

**Wirkung von TRPA1-Rezeptor-Agonisten
bei der meningealen Nozizeption
und Kopfschmerzentstehung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Stephanie Kerstin Stöckl

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
und -Biochemie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

und

dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie der
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Betreuer: Prof. Dr. K. Meßlinger

**Wirkung von TRPA1-Rezeptor-Agonisten
bei der meningealen Nozizeption
und Kopfschmerzentstehung**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Stephanie Kerstin Stöckl
Tierärztin aus Öhringen

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. K. Meßlinger

Tag der Disputation: 13.06.2016

Meinen Eltern und Thomas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Klassifikation von Kopfschmerzen	2
1.2	Charakteristika der Migräne	2
1.3	Migräne im Alltag – Triggerfaktoren	3
1.4	Pathophysiologie	4
1.4.1	Anatomie des trigeminovaskulären Systems	5
1.4.2	Schmerzentstehung	6
1.4.3	Relevante Botenstoffe	6
1.4.4	TRPA1	13
1.5	Tiermodelle in der Kopfschmerzforschung	16
1.5.1	Messung neuronaler Aktivität im spinalen Trigeminuskern <i>in vivo</i>	18
1.5.2	Messung neuronaler Aktivität meningealer Afferenzen <i>in vitro</i>	20
1.5.3	Messung des meningealen Blutflusses <i>in vivo</i>	21
2	Fragestellungen	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Chemikalien	25
3.1.2	Lösungen	26
3.1.3	Geräte und Laborbedarf	29

3.1.4	Software	32
3.2	Methoden	33
3.2.1	<i>In vivo</i> Experimente	33
3.2.2	<i>In vitro</i> Experimente	53
3.3	Auswertung und Statistik	59
3.3.1	Auswertung der <i>in vivo</i> Experimente	59
3.3.2	Auswertung der <i>in vitro</i> Experimente	60
3.3.3	Statistik	60
4	Ergebnisse	61
4.1	Charakterisierung der abgeleiteten Neurone im <i>in vivo</i> Modell	61
4.2	Einfluss der mechanischen Stimulation der Dura mater auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern	63
4.3	Wirkung des sGC-Aktivators GTN auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern	64
4.4	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern	66
4.4.1	Wirkung von Nitroxyl bei topischer Applikation auf die Dura mater	66
4.4.2	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone bei topischer Applikation auf den Hirnstamm	68

4.5	Wirkung von Senföl auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone	70
4.5.1	Wirkung von Senföl bei topischer Applikation auf die Dura mater	70
4.5.2	Wirkung von Senföl bei topischer Applikation auf den Hirnstamm	72
4.6	Wirkung von Acrolein auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone	74
4.6.1	Wirkung von Acrolein bei topischer Applikation auf die Dura mater	74
4.6.2	Wirkung von Acrolein bei Injektion ins Ganglion trigeminale	76
4.6.3	Wirkung von Acrolein bei topischer Applikation auf den Hirnstamm	78
4.6.4	Wirkung von Acrolein auf den meningealen Blutfluss	80
4.7	Charakterisierung meningealer Afferenzen im <i>in vitro</i> Modell	82
4.8	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen im <i>in vitro</i> Modell	84
4.8.1	Stabilität der Kontrollen und Einfluss des Vehikels	84
4.8.2	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei C57Bl6 Mäusen	84
4.8.3	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei TRPA1-Knockout-Mäusen	87
4.8.4	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei TRPA1-/TRPV1-Doppelknockout-Mäusen	89

4.8.5	Vergleich der Aktivitätssteigerung zwischen den drei Genotypen	91
5	Diskussion	94
5.1	Wirkung einer Langzeitinfusion von Nitroglycerin (GTN)	94
5.2	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminskern <i>in vivo</i>	97
5.3	Wirkung der TRPA1-Agonisten Senföl und Acrolein auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminskern <i>in vivo</i>	99
5.4	Wirkung des TRPA1-Agonisten Acrolein auf den meningealen Blutfluss	100
5.5	Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen im <i>In-vitro</i> -Modell	103
5.6	Die Rolle des TRPA1-Rezeptor-Kanals und seiner Agonisten bei der meningealen Nozizeption und der Kopfschmerzentstehung	105
6	Zusammenfassung	108
7	Summary	110
8	Literaturverzeichnis	112
9	Danksagung	125

