Serumkonzentrationen der Neurotransmitter „Nerve Growth Factor“, „Substanz P“ und „Calcitonin Gene-Related Peptide“ bei chronischem Spannungskopfschmerz

INAUGURALDISSERTATION
ZUR ERLANGUNG EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DES FACHBEREICHS MEDIZIN
DER JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN

Vorgelegt von Lisa Bölter, geb. Windecker
aus Mainz

Gießen 2010

Aus dem Medizinischen Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
-Neurologische Klinik-

Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter:
Prof. Dr. med. F. Blaes

Gutachter:
Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Tag der Disputation: 04.03.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Klassifikation des Kopfschmerzes — geschichtliche und neue Aspekte 1

1.2 Spannungskopfschmerz — klinische Beschreibung 3

1.2.1 Epidemiologie 4

1.2.2 Diagnostik 6

1.2.3 Differentialdiagnose 7

1.2.4 Therapie 7

1.3 Pathophysiologie des Spannungskopfschmerzes 10

1.3.1 Periphere Faktoren 10

1.3.2 Zentrale Faktoren 11

1.3.3 Neurotransmitter 12

1.3.3.1 Die neurogene Entzündung 12

1.3.3.2 Serotonin, Stickstoffmonoxid, Neuropeptide Y und Vasoactive Intestinal Peptide 14

1.3.3.3 Nerve Growth Factor 15

1.3.3.4 Substanz P 17

1.3.3.5 Calcitonin gene-related Peptide 19

1.4 Fragestellung 21

2. Material und Methoden 22

2.1 Studienteilnehmer 22

2.1.1 Patientenkollektiv 22

2.1.2 Normalkollektiv 22

2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 23

2.3 Nerve Growth Factor (NGF) –ELISA 25

2.4 Substanz P-ELISA 29

2.5 CGRP 32

2.6 Statistische Auswertung 34

3. Ergebnisse 35

3.1 NGF 35

3.2 SP 37

3.3 CGRP 38
3.4 Vergleich der Neurotransmitter untereinander 39
4. Diskussion 41
4.1 Diskussion der Methodik 41
4.1.1 Auswahl der Studienteilnehmer 41
4.1.2. *Nerve Growth Factor* (NGF) 42
4.1.3 Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP) 42
4.2 Diskussion der Ergebnisse 43
4.2.1 *Nerve growth factor* (NGF) 43
4.2.2 Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP) 44
4.2.3 Vergleich der Neurotransmitter untereinander 46
4.3 Ausblick 47
5. Zusammenfassung 48
6. Summary 49
7. Literaturverzeichnis 50
8. Anhang 64
9. Danksagung 69
10. Lebenslauf 70

1 Einleitung

1.1 Klassifikation des Kopfschmerzes — geschichtliche und aktuelle Aspekte

Die erste Klassifikation von Kopfschmerzsyndromen wurde 1962 von dem *Ad-Hoc Committee of the National Institute of Health* veröffentlicht. Diese war jedoch von subjektiven Eindrücken der Untersucher abhängig (Übersicht in Göbel 2001). Außerdem wurden Spannungskopfschmerzen dabei nur wenig beachtet. Sie galten lange Zeit als ein psychiatrisches Problem. Dies geht auch aus den alten Termini „Psychogener Kopfschmerz", „Psychomyogener Kopfschmerz", „Stress-kopfschmerz" oder „Muskelkontraktionskopfschmerz" hervor (Übersicht in Jensen 2001).

1988 veröffentlichte die *International Headache Society* (IHS) die erste Einteilung von Kopfschmerzen. Diese teilte die Beschwerden der Patienten nach objektiven Kriterien in 13 Hauptgruppen ein. Den Hauptgruppen wurden mehr als 160 Diagnosen zugeteilt (IHS 1988). In dieser IHS-Klassifikation wurden Kopfschmerzen erstmals in primäre (essentielle, idiopathische) und sekundäre (symptomatische) Kopfschmerzsyndrome eingeteilt. Die primären Formen bildeten die ersten vier Hauptgruppen: Migräne, Spannungskopfschmerz, Cluster Kopfschmerz und chronische paroxysmale Hemikranie. Alle anderen Gruppen wurden den sekundären Kopfschmerzen zugeordnet.

Einige Jahre später wurde von mehreren Autoren die Kritik geäußert, die Klassifikation der IHS berücksichtige „chronisch tägliche Kopfschmerzen" (*chronic daily headache*, CDH) nicht ausreichend. Außerdem haben viele Patienten mehrere Formen von Kopfschmerzen, sie konnten jedoch in der Einteilung von 1988 nicht mehreren Gruppen gleichzeitig zugeordnet werden. Daher wurde die erste IHS-Klassifikation der Kopfschmerzen entsprechend modifiziert und zusätzlich wurden die „Silberstein-Lipton-Kriterien" verwendet (Solomon *et al.* 1992; Sanin *et al.* 1994; Silberstein *et al.* 1994 und 1996; Bigal *et al.* 2004). Diese Einteilung differenziert „chronisch tägliche Kopfschmerzen mit langer Dauer" (mehr als vier Stunden am Tag an mindestens 15 Tagen im Monat über mindestens ein halbes Jahr) von episodischen Kopfschmerzen. Beide Formen gehören zu den primären

Kopfschmerzen. Folgende Diagnosen wurden „Chronisch täglichen Kopfschmerzen mit langer Dauer“ zugeordnet: Chronischer Spannungskopfschmerz (*chronic tension-type headache*, CTTH), neuer täglich persistierender Kopfschmerz (*newly daily persistent headache*, NDPH), *Hemicrania continua* (HC) und Transformierte Migräne (*transformed migraine*, TM). Der Begriff TM wurde von Mathew *et al.* 1982 eingeführt und bedeutet chronifizierte Migräne. Bei „chronisch täglichen Kopfschmerzen“ wird auch zwischen medikamenteninduzierten und nicht medikamenteninduzierten Kopfschmerzen unterschieden.

Die neue Klassifikation von Kopfschmerzsyndromen wurde 2004 veröffentlicht und schließt Kriterien für „chronisch tägliche Kopfschmerzen mit langer Dauer“ ein (IHS 2004). Aktuell werden Kopfschmerzen in 14 Hauptgruppen (s. Tab. 1) mit mehr als 170 Kopfschmerzformen unterteilt. Neuralgien werden in der neuen Einteilung nicht mehr sofort als symptomatisch eingestuft, denn es sind auch primäre, zentrale Neuralgien bekannt. „Kopfschmerzen zurückzuführen auf psychiatrische Störungen“ wurden als zusätzliche Gruppe aufgenommen. Die einzelnen Hauptgruppen werden weiter unterteilt. Beim Kopfschmerz vom Spannungstyp wird eine sporadisch auftretende, episodische von einer häufigen, episodischen und der chronischen Verlaufsform unterschieden. Unterscheidungskriterium ist die Anzahl der Tage mit Spannungskopfschmerz im Jahr. Weiter wird unterschieden zwischen Kopfschmerzen mit und ohne Schmerzempfindlichkeit der perikranialen Muskulatur (Evers 2004).

Tabelle 1: Einteilung in Hauptgruppen nach der IHS-Klassifikation von 2004 (Evers 2004)

Primäre Kopfschmerzerkrankungen	1.	Migräne
	2.	Kopfschmerz vom Spannungstyp
	3.	Clusterkopfschmerz und andere trigeminoauto-nome Kopfschmerzerkrankungen
	4.	Andere primäre Kopfschmerzen
Sekundäre Kopfschmerzerkrankungen (Kopfschmerz zurückzuführen auf…)	5.	Ein Kopf- und/oder HWS-Trauma
	6.	Gefäßstörungen im Bereich des Kopfes oder des Halses
	7.	Nichtvaskuläre intrakranielle Störungen
	8.	Eine Substanz oder deren Entzug
	9.	Eine Infektion
	10.	Eine Störung der Homöostase
	11.	Erkrankungen des Schädels sowie von Hals, Augen, Ohren, Nase, Nebenhöhlen, Zähnen, Mund oder anderen Gesichts- oder Schädelstrukturen
	12.	Psychiatrische Störungen
Neuralgien und Sonstige	13.	Kraniale Neuralgien und zentrale Ursachen von Gesichtsschmerzen
	14.	Andere Kopfschmerzen, kraniale Neuralgien, zentrale oder primäre Gesichtsschmerzen

1.2 Spannungskopfschmerz — klinische Beschreibung

Wie oben bereits erwähnt, gehört der Spannungskopfschmerz zu den primären Formen. Dabei wird eine episodische von einer chronischen Form unterschieden. Der episodische Spannungskopfschmerz tritt nur gelegentlich für ein bis zwei Tage auf. Patienten, die unter der chronischen Form leiden, haben durchschnittlich an mehr als 15 Tagen im Monat oder mehr als 180 Tagen im Jahr Kopfschmerzen. Das Leiden kann primär chronisch sein oder sich aus dem episodischen Spannungskopfschmerz sekundär entwickeln (IHS 1988).

Beim Spannungskopfschmerz steigt die Schmerzintensität mit der Kopfschmerzfrequenz. Im Extremfall kommt es zu täglichen, starken Kopfschmerzen. Dies führt bei den betroffenen Patienten zu erheblichen Einschränkungen im sozialen, persönlichen und beruflichen Bereich (Rasmussen *et al.* 1992).

Spannungskopfschmerzen werden von den betroffenen Patienten meist als diffus, dumpf-drückend, einengend und bandförmig beschrieben. Sie treten vorwiegend

bilateral frontal und/oder okzipital auf, können aber auch parietal oder holozephal vorkommen (Übersicht in Jensen 1999; Millea und Brodie 2002). Oft strahlen die Schmerzen auch in die Nacken- und Rückenmuskulatur aus. Diese Muskeln weisen bei vielen Betroffenen der chronischen und der episodischen Form im Vergleich zu Gesunden schmerzhafte Verspannungen und Verhärtungen auf. Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz sind davon meist mehr betroffen, als solche, die an der episodischen Form leiden (Übersicht in Jensen 1999). Während der Kopfschmerzepisoden steigert sich der bei Patienten ohnehin erhöhte Tonus dieser Muskelgruppen oft noch zusätzlich.

Die Intensität der Schmerzen wird meist als mittelschwer beschrieben. Die Patienten können ihrer gewohnten Tätigkeit weiter nachgehen. Nur gelegentlich kommt es bei körperlicher Belastung zu einer leichten Zunahme der Schmerzen (Übersicht in Bertolotti 2003). Die einzelnen Schmerzepisoden dauern zwischen 30 Minuten und 7 Tagen.

1.2.1 Epidemiologie

Der Spannungskopfschmerz gilt als eine der am häufigsten auftretenden Form von Kopfschmerz. Im Folgenden wird nur auf Spannungskopfschmerz allgemein und chronischen Spannungskopfschmerz eingegangen. Zum Vergleich mit der episodischen Form s. Tab. 2.

Die Prävalenz (Krankheitsfälle einer Population zum Zeitpunkt der Untersuchung) wird mit 12%-38% angegeben (Hagen *et al.* 2000; Deleu *et al.* 2001; Kaynak *et al.* 2004). Die Jahresprävalenz (Krankheitsfälle einer Population in einem Jahr) liegt bei 18% -27% (Lavados und Tenhamm 1998; Zwart *et al.* 2004). Die Lebenszeitprävalenz (Häufigkeit für das Auftreten einer Erkrankung im gesamten Leben) des Spannungskopfschmerzes beträgt 78%-98% (Rasmussen *et al*. 1991; Deleu *et al.* 2001). Beim chronischen Spannungskopfschmerz liegen die Prävalenz und die Jahresprävalenz bei 1%-3% (Göbel *et al.* 1994; Lavados und Tenhamm 1998; Schwartz *et al.* 1998; Rasmussen *et al*. 1991; Kaynak *et al.* 2004).

Die meisten Studien konnten zeigen, dass Frauen häufiger betroffen sind als Männer. Das Verhältnis m/w liegt bei 1:1.23-1.9 (Ulrich *et al.* 1996; Lavados und Tenhamm

1998; Rasmussen 1999). Beim chronischen Spannungskopfschmerz liegt das Verhältnis zwischen Männern und Frauen bei 1:1.6-3.5 (Rasmussen 1991; Lavados und Tenhamm 1998).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 25 Jahre - 30 Jahre (Rasmussen 2001), wobei die Prävalenz mit zunehmendem Alter abnimmt (Rasmussen 1991; Hagen *et al.* 2000).

Viele Patienten konsultieren nie wegen ihrer Kopfschmerzen ihren Hausarzt. Zum Einen ist der Spannungskopfschmerz meist mild und selbstlimitierend, zum Anderen rechnen die Patienten oft nicht damit, dass ihnen geholfen werden könnte. Sie greifen in erster Linie zu rezeptfreien Medikamenten. Dies erhöht allerdings die Gefahr des medikamenteninduzierten Kopfschmerzes (Rasmussen *et al.* 1992).

Tabelle 2: Epidemiologie (Zahlenangaben in Bezug auf die Normalbevölkerung)

Prävalenz des Spannungskopfschmerzes	12%-38%	(Göbel *et al.* 1994; Deleu *et al.* 2001; Kaynak *et al.* 2004)
Jahresprävalenz des Spannungskopfschmerzes	18%-27%	(Lavados und Tenhamm 1998; Zwart *et al.* 2004)
Prävalenz des chronischen Spannungskopfschmerzes	2%-3%	(Schwartz *et al.* 1998; Rasmussen 2001; Kaynak *et al.* 2004)
Jahresprävalenz des chronischen Spannungskopfschmerzes	1%-3%	(Rasmussen *et al.* 1991; Göbel *et al.* 1994; Lavados und Tenhamm 1998; Schwartz *et al.* 1998; Kaynak *et al.* 2004)
Prävalenz des episodischen Spannungskopfschmerzes	18%-37%	(Lavados und Tenhamm 1998; Rasmussen 2001; Kaynak *et al.* 2004)
Jahresprävalenz des episodischen Spannungskopfschmerzes	38%	(Schwartz *et al.* 1998)
Lebenszeitprävalenz des Spannungskopfschmerzes	78%-98%	(Rasmussen 1991; Deleu *et al.* 2001)
Verhältnis M/W beim Spannungskopfschmerz	1:1.23-1.9	(Ulrich *et al.* 1996; Lavados und Tenhamm 1998; Rasmussen 1999), 1.25:1 (Deleu *et al.* 2001)
Verhältnis bei der chronischen Form M/W	1:1.6-3.5	(Rasmussen 1991; Lavados und Tenhamm 1998)
Verhältnis bei der episodischen Form M/W	1:1.16-1.8	(Lavados und Tenhamm 1998; Schwartz *et al.* 1998)
Häufigstes Erkrankungsalter	20-30 Jahre	(Rasmussen 2001)

1.2.2 Diagnostik

Nach den Kriterien der *International Headache Society* (IHS) von 1988 gelten für Spannungskopfschmerz, chronischen Spannungskopfschmerz und chronischen Kopfschmerz folgende diagnostische Kriterien (IHS 1988):

Der Patient hat mindestens 10 vorherige Kopfschmerzepisoden erlitten, die allerdings weniger als 180 mal im Jahr oder weniger als 15 mal pro Monat auftraten,

30 Minuten bis höchstens 7 Tage dauerten und mindestens 2 der folgenden Schmerzcharakteristika aufwiesen:

1. Drückend, beengend, nicht pulsierend
2. Milde bis moderate Intensität
3. Bilaterales Auftreten
4. Keine Steigerung der Schmerzintensität durch körperliche Anstrengung, wie zum Beispiel Treppen steigen

Außerdem darf es während dieser Episoden weder zu Übelkeit oder Erbrechen, noch zu einer Photo- oder Phonophobie oder höchstens zu einer der beiden letzteren kommen.

Bei chronischen Spannungskopfschmerzen treten die Beschwerden an mindestens 15 Tagen pro Monat über mindestens ein halbes Jahr auf. „Chronischer täglicher Kopfschmerz“ besteht an wenigstens 6 Tagen pro Woche, ansonsten erfüllt er die gleichen Kriterien, wie die chronische Form.

1.2.3 Differentialdiagnose

Zu Differentialdiagnosen des Spannungskopfschmerzes gehören vor allem Kopfschmerzen, hervorgerufen durch arterielle Hypertonie, Hyperthyreose, Sinusitis frontalis, zerebrale Raumforderungen, Arteriitis temporalis, Meningitis, ischämischer Insult, Karotisdissektion, posttraumatischer Kopfschmerz und medikamenten-induzierter Kopfschmerz (Übersicht in Millea und Brodie 2002).

1.2.4 Therapie

Wichtig ist vor allem, andere primäre oder sekundäre Kopfschmerzarten durch eine gründliche Diagnostik auszuschließen. Eine Heilung der Disposition zum chronischen Spannungskopfschmerz ist nicht möglich. Mögliche Trigger, wie Zahnprobleme, Sinusitiden, psychische Probleme und allgemeine Stressoren (unregelmäßige Mahlzeiten, zu wenig Schlaf, Nikotin-, Alkoholkonsum etc.) sollten ausgeschaltet werden (Übersicht in Jensen und Olesen 2000; Millea und Brodie 2002).

Bei den therapeutischen und prophylaktischen Ansätzen steht die medikamentöse Therapie an erster Stelle (Millea und Brodie 2002). Kontrollierte Studien zur Therapie des Spannungskopfschmerzes gibt es über einige Nichtsteroidale Antirheumatika, wie Acetylsalicylsäure (ASS), Ibuprofen und Naproxen und über trizyklische Antidepressiva, wie Amitriptylin. Nach jahrelanger, regelmäßiger Einnahme von Analgetika besteht allerdings die Gefahr eines sogenannten medikamenteninduzierten Dauerkopfschmerz.

Bei der chronischen Form besteht die Indikation zur medikamentösen Prophylaxe, wenn die Kopfschmerzen jeden zweiten Tag oder täglich über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten auftreten. Zur Prophylaxe werden vor allem trizyklische Antidepressiva verordnet. Ob die Prophylaxe Erfolg hat, kann erst nach frühestens zwei Monaten festgestellt werden. Bei dem nichtselektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Amitriptylin sind meist schon Dosierungen wirksam, die weit unter der thymoleptischen Schwelle liegen. Es konnte eine herabgesetzte Frequenz und Dauer der Kopfschmerzen nach Einnahme von Amitriptylin festgestellt werden (Diamond und Baltes 1971; Bendtsen *et al.* 1996b; Cerbo *et al.* 1998; Bendsten und Jensen 2000b). Die Intensität der Schmerzen verringerte sich selten, wenn dann geringfügig (Bendsten und Jensen 2000b). Cerbo *et al.* (1998) konnten beim episodischen Spannungskopfschmerz durch Amitriptylin keine signifikanten Veränderungen der Schmerzattacken feststellen. Patienten, die nach einer längeren Einnahme von Amitriptylin eine herabgesetzte Kopfschmerzintensität hatten, litten gleichzeitig unter weniger perikranialen myofaszialen Verhärtungen. Bei Patienten mit unveränderter Schmerzintensität hingegen wurden auch keine Veränderungen in der Muskelhärte festgestellt (Bendsten und Jensen 2000b). Amitriptylin potenziert die Wirkung endogener Opioide (Botney und Fields 1983; Valverde *et al.* 1994). Der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Citalopram hat keinen prophylaktischen Effekt bei chronischen Spannungskopfschmerzen (Bendtsen *et al.* 1996b; Bendsten und Jensen 2000b).

Ein weiterer Ansatz besteht in der Behandlung mit dem Toxin des Bakteriums *Clostridium botulinum* (Wheeler 1998; Schulte-Mattler *et al.* 1999). Den Patienten wird Botulinumtoxin in kleinen Dosen in bestimmte Triggerpunkte der perikranialen Muskulatur injiziert (Schulte-Mattler *et al.* 1999). Dadurch kommt es zu einer

Blockade der Acetylcholinfreisetzung in den synaptischen Spalt, das heißt zu einer Behinderung der Signalübertragung von Nerven auf Muskeln (Wheeler 1998; Relja und Telarović 2004). Dadurch wird eine temporäre Schwäche der Muskulatur ausgelöst. Bei gezielter Anwendung können die schmerzhaften Verspannungen bei Patienten beseitigt werden. Außerdem wird davon ausgegangen, dass die Behandlung die zentralen Veränderungen, zu denen es wahrscheinlich durch chronische Schmerzbelastung kommt, unterdrückt. Mehrere offene Studien zeigten, dass Botulinumtoxin sowohl die Kopfschmerzfrequenz als auch die -intensität verringert (Relja 1997; Wheeler 1998; Schulte-Mattler *et al.* 1999; Relja und Telarović 2004). Unter mehreren doppelblind-placebokontrollierten Studien konnten bisher nur in einer Studie signifikante Unterschiede zwischen Botulinumtoxin und Placebo festgestellt werden (Relja und Korsic 1999; Göbel *et al.* 1999; Rollnik *et al.* 2000; Schmitt *et al.* 2001; Padberg *et al.* 2004; Relja und Telarović 2004). Dabei wurden verschiedene Kriterien beachtet, wie Schmerzintensität, Anzahl schmerzfreier Tage bzw. Häufigkeit der Schmerzen, Kopfschmerzdauer und Einnahme von Analgetika. Relja und Telarović (2004) fanden eine reduzierte Muskelverspannung und eine geringere Schmerzintensität im Vergleich zu Placebo. Alle anderen genannten Autoren zeigten bei keinem Kriterium Unterschiede auf.

Bei einer konsequenten physiotherapeutischen Behandlung nimmt die Kopfschmerzfrequenz, nicht jedoch die Schmerzintensität und -dauer ab. Auch die Menge der eingenommenen Medikamente ändert sich nicht. Beim Vergleich zwischen episodischem und chronischem Kopfschmerz wurde ein besseres Ergebnis bei chronischem Spannungskopfschmerz registriert. Außerdem empfanden mehr Frauen im Vergleich zu Männern einen positiven Effekt durch Physiotherapie (Torelli *et al*. 2004).

Auch physikalische Therapie wird angewandt. Dabei kommen vor allem heiße und kalte Anwendungen, Ultraschall und elektrische Stimulation zum Einsatz (Jensen und Olesen 1995; Hammill *et al.* 1996). Die Verhaltenstherapie spielt bei chronischen Spannungskopfschmerzen ebenfalls eine Rolle. Es werden in erster Linie das muskuläre Relaxationsverfahren nach Jakobson und Muskel-Biofeedback angewandt (Millea und Brodie 2002).

Die meisten Patienten benötigen eine Kombination der verschiedenen medikamentösen und physikalischen Behandlungsansätze (Übersicht in Vernon 1999).

1.3 Pathophysiologie des Spannungskopfschmerzes

1.3.1 Periphere Faktoren

Die oben erwähnten Schmerzqualitäten des Spannungskopfschmerzes sind der Irritation der Tiefensensibilität zuzuordnen. Sie sind mit viszeralen, insbesondere myofaszialen Schmerzen zu vergleichen.

Patienten haben eine gesteigerte Muskelspannung und eine herabgesetzte Druckschmerztoleranz am Kopf im Vergleich zu Gesunden. Außerdem haben sie während Kopfschmerzepisoden verringerte Schmerzschwellen bei Wärmeeinwirkung im Vergleich zum schmerzfreien Intervall. Dies spricht für eine Hyperalgesie bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz (Langemark und Olesen 1987; Bendtsen *et al*. 1996a; Jensen 1996a; Mørk *et al*. 2003). Druckschmerztoleranzen können manuell durch Palpation an definierten Druckpunkten der Kopf-Halsregion und an Fingern untersucht werden. Der Untersucher beurteilt die Druckintensität bei einer Schmerzäußerung der Patienten nach eigenem Empfinden und drückt sie in Ziffern von null bis drei aus. Anschließend wird daraus durch Addition der sogenannte *Total Tenderness Score* (TTS) ermittelt. Durch ein standardisiertes Gerät, das sogenannte *Palpometer* oder *Hardness Meter*, wird während der manuellen Untersuchungen der Druck gemessen, bei dem von Seiten der Patienten Schmerzen geäußert werden (Jensen *et al*. 1986; Langemark und Olesen 1987).

Die elektromyographische Ruheaktivität in verschiedenen perikranialen Muskeln ist bei Patienten mit chronischen Spannungskopfschmerzen signifikant erhöht, sowohl während Kopfschmerzepisoden als auch an schmerzfreien Tagen. Zusätzlich kommt es zu einer Zunahme der Muskelverhärtung während akuter Kopfschmerzen (Jensen und Rasmussen 1996b; Jensen *et al.* 1998; Ashina *et al*. 1999c).

Nach der willkürlichen Anspannung der Kiefermuskulatur hatten mehr Patienten Kopfschmerzen, als Gesunde. Allerdings war die Kopfschmerzhäufigkeit bei

Patienten auch bei einer „Placebomethode“ (lockeres Halten eines Zahnstochers zwischen den Lippen) im Vergleich zu den Kontrollen erhöht und zwischen Zähnezusammenbeißen und Placebo wurden bei beiden Gruppen jeweils keine Unterschiede festgestellt (Neufeld *et al.* 2000).

In einer weiteren Placebo-kontrollierten Studie bekamen Patienten mit episodischem Spannungskopfschmerz und gesunde Kontrollen eine Mischung aus Bradykinin, Serotonin, Histamin und Prostaglandin E_2 in den *Musculus Trapecius* injiziert. Die Verspannungen bei Patienten waren ausgeprägter, als bei gesunden Personen (Mørk *et al.* 2003). Keine dieser Studien konnte bisher aufzeigen, ob die gesteigerte Muskelspannung dieser Patienten primär auftritt oder ein sekundäres Problem darstellt.

Ashina *et al.* (2002) konnten zeigen, dass die Blutflussgeschwindigkeit bei Patienten in Regionen mit starker Verspannung bei statischer Muskelaktivität und danach im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant herabgesetzt ist. Im Gegensatz dazu gibt es im Zustand ohne Muskelaktivität bei Patienten und Gesunden keine Flussunterschiede. Bei den Laktatkonzentrationen gibt es keine Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden.

1.3.2 Zentrale Faktoren

Ein großer Teil der Patienten mit episodischem Spannungskopfschmerz weisen wie auch chronisch belastete Patienten eine gesteigerte schmerzhafte Spannung im myofaszialen Gewebe auf. Sie haben jedoch im Gegensatz zu diesen keine gesteigerte Schmerzsensitivität (Jensen *et al.* 1998). Es konnte bei Patienten mit chronischen Kopfschmerzen vom Spannungstyp eine generelle Hypersensitivität in Bezug auf Schmerzstimulationen bewiesen werden (Bendtsen *et al.* 1996a). Dies spricht für die Vermutung, dass es bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz bei sensorischen Signalen zu einer zentralen Fehlinterpretation kommt. Diese zentrale Sensibilisierung auf der Ebene von Hinterhorn und *Nucleus nervi trigemini* scheint eines der Hauptprobleme zu sein (Jensen 1999). Das trigeminale System ist nur bei Patienten mit chronischem

Spannungskopfschmerz in die Zusammenhänge zwischen peripheren und zentralen Faktoren involviert (Nardone und Tezzon 2003).

Langemark *et al.* (1993) zeigten, dass bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz der nozizeptive Beugereflex, ein spinaler Reflex, im Vergleich zu Gesunden schwächer ist. Daraufhin wurde von einigen Wissenschaftlern ein Defekt im Opioidsystem oder in der Produktion von Neurotransmittern bei den betroffenen Patienten angenommen (Langemark *et al.* 1995; Jensen 1999). Dies wird jedoch kontrovers diskutiert. Langemark *et al.* (1995) konnten diese Theorie erstmals bestätigen. Sie fanden bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz erhöhte Konzentrationen von Metenkephalin im Liquor cerebrospinalis.

1.3.3 Neurotransmitter

Neurotransmitter sind Überträgerstoffe, die Informationen sowohl innerhalb des zentralen und peripheren Nervensystems als auch von Nervenendigungen auf Gewebe weiterleiten. Die wichtigsten Neurotransmitter in Zusammenhang mit Kopfschmerzen sind Serotonin, Stickstoffmonoxid (NO), Neuropeptid Y (NPY), Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Nerve Growth Factor (NGF), Substanz P (SP) und Calcitonin gene-related Peptide (CGRP). Auf diese wird in den Abschnitten 1.3.3.2 bis 1.3.3.7 näher eingegangen.

Neurokinin A und die Aminosäure Glutamat sind bei der Entwicklung der zentralen Sensibilisierung beteiligt (Übersicht in Bendsten 2000a).

1.3.3.1 Die neurogene Entzündung

Neurotransmitter sind bei der Entwicklung und Unterhaltung neurogener Entzündungen beteiligt (Übersicht in Willis 1999). Sie werden nach Einwirkung physikalischer (thermischer, mechanischer, elektrischer) oder chemischer Reize freigesetzt (Benrath *et al.* 1995). Die Synthese dieser Neurotransmitter erfolgt in Spinalganglien afferenter Fasern. Über axonalen Transport gelangen sie zu den Synapsen am Hinterhorn und in periphere Nervenendigungen. Substanz P (s. 1.3.3.6)

und CGRP (s. 1.3.3.7) gelten als die Hauptmediatoren in diesem Zusammenhang (Herbert und Holzer 2002a).

Primär afferente Neurone übertragen ihre Informationen direkt über Aktionspotentiale auf das nächste Neuron im Hinterhorn des Rückenmarks. Vom Hinterhorn werden sie dann zum Hirnstamm geleitet. Es gibt im peripheren Nervensystem zwei Arten von afferenten Fasern: dünnmyelinisierte A-delta- oder Gruppe III-Fasern und unmyelinisierte C- oder Gruppe IV-Fasern (Übersicht in Herbert und Holzer 2002a). Letztere leiten die Informationen langsamer und zum Teil nicht nur orthodrom zum Rückenmark. Sie können innerhalb des betreffenden Innervationsareals eine Entzündungsreaktion hervorrufen, die neurogene Entzündung genannt wird. Diese neurogene Entzündung kann in unterschiedlichen Geweben und Organen auftreten und wird meist als Überbegriff für die sogenannte *triple response* in Verbindung mit Dolor (Entzündungsschmerz) verwendet (Begriffe eingeführt von Lewis 1927 und 1936; Übersicht in Herbert und Holzer 2002a).

Diese *triple response* besteht aus den Kardinalsymptomen Rubor (Erythem durch Dilatation der Arteriolen), Tumor (Ödem durch Extravasation von Proteinen an den postkapillären Venolen) und der sogenannten *flare response*, auch Axonreflex genannt. Durch antidrome Reizleitung an Nervenabzweigungen werden die Informationen auch in das Gebiet um die Reizstelle herum, jedoch noch innerhalb des Innervationsgebietes des gereizten Nerven weitergegeben. Dadurch kommt es zu einer flächenhaften, retikulären Ausbreitung der Rötung, die *flare response* genannt wird. Hervorgerufen wird die *triple response* im Gebiet der Reizstelle durch Neurotransmitter, die zu einer Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel Histamin, Serotonin, Leukotrienen, Prostaglandinen führen (Übersicht in Herbert und Holzer 2002a). Die Vasodilatation wird vor allem von CGRP hervorgerufen. Auch SP und durch SP freigesetztes Histamin spielen dabei eine Rolle. Die Proteinextravasation wird durch SP, Neurokinin A und später durch Mediatoren hervorgerufen und durch CGRP und VIP potenziert (Übersicht in Willis 1999). Es kommt zu einer flächenhaften Hyperämie im Innervationsgebiet der gereizten Nervenfaser und dadurch zu Überwärmung, einem weiteren Kardinalsymptom einer Entzündung.

SP und CGRP verbessern die Durchblutung des geschädigten Gewebes und tragen dadurch zur Reparatur der Gewebeintegrität bei. Außerdem beeinflussen diese Peptide als Wachstumsfaktoren die Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen positiv (Übersicht in Herbert und Holzer 2002b). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass freigesetzte Immunmodulatoren, wie Interleukine und Tumornekrosefaktoren mit Neuropeptiden interagieren (Hartung und Toyka 1983; Hartung *et al.* 1986; Stanisz *et al.* 1986; Ferreira *et al.* 1988; Cunha *et al.* 1992). Eine neurogene Entzündung geht nicht immer mit dem Auftreten von Schmerzen einher. Von Herbert und Holzer (2002a) wurde die Vermutung geäußert, dass Immunmodulatoren die Entzündungssymptome verstärken und dadurch Schmerzen verursachen könnten.

All diese Tatsachen sind Ausdruck einer neuronalen Plastizität. Es ist gezeigt worden, dass durch diese Plastizität Veränderungen bei der Synthese von Neurotransmittern, Rezeptoren und Ionenkanälen hervorgerufen werden. Dadurch kommt es zu einer Steigerung der Aktivität von Schmerzbahnen oder zu einer Verringerung der Aktivität schmerzinhibitorischer Systeme (Übersicht in Fusco *et al.* 2003). Diese pathophysiologischen Vorgänge könnten auch bei der Entwicklung von episodischen zu chronischen Kopfschmerzen eine entscheidende Rolle spielen (Bussone 2003).

Die Schmerzmechanismen des Spannungskopfschmerzes haben eine ausgeprägte Eigendynamik. Es gibt nicht nur starke interindividuelle Unterschiede in Frequenz und Intensität der Schmerzen, sondern auch in Bezug auf die lange Leidenszeit kommt es intraindividuell immer wieder zu Veränderungen der Kopfschmerzen (Übersicht in Jensen 2001).

1.3.3.2 Serotonin, Stickstoffmonoxid (NO), Neuropeptid Y (NPY) und Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP)

Da diese Transmitter in Studien zu Spannungskopfschmerzen meist zusammen untersucht wurden, werden sie hier zusammengefasst. Das Serotonin-System ist bei der Schmerzentstehung und -regulation im zentralen Nervensystem beteiligt (Übersicht in Bendtsen *et al.* 1997 und 2000). Serotonin, auch 5-Hydroxytryptamin (5-HT) gehört zu den Entzündungsmediatoren, es verursacht eine Vasodilatation und

erhöhte Gefäßpermeabilität. Gebildet wird das Serotonin in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes (Fozard 1982). Studien über Serotonin und (Kopf-) schmerz kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen (D'Andrea *et al.* 1993, Nakano *et al.* 1993, Marukawa *et al.* 1996, Bendtsen *et al.* 1997, Sarchielli *et al.* 1999, Srikiatkhachorn 1999).

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiger Transmitter in Schmerzbahnen des Rückenmarks und beeinflusst die Entwicklung der zentralen Sensibilisierung auf Rückenmarksebene (Ashina 2004). NO spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie primärer Kopfschmerzen. Ein NO-Synthase-Inhibitor reduziert die Kopfschmerzintensität und schmerzhafte Muskelspannungen (Ashina *et al.* 1999d; Ashina *et al.* 1999b). Der NO-Donator Glyceroltrinitrat verursacht bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz häufiger und stärkere Kopfschmerzen, als auch bei Gesunden (Ashina *et al.* 2000a).

Neuropeptid Y (NPY) gehört zum sympathischen Nervensystem, ist eine Variante des Neurokinin A (NKA, s. unten) und bewirkt eine Vasokonstriktion (Edvinsson und Goadsby 1995; Vigna 2003). VIP ist ein parasympathischer Neurotransmitter, der vasodilatierend wirkt. Nervenfasern, die diese Neurotransmitter enthalten, sind in kleinen Blutgefäßen der kranialen Muskulatur und in zerebralen und meningealen Arterien zu finden (Edvinsson *et al.* 1987; Jansen *et al.* 1992; Edvinsson *et al.* 1994). Akute und chronische Nozizeption bedingt die Freisetzung von NPY und VIP aus peripheren sensorischen Nervenendigungen und spinalen sensorischen afferenten Bahnen, jedoch konnten zwischen Patienten und Kontrollen bisher keine Unterschiede festgestellt werden (Ashina *et al.* 1999a, Ashina 2004).

1.3.3.3 *Nerve Growth Factor* (NGF)

NGF ist ein neurotrophisches Protein in sympathischen und sensorischen Neuronen. Neben NGF gehören der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-5 (NT-5) zur Familie der humanen Neurotrophine. Letzteres wird in der Literatur auch als NT-4/5 bezeichnet, da NT-4 aus Kröten (*Xenopus*) wahrscheinlich das homologe Neurotrophin zum NT-5 höherer Wirbeltiere ist. (Übersicht in Ebendal 1992 und Bradshaw *et al.* 1994). NGF besteht aus 6 Untereinheiten, die drei Polypetidketten α, β und γ sind jeweils doppelt

vorhanden (Varon *et al.* 1967). Alle bekannten Funktionen des NGF gehen von der β-Polypeptidkette aus, die aus 120 Aminosäuren besteht (Abb. 1) und ein Molekulargewicht von ca. 26.5 kDa hat (Greene *et al.* 1971; Angeletti und Bradshaw 1971). Das für β-NGF kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 1.

Das Protein bindet mit hoher Affinität an den spezifischen Tyrosinkinaserezeptor Trk A ($p140^{trkA}$) (Kaplan *et al.* 1991; Klein *et al.* 1991). Ein anderer NGF-bindender Rezeptor mit niedriger Affinität ist der p75-Rezeptor ($p75^{NGFR}$) (Radeke 1987). An diesen Rezeptor können alle neurotrophischen Proteine binden (Übersicht in Chao 1994). Er aktiviert den Transkriptionsfaktor *Nuclear factor κB* (NF-κB), nachdem NGF gebunden hat und vermittelt die Apoptose neuronaler Zellen, wenn kein NGF vorhanden ist (Barrett und Bartlett 1994; Carter *et al.* 1996).

NGF wird normalerweise in Organen wie Haut, Blutgefäße und Harnblase gebildet und freigesetzt und bindet dann an sensorische und sympathische Nervenfasern. Von dort aus gelangt das Protein retrograd in sensorische Neurone der Hinterwurzel des Rückenmarks (Übersicht in Thoenen und Barde 1980). Im Rückenmark werden durch seinen Einfluss die Konzentrationen von Neuropeptiden, unter anderem auch CGRP (s. 1.3.3.7), und die Anzahl bestimmter Rezeptoren erhöht (Lindsay and Harmar 1989).

Der Neurotransmitter ist bei der Entwicklung und Erhaltung sensorischer Innervationen beteiligt und wird durch die neuronale Plastizität (s. oben) beeinflusst (Übersicht in Kullander *et al.* 1997). Während der Embryonalentwicklung ist NGF für das Überleben des ungeborenen Kindes notwendig, indem es an der Entwicklung und Differenzierung sympathischer und sensorischer peripherer Nerven und des ZNS beteiligt ist (Übersicht in Thoenen *et al.* 1987, Lewin und Mendell 1993). Es spielt anfangs sowohl eine entscheidende Rolle bei der Apoptose (Smeyne *et al.* 1994) sowie später bei der Reparatur verletzter peripherer Nerven (Csillik 1985).

Bei Erwachsenen ist die Konzentration von NGF in entzündeten Geweben erhöht (Woolf *et al.* 1994). Der Transmitter ist entscheidend bei der Entwicklung des Entzündungsschmerzes beteiligt, indem er schnell eine Hyperalgesie verursacht (Donnerer *et al.* 1992; Reinert *et al.* 1998). Die Hyperalgesie wird direkt über Sensibilisierung von Nozizeptoren durch NGF, indirekt über gesteigerte Freisetzung von SP und CGRP und somit über zentrale Sensibilisierung und Auslösen einer

neurogenen Entzündung verursacht (Übersicht in Lewin und Mendell 1993). Auch lokal wirksame Faktoren, wie Histamin aus Mastzellen spielen dabei eine Rolle (Übersicht in Anand 1995). Systemisch appliziertes NGF (i.v. und s.c.) in pharmakologischen Dosen führte bei gesunden Menschen zu einer Schmerzauslösung (Petty *et al.* 1994). Bei NGF-Mangel kam es im Tiermodell zu einer verringerten Expression von SP und CGRP (Übersicht in Anand 1995).