10 Erklärung _____ **126**

11 Anhang _____ **127**

Verzeichnis der Abkürzungen

15d-PGJ ₂	15-deoxy-Prostaglandin-J ₂
AgCl	Silberchlorid
AP	Aktionspotential
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Angeli's Salt
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CGRP ₈₋₃₇	Calcitonin Gene-Related Peptide ₈₋₃₇
CLR	Calcitonin receptor-like receptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRG	Dorsal Root Ganglia
DTT	Dithiothreitol
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAU	Friedrich-Alexander-Universität
GTN	Glyceroltrinitrat
IASP	International Association for the Study of Pain
i. g., i. v.	intraganglionär, intravenös
IHS	International Headache Society
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KL	Kreislauf (des Gewebebads <i>in vitro</i>)
LED	Licht-emittierende Diode
min	Minuten
M	molar (mol/L)
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ S	Natriumsulfid
nNOS	neuronale NO-Synthase
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Konzentration
RAMP	Receptor activity-modifying protein

RCP	Receptor component protein
s. c.	subcutan
SIF	synthetische interstitielle Flüssigkeit
SEM	standard error of the mean
SÖ	Senföl
TRPA1	Transient receptor potential channel ankyrin 1
TRPM8	Transient receptor potential channel melastatin 8
TRPV1	Transient receptor potential channel vanilloid 1
TRPV2	Transient receptor potential channel vanilloid 2
TVS	trigeminovaskuläres System
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Primäre Kopfschmerzerkrankungen wie die Migräne zählen weltweit zu den häufigsten neurologischen Leiden, werden aber in ihrer sozioökonomischen Bedeutung nach wie vor unterschätzt. In Europa liegt die durchschnittliche Einjahres-Prävalenz aller Kopfschmerzerkrankungen von Erwachsenen laut WHO bei 56,1% (WHO 2011), wobei in allen Ländern deutlich mehr Frauen als Männer betroffen sind (Rasmussen, 2001; Buse *et al.*, 2013). Abgesehen von den zu erleidenden Schmerzen für die Betroffenen sind die sekundären Folgen für die Lebensqualität im privaten und beruflichen Umfeld, aber auch die Kosten, die durch Diagnostik und Behandlung der Migräne sowie durch Arbeitsausfälle entstehen, immens.

In jahrzehntelanger Forschung formulierten Wissenschaftler verschiedene vielversprechende Hypothesen zur Migräneentstehung, doch bis heute ist daraus keine widerspruchsfreie Theorie entstanden, die alle Beobachtungen berücksichtigt. Ein Grund dafür mag sein, dass die konkreten pathophysiologischen Mechanismen der meningealen Nozizeption, die der Entstehung primärer Kopfschmerzen zu Grunde liegen, noch weitgehend ungeklärt sind. Das ist vielleicht auch eine der Ursachen dafür, dass für ein Drittel aller Patienten keine ausreichend wirksame Therapie zur Verfügung steht oder diese mit erheblichen unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist (Villalón *et al.*, 2003).

Da die anatomisch-physiologischen Grundlagen der meningealen Nozizeption unter den Säugetieren weitgehend übereinstimmen, ist es möglich, mutmaßliche Faktoren der Kopfschmerzentstehung am Tier zu untersuchen (Kopfschmerzmodell, siehe unten) und neue Hypothesen im Tierexperiment auf ihre Plausibilität zu prüfen. Aus dieser Argumentation folgt andererseits die Annahme, dass auch Tiere an Kopfschmerzen leiden können, auch wenn dies heutzutage in der Veterinärmedizin noch keine Beachtung erfährt. Falls Tiere Kopfschmerzen haben, zeigt sich dies allerdings kaum in eindeutigen

äußerlich erkennbaren Symptomen, wie es etwa bei Schmerzen in der Pfote durch eine klassifizierbare Lahmheit der Fall ist.