Außerdem ist NGF bei Erwachsenen auch für weitere Immunreaktionen von Bedeutung (Übersicht in Levi-Montalcini 1995). Mehrere Autoren konnten die Produktion von NGF in B- und T-Lymphozyten nachweisen und zeigen, dass durch NGF die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen angeregt wird (Thorpe und Perez-Polo 1987; Otten *et al.* 1989; Ehrhard *et al.* 1993; Santambrogio *et al.* 1994; Torica *et al.* 1996; Lambiase *et al.* 1997). Des Weiteren ist NGF für das Überleben von B-Lymphozyten wichtig (Torica *et al.* 1996) und es bewirkt die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (Otten *et al.* 1989).

In akuten und chronischen Stresssituationen erhöht sich die Plasmakonzentration von NGF unabhängig vom Alter der Studienteilnehmer (Aloe *et al.* 1994; Hadjinconstantinou *et al.* 2001). Sarchielli *et al.* (2001) konnten bei Patienten, die an chronisch täglichen Kopfschmerzen leiden, im Vergleich zu Gesunden eine erhöhte Konzentration von NGF im Liquor cerebrospinalis nachweisen.

Ser-Ser-Ser-His-Pro-Ile-Phe-His-Arg-Gly-Glu-Phe-Ser-Val-Cys-Asp-Ser-Val-Ser-Val-Trp-Val-Gly-Asp-Lys-Thr-Thr-Ala-Thr-Asp-Ile-Lys-Gly-Lys-Glu-Val-Met-Val-Leu-Gly-Glu-Val-Asn-Ile-Asn-Asn-Ser-Val-Phe-Lys-Gln-Tyr-Phe-Phe-Glu-Thr-Lys-Cys-Arg-Asp-Pro-Asn-Pro-Val-Asp-Ser-Gly-Cys-Arg-Gly-Ile-Asp-Ser-Lys-His-Trp-Asn-Ser-Tyr-Cys-Thr-Thr-Thr-His-Thr-Phe-Val-Lys-Ala-Leu-Thr-Met-Asp-Gly-Lys-Gln-Ala-Ala-Trp-Arg-Phe-Ile-Arg-Ile-Asp-Thr-Ala-Cys-Val-Cys-Val-Leu-Ser-Arg-Lys-Ala-Val-Arg-Arg-Ala

Abbildung 1: Sequenz des humanen β-NGF (Bradshaw et al. 1994)

1.3.3.4 Substanz P (SP)

Substanz P (SP) ist ein Transmitter des zentralen und peripheren Nervensystems (Hokfelt *et al.* 1975). Er ist ein wichtiger Neuromodulator und spielt eine entscheidende Rolle bei der zentralen Sensibilisierung und bei der Ausbildung der neurogenen Entzündung (Übersicht in Ashina 2004). Substanz P besteht aus 11

Aminosäuren (Abb. 2) und hat ein Molekulargewicht von ca. 1340 Da (Chang und Leeman 1970; Vigna 2003). Das für Substanz P kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 7.

Der Neurotransmitter gehört mit Neurokinin A und B (NKA, NKB) zur Gruppe der Tachykinine und bindet an den G-Protein-gekoppelten Neurokinin-1-Rezeptor (NK-1R) (Übersicht in Willis 1999 und Simeonidis *et al.* 2003). Simeonidis *et al.* (2003) zeigten, dass der NK-1R eine Bindungsstelle für *Nuclear factor κB* (NF-κB) hat und dass NF-κB für die Regulation der NK-1R-Genexpression verantwortlich ist. NK-1-Rezeptoren sind sowohl im ZNS als auch im PNS lokalisiert. Sie sind vermehrt im Locus coeruleus und ventralen Striatum zu finden, in geringerer Anzahl im zerebralen Kortex, Hippocampus und Amygdala. Einige Rezeptoren befinden sich auch im Zerebellum und im Thalamus.

Edvinsson (1985) konnte in Zerebralarterien von Labortieren SP und CGRP nachweisen. Auch beim Menschen konnten diese beiden Neuropeptide in der Adventitia der *Arteria meningea media* und der *Arteria temporalis* und in kleinen Gefäßen der kranialen Muskulatur gefunden werden (Jansen *et al.* 1986; Uddman *et al.* 1986; Edvinsson *et al.* 1987).

Substanz P gilt als einer der Hauptverursacher der Plasmaextravasation und der Vasodilatation bei neurogener Entzündung, wobei letztere auch von einem intakten Endothel abhängig und NO-vermittelt ist (Lembeck 1953; Bolton und Clapp 1986; Burnstock 1990). Nach Injektion von CGRP und SP in die Haut des Unterarms freiwilliger gesunder Probanden kam es zu Erythemen und Schmerzempfindungen (Pedersen-Bjergaard *et al.* 1991). Wurde nur CGRP injiziert, kam es lediglich zu einer Erythembildung.

Ohkubo *et al.* (1990) und Tiseo *et al.* (1990) konnten einen Anstieg von SP in Ganglien der Hinterwurzel und eine Freisetzung dieses Neurotransmitters aus dem Hinterhorn des Rückenmarks nach nozizeptiver Stimulation nachweisen. Bei Ratten nahm die Dichte SP-enthaltender Nervenfasern in Arterienwänden nach induzierter Myositis zu (Reinert *et al.* 1998). Nach induzierter Entzündungsreaktion an der Hinterpfote von Ratten konnte eine erhöhte Konzentration von SP im Hinterhorn nachgewiesen werden (Garry und Hargreaves 1992). Ebersberger *et al.* (1999)

stellten nach elektrischer und chemischer Stimulation keine Veränderungen der SP-Konzentration in der Dura mater von Ratten fest.

Im Liquor konnten bei Patienten mit chronisch täglichen Kopfschmerzen erhöhte Konzentrationen von SP nachgewiesen werden (Sarchielli e*t al.* 2001). Ashina *et al.* (1999a) konnten dagegen im Blutplasma keine Konzentrationsunterschiede von SP bei Patienten und Gesunden feststellen. Auch beim Vergleich verschiedener Schmerzzustände innerhalb des Patientenkollektivs zeigten sich keine Konzentrationsunterschiede dieses Neurotransmitters. Die SP-Konzentration aus Liquor und Blutplasma wurden in einer weiteren Studie miteinander verglichen. Dabei wurde eine signifikant positive Korrelation festgestellt (Clark *et al.* 1994).

In Speichelproben konnten von Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz insbesondere während Schmerzepisoden signifikant erhöhte Spiegel von SP und Serotonin nachgewiesen werden (Marukawa *et al.* 1996).

Kopfschmerzattacken bewirken außerdem eine Zunahme von SP in Thrombozyten (Nakano *et al.* 1993). Wahrscheinlich wird SP während des Schmerzes aus afferenten Fasern des *Nervus trigeminus* oder aus anderen schmerzsensorischen Fasern (Nakano *et al.* 1993) und aus Speicheldrüsen freigesetzt (Marukawa *et al.* 1996).

Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH_2

Abbildung 2: Sequenz von Substanz P (Vigna 2003)

1.3.3.5 *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP)

Dieses Neuropeptid gehört zu den Transmittern des zentralen und peripheren, sensorischen Nervensystems. Es spielt als Neuromodulator und vasodilatatorisch wirkende Substanz eine entscheidende Rolle bei der zentralen Sensibilisierung und bei der Ausbildung der neurogenen Entzündung (Übersicht in Ashina 2004).

Zusammen mit Calcitonin, Adrenomedullin und Amylin gehört CGRP zur Calcitonin-Gen-Peptidfamilie (Wimalawansa 1997). CGRP besteht aus 37 Aminosäuren. Es sind zwei Calcitonin-Gene bekannt, die für die Bildung zweier verschiedener CGRP verantwortlich sind (α-CGRP und β-CGRP bzw. CGRP1 und CGRP2). Die beiden Gene befinden sich auf Chromosom 11 (Hoppener *et al.* 1985). Die für CGRP kodierende mRNA entsteht durch alternatives *Splicing* der

Calcitonin/CGRP-prä-mRNA. Diese CGRP-mRNA besteht aus den Exons 1, 2, 3, 5 und 6 der genannten Prä-mRNA (Steenbergh *et al.* 1985; Bovenberg *et al.* 1988). Die Peptide α- und β-CGRP unterscheiden sich in drei der 37 Aminosäuren (Abb. 3) und haben ein Molekulargewicht von 3789 Da (Steenbergh *et al.* 1985).

Der für CGRP spezifische Rezeptor (CGRP-A-Rezeptor) ist ein Komplex aus drei Proteinen: *Calcitonin-like-receptor* (CL-Rezeptor, früher *Calcitonin receptor-like-receptor* (CRLR)), *receptor activity-modifying protein 1* (RAMP1) und *CGRP receptor component protein* (RCP). Der CL-Rezeptor gehört zur Gruppe B der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er hat sieben Transmembrandomänen (Übersicht in Springer *et al*. 2003) und wird durch RAMP1 (hat eine Transmembrandomäne) zur Zellmembran transportiert (McLatchie *et al.* 1998). Wird statt RAMP1 RAMP2 oder RAMP3 zusammen mit dem CL-Rezeptor exprimiert, entstehen Rezeptoren für Adrenomedullin (McLatchie *et al.* 1998). RCP befindet sich intrazellulär und ist für die Regulation der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion notwendig (Prado *et al.* 2001).

CGRP kommt vor allem in der Adventitia kleiner Blutgefäße der kranialen Muskulatur vor (Saldanha *et al.* 1999). Neben der bereits erwähnten Vasodilatation wird durch diesen Transmitter die intestinale Motilität verlangsamt und der Appetit verringert. CGRP ist an der Regulation des Calcium- und des Glucosemetabolismus beteiligt, es reduziert die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und bewirkt eine Zunahme der Herzfrequenz (Übersicht in Aiyar *et al.* 1996).

Der Neurotransmitter kann durch elektrische und chemische Stimulation (Morton und Hutchinson 1989; Ebersberger *et al.* 1999) oder endogen durch die Freisetzung von NO und Leukotrienen (Übersicht in Springer *et al.* 2003) ausgeschüttet werden. Am Tiermodell wurde eine gesteigerte Freisetzung von Neuropeptiden, wie CGRP, SP, VIP und NPY in das Hinterhorn des Rückenmarks bei akuter und chronischer Nozizeption nachgewiesen (Shehab und Atkinson 1986; Garry und Hargreaves 1992; Sluka und Westlund 1993; Weihe *et al.* 1994).

Die Dichte der CGRP-enthaltenden Fasern um die Gefäße nimmt bei Ratten in dauerhaft entzündeten Muskeln zu (Reinert *et al.* 1998). Saldanha *et al.* (1999) konnten eine herabgesetzte Immunreaktivität von CGRP in Nervenfasern bei Entzündungsreaktionen nachweisen.

CGRP spielt eine Rolle in der Pathophysiologie der Migräne und des Cluster Kopfschmerzes (Goadsby et *al.* 1990; Goadsby und Edvinsson 1994). Erhöhte CGRP-Konzentrationen im Plasma wurden bei Migräne-Patienten während Migräneattacken und im schmerzfreien Intervall (Goadsby *et al.* 1990) sowie bei Cluster-Kopfschmerz-Patienten während Kopfschmerzattacken und bei Schmerzfreiheit während aktiver Perioden gefunden (Goadsby und Edvinsson 1994; Fanciullacci *et al.* 1997).
Sarchielli *et al.* (2001) stellten im Liquor erhöhte Konzentrationen von NGF, SP und CGRP bei Patienten mit chronisch täglichen Kopfschmerzen fest. Dabei gab es signifikant positive Korrelationen zwischen den einzelnen Neurotransmittern.

α-CGRP	H-Ala-Cys-Asp-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-Val-Val-Lys-Asn-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH_2
β-CGRP	H-**Asn**-Cys-**Asn**-Thr-Ala-Thr-Cys-Val-Thr-His-Arg-Leu-Ala-Gly-Leu-Leu-Ser-Arg-Ser-Gly-Gly-**Met**-Val-Lys-**Ser**-Asn-Phe-Val-Pro-Thr-Asn-Val-Gly-Ser-Lys-Ala-Phe-NH_2

Abbildung 3: Sequenz von α-CGRP und β-CGRP (Springer et al. 2003)

1.4 Fragestellung

Es war bekannt, dass Neurotransmitter bei der Entstehung verschiedener Kopfschmerzarten involviert sind. Die Transmitter NGF, SP und CGRP werden in der Literatur besonders häufig mit Kopfschmerzsyndromen in Verbindung gebracht. Dabei stellten sich uns folgende Fragen:

1. Lassen sich Konzentrationsunterschiede zwischen Gesunden und Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz aufzeigen?
2. Korrelieren die Konzentrationen der Neurotransmitter innerhalb der einzelnen Kollektive miteinander?
3. Gibt es bei der NGF-Ausschüttung eine zirkadiane Rhythmik?
4. Sind die NGF-Konzentrationen bei weiblichen und männlichen Gesunden unterschiedlich?

2 Material und Methoden

2.1 Studienteilnehmer

Alle Blutproben von Patienten und gesunden Kontrollen wurden zentrifugiert, das Serum aliquotiert und dann bei –80 °C gelagert.

2.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden 46 Patienten (30 W, 16 M, Alter 49.6 Jahre +/-1.6 Jahre (Mittelwert +/- Standardabweichung)) mit der Diagnose „Chronischer Spannungskopfschmerz“ in die Studie eingeschlossen (s. Anhang, Tab. 6). Alle Patienten gaben vor Beginn der Untersuchungen schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität in Gießen genehmigt.

Die Diagnose wurde nach den folgenden Kriterien der „International Headache Society (IHS)“ gestellt (IHS 1988):

Kopfschmerzepisoden, die mindestens 180 mal im Jahr oder mindestens 15 mal pro Monat auftreten. Die Schmerzzustände dauern 30 Minuten bis höchstens sieben Tage und weisen mindestens zwei der folgenden Schmerzcharakteristika auf:

1. Drückend, beengend, nicht pulsierend
2. Milde bis moderate Intensität
3. Bilaterales Auftreten
4. Keine Steigerung der Schmerzintensität durch körperliche Anstrengung, wie zum Beispiel Treppen steigen

Übelkeit oder Erbrechen dürfen nicht auftreten. Außerdem besteht nur entweder eine Photo- oder eine Phonophobie.

2.1.2 Normalkollektiv

Als Kontrollen dienten Seren von 35 freiwilligen, gesunden Probanden (25 W, 10 M, Alter 37.0 Jahre +/- 1.8 Jahre) (s. Anhang, Tab. 6). Bei 19 Personen dieser Gruppe

wurde einmalig jeweils 5-10ml Blut abgenommen. Um zu untersuchen, ob sich die Konzentration des *Nerve growth factor* (NGF) im Tagesverlauf ändert und ob sich die Konzentrationen von weiblichen und männlichen Personen unterscheiden, wurde von 16 Personen (8 W, 8 M) innerhalb von 24 Stunden zu folgenden Zeiten jeweils 5-10ml Blut abgenommen: 8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00Uhr, 0.00Uhr. Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) wurde bei allen gesunden Probanden jeweils nur in einer Serumprobe untersucht.

Aus organisatorischen Gründen wurde das Normalkollektiv zu Beginn der Studie zusammen gestellt. Obwohl versucht wurde, Alter und Geschlechtsverteilung den erwarteten Daten des Patientenkollektivs anzupassen, waren die Spannungskopfschmerzpatienten signifikant älter als die gesunden Kontrollen (49.6 +/- 1.6 Jahre vs. 37.0 +/- 1.8 Jahre, $p<0.06$). Daher wurden die Einzelkollektive hinsichtlich einer Altersabhängigkeit der gemessenen Neurotransmitter untersucht. Dabei fand sich sowohl für NGF, als auch für Substanz P eine Altersabhängigkeit der Serumspiegel, jedoch nicht für CGRP (Daten nicht gezeigt).

2.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) — Testprinzip

Mit Hilfe von *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (ELISA) werden Konzentrationen von Antigenen oder Antikörpern enzymatisch nachgewiesen. Alle ELISA beruhen auf mehreren Arbeitschritten, bei denen verschiedene Reagenzien in die Vertiefungen pipettiert werden. Diese gehen dann Verbindungen mit dem durch Bindung an die Platte immobilisierten Reaktionspartner ein (Lottspeich 1998).

Zwischen den einzelnen Schritten werden freie und an die Oberfläche der Platte gebundene Substanzen durch Waschen voneinander getrennt. Danach sind nur gebundene, enzymatisch markierte Antigen-Antikörper-Komplexe in den Vertiefungen. Als Waschpuffer wird meist *phosphate-buffered saline* (PBS) verwendet, da der pH-Wert von PBS für die meisten Reaktionen von Antigenen und Antikörpern optimal ist. In einigen Versuchen wird Tween-20 als Detergenz zugegeben.

Bei Enzymatischen Immunassays, die erstmalig von Engvall und Perlman (1971) beschrieben wurden, wird ein Antigen- oder Antikörperreagenz mit Enzymen

markiert. Enzyme sind meist sehr instabil. Dadurch ist die Gefahr der Zerstörung des Enzyms bei der Trennung der gebundenen und der freien Fraktion groß. Beim enzymatischen Assay werden daher antigen- oder antikörperbeschichtete Festphasensysteme, sogenannte *8x12-well*-Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen) aus Kunststoff verwendet. Die Abtrennung der freien von der gebundenen Fraktion führt bei Festphasensystemen nicht zur Denaturierung von Protein. Das Enzym wird nicht zerstört (Liddell und Weeks 1996).
Die Mikrotiterplatten sind unbeschichtet oder, je nach zu untersuchender Substanz, schon mit bestimmten Antigenen oder Antikörpern beschichtet als kompletter *Kit* erhältlich. Erstere müssen dann im ersten Arbeitsschritt beschichtet werden (Liddell und Weeks 1996). Dazu werden die gewünschten Antigene oder Antikörper in einer Pufferlösung (meist PBS) gelöst. Sie binden leicht über passive Adsorption an den Kunststoff der Vertiefungen.
Zuletzt wird das Substrat zugegeben. Die Enzym-Substratreaktion bewirkt eine Farbentwicklung, die mit einem Photometer gemessen wird. Die Messungen sind genauer, wenn sie mit einem speziellen ELISA-Lesegerät (Mehrkanalphotometer) gemacht werden. Mithilfe einer Standardkurve werden dann die Konzentrationen der zu messenden Substanz ausgerechnet.

Grundsätzlich werden drei Hauptsysteme des ELISA unterschieden (Crowther 2000; Lottspeich 1998):

1. Direkter ELISA
Die Platte wird mit Antigen aus der zu untersuchenden Probe beschichtet. Anschließend werden in aufeinander folgenden Arbeitsschritten spezifische, enzymmarkierte Antikörper, Substrat und Stopplösung in die Vertiefungen pipettiert. Danach wird die Farbintensität mit Hilfe eines Photometers gemessen und die einzelnen Konzentrationen bestimmt.

2. Indirekter ELISA
Bei diesem System werden nach der Beschichtung der Platte mit Antigen Antikörper in die Vertiefungen pipettiert. Danach werden enzymatisch markierte Anti-

Antikörper zugegeben, die dann mit Substrat reagieren können. Schließlich wird die Extinktion gemessen, um die Konzentration der Antigene ausrechnen zu können.

3. Sandwich-ELISA
Zunächst wird die Platte mit Antikörpern beschichtet. Die immobilisierten Antikörper dienen als sogenannte Fangantikörper für die zu messenden Antigene (Lottspeich 1998). Da nach den Antigenen wieder Antikörper pipettiert werden, erinnert das Prinzip an ein „Sandwich".
Auch hier kann zwischen einer direkten und einer indirekten Variante unterschieden werden.

Zusätzlich wird bei allen diesen Hauptsystemen zwischen nicht-kompetitiven (siehe Hauptsysteme), kompetitiven und inhibitorischen ELISA unterschieden:
Beim kompetitiven ELISA werden Antigene beziehungsweise Antikörper aus der Probe zusammen mit enzymatisch markierten Antigenen beziehungsweise Antikörpern in die Vertiefungen der Platte gegeben, die dann um freie Bindungsstellen konkurrieren. Nach Zugabe des Substrats ist die Farbintensität umso geringer, je höher die Konzentration der interessierenden Antigene beziehungsweise Antikörper ist. Deshalb müssen die gemessenen Extinktionen umgerechnet werden, bevor mit Hilfe der Standardkurve die Konzentrationen bestimmt werden können (Crowther 2000; Lottspeich 1998).
Bei inhibitorischen ELISA werden die konkurrierenden Substanzen nacheinander in die Vertiefungen pipettiert. Freie Bindungsstellen werden von den in der Probe enthaltenen Antigenen oder Antikörpern besetzt, ohne zu konkurrieren. Nur nach dieser Inkubation noch freie Stellen können dann schließlich zu einer Farbreaktion führen.

2.3 Nerve Growth Factor (NGF)-ELISA

Im Rahmen dieser Studie wurde für die Messung von NGF ein Sandwich-ELISA verwendet. Die Platten wurden zuerst mit einem monoklonalen antihumanen β-NGF-

Antikörper aus Mäusen beschichtet. Wegen der zu erwartenden geringen Konzentrationen wurde hier das Biotin:Avidin-System zu Hilfe genommen. Dieses kann verwendet werden, um die Anzahl der Bindungsstellen für das Enzym zu erhöhen. Biotin (Synonyme: Vitamin H, Vitamin B_7) kommt ubiquitär vor und wird als Bindungskomponente verwendet. Avidin aus Eiklar beziehungsweise Streptavidin aus *Streptomyces avidinii*-Bakterien haben jeweils vier Bindungsstellen für Biotin.

Avidin oder Streptavidin werden an Markerenzyme, wie zum Beispiel Peroxidase aus Meerrettich, gekoppelt (Lottspeich 1998). Durch Biotin und Avidin ist letztendlich mehr Enzym in den einzelnen Vertiefungen gebunden, was zu mehr Enzym-Substrat-Reaktionen und damit zu einer intensiveren Farbintensität führt (Abb. 4).

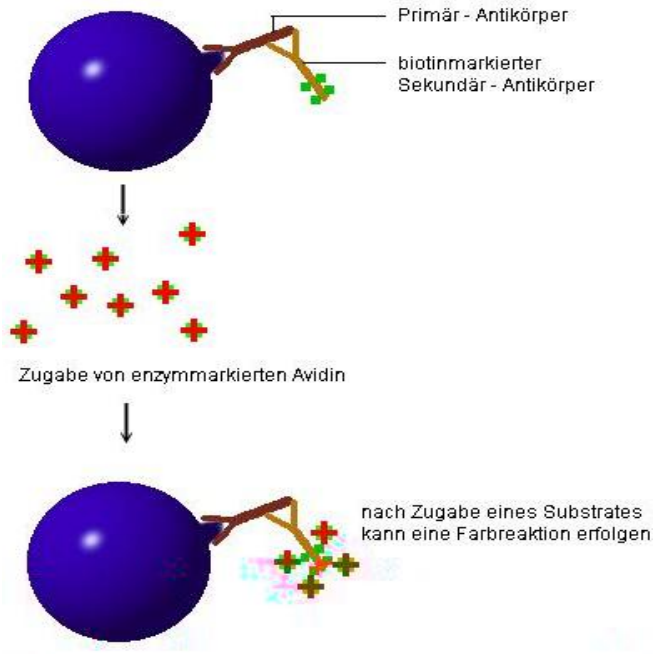

Abbildung 4: Biotin-Avidin-Methode
(http://retro.mta-labor.info/cms/fachbereiche/histo/immunhisto/avidin.php)

Zur Vorbereitung wurden die Antikörper *Monoclonal Anti-human β-NGF Antibody* (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) und *Biotinylated Anti-human β-NGF Antibody* (R&D Systems, Inc.) in PBS gelöst und in der Konzentration 500µg/ml beziehungsweise 50µ/ml zur besseren Haltbarkeit eingefroren. Das zur Erstellung der

Standardkurve verwendete *Recombinant Human β-NGF* (R&D Systems, Inc.) wurde ebenfalls in PBS gelöst und in Portionen eingefroren (1µg/ml).
Für diesen Test wurden unterschiedliche Reagenzien benötigt. Dazu gehörten PBS pH 7.45 (2.0 l Aqua dest., 16.0 g NaCl, 2.84 g $Na_2HPO_4*2H_2O$, 0.4 g KH_2PO_4, 0.4 g KCl), Blockierlösung (100 ml PBS, 0.5 g *Bovine Serum Albumin* (BSA)), Assay Puffer (100 ml PBS, 0.5 g BSA, 100 µl *Tween 20*), Standardverdünnungspuffer (100 ml PBS, 1.0 g BSA, 100 µl *Tween 20*), Waschpuffer (1000 ml PBS, 1.0 ml *Tween 20*) und Stopplösung (4 N H_2SO_4: 16 ml Aqua dest., 2 ml H_2SO_4 95%- 98%).

Um die Vertiefungen der Platte mit antihumanem β-NGF Antikörper zu beschichten, wurden 100 µl des Antikörpers in einer Konzentration von 2 µg/ml in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde dann abgedeckt und 15 Stunden bei 4°C inkubiert.
Danach wurde die Platte gewaschen. Alle Waschvorgänge liefen folgendermaßen ab: Die Platte wurde auf Zellstoff ausgeklopft, 5 Mal mit dem ELISA Waschgerät BEP 2 (Behring, Schwalbach, Deutschland) gewaschen und anschließend wieder ausgeklopft.
Im nächsten Schritt wurde die Platte mit 200 µl Blockierlösung je Vertiefung eine Stunde inkubiert. Alle benötigten Reagenzien und Proben wurden zuvor auf Raumtemperatur gebracht. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte erneut fünfmal gewaschen.
Für die Standardreihe benötigte man rekombinantes NGF in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurde Standardverdünnungspuffer verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen betrugen 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml und 0 pg/ml.
100 µl der jeweiligen Standardverdünnung beziehungsweise der Proben (Blutserum) wurden nach dem in Tabelle 3 beschriebenen Pipettierschema in die Vertiefungen pipettiert und anschließend für zwei Stunden inkubiert. Alle Standards und Proben wurden doppelt pipettiert.

Tabelle 3: Pipettierschema des NGF – ELISA
S1 = Leerwert, S2 = Standardkonz. 31.25 pg/ ml, ..., S8 = 2000 pg/ ml, P = Proben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	S1	S5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	S2	S6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D	S2	S6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
E	S3	S7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
F	S3	S7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	S4	S8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H	S4	S8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen. Anschließend wurden pro Vertiefung 100 µl des mit Biotin markierten Antikörpers in einer Konzentration von 100 ng/ml, in Assay Puffer verdünnt zugegeben und für zwei Stunden inkubiert.

Nach erneutem Waschen wurden jeweils 100 µl ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma, Protein-Konzentration: 2.0- 2.5 mg/ml) in der Verdünnung 1: 20000 in Assay Puffer in die Vertiefungen pipettiert. Danach wurde die Platte 20 Minuten inkubiert und anschließend gewaschen.

Als Substrat wurde 3,3´,5,5´-Tetramethylbenzidinhydrochlorid (TMB) verwendet. Dazu wurden TMB Peroxidase Substrat mit Peroxidase-Lösung B im Verhältnis 1:1 gemischt, anschließend wurden davon 100 µl in jede Vertiefung pipettiert. Die darauf folgende Inkubation dauerte circa 30 Minuten. Es kam, je nach NGF-Konzentration zu einer mehr oder weniger intensiven gelben Farbentwicklung. Nach der Gelbfärbung wurde die Reaktion mit je 50 µl 4-Normaler Schwefelsäure gestoppt. Daraufhin verfärbte sich die Flüssigkeit in den Vertiefungen blau.

Die Extinktion jeder Probe wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm im *ELISA reader (Vmax Kinetic microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)* bestimmt. Das Computerprogramm im *ELISA* reader lieferte, nachdem der Leerwert von allen anderen Werten abgezogen war, eine Standardkurve. Auf der X-Achse wurden die Konzentrationen an NGF abgetragen und auf der Y-Achse die Extinktionswerte. Anschließend rechnete der Computer für alle Proben die NGF-Konzentrationen aus.

2.4 Substanz P (SP)-ELISA

Substanz P wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits für einen kompetitiven ELISA gemessen. Die Mikrotiterplatten waren bereits mit einem monoklonalen Antikörper von Mäusen beschichtet. Das verwendete Enzym war an einen SP-Tracer gekoppelt.

Bei diesem ELISA mussten alle Proben mit Hilfe einer Säule (Sep-Pak® C18-Cartridge, Waters™) aufbereitet werden. Diese enthält Kohlenstoff (C18) und Siliziumdioxid und dient der Trennung (auch schwach) hydrophober Partikel mit einem Durchmesser zwischen 55µm und 105µm von wässrigen Lösungen. Hydrophobe Partikel binden an die Säule und werden im nächsten Schritt mit Hilfe eines Lösungsmittels (hier war dies ein Ethanol-Wasser-Essigsäure-Gemisch) eluiert. Die Aufbereitung diente dazu, reine, in Puffer gelöste SP zu erhalten. Organische Substanzen aus dem Blutserum, die im Test zu störenden Reaktionen führen könnten wurden dadurch entfernt. Die Konzentration von SP in der Probenlösung entsprach der Konzentration im Serum.

Zur Vorbereitung der Säule wurde diese mit Hilfe einer Spritze mit 5 ml Methanol und anschließend 5 ml Aqua dest. befeuchtet und gewaschen. Danach wurde die Säule mit einem Proben-Essigsäure-Gemisch (500 µl Serum, 1500 µl 4%ige Essigsäure) langsam innerhalb von zwei Minuten benetzt. Anschließend wurde mit 10 ml 4%iger Essigsäure erneut gewaschen. Im nächsten Schritt wurde Substanz P mit 3 ml eines Ethanol-Wasser-Essigsäure-Gemischs im Verhältnis 180:20:0.8 eluiert. Diese Flüssigkeit wurde mit Stickstoffgas verdampft und der Rückstand anschließend in 500 µl EIA-Puffer (s. unten) aufgelöst. Die Lösung wurde dann für den ELISA verwendet.

Mit Hilfe eines Metallkammes konnten 10 Proben gleichzeitig verdampft werden. Da auf eine Mikrotiterplatte bis zu 36 Proben pipettiert werden konnten, wurden mehrere dieser Aufbereitungen nacheinander durchgeführt. Es wurden dann später alle Proben gleichzeitig in EIA-Puffer gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem *Substance P Enzyme Immunoassay Kit (SP-EIA-Kit)* von Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA. Dieser Kit enthielt folgende Reagenzien: EIA-Puffer-Konzentrat, welches in 90 ml Aqua

dest. gelöst wurde; Waschpuffer-Konzentrat, das in 2 l Aqua dest. gegeben und mit 1 ml *Tween 20* versetzt wurde; *Substance P EIA Antiserum*, gelöst in 6 ml EIA-Puffer; *Substance P Acetylcholin-Esterase Tracer* (AChE-Tracer), der in 6 ml EIA-Puffer aufgelöst wurde; *Substance P EIA Standard*, welcher in 1 ml EIA-Puffer gelöst werden musste; *Ellman´s Reagent*, das kurz bevor es benötigt wurde in 20 ml Aqua dest. gelöst wurde.
Außerdem waren im Kit eine „96-well Mikrotiterplatte“, die mit einem Anti-Kaninchen-IgG von Mäusen beschichtet war und Färbemittel für den EIA Tracer und das EIA Antiserum enthalten. Diese Farben konnten zur besseren Orientierung beim Pipettieren in die entsprechenden Vertiefungen der Platte dazugegeben werden.

Für die Standardreihe wurden 8 Eppendorf-Reaktionsgefäße benötigt. In das Erste wurden 900 µl EIA-Puffer und 100 µl des Substanz P-Standards mit der Konzentration 10 ng/ml gegeben. Somit hatte der erste Standardwert die Konzentration 1000 pg/ml. Alle anderen Reaktionsgefäße wurden mit 500 µl EIA-Puffer und 500 µl der jeweils vorherigen Verdünnung gefüllt, was den Konzentrationen 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.25 pg/ml, 15.62 pg/ml und 7.81 pg/ml entsprach.
Die 96-well-Platte wurde einmal gewaschen. Danach wurde nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema pipettiert.
In die Vertiefungen für die Nicht-Spezifische-Bindung (C1, D1) wurden je 100 µl, in die für die Maximale Bindung (E1, F1) je 50 µl EIA-Puffer pipettiert. Die Standards wurden wie in der Tabelle beschrieben mit jeweils 50 µl, beginnend mit der höchsten Konzentration pipettiert. Auch von der aufbereiteten Probenlösung wurden jeweils 50 µl in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Alle Proben wurden in jeweils 2 Vertiefungen pipettiert. Danach wurde überall, außer in die Vertiefungen für die Leerwerte (A1, B1) und die für die Totale Aktivität (G1, H1) jeweils 50 µl AChE-Tracer dazugegeben. Schließlich wurde außer in die Vertiefungen für Leerwerte, Nicht-Spezifische-Bindung und Totale Aktivität jeweils 50 µl Antiserum pipettiert, die Platte mit einem Kunststoff-Klebefilm bedeckt und für 18 Stunden bei 4°C inkubiert.

Tabelle 4: Pipettierschema des Substanz P (SP) - ELISA B = Leerwert, NSB = Nicht-Spezifische-Bindung, B_0 = Maximale Bindung, TA = Totale Aktivität, S1 = Standardkonz. 1000 pg/ ml, ..., S8 = 7.81 pg/ ml, P= Proben

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	B	S1	S5	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	B	S1	S5	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	NSB	S2	S6	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D	NSB	S2	S6	P	P	P	P	P	P	P	P	P
E	B_0	S3	S7	P	P	P	P	P	P	P	P	P
F	B_0	S3	S7	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	TA	S4	S8	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H	TA	S4	S8	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Nach der Inkubation wurde Ellman´s Reagent in 20 ml Aqua dest. aufgelöst und bis nach dem Waschen der Platte an einen dunklen Ort gestellt. Nach dem Waschen wurde in jede Vertiefung 200 µl Ellman´s Reagent pipettiert und in die für die Totale Aktivität (G1, H1) jeweils 5 µl Tracer dazugegeben.
Die darauf folgende Inkubationszeit betrug je nach Farbentwicklung 90 bis 120 Minuten. Da die Reaktion nicht gestoppt werden musste, konnten die Extinktionen mehrmals bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Die Extinktion von B_0 sollte zwischen 0.3 und 0.8 Absorbance Units (A.U.) liegen.

In diesem Assay konkurrierten freie SP und ein SP-Tracer, das heißt an Acetylcholinesterase gebundene SP um die Bindungsstellen. Die Menge des Tracers blieb konstant, während die Konzentration der freien SP in Standards und Proben variierte. Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen, um alle nicht gebundenen Reagenzien zu entfernen. Danach wurde Ellman´s Reagent, was dem Substrat von Acetylcholinesterase entsprach, zugegeben. Die sich entwickelnde Farbintensität war proportional zur Menge an gebundenem SP-Tracer und umgekehrt proportional zur Konzentration der freien SP.
Da sich der Leerwert aufgrund folgender mathematischer Gegebenheiten in der Kalkulation aufhebt, wurde er nicht berücksichtigt:
Zuerst musste der Leerwert gemittelt (mB) und dann von allen anderen Werten subtrahiert werden. Außerdem mussten entsprechend die Mittelwerte von allen anderen Werten gebildet werden. Dann wurde das korrigierte B_0 (corr. B_0) gebildet, indem der Mittelwert von NSB (mNSB) vom Mittelwert von B_0 (mB_0) subtrahiert

wurde. Schließlich musste das sogenannte $\%B/B_0$ gebildet werden. B stand hier für Standard bzw. Probe. Dazu musste der Mittelwert von NSB von den Mittelwerten von X_i (X_i steht für Standards beziehungsweise Proben) subtrahiert und durch corr. B_0 dividiert werden. Das Ergebnis musste dann mit 100 multipliziert werden, weil die Werte prozentual angegeben werden.

Daraus ergab sich folgende Formel:

$$\frac{(mX_i - mB) - (mNSB - mB)}{\text{corr. Bo}} * 100$$

$$= \frac{(mX_i - mB) - (mNSB - mB)}{(mB_0 - mB) - (mNSB - mB)} * 100$$

$$= \frac{mX_i - mB - mNSB + mB}{mB_0 - mB - mNSB + mB} * 100$$

$$= \mathbf{\frac{mX_i - mNSB}{mB_0 - mNSB} * 100}$$

Um die Konzentrationen von SP zu bekommen wurde, nachdem alle Werte umgerechnet wurden, eine Standardkurve erstellt. Auf der X-Achse wurden die Konzentration an SP logarithmisch und auf der Y-Achse die Ergebnisse aus obiger Rechnung in % abgetragen. Auf dieser Kurve konnten dann die Konzentrationen der Proben abgelesen werden.

2.5 Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)-ELISA

Für CGRP wurde der kommerziell erhältliche *Calcitonin Gene-Related peptide (CGRP) (Human) EIA* Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Belmont, CA, USA) verwendet. Es handelte sich um einen kompetitiven ELISA, bei dem ebenfalls das oben beschriebene Biotin:Avidin-System verwendet wurde. Die im Kit enthaltene Mikrotiterplatte war bereits mit einem Antikörper beschichtet. Folgende Reagenzien waren im Kit enthalten: *Assay buffer concentrate* (20x 50ml), welches für den Test in 950ml *Aqua dest*. gelöst wurde; *Primary antiserum (rabbit anti-peptide IgG*), aufgelöst in 5ml Assay Puffer; *Standard peptide* (1µg), gelöst in 1ml Assay Puffer;

Biotinylated peptide wurde in 5ml Assay Puffer aufgelöst; *Streptavidin-horseradish-peroxidase* (30µl), *Substrate solution* (12ml), 2N HCl (15ml).
Auch bei diesem ELISA war vor Verwendung des Probenmaterials eine Aufbereitung der Seren notwendig. Durch diese Aufbereitung wurden organische Substanzen, die im Test zu störenden Reaktionen führen könnten entfernt. Nach der Aufbreitung wurde reines, in Puffer gelöstes CGRP erhalten. Für die Extraktion des CGRP wurden C18-Säulen (Sep-Pak® C18-Cartridge, Waters™), Puffer A (1% Trifluoressigsäure (TFA) in H_2O) und Puffer B (60% *acetonitrile* in 1% TFA) benötigt. Zur Funktion der Säule siehe oben (2.4 Substanz P). Es wurde nach folgendem Schema vorgegangen:
Zum Serum wurde die entsprechende Menge von Puffer A gegeben. Zur Vorbereitung der Säule wurde diese zunächst einmal mit 1ml Puffer B, anschließend dreimal mit 3ml Puffer A gewaschen. Das Puffer-Serum-Gemisch wurde dann auf die Säule gegeben. Danach wurde die C18-Säule zweimal mit 3ml Puffer A gewaschen. CGRP wurde anschließend mit Hilfe von 3ml Puffer B aus der Säule eluiert. Diese Lösung wurde dann mit wie unter 2.4. beschrieben mit Hilfe von Stickstoffgas verdampft. Der Rückstand wurde in Assay Puffer aufgelöst.

Für die Standardreihe wurden 5 Eppendorf-Reaktionsgefäße benötigt. Der erste Standardwert wurde direkt aus dem in Assay Puffer gelösten CGRP-Standard aus dem Kit genommen und hatte die Konzentration 1000 ng/ml. Die Reaktionsgefäße wurden mit 900 µl Assay Puffer und 100 µl der jeweils vorherigen Verdünnung gefüllt, was den Konzentrationen 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0.1 ng/ml, 0.01 ng/ml entsprach.
Es wurde nach dem in Tabelle 5 dargestellten Schema pipettiert. Die Vertiefung A1 wurde als Leerwert verwendet. In die Vertiefung B1 wurden 50µl Assay Puffer gegeben. Die Standardreihe wurde wie in der Tabelle beschrieben mit jeweils 50 µl, beginnend mit der höchsten Konzentration pipettiert. Auch von der aufbereiteten Probenlösung wurden jeweils 50 µl in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Danach wurde in jede Vertiefung außer in A1 zunächst 25 µl Antiserum, dann 25 µl biotinyliertes Peptid dazugegeben. Anschließend wurde die Platte mit einem Kunststoff-Klebefilm bedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 5: Pipettierschema des Calcitonin gene-related Peptide (CGRP) - ELISA
B = Leerwert, TB = Total Binding, S1 = Standardkonz. 1000 ng/ ml, ..., S5 = 0.01 ng/ ml, P= Proben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
B	TB	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	S1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
D	S2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
E	S3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
F	S1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
G	S4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
H	S5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Nach der Inkubation wurde die Platte fünfmal gewaschen. Von der Streptavidin-Peroxidase wurden 12 µl in 12ml Assay Puffer gegeben. Davon wurden in jede Vertiefung bis auf A1 100µl pipettiert. Die darauf folgende Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte gewaschen.
Danach wurden in jede Vertiefung 100µl Substrat gegeben und die 96-well-Platte erneut für eine Stunde inkubiert. Die Reaktion wurde zuletzt mit jeweils 100µl 2N HCl gestoppt und die Extinktionen bei 450nm gemessen.

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit dem Computer-Programm *Graph Pad Prism4* (San Diego, CA, USA) vorgenommen. Die Konzentrationen der einzelnen Neurotransmitter bei Patienten und Kontrollen, sowie das Alter der Teilnehmer wurden mit Hilfe des unpaaren t-Tests und der *Column* Statistik miteinander verglichen. Die zirkadian ermittelten Werte von NGF wurden durch *ANOVA* und *Bonferroni's Multiple Comparison Test* und die geschlechtsgetrennten Mittelwerte durch den unpaaren t-Test analysiert. Anschließend wurden die Konzentrationen von NGF, SP und CGRP untereinander verglichen. Um zu sehen, ob die Konzentrationen miteinander korrelieren wurde eine Lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

Für die Messungen von NGF wurde ein ELISA etabliert. Die Konzentrationen von SP und CGRP wurden jeweils mit kommerziell erhältlichen ELISA gemessen.

3.1 Nerve Growth Factor (NGF)

Zunächst wurde untersucht, ob sich die NGF-Konzentration im Serum zirkadian ändert. Dazu wurde bei 16 Personen des Kontrollkollektivs innerhalb von 24 Stunden viermal Blut abgenommen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte der NGF-Konzentrationen zu den verschiedenen Tageszeiten (s. Anhang, Tab.7, Abb. 5). Ebenso konnte bei keinem einzelnen Probanden eine signifikante Änderung der NGF-Konzentration im Tagesverlauf beobachtet werden (Abb. 5, n. sign.).

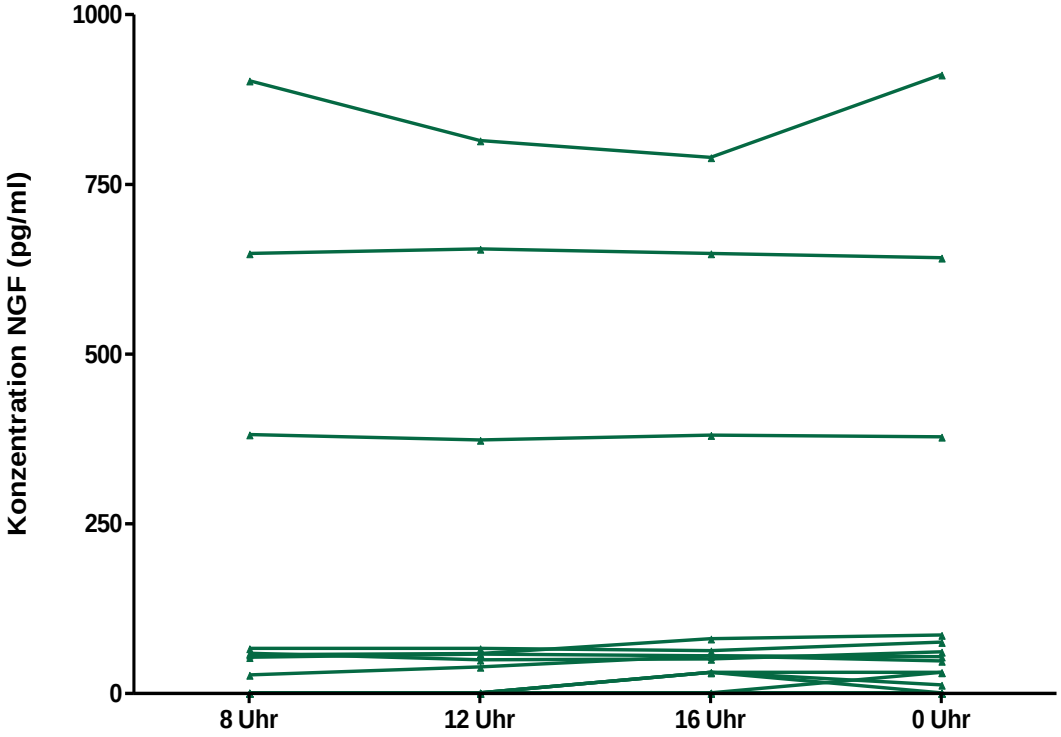

Abbildung 5: Serumkonzentrationen von NGF bei Gesunden zu festgelegten Uhrzeiten innerhalb eines Tages (8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00 Uhr, 00.00 Uhr). (Dabei entspricht eine Kurve jeweils den vier zirkadianen Messwerten einer Person.)
Es besteht keine zirkadiane Rhythmik.

Auch eine geschlechtsgetrennte Auswertung zeigte keinen Unterschied zwischen den männlichen und weiblichen Probanden zu Beginn oder im Tagesverlauf (s. Anhang, Tab. 8, Abb. 6, n. sign.).

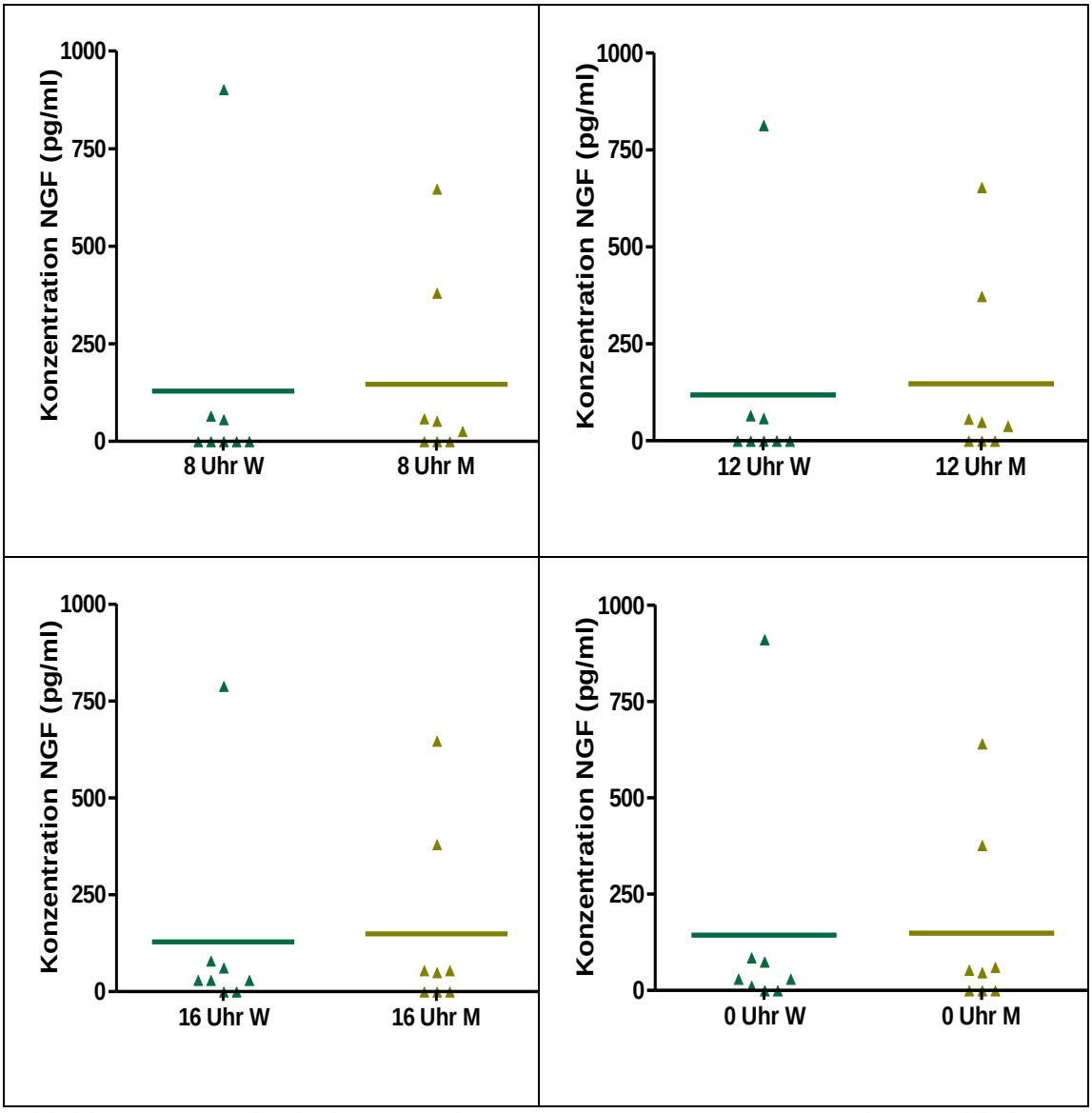

Abbildung 6: Vergleich der Serumkonzentrationen von NGF zwischen weiblichen und männlichen Kontrollen zu den festgelegten Zeiten (Jeder Punkt entspricht einem Messwert, die Gerade entspricht jeweils dem arithmetischem Mittelwert der Messwerte.). Die Konzentrationen von NGF waren bei weiblichen und männlichen und Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich.

Weiterhin wurde die Serumkonzentration von NGF bei 35 Gesunden und 46 Patienten gemessen. Bei 20 Gesunden und 24 Patienten lagen die Konzentrationen unter dem messbaren Bereich und wurden 1 pg/ml gesetzt (s. Anhang, Tab. 9 und

10). Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kopfschmerzpatienten und den gesunden Kontrollen (Kontrollen 90.2 ±198.3 pg/ml vs. Patienten 26.2±93.0 pg/ml) (Abb.7, n. sign.).

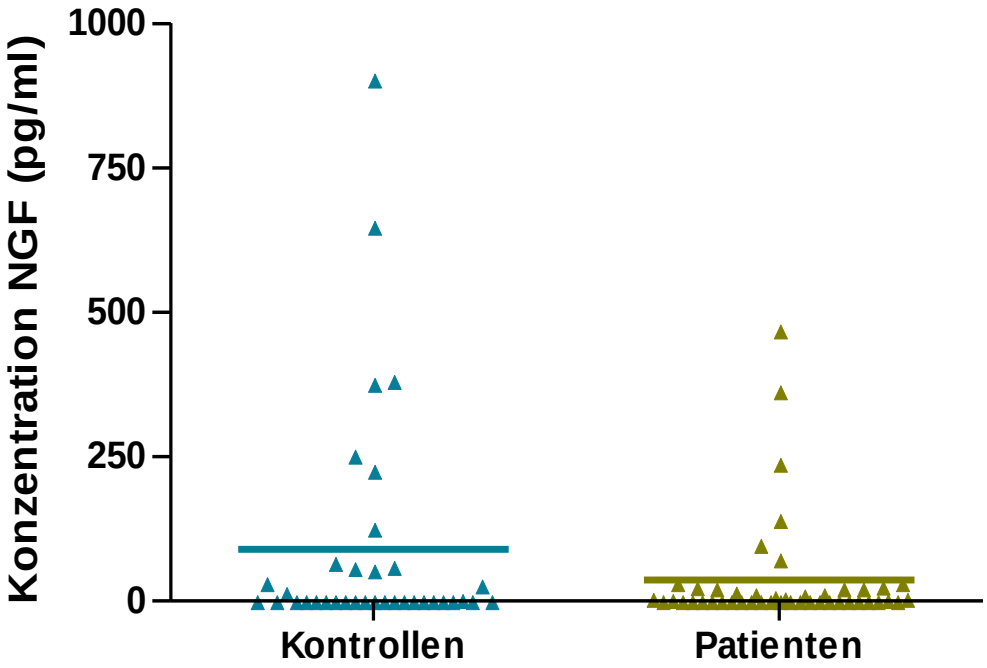

Abbildung 7: Vergleich der Serumkonzentrationen von NGF zwischen Patienten und Kontrollen (Jeder Punkt entspricht einem Messwert, die Gerade entspricht jeweils dem arithmetischem Mittelwert der Messwerte.). Die Konzentrationen von NGF waren bei Patienten und Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich.

3.2 Substanz P (SP)

Hier wurden die SP-Konzentrationen von Patienten und Gesunden im Serum untersucht.

Die Extinktionswerte aller Patienten und Kontrollen wurden zunächst, wie vom Hersteller des Kits angegeben, in prozentuale Werte umgerechnet. Danach wurden die Konzentrationen mit Hilfe des Mathematikprogrammes *Derive 5* (*Texas Instruments Incorporation*, Dallas, USA) ermittelt.

Bei dieser Untersuchung hatten alle 35 Kontrollen und 39 Patienten messbare Konzentrationen des Neurotransmitters SP. Bei den fehlenden 7 Patienten war das Serum nach Abschluss der NGF-Messung nicht mehr ausreichend. Die Konzentration von Substanz P im Serum der Patienten war signifikant höher, als in gesunden Kontrollseren (Kopfschmerz 81.7 pg/ml ± 42.4 pg/ml vs. Kontrollen 55.5 pg/ml ± 27.3 pg/ml) (s. Anhang, Tab. 9 und 10, Abb. 8, $p < 0.05$).

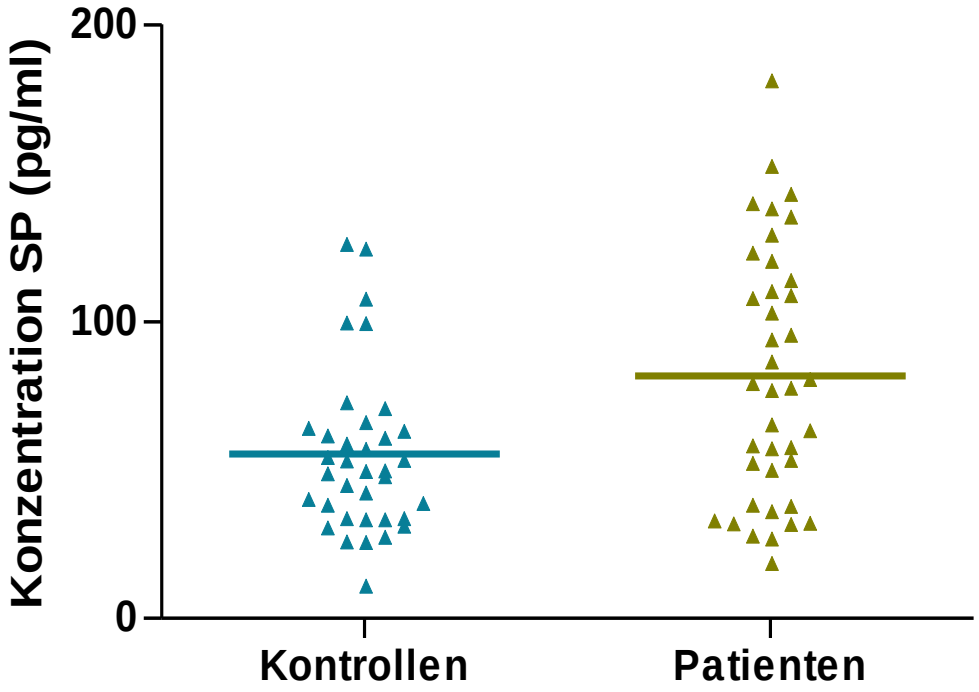

Abbildung 8: Vergleich der Serumkonzentrationen von SP zwischen Patienten und Kontrollen (Jeder Punkt entspricht einem Messwert, die Gerade entspricht jeweils dem arithmetischem Mittelwert der Messwerte.). Die Konzentrationen von SP waren im Patientenkollektiv signifikant höher, als bei den Kontrollen ($p < 0.05$).

3.3 Calcitonin gene-related Peptide (CGRP)

Es wurden die CGRP-Konzentrationen im Serum von 35 Kontrollpersonen und 43 Patienten gemessen. Der Konzentrationsunterschied zwischen den Kollektiven war

nicht signifikant (Kontrollen 6.8ng/ml ± 7.3ng/ml vs. Kopfschmerz 9.3ng/ml ± 6.7ng/ml) (s. Anhang, Tab. 9 und 10, Abb. 9, n. sign.).

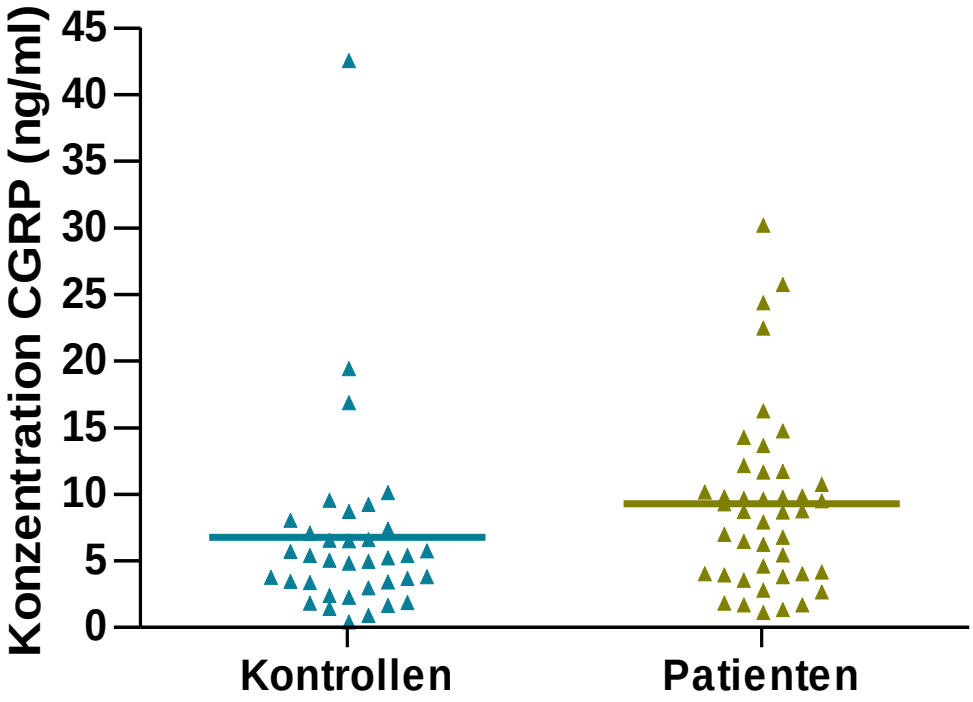

Abbildung 9: Vergleich der Serumkonzentrationen von CGRP zwischen Patienten und Kontrollen (Jeder Punkt entspricht einem Messwert, die Gerade entspricht jeweils dem arithmetischem Mittelwert der Messwerte.).
Die Konzentrationen von CGRP waren bei Kontrollen und Patienten nicht signifikant unterschiedlich.

3.4 Vergleich der Neurotransmitter untereinander

Die Ergebnisse der Neurotransmitterbestimmungen wurden mit der Linearen Regression (*Graph pad prism*) miteinander verglichen. Beim Vergleich der Konzentrationen innerhalb der einzelnen Kollektive konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden (Abb. 10, n. sign.). Dabei ergaben sich folgende Werte: NGF vs. SP in der Patientengruppe bzw. der Kontrollgruppe (r^2 0,03, n.sign. bzw. r^2 0,01, n. sign.), NGF vs. CGRP bei Patienten bzw. Kontrollen (r^2 0,05, n. sign. bzw. r^2 0,05, n.sign.) und SP vs. CGRP Patienten bzw. Kontrollen (r^2 0,04, n. sign. bzw. r^2 0,04, n. sign.).

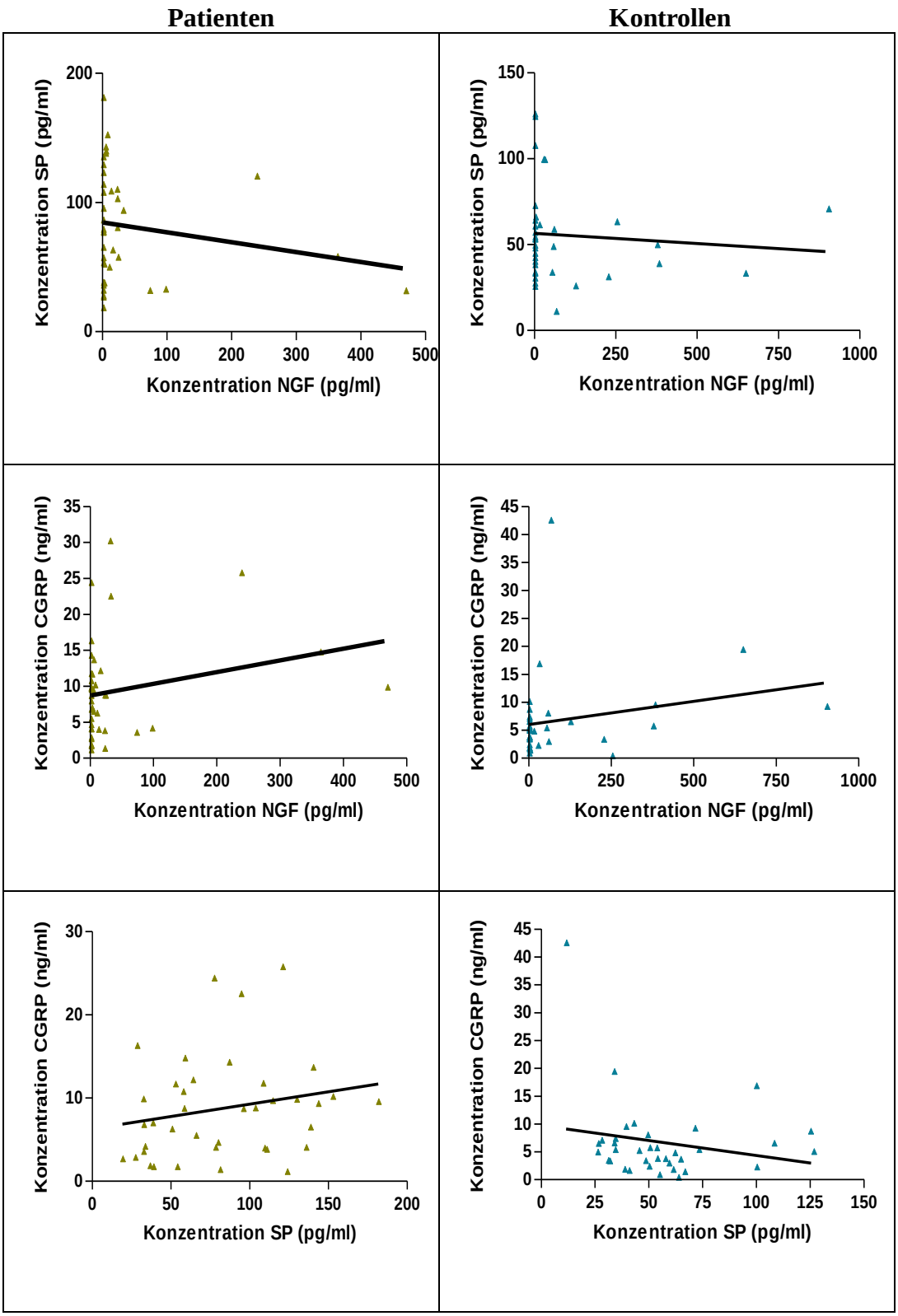

Abbildung 10: Vergleich der Konzentrationen von NGF, SP und CGRP untereinander. Es sind jeweils auf X- und Y-Achse die Konzentrationen eines Transmitters abgetragen, die Gerade entspricht jeweils der Regressionslinie. Die einzelnen Neurotransmitterwerte korrelieren nicht miteinander.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Auswahl der Studienteilnehmer

Bei der Auswahl der Kontrollen wurde auf die Geschlechtsverteilung des chronischen Spannungskopfschmerzes geachtet. Die Angaben in der Literatur variieren sehr. Meist sind in der Literatur mehr Frauen betroffen, als Männer (Ulrich *et al.* 1996; Lavados und Tenhamm 1998; Schwartz *et al.* 1998; Jensen 1999; Hagen *et al.* 2000; Rasmussen 2001). In unserem Kontrollkollektiv ist das Verhältnis M:W 1:2.5. Das Verhältnis M:W im Patientenkollektiv liegt bei 1:1.88.

Des Weiteren wurde versucht, den Altersdurchschnitt des Kontrollkollektivs dem des zu erwartenden Altersdurchschnitts des Patientenkollektivs anzugleichen. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 20 und 30 Jahren (Rasmussen 2001), wobei Kopfschmerzpatienten meist erst nach einer längeren Krankheitsphase einen Arzt konsultieren (Rasmussen *et al.* 1992). Das Normalkollektiv wurde zu Beginn der Studie zusammengestellt. Aus diesem Grund konnte die Geschlechtsverteilung und das mittlere Alter nur geschätzt werden. An der Studie nahmen 35 Gesunde (arithmetischer Mittelwert in Jahren: 37.0) und 47 Patienten (arithmetischer Mittelwert in Jahren: 49.6) teil. Das Alter der Teilnehmer unterschied sich signifikant. Dies ist am ehesten auf den späten Arztbesuch der Patienten nach jahrelangem Leiden zurückzuführen. Aus organisatorischen Gründen musste jedoch unser Kontrollkollektiv vor Erhalt aller Patientendaten und -proben aufgestellt werden. Die einzelnen Kollektive wurden hinsichtlich einer Altersabhängigkeit der gemessenen Neurotransmitter untersucht. Dabei zeigte sich für NGF und für Substanz P eine Altersabhängigkeit der Serumspiegel. Die Kollektive waren für eine statistische Auswertung ausreichend groß.

Bei 16 Personen des Kontrollkollektivs (8W, 8M) wurden innerhalb eines Tages 4 Blutentnahmen (8.00 Uhr, 12.00 Uhr, 16.00 Uhr, 24.00 Uhr) vorgenommen. Hiermit wurde untersucht, ob sich die NGF-Ausschüttung im Tagesverlauf ändert.

4.1.2 *Nerve growth factor* (NGF)

Zur Messung von NGF wurde ein einfacher Sandwich-ELISA verwendet, der anfangs etabliert wurde.

Die Serumkonzentrationen wurden in pg/ml gemessen (s. auch Aloe *et al.* 1994). Wegen dieser geringen Konzentrationen wurde in den Versuchen das Biotin:Avidin-System zu Hilfe genommen. Durch die oben bereits erwähnten vier Bindungsstellen des Biotins für das Enzym können mehr Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden werden. Durch die so erzielte Steigerung der Enzym-Substrat-Reaktionen werden auch geringe Konzentrationen messbar. Trotzdem konnte bei vielen Proben keine NGF-Konzentration festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Konzentration für nicht messbare Werte als 1pg/ml gesetzt. Die niedrigste tatsächlich gemessene NGF-Konzentration lag bei 2.3 pg/ml (s. Anhang, Tab. 9).

Auffällig sind die großen Unterschiede der Konzentrationen innerhalb der Kollektive und die Menge der Proben, deren NGF-Konzentration trotz des Biotin:Avidin-Systems unterhalb des Referenzbereichs lag. Um systematische Messfehler weitgehend auszuschließen, wurden von allen Proben Doppelbestimmungen vorgenommen. Die Messungen wurden, wenn sich die Doppelbestimmungen zu stark unterschieden, wiederholt. Gelagert wurden die Seren wie in der Literatur empfohlen bei -80°C, nachdem sie zentrifugiert waren. Die Proben von externen Kliniken wurden auf Trockeneis transportiert, sodass eine lückenlose Kühlkette gewährleistet war. Insgesamt sind daher systematische Fehler sehr unwahrscheinlich.

4.1.3 Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP)

SP und CGRP werden in der Literatur häufig zusammen erwähnt, da in Studien meist beide Neurotransmitter untersucht werden. Aus diesem Grund werden die beiden Neurotransmitter gemeinsam diskutiert (Sarchielli 2001, Edvinsson und Goadsby 1995).

Beide Transmitter wurden mit einem bereits etablierten, als Kit kommerziell erhältlichen ELISA untersucht. Diese waren ausreichend valide, bei der Testdurchführung ergaben sich keine Probleme.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 *Nerve growth factor* (NGF)

Zu Beginn der Studie sollte herausgefunden werden, ob der Zeitpunkt der Blutentnahme einen signifikanten Einfluss auf die NGF-Konzentration hat. Dazu wurde von 16 Gesunden zu vier verschiedenen Uhrzeiten im Tagesverlauf Serum untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration von NGF im Blutserum weder bei weiblichen noch bei männlichen Gesunden einer zirkadianen Rhythmik unterliegt (Abb. 5). Diese Abbildung verdeutlicht auch die großen interindividuellen Unterschiede der NGF-Konzentrationen. Außerdem zeigte der Vergleich der NGF-Konzentrationen zwischen Gesunden und Patienten keine Unterschiede.

Hadjinconstantinou *et al.* (2001) untersuchten NGF-Konzentrationen bei Krankenpflegern mit einem hohen subjektiven Stresspotential bei ihrer Arbeit. Aloe *et al.* (1994) verglichen die Serumkonzentrationen von NGF bei männlichen Soldaten und deren erstem Fallschirmsprung mit Soldaten, die nicht springen mussten. Beide Arbeitsgruppen kamen zu dem Ergebnis, dass Serumkonzentrationen von NGF bei Personen, die größerem Stress ausgesetzt sind erhöht sind. Schmerz führt ebenfalls zu einer Stressreaktion, weshalb eine erhöhte NGF-Serumkonzentration bei den Patienten zu vermuten war. Unser Ergebnis war daher unerwartet, könnte jedoch in der langen Krankheitsdauer und dem eher chronischen Schmerz niedriger Schmerzintensität begründet sein.

Bei der Pathophysiologie des Spannungskopfschmerzes spielen mehrere periphere und zentrale Faktoren eine Rolle. Eine dauerhafte Stimulation peripherer Nozizeptoren führt langfristig zu einer zentralen Sensibilisierung auf Ebene des Rückenmarkhinterhorns beziehungsweise des *Nucleus nervi trigemini* (Übersicht in Jensen 1999). Diese zentrale Sensibilisierung scheint beim chronischen Spannungskopfschmerz eines der Hauptprobleme zu sein. Die Aktivierung des trigeminalen Systems beziehungsweise eine pathologische Antwort des Trigemo-zervikalen Reflexes auf elektrische Stimulation spielt dabei eine entscheidende Rolle (Nardone und Tezzon 2003). Bei der Entstehung von Schmerzattacken bei Spannungskopfschmerzpatienten müssen Neurotransmitter sensorischer Neurone

beteiligt sein. NGF wird bei (neurogenen) Entzündungen bzw. durch Sensibilisierung von Nozizeptoren ausgeschüttet und verursacht eine Hyperalgesie (Petty *et al.* 1994). Der Transmitter bewirkt eine erhöhte Freisetzung von SP und CGRP (Übersicht in Lewin and Mendell 1993). Sarchielli *et al.* (2001) fanden im Liquor cerebrospinalis bei Patienten mit chronischen Kopfschmerzen eine erhöhte Konzentration von NGF. NGF wird normalerweise in Zielorganen synthetisiert und besonders bei entzündlichen Geschehen ausgeschüttet. Nachdem das Protein an sensorische und sympathische Nervenfasern gebunden hat, gelangt es retrograd in sensorische Neurone der Hinterwurzel des Rückenmarks (Übersicht in Thoenen und Barde 1980). Die Arbeitsgruppe um Sarchielli vermutet, dass die Ursache der erhöhten NGF-Konzentrationen im Liquor durch eine vermehrte Produktion des Transmitters im trigeminalen System (periphere Nervenendigungen, Nucleus caudalis trigeminini) und dem retrograden Transport zu sehen ist. Dies wäre eine Erklärung, warum im Gegensatz zu erhöhten NGF-Konzentrationen im Liquor, die Serumkonzentrationen in unserer Studie nicht erhöht waren.

4.2.2 Substanz P (SP) und *Calcitonin gene-related Peptide* (CGRP)

Die zentrale Sensibilisierung und neurogene Entzündung wird vor allem durch SP und CGRP verursacht (Übersicht in Herbert und Holzer 2002a). Da akute und chronische Nozizeption zu einer Freisetzung von CGRP, SP NPY und VIP in das Hinterhorn des Rückenmarks führt, vermuteten Wissenschaftler einen Zusammenhang zwischen Neurotransmittern und zentraler Sensibilisierung (Garry und Hargreaves 1992; Sluka und Westlund 1993; Weihe *et al.* 1994).

Nach Injektion von SP und CGRP in die Haut, kam es zu Schmerzempfindungen der Probanden und einer Erythembildung. CGRP führt bei der neurogenen Entzündung zu einer Dilatation von Arteriolen und damit verbunden zu einer Hyperämie, die ein Erythem verursacht (Pedersen-Bjergaard *et al.* 1991; Holzer 1992). Die zur neurogenen Entzündung gehörende Extravasation von Proteinen wird vor allem durch SP und Neurokinin A verursacht (Holzer 1992). Aus diesen Zusammenhängen schlossen Pedersen-Bjergaard *et al.* (1991), SP könnte eine wichtige Rolle beim Empfindungsvermögen der Haut spielen. Andere Studien bestätigen eine Beteiligung

von SP an der Schmerzentstehung und –verarbeitung, sowie bei Entzündungsreaktionen (Ohkubo *et al.* 1990; Tiseo *et al.* 1990; Garry und Hargreaves 1992; Mazzotta *et al.* 1997; Reinert *et al.* 1998).

Auch Ebersberger *et al.* (1999) vermuten einen Zusammenhang zwischen neurogenen Entzündungen und Kopfschmerzen. Sie fanden eine gesteigerte CGRP-Konzentration in der Dura mater von Ratten nach elektrischer und chemischer Stimulation. Es ist jedoch unklar, ob bei diesen Tieren Kopfschmerzen bestanden.

In der Pathophysiologie der Migräne und des Cluster Kopfschmerzes ist eine Beteiligung des CGRP nachgewiesen (Goadsby *et al.* 1990; Goadsby und Edvinsson 1994; Ashina *et al.* 2000b). Bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz wurden dagegen bisher keine Konzentrationsunterschiede von CGRP im Vergleich zu Gesunden gefunden (Ashina *et al.* 2000c). Ashina *et al.* (2000c) konnten außerdem im Serum der Vena jugularis externa und einer Armvene jeweils im schmerzfreien Intervall und während Kopfschmerzen keine Unterschiede finden. Ebenfalls keine Konzentrationunterschiede wurden beim Vergleich der Geschlechter untereinander gefunden. In einer weiteren Studie konnten Ashina *et al.* (2001) weder beim Vergleich Patienten versus Kontrollen, noch beim Vergleich NO-induzierter Kopfschmerzen zu Placebo Unterschiede bei den Konzentrationen von CGRP feststellen. Es wurde eine Zunahme der Peptidkonzentrationen innerhalb des Tagesverlaufs bei Patienten und Gesunden unabhängig von Glyceroltrinitrat (ein NO-Donator) oder Placebo festgestellt. Bei Migräne-Patienten war der erhöhte CGRP-Spiegel während der Schmerzattacke nur im Blut aus der Vena jugularis externa messbar, nicht jedoch im peripheren Blut (Goadsby *et al.* 1990). Die Konzentrationen von SP und CGRP ist in Zerebralarterien höher, als in der Arteria meningealis medialis und Arteria temporalis (Edvinsson und Goadsby 1995).

Im Liquor von Patienten mit chronisch täglichen Kopfschmerzen wurden erhöhte Konzentrationen von NGF, SP und CGRP gemessen. Dabei gab es signifikant positive Korrelationen zwischen den einzelnen Neurotransmittern (Sarchielli 2001). Marukawa *et al.* (1996) konnten bei Patienten mit Kopfschmerzsyndromen erhöhte Konzentrationen von SP in Speichelproben nachweisen. Außerdem kommt es während Kopfschmerzattacken zu einer Zunahme von SP in Thrombozyten (Nakano *et al.* 1993). Clark *et al.* (1994) wiesen beim Vergleich der SP-Konzentrationen im

Liquor und Blutplasma eine signifikant positive Korrelation nach. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung dieser Neurotransmitter bei Patienten mit CDH, Migräne und Cluster-Kopfschmerz. Zum chronischen Spannungskopfschmerz gibt es meines Wissens bisher keine Studie, die sich mit Neurotransmittern im Liquor befasst.

Bei Untersuchungen von Blutplasma konnten bisher keine Konzentrationsunterschiede von SP bei Patienten und Gesunden festgestellt werden (Ashina *et al.* 1999a). Auch der Vergleich bei der Untersuchung kranialer Blutproben (aus der V. jugularis externa) zeigte keine signifikanten Unterschiede. Nur bei einigen Patienten konnte ein Anstieg von CGRP während Kopfschmerzattacken nachgewiesen werden. Die davon betroffenen Patienten litten unter einem pulsierenden Schmerzcharakter (Ashina *et al.* 2000c).

Wir vermuteten jedoch eine Beteiligung dieser Neurotransmitter auch beim chronischen Spannungskopfschmerz. Eine Studie, die die Konzentrationen der drei Transmitter im Liquor untersucht, wäre für das weitere Verständnis des chronischen Spannungskopfschmerzes sinnvoll. Hier stellt sich jedoch die Frage, ob eine Lumbalpunktion zu Studienzwecken ethisch zu vertreten wäre.

Die Ergebnisse dieser Studie sprechen ebenfalls für eine Beteiligung von SP an der Schmerzgenese. Es konnte gezeigt werden, dass die SP-Konzentration im Blutserum aus peripheren Venen bei Patienten, die an chronischem Spannungskopfschmerz leiden, im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist ($P<0.05$). Dagegen konnten wir in der CGRP-Konzentration keine Unterschiede aufzeigen. Von Ashina (2004) wurde die Vermutung geäußert, dass die verschiedenen Neuromodulatoren, wie SP und CGRP bei einer Ausschüttung im Gebiet des ZNS nicht in messbarer Konzentration in die periphere Blutzirkulation gelangen. Trotzdem könnten sie eine Rolle in der Pathophysiologie spielen.

4.2.3 Vergleich der Neurotransmitter untereinander

Der Vergleich der Transmitter-Konzentrationen untereinander zeigte in dieser Studie keine Korrelationen. In der Literatur zur Pathophysiologie von Schmerzsyndromen und Entzündungsreaktionen wird häufig über Zusammenhänge zwischen

Neurotransmittern diskutiert. Aus früheren Studien ist eine positive Wirkung des NGF auf die Freisetzung von SP und CGRP bekannt (Lindsay and Harmar 1989). Im Liquor konnten erhöhte Konzentrationen von NGF, SP und CGRP bei Patienten mit chronisch täglichen Kopfschmerzen nachgewiesen werden (Sarchielli *et al.* 2001). Dabei gab es signifikant positive Korrelationen zwischen den einzelnen Neurotransmittern.
Im Vergleich zu den berichteten Ergebnissen im Liquor, scheint die Messung von Serumspiegel dieser Neurotransmitter keine geeignete Methode zur Evaluierung pathophysiologischer Vorgänge beim chronischen Spannungskopfschmerz zu sein.

4.3 Ausblick

Durch diese Studie wurde gezeigt, dass sich die peripheren Serumkonzentrationen von NGF und CGRP bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz nicht von denen gesunder Kontrollen unterscheiden. Außerdem wurde festgestellt, dass die NGF-Ausschüttung keiner zirkadianen Rhythmik unterliegt. Innerhalb der Kollektive gab es keine signifikanten Korrelationen zwischen den gemessenen Neurotransmittern.
Trotz dieser negativen Ergebnisse im Serum, ist eine Beteiligung des NGF beim chronischen Spannungskopfschmerz nicht ausgeschlossen. Frühere Studien belegen eine durch NGF hervorgerufene Hyperalgesie in entzündeten Geweben und eine gesteigerte NGF-Konzentration im Liquor bei CDH-Patienten. Da in dieser Studie eine erhöhte Serumkonzentration von Substanz P bei Patienten nachgewiesen wurde, ist wegen der bekannten pathophysiologischen Zusammenhänge zu vermuten, dass die vermehrte zentrale NGF-Ausschüttung im peripheren Blut nicht messbar ist. Durch die nachgewiesene Altersabhängigkeit der Konzentrationen von NGF und Substanz P relativieren sich jedoch die Ergebnisse für Substanz P.
Es sollte versucht werden, eine Studie mit Liquoruntersuchungen durchzuführen. Dazu ist jedoch eine Studie notwendig, bei der Patienten, die aus anderen Gründen lumbalpunktiert werden, in Kollektive mit chronischem Spannungskopfschmerz und ohne Kopfschmerzananmnese eingeteilt werden.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit werden die Neurotransmitter Nerve Growth Factor (NGF), Substanz P (SP) und Calcitonin gene-related peptide (CGRP) beim chronischen Spannungskopfschmerz untersucht. Neurotransmitter spielen eine Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Schmerzzustände und Kopfschmerzsyndrome. Für NGF, SP und CGRP ist eine Beteiligung bei der Entstehung von Migräne und Cluster Kopfschmerz bereits nachgewiesen. Wir vermuteten auch bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz erhöhte Werte.

Es wurden Serumkonzentrationen der drei Proteine bei Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz und bei gesunden Kontrollen gemessen. Hierzu wurde für NGF ein ELISA etabliert, SP und CGRP wurden jeweils mit kommerziell erhältlichen ELISA gemessen. Beim NGF wurden des Weiteren zirkadiane Messungen bei 16 Kontrollpersonen vorgenommen. Dabei wurde auch auf eventuelle geschlechtsbezogene Unterschiede geachtet.

Die NGF-Konzentrationen bei Patienten unterschieden sich nicht von denen gesunder Kontrollen (Kopfschmerz 90.2 ±198.3 pg/ml vs. Kontrollen 26.2±93.0 pg/ml, n. sign.). Es gibt keine zirkadiane Rhythmik in der Freisetzung des NGF. Die Werte weiblicher und männlicher Probanden unterscheiden sich nicht signifikant. Auch beim CGRP zeigten sich keine unterschiedlichen Konzentrationen (Kopfschmerz 9.3ng/ml ± 6.7ng/ml vs. Kontrollen 6.8ng/ml ± 7.3ng/ml, n. sign.). Dagegen waren die Konzentrationsunterschiede bei SP zwischen Patienten und Kontrollen signifikant (Kopfschmerz 81.7 pg/ml ± 42.4 pg/ml vs. Kontrollen 55.5 pg/ml ± 27.3 pg/ml, $p < 0.05$). Die Serumkonzentrationen der Transmitter korrelieren nicht untereinander.

Da die signifikant höheren SP-Werte bei Patienten am ehesten durch NGF verursacht sind, ist trotz unserer teils negativen Ergebnisse eine Beteiligung aller drei untersuchten Neurotransmitter wahrscheinlich. Am ehesten ist die Ursache der fehlenden Konzentrationsunterschiede bei NGF und CGRP zwischen den beiden Kollektiven in der Diskrepanz zwischen zentraler Ausschüttung und peripherer Blutkonzentrationen zu sehen. Hierzu sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

6 Summary

In this study we measured the plasma levels of the neurotransmitters Nerve Growth Factor (NGF), Substance P (SP) und Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in patients with chronic tension-type headache. Neurotransmitters play a role in the pathophysiology of pain and headache syndromes. In migraine and Cluster headache an involvement of NGF, SP and CGRP is already proved. We presumed higher levels in patients with chronic tension-type headache as well.

Therefore we measured plasma levels of these three proteins in patients with chronic tension-type headache and healthy controls. For NGF we established an ELISA, SP and CGRP were measured with two different commercial available ELISA. In 16 controls we analysed weather there exists an circadian change in NGF levels of men and women.

NGF levels did not differ significantly between patients and healthy controls (headache patients 90.2 ±198.3 pg/ml vs. controls 26.2±93.0 pg/ml, n. sign.). There does not exist any circadian rhythm in the release of NGF. There is no significant difference in CGRP levels as well (headache 9.3ng/ml ± 6.7ng/ml vs. controls 6.8ng/ml ± 7.3ng/ml, n. sign.). In contrast to this, the levels of SP were significantly higher in patients than in controls (headache 81.7 pg/ml ± 42.4 pg/ml vs. controls 55.5 pg/ml ± 27.3 pg/ml, $p < 0.05$). The plasma levels of these neurotransmitters do not correlate with each other.

As the higher levels of SP are probably generated by NGF, we assume that all the three neurotransmitters are involved. The reason for no significant difference in the concentration of NGF and CGRP between the two groups is probably the discrepancy between central release and concentration in peripheral blood. For this purpose we need further studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Ad hoc Committee on Classification of Headache of the National Institute of Health. Classification of headache; JAMA 1962; 179:717-718
2. Aiyar N, Rand K, Elshourbagy NA et al.. A cDNA encoding the Calcitonin gene-related Peptide type I receptor; J Biol Chem 1996; 271:11325-11329
3. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes; Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:10440-10444
4. Anand P. Nerve growth factor regulates nociception in human health and disease; Br J Anasth 1995; 75:201-208
5. Angeletti RH, Bradshaw RA. Nerve grwoth factor from submaxillary gland: amino acid sequence; Proc Natl Acad Sci USA 1971; 68:2417-2420
6. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Ekman R, Olesen J. Plasma levels of substance P, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in patients with chronic tension-type headache; Pain 1999a; 83:541-547
7. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Lassen LH, Sakaki F, Olesen J. Possible mechanisms of action of nitric oxide synthase inhibitors in chronic tension-type headache; Brain 1999b;122:1629-1635
8. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Sakai F, Olesen J. Muscle hardness in patients with chronic tension-type headache: relation to headache state; Pain 1999c; 79:201-205
9. Ashina M, Lassen LH, Bendtsen L, Jensen, Olesen J. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on chronic tension-type headache: a randomized crossover trial.; Lancet 1999d; 353:287-289
10. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Olesen J. Nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache; Brain 2000a; 123:1830-1837
11. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Schifter S, Olesen J. Evidence for increased plasma levels of calcitonin gene-related peptide in migraine outside of attacks; Pain 2000b; 86:133-138

12. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Schifter S, Jansen-Olesen I, Olesen J. Plasma levels of calcitonin gene-related peptide in chronic tension-type headache; Neurology 2000c; 55:1335-1339
13. Ashina M, Bendtsen L, Jensen, Schifter S, Olesen J. Calcitonin gene-related peptide levels during nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache; Eur J Neurol 2001; 8:173-178
14. Ashina M, Stallknecht B, Bendtsen L, et al.; *In vivo* evidence of altered skeletal muscle blood flow in chronic tension-type headache; Brain 2002; 125:320-326
15. Ashina M. Neurobiology of chronic tension-type headache; Cephalalgia 2004; 24:161-172
16. Barrett GL, Bartlett PF. The p75 nerve growth factor receptor mediates survival or death depending on the stage of sensory neuron development; Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6501-6505
17. Bendtsen L. Central sensitization in tension-type headache– possible pathophysiological mechanisms; Cephalalgia 2000a; 20:486-508
18. Bendtsen L, Jensen. Amitriptyline reduces myofascial tenderness in patients with chronic tension-type headache; Cephalalgia 2000b; 20:603-610
19. Bendtsen L, Jensen, Olesen J. Decreased pain detection and tolerance thresholds in chronic tension-type headache; Arch Neurol 1996a; 53:373-376
20. Bendtsen L, Jensen, Olesen J. A non-selective (amitriptyline), but not a selective (citalopram), serotonin reuptake inhibitor is effective in the prophylactic treatment of chronic tension-type headache; J Neurol Neurosurg Psychiatry 1996b; 61:285-290
21. Bendtsen L, Jensen, Hindberg I, Gammeltoft S, Olesen J. Serotonin metabolism in chronic tension-type headache. Cephalalgia 1997; 17: 843- 848
22. Benrath J, Eschenfelder C, Zimmerman M, Gillardon F. Calcitonin gene-related peptide, substance P and nitric oxide are involved in cutaneous inflammation following ultraviolet irradiation; Eur J Pharmacol 1995; 293:87-96
23. Bertolotti G, Vidotto G, Sanavio E, Frediani F. Psychological and emotional aspects of pain; Pathophysiology Of Pain; Neurol Sci 2003; 24:71-75; Springer-Verlag 2003

24. Bigal ME, Tepper SJ, Sheftell FD, Rapoport AM, Lipton RB. Chronic Daily Headache: Correlation Between the 2004 and the 1988 International Headache Society Diagnostic Criteria; Headache 2004; 44:684-691
25. Bolton TB, Clapp LH. Endothelial-dependent relaxant actions of carbachol and substance P in arterial smooth muscle; Br J Pharmac 1986; 87:713-723
26. Botney M, Fields HL. Amitriptyline potentiates morphine analgesia by direct action on the central nervous system; Ann Neurol 1983; 13:160-164
27. Bovenberg RA, Adema GJ, Jansz HS, Baas PD. Model for tissue specific Calcitonin/ CGRP-I RNA processing from in vitro experiments; Nucleic Acids Res 1988; 16:7867-7883
28. Bradshaw RA, Murray-Rust J, Ibáñez CF, McDonald NQ, Lapatto R, Blundell TL. Nerve growth factor: Structure/function relationships; Protein Sci 1994; 3:1901-1913
29. Burnstock G. Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium; J Hypertens Suppl; 1990; 8:95-106
30. Bussone G. Chronic migraine and chronic tension-type headache: different aspects of the chronic daily headache spectrum. Clinical and pathogenetic considerations; Pathophysiology Of Pain; Neurol Sci 2003; 24:90-93; Springer-Verlag 2003
31. Carter BD, Kaltschmidt C, Kaltschmidt B et al.. Selective Activation of NF-κB by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75; Science 1996; 272:542-545
32. Chang MM, Leeman SE. Isolation of a Sialogogic Peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as Substance P; J Biol Chem 1970; 245:4784-4790
33. Chao MV. The p75 neurotrophin receptor; J Neurobiol. 1994; 25:1373-1385
34. Cerbo R, Barbanti P, Fabbrini G, Pascali MP, Catarci T. Amitriptyline is effective in chronic but not in episodic tension-type headache: Pathogenetic implications; Headache 1998; 38:453-457
35. Clark JW, Senanayake PD, Solomon GD, Gallagher C. Substance P: correlation of CSF and plasma levels; Headache 1994; 34:261-264

36. Crowther, J. R.. Methods in Molecular Biology; vol.149: The ELISA Guidebook; Humana Press Inc.®, Totowa, NJ 2000; 1-39, 46-73
37. Csillik B, Schwab ME, Thoenen H. Transganglionic regulation of central terminals of dorsal root ganglion cells by nerve grwoth factor (NGF); Brain Res 1985; 331:11-15
38. Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia; Br J Pharmacol 1992; 107:660-664
39. D`Andrea G, Hasselmark L, Alecci M, Perini F, Welch KMA. Increased platelet serotonin content and hypersecretion from dense and a-granules in vitro in tension-type headache; Cephalalgia 1993; 13:349-353
40. Deleu D, Khan MA, Humaidan H, Al Mantheri Z, Al Hashami S. Prevalence and clinical characteristics of headache in medical students in Oman; Headache 2001; 41:798-804
41. Diamond S, Baltes BJ. Chronic tension headache- treated with amitriptylin- a double-blind study; Headache 1971; 11:110-116
42. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor im vivo; Neuroscience 1992; 29:693-398
43. Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and ist receptors; J Neurosci Res 1992;32(4):461-470
44. Ebersberger A, Averbeck B, Messlinger K, Reeh PW. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro; Neuroscience 1999; 89:901-907
45. Edvinsson L. Role of perivascular peptides in the control of the cerebral circulation; Trends Neurosci 1985; 8:126-131
46. Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, Ottosson A, Uddman R. Peptide-containing nerve fibres in human cerebral arteries: immunocytochemistry, radioimmunoassay and in vitro pharmacology; Ann Neurol 1987; 21:431-437

47. Edvinsson L, Jansen I, Cunha e Sa M, Gulbenkian S. Demonstration of neuropeptide containing nerves and vasomotor responses to perivascular peptides in human cerebral arteries; Cephalalgia 1994; 14:88-96
48. Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in the cerebral circulation: relevance to headache; Cephalalgia 1995; 15:272-276
49. Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones; Proc Natl Acad Sci 1993; 90:10984-10988
50. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobin G. Immunochemistry. 1971; 8:871-874
51. Evers S. Die neue IHS-Klassifikation –Hintergrund und Struktur; Schmerz 2004; 18:351-356
52. Fanciullacci M, Alessandri M, Sicuteri R, Marabini S; Responsiveness of the trigeminovascular system to nitroglycerine in cluster headache patients; Brain 1997; 120:283-288
53. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue; Nature 1988; 334:698-700
54. Fozard JR. Serotonin, migraine and platelets; in: Progress in pharmacology; Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1982; 4:135-146
55. Fusco M, D`Andrea G, Miccichè F, Stecca A, Bernardini D, Cananzi AL. Neurogenic inflammation in primary headaches; Pathophysiology Of Pain; Neurol Sci 2003; 24:61-64; Springer-Verlag 2003
56. Garry MG, Hargreaves KM. Enhanced release of immunoreactive CGRP and Substance P from spinal dorsal horn slices occurs during carrageenan inflammation; Brain Res 1992; 582:139-142
57. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache; Ann Neurol 1990; 28:183-187
58. Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies; Brain 1994; 117:427-434

59. Göbel H, Petersen-Braun M, Soyka D. The epidemiology of headache in Germany: a nationwide survey of a representative sample on the basis of the headache classification of the International Headache Society; Cephalalgia 1994; 14:97-106
60. Göbel H, Lindner V, Krack P, Heinze A, Gaartz N, Deuschl G. Treatment of chronic tension-type headache with botulinum toxin; Cephalalgia 1999; 19:455
61. Göbel H. Classification of headaches; Cephalalgia 2001; 21:770-773
62. Greene LA, Varon S, Piltch A, Shooter EM. Substructure of the β-subunit of mouse 7S nerve growth factor; Neurobiology 1971; 1:37-48
63. Hadjinconstantinou M, McGuire L, Duchemin A-M, Laskowski B, Kiecolt-Glaser J, Glaser R. Changes in plasma nerve growth factor levels in older adults associated with chronic stress; J Neuroimmunol 2001; 116:102-106
64. Hagen K, Zwart J-A, Vatten L, Stovner LJ, Bovim G. Prevalence of migraine and non-migrainous headache–head-HUNT, a large population-based study; Cephalalgia 2000; 20:900-906
65. Hammill JM, Cook TM, Rosecrane JC. Effectiveness of a physical therapy regimen in the treatment of tension-type headache; Headache 1996; 36:149-153
66. Hartung HP, Toyka KV. Activation of macrophages by substance P: induction of oxidative burst and thromboxane release; Eur J Pharmacol 1983; 89:301-305
67. Hartung HP, Wolters K, Toyka KV. Substance P: binding properties and studies on cellular responses in guinea pig macrophages; J Immunol 1986; 136:3856-3863
68. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain; Cephalagia 1988; 8:1-96
69. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS). The International Classification of Headache Disorders. Second Edition. Cephalalgia 2004; 1:1-160
70. Herbert MK, Holzer P. Die neurogene Entzündung– I. Grundlegende Mechanismen, Physiologie und Pharmakologie; Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2002a; 37:314-325; Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York

71. Herbert MK, Holzer P. Die neurogene Entzündung– II. Pathophysiologie und klinische Implikationen; Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2002b; 37:386-394; Georg Thieme Verlag Stuttgart- New York
72. Hokfelt T, Kellerth JO, Nilsson G, Pernow B. Substance P: localization in the central nervous system in some primary sensory neurons; Science 1975; 190:889-890
73. Holzer P. Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds; Rev Physiol Biochem Pharmacol 1992; 121:49-146
74. Hoppener JW, Steenbergh PH, Zandberg J et al.; The second human calcitonin/CGRP gene is located on chromosome 11; Hum Genet 1985; 70:259-263
75. Jansen I, Uddman R, Hocherman M et al.. Localization and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal polypeptide, substance P and calcitonin gene-related peptide in human cerebral arteries; Ann Neurol 1986; 20:496-501
76. Jansen I, Uddman R, Ekman R, Olesen J, Ottosson A, Edvinsson L. Distribution and effects of neuropeptide Y, vasoactive intestinal peptide, and calcitonin gene-related peptide in human middle meningeal arteries: comparison with cerebral and temporal arteries; Peptides 1992; 13:527-536
77. Jensen K, Anderson HO, Olesen J, Lindblom U. Pressure-pain threshold in human temporal region. Evaluation of a new pressure algometer; Pain 1986; 25:313-323
78. Jensen R, Olesen J. Is there an effect of physiotherapy in tension-type headache? Cephalalgia 1995; 15:152
79. Jensen R. Mechanisms of spontaneous tension-type headaches: an analysis of tenderness, pain thresholds and EMG; Pain 1996; 64:251-256
80. Jensen R, Rasmussen BK. Muscular disorders in tension-type headache; Cephalalgia 1996; 16:97-103
81. Jensen R, Bendtsen L, Olesen J. Muscular Factors are of Importance in Tension-Type Headache; Headache 1998; 38:10-17
82. Jensen R. Pathophysiological mechanisms of tension-type headache: a review of epidemiological and experimental studies; Cephalalgia 1999; 19:602-621

83. Jensen R, Olesen J. Tension-type headache: an update on mechanisms and treatment; Curr Opin Neurol 2000; 13:285-289
84. Jensen R. Mechanisms of tension-type headache; Cephalalgia 2001; 21:786-789
85. Kaplan DR, Hempstead BL, Martin-Zanca D, Chao MV, Parada LF. The trk proto-oncogen product: A signal transducing receptor for nerve growth factor; Science 1991; 252:554-558
86. Kaynak Key FN, Donmez S, Tuzun U. Epidemiological and clinical characteristics with psychosocial aspects of tension-type headache in turkish college students; Cephalalgia 2004; 24:669-674
87. Klein R, Jing S, Nanduri V, O´Rourke E, Barbacid M. The trk Proto-Oncogene encodes a receptor for nerve growth factor; Cell 1991; 65:189-197
88. Kullander K, Kaplan D, Ebendal T. Two restricted sites on the surface of the nerve growth factor molecule independently determine specific Trk A receptor binding and activation; J Biological Chemistry 1997; 272:9300-9307
89. Lambiase A, Bracci-Laudiero L, Bonini S et al.. Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors; J Allergy Clin Immunol. 1997; 100:408-414
90. Langemark M, Olesen J. Pericranial tenderness in tension headache. A blind, controlled study; Cephalalgia 1987; 7:249-255
91. Langemark M, Bach FW, Jensen TS, Olesen J. Decreased nociceptive flexion reflex in chronic tension-type headache; Arch Neurol 1993; 50:1061-1064
92. Langemark M, Bach FW, Ekman R, Olesen J. Increased cerebrospinal fluid Met-enkephalin immunoreactivity in patients with chronic tension-type headache; Pain 1995; 63:103-107
93. Lavados PM, Tenhamm E. Epidemiology of tension-type headache in Santiago, Chile: a prevalence study; Cephalalgia 1998; 18:552-558
94. Lembeck F. Zur Frage der zentralen Übertragung afferenter Impulse; III. Mitteilung. Das Vorkommen und die Bedeutung der Substanz P in den dorsalen Wurzeln des Rückenmarks; Arch Exp Pathol Pharmacol; 1953; 219:197-213
95. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, Della Valle F, Skaper SD, Leon A. Update of the NGF saga; J Neurol Sci 1995; 130:119-127

96. Lewin GR, Mendell LM. Nerve growth factor and nociception; Trends Neurosci 1993; 16:353-359
97. Lewis T. The blood vessels of human skin and their responses; London: Shaw & Sons Ltd. 1927; 1-322
98. Lewis T. Experiments relating to cutaneous hyperalgesia and its spread through somatic nerves; Clin Sci 1936; 2:373-423
99. Liddell E, Weeks J. Antikörper-Techniken; Labor im Fokus; Spektrum Akademischer Verlag 1996; 87-108
100. Lindsay RM, Harmar AJ. Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons; Nature 1989; 337:362-364
101. Lottspeich F; Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag 1998; 98-102, 658-671
102. Marukawa H, Shimomura T, Takahashi K. Salivary Substance P, 5-Hydroxytryptamine and γ-Aminobutyric Acid Levels in Migraine and Tension-Type Headache; Headache 1996; 36:100-104
103. Mathew NT, Stubits E, Nigam MP. Transformation of episodic migraine into daily headache: analysis of factors; Headache 1982; 22:66-68
104. Mazzotta G, Sarchielli P, Gaggioli A, Gallai V. Study of Pressure Pain and Cellular Concentration of Neurotransmitters Related to Nociception in Episodic Tension-Type Headache Patients; Headache 1997; 37:565-571
105. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ et al.. RAMPs regulate the transport and ligand specifity of the calcitonin-receptor-like receptor; Nature 1998; 28:333-339
106. Millea PJ, Brodie JJ. Tension-Type Headache; Am Fam Physician 2002; 66:797-804
107. Mørk H, Ashina M, Bendtsen L, Olesen J, Jensen. Induction of prolonged tenderness in patients with tension-type headache by means of a new experimental model of myofascial pain; Eur J Neurol 2003; 10:249-256
108. Morton CR, Hutchison WD. Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin; Neuroscience 1989; 31:807-815

109. Nakano T, Shimomura T, Takahashi K, Ikawa S. Platelet substance P and 5-hydroxytryptamine in migraine and tension-type headache; Headache 1993; 33:528-532
110. Nardone R; Tezzon F. The trigemino-cervical reflex in tension-type headache; Eur J Neurol 2003; 10:307-312
111. Neufeld JD, Holroyd KA, Lipchik GL. Dynamic Assessment of Abnormalities in Central Pain Transmission and Modulation in Tension-Type Headache Sufferers; Headache 2000; 40:142-150
112. Ohkubo T, Shibata M, Takahashi H, Inoki R. Roles of substance P and somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord; J Pharmacol Exp Ther 1990; 252:1261-1268
113. Otten U, Ehrhard P, Peck R. Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B lymphocytes; Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:10059-10063
114. Padberg M, de Bruijn SFTM, de Haan RJ, Tavy DLJ. Treatment of chronic tension-type headache with botulinum toxin: A double-blind, placebo-controlled clinical trial; Cephalalgia 2004; 24:675-680
115. Pedersen-Bjergaard U, Nielsen LB, Jensen, Edvinsson L, Jansen I, Olesen J. Calcitonin gene-related peptide, neurokinin A and substance P: effects on nociception and neurogenic inflammation in human skin and temporal muscle; Peptides 1991; 12:333-337
116. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT et al.. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects; Ann Neurol 1994; 36:244-246
117. Prado MA, Evans-Bain B, Oliver KR, Dickerson IM. The role of CGRP-receptor component protein (RCP) in adrenomedullin receptor signal transduction; Peptides 2001; 22:1773-1781
118. Radeke MJ, Misko TP, Hsu C, Herzenberg LA, Shooter EM. Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor; Nature 1987; 325:593-597
119. Rasmussen BK, Jensen, Schroll M, Olesen J. Epidemiology of headache in a general population - a prevalence study; J Clin Epidemiol 1991; 44:1147-1157

120. Rasmussen BK, Jensen, Olesen J. Impact of headache on sickness absence and utilisation of medical services: a Danish population study; J Epidemiol Community Health 1992; 46:443-446
121. Rasmussen BK. Epidemiology and socio-economic impact of headache; Cephalagia 1999; 19:20-23
122. Rasmussen BK. Epidemiology of headache; Cephalalgia 2001; 21:774-777
123. Reinert A, Kaske A, Mense S. Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle; Exp Brain Res 1998; 121:174-180
124. Relja M. Treatment of tension-type headache by local injection of botulinum toxin; Eur J Neurol 1997; 4:71-73
125. Relja M, Korsic M. Treatment of tension-type headache by injections of botulinum toxin type A: a double-blind placebo controlled study; Neurology 1999; 52:A203
126. Relja M, Telarović S. Botulinum toxin in tension-type headache; J Neurol 2004; 251:I/12-I/14
127. Rollnik JD, Tanneberger O, Schubert M, Schneider U, Dengler R. Treatment of chronic tension-type headache with botulinum toxin type A: A double-blind, placebo-controlled study; Headache 2000; 40:300-305
128. Saldanha G, Hongo J, Plant G, Acheson J, Levy I, Anand P. Decreased CGRP, but preserved Trk A immunoreactivity in nerve fibres in inflamed human superficial temporal arteries; J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; 66:390-392
129. Sanin LC, Mathew NT, Bellmeyer LR, Ali S. The International Headache Society (IHS) Headache Classification as applied to a headache clinic population; Cephalalgia 1994; 14:443-446
130. Santambrogio L, Benedetti M, Chao MV et al.. Nerve growth factor production by lymphocytes; J Immunol 1994; 153:4488-4495
131. Sarchielli P, Alberti A, Russo S et al.. Nitric oxide pathway, Ca^{2+}, and serotonin content in platelets from patients suffering from chronic daily headache; Cephalalgia 1999; 19:810-816

132. Sarchielli P, Alberti A, Floridi A, Gallai V. Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients; Neurology 2001; 57:132-134
133. Schmitt WJ, Slowey E, Fravi N, Weber S, Burgunder J-M. Effect of botulinum toxin A injections in the treatment of chronic tension-type headache: A double-blind, placebo-controlled trial; Headache 2001; 41:658-664
134. Schulte-Mattler WJ, Wieser T, Zierz S. Treatment of tension-type headache with botulinum toxin: a pilot study; Eur J Med Res 1999; 4:183-186
135. Schwartz BS, Stewart WF, Simon D, Lipton RB. Epidemiology of tension-type headache; JAMA 1998; 279:381-383
136. Shehab SA, Atkinson ME. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) increases in the spinal cord after peripheral axotomy of the sciatic nerve originate from primary afferent neurons; Brain Res 1986; 372:37-44
137. Silberstein SD, Lipton RB, Solomon S, Mathew N. Classification of daily and near-daily headaches: proposed revisions to the IHS criteria; Headache 1994; 34:1-7
138. Silberstein SD, Lipton RB, Sliwinski M. Classification of daily and near-daily headaches: field trial of revised IHS criteria; Neurology 1996; 47:871-875
139. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A et al.. Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-κB site on its promoter; PNAS 2003; 100:2957-2962
140. Sluka KA, Westlund KN. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats; Pain 1993; 55:367-377
141. Smeyne RJ, Klein R, Schnapp A et al.. Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene; Nature 1994; 368:246-249
142. Solomon S, Lipton RB, Newman LC. Evaluation of chronic daily headache–comparison to criteria for chronic tension-type headache; Cephalalgia 1992; 12:365-368
143. Springer J, Geppetti P, Fischer A, Groneberg DA. Calcitonin gene-related peptide as inflammatory mediator; Pulm Pharmacol Ther 2003; 16:121-130

144. Srikiatkhachorn A, Tarasub N, Govitrapong P. Acetaminophen-induced antinociception via central 5-HT(2A) receptors; Neurochem Int 1999; 34:491-498
145. Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J. Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer´s patches, mesenteric lymph nodes and spleen; J Immunol 1986; 136:152-126
146. Steenbergh PH, Höppener JWH, Zandberg J, Lips CJM, Jansz HS. A second human calcitonin/CGRP Gene; FEBS 1985; 183:403-407
147. Thoenen H, Barde YA. Physiology of Nerve Growth Factor; Physiol. Rev. 1980; 60:1284-1335
148. Thoenen H, Bandtlow C, Heumann R. The physiological function of nerve growth factor in the central nervous system: Comparison with the periphery; Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol 1987; 109: 145-178
149. Thorpe LW, Perez-Polo JR. The influence of nerve growth factor on the in vitro proliferative response of rat spleen lymphocytes; J Neurosci Res 1987; 18:134-139
150. Tiseo PJ, Adler MW, Liu-Chen LY. Differential release of substance P and somatostatin in the rat spinal cord in response to noxious cold and heat; effect of dynorphin A(1-17); J Pharmacol Exp Ther 1990; 252:539-545
151. Torelli P, Jensen, Olesen J. Physiotherapy for tension-type headache: a controlled study; Cephalalgia 2004; 24:29-36
152. Torica M, Bracci-Laudiero L, Lucibello M et al.. Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes; Cell 1996; 85:345-356
153. Uddman R, Edvinsson L, Jansen I et al.. Peptide-containing nerve fibres in human extracranial tissue: a morphological basis for neuropeptide involvement in extracranial pain; Pain 1986; 27:391-399
154. Ulrich V, Russell MB, Jensen, Olesen J. A comparison of tension-type headache in migraineurs and non-migraineurs: a population-based study; Pain 1996; 67:501-506

155. Valverde O, Mico JA, Maldonado R, Mellado M, Gilbert-Rahola J. Participation of opioid and monoaminergic mechanisms on the antinociceptive effect induces by tricyclic antidepressants in two behavioural pain test in mice; Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1994; 18:1073-1092
156. Varon S, Nomura J, Shooter EM. The isolation of the mouse nerve growth factor protein in a high molecular weight form; Biochemistry 1967; 6:2202-2209
157. Vernon H, McDermaid CS, Hagino C. Systematic review of randomized clinical trials of complementary/ alternative therapies in the treatment of tension-type and cervicogenic headache; Compl Therap Med 1999; 7:142-155
158. Vigna SR. The role of the amino-terminal domain of tachykinins in neurokinin-1 receptor signaling and desensitization; Neuropeptides 2003; 37:30-35
159. Weihe E, Schäfer MK, Nohr D, Persson S. Expression of neuropeptides, neuropeptide receptors and neuropeptide processing enzymes in spinal neurons and peripheral non-neural cells and plasticity in models of inflammatory pain. In: Hokfelt T, Schaible HG, Schmidt RF, editors. Neuropeptides, nociception and pain. London: Chapman & Hall, 1994:43-69
160. Wheeler AH. Botulinum Toxin A, Adjunctive therapy for refractory headaches associated with pericranial muscle tension; Headache 1998; 38:446-471
161. Willis WD Jr.. Dorsal root potentials and dorsal rot reflexes: a double-edged sword; Exp Brain Res 1999; 124: 295-421
162. Wimalawansa SJ. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily; Crit Rev Neurobiol 1997;11:167-239.
163. Woolf CJ, Safieh-Garabedian B, Ma QP. Nerve growth factor contributes to the generation of inflammatory sensory hypersensitivity; Neuroscience 1994; 62:327-331
164. Zwart JA, Dyb G, Holmen TL, Stovner LJ, Sand T. The prevalence of migraine and tension-type headaches among adolescents in Norway. The Nord-Trøndelag Health Study (Head-HUNT-Youth), a large population-based epidemiological study; Cephalalgia 2004; 24:373-379
165. http://retro.mta-labor.info/cms/fachbereiche/histo/immunhisto/avidin.php

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicysäure
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CGRP	Calcitonin gene-related Peptide
CL-R	CL-Rezeptor
CRLR	Calcitonin receptor-like-Rezeptor
CTTH	chronic tension-type headache
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
HC	Hemicrania continua
IHS	International Headache Society
NDPH	newly daily persistent headache
NF-κB	Nuclear factor κB
NGF	Nerve Growth Factor
NK-1R	Neurokininrezeptor
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NT-3, -4, -5	Neurotrophin-3, -4, -5
PCM	Paracetamol
RAMP1, -2, -3	receptor activity-modifying protein 1, -2, -3
RCP	CGRP receptor component protein
SP	Substanz P
TM	transformed migraine
TTS	Total tenderness score
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
Trk A	Tyrosinkinase A
ZNS	Zentrales Nervensystem
PNS	Peripheres Nervensystem
NKA	Neurokinin A
NKB	Neurokinin B
PBS	Phosphate-buffered saline

Tab. 6: Alter von Patienten und Kontrollen

Kontr. Alter	Anzahl
22	3
23	3
24	2
28	3
30	1
32	3
33	1
34	2
38	1
40	1
43	1
44	1
45	2
46	2
47	2
49	1
50	2
52	2
53	2

	Kontrollen	Patienten
Summe	35	46
Min.	22	26
Max.	53	71
Mittelw.	36,97	49,15
Stand.abw.	10,89	11,43

Pat. Alter	Anzahl
26	1
28	1
29	1
32	1
33	1
34	2
36	1
39	1
40	1
42	2
43	2
44	2
45	3
49	3
50	1
51	2
52	2
53	2
54	2
55	1
56	1
59	2
60	4
61	2
63	1
64	1
65	1
66	1
71	1

Tab. 7: Konzentrationen von NGF bei Gesunden zu den verschiedenen Uhrzeiten

Name	8.00 Uhr	12.00 Uhr	16.00 Uhr	00.00 Uhr
H.T.	53,5	58	55,8	54,4
O.S.	59,4	49,8	51,1	61,7
R.F.	66,4	66,4	63	75,8
H.H.	648,3	655	648,3	642
C.T.	381,7	373,7	380,8	378,3
W.L.	902,8	814,5	789,6	911,8
S.	57,3	59,2	80,7	86,2
R.	27,5	39,2	55,7	48
T.M.	1	1	31,3	1
W.R.	1	1	1	1
A.	1	1	1	1
D.	1	1	31,3	31,3
S.N.	1	1	31,3	12,6
H.F.	1	1	1	31,3
K.I.	1	1	1	1
B.F.	1	1	1	1
Mittelw.	137,8	132,7	139,0	146,2
St.abw.	269,8	253,7	245,2	267,0
Min.	1	1	1	1
Max.	902,8	814,5	789,6	911,8

Tab. 8: Mittelwerte der zirkadianen Messungen von NGF

Tages - zeit	nach Geschlechtern getrennt		für beide Geschlechter zusammengefasst
	Geschlecht	Mittelwerte +/- Standardabweichung (pg/ml)	Mittelwerte+/- Standardabweichung (pg/ml)
8.00	w	128.9 +/- 313.9	137.8 +/- 269.8
	m	146.7 +/- 239.4	
12.00	w	118.1 +/- 282.8	132.7 +/- 253.7
	m	147.3 +/- 139.8	
16.00	w	128.7 +/- 268.5	139.0 +/- 245.2
	m	149.3 +/- 237.8	
00.00	w	143.9 +/- 311.9	146.2 +/- 267.0
	m	148.4 +/- 235.5	

Tab. 9: Konzentration von NGF, SP und CGRP; Normalkollektiv

Name	Alter	Geschl.	SP (pg/ml)	NGF (ng/ml)	CGRP (ng/ml)	Name
H.T.	24	M	34.3	53.5	5.531	H.T.
O.S.	23	M	59.3	59.4	3.125	O.S.
R.F.	24	W	11.5	66.4	42.695	R.F.
H.H.	28	M	33.8	648.3	19.560	H.H.
C.T.	23	M	39.3	381.7	9.685	C.T.
W.L.	22	W	71.3	902.8	9.387	W.L.
S.	30	W	49.4	57.3	8.187	S.
R.	32	M	100	27.5	2.415	R.
L.E.	43	W	26.4	125.8	6.657	LE
H.M.	45	W	50.3	376.9	5.876	H.M.
DÖ	50	M	63.7	252.5	0.547	DÖ
I.K.	23	W	31.7	226.6	3.489	I.K.
W.H.	20	W	66.6	81.3	1.569	W.H.
T.M.	22	W	34.3	1	7.520	T.M.
W.R.	52	M	61.2	1	1.946	W.R.
A.	34	M	40.7	1	1.782	A.
D.	32	W	53.6	1	5.855	D.
S.N.	32	W	50	1	2.537	S.N.
H.F.	22	W	28	1	7.210	H.F.
K.I.	28	W	31	1	3.590	K.I
B.F.	34	M	38.7	1	2.000	B.F.
SP	40	W	42.9	1	10.265	SP
SC	53	W	99.9	31.3	16.987	SC
W-F.	52	W	26.1	1	5.093	W-F.
MI	38	M	126.5	1	5.196	MI
BU	28	W	62	14.5	4.978	BU
WE	44	W	57.6	1	3.892	WE
HA	33	W	48.4	1	3.550	HA
MÜ	47	W	54.9	1	1.033	MÜ
RO	47	W	64.7	1	3.826	RO
ST	49	W	45.3	1	5.340	ST
DI	46	W	33.8	1	6.731	DI
YI	45	W	108.1	1	6.682	YI
S-M.	50	W	125	1	8.826	S-M.
SH	53	W	53.9	1	3.969	SH
AL	46	W	73.2	1	5.555	AL

Tab. 10: Konzentrationen von NGF, SP und CGRP; Patienten

Name	Alter	Geschl.	SP (pg/ml)	NGF (ng/ml)	CGRP (ng/ml)	Name
VE	29	W	123.7	1	1.250	VE
Z-K	44	W	32.5	73	3.672	Z-K.
AV	50	W	33.4	97.4	4.285	AV
024 E.B.	54	W	65.8	1	5.594	024 E.B.
022 H.G.	51	M	38.7	1	1.832	022 H.G.
021 W.L.	51	M	50.5	10.3	6.354	021 W.L.
UR	53	W	79.8	1	4.738	UR
LA	34	W	19.2	1	2.780	LA
YA	61	W	53.9	1	1.840	YA
JU	71	W	57.7	1	10.872	JU
HI	34	M	27.3	1	2.955	HI
AR	49	W	36.5	1	1.967	AR
HO	53	W	32.6	1	6.892	HO
005 R.B.	56	W	120.8	238.7	25.879	005 R.B.
008 H.A.	60	W	95.9	1	8.807	008 H.A.
006 M.L.	45	W	181.6	1	9.661	006 M.L.
007 A.P.	45	M	38.4	2.5	7.115	007 A.P.
094 H.W.	52	W	52.8	2.3	11.789	094 H.W.
101S.J.	26	W	94.4	31.8	22.618	101 S.J.
102 E.S.	32	M	32.3	469.2	9.980	102 E.S.
122 U.P.	60	W	58.7	363.3	14.891	122 U.P.
106 U.R.	42	M	78.2	1	4.153	106 U.R.
104 M.V.	55	W	28.4	1	16.404	104 M.V.
105 F.Z.	64	M	86.9	1	14.390	105 F.Z.
039 M.K.	44	W	114.4	1	9.786	039 M.K.
107 H.H.	60	W	108.4	1	11.854	107 H.H.
114 E.S.	65	W	143.5	4.7	9.441	114 E.S.
115 H.J.	63	M	138.5	4.7	6.607	115 H.J.
040 K.K.	49	W	140.2	5.1	13.785	040 K.K.
037 F.M.	59	M	110.6	22.5	3.932	037 F.M.
058 A.R.	61	M	77.3	1	24.501	058 A.R.
129 K.P.	28	W	58.2	24.1	8.850	129 K.P.
128 I.L.	66	W	109.4	13	4.087	128 I.L.
126 S.C.	39	M	152.8	7.3	10.291	126 S.C.
116 U.M.	60	W	135.7	1	4.160	116 U.M.
124 P.H.	36	W	63.9	15.5	12.265	124 P.H.
123 H.M.	59	W	103.4	22.6	8.886	123 H.M.
121 R.O.	45	M	81.1	22.6	1.472	121 R.O.
127 R.T.	49	M	129.7	1	9.939	127 R.T.
108 P.B.	43	W		31.3	30.317	108 P.B.
113 H.S.	52	M		1	9.885	113 H.S.
103 E.T.	43	W		1	8.031	103 E.T.
038 U.S.	40	W		1	9.800	038 U.S.
057 M.G.	54	M		12.2		
059 M.C.	42	M		25.2		
060 J.C.	33	W		140.7		

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in ihrem experimentellen Teil von Oktober 2000 bis Mai 2006 im Labor der Abteilung Neurologie des Universitätsklinikums Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. F. Blaes durchgeführt.
Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in de Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir ausgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. F. Blaes für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und seinen wissenschaftlichen Rat.

Herrn Prof. Dr. med. M. Kaps für die freundliche Aufnahme in seinem Institut.

Frau C. Roth und Frau H. Weiser-Fichtner für die hilfsbereite Einarbeitung im Labor.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Michael für den liebevollen Beistand während der Schreibphase dieser Arbeit, sowie meiner Schwester Hanna und meinen Eltern für den Beistand und das Korrekturlesen.