Diese Arbeit soll dazu beitragen, aktuelle Fragestellungen der Kopfschmerzentstehung durch Entschlüsselung der komplexen pathophysiologischen Vorgänge der meningealen Nozizeption zu klären.

1.1 Klassifikation von Kopfschmerzen

Nach der Klassifikation der International Headache Society (IHS) werden drei übergeordnete Gruppen von Kopfschmerzerkrankungen unterschieden. In Gruppe 1 fallen alle primären Kopfschmerzen wie Migräne, Cluster-Kopfschmerz und Spannungskopfschmerz, bei welchen der Kopfschmerz selbst die Erkrankung darstellt und deren konkrete Ursache weitgehend unbekannt ist. Sekundäre Kopfschmerzen werden in Gruppe 2 zusammengefasst. Hier liegt zunächst eine andere primäre somatische Grunderkrankung vor, als deren Begleiterscheinung dann der Kopfschmerz auftritt. Folglich ist die Bandbreite der Klassifikation in dieser Gruppe wesentlich größer; beispielhaft seien genannt: Kopfschmerzen zurückzuführen auf Infektionen, Traumata oder vaskuläre Störungen. Auch der Kopfschmerz durch Medikamentenübergebrauch wird der Gruppe 2 zugeordnet. In die dritte Gruppe werden schließlich kraniale Neuralgien und Gesichtsschmerzen zentraler Ursache sowie andere noch nicht klassifizierte Kopfschmerzen eingeordnet.

1.2 Charakteristika der Migräne

Da die Fragestellungen dieser Arbeit vor allem im Zusammenhang mit der Migräne stehen, soll hiermit auf diese Erkrankung kurz eingegangen werden.

Die IHS unterteilt die Migräne in ihrer Internationalen Klassifikation der Kopfschmerzerkrankungen in zwei Subtypen. Der häufiger vorkommende Subtyp 1 ist die Migräne ohne Aura. Die Kopfschmerzattacken sind wiederkehrend und dauern bis zu 72 Stunden an, wobei die Attackenfrequenz

höher ist als bei der Migräne mit Aura. Der Kopfschmerz ist einseitig, pulsierend, am häufigsten frontotemporal lokalisiert und von mäßiger bis starker Intensität. Der Schmerz verschlimmert sich in der Regel durch körperliche Aktivität und wird häufig von vegetativen Symptomen wie Übelkeit und/oder Photo- und Phonophobie begleitet.

Der Subtyp 2 ist die Migräne mit Aura. Der neurologische Symptomkomplex der Aura bestehend aus fokalen visuellen und/oder sensiblen Störungen und/oder Sprachstörungen tritt dabei in der Regel kurz vor oder zu Beginn des Migränekopfschmerzes auf. Der Schmerzcharakter ist ähnlich wie der bei Migräne ohne Aura.

1.3 Migräne im Alltag – Triggerfaktoren

Migränepatienten stoßen häufig im Laufe ihres Krankheitsgeschehens von selbst oder durch das Führen so genannter Migränetagebücher auf Faktoren aus ihrer Umwelt, die die Entstehung einer Kopfschmerzattacke auslösen, beschleunigen oder intensivieren können. Um diese subjektiven Triggerfaktoren zu bestätigen und als empirische Hinweise auf das pathophysiologische Geschehen der Migräneentstehung zu nutzen, wurden viele epidemiologische Daten an einer großen Anzahl an Migränepatienten erhoben. Bei Frauen wurden als wichtigste Triggerfaktoren ausgelassene Mahlzeiten, Wetteränderungen, Menstruation, Entspannungsphase nach Stress und Müdigkeit identifiziert, bei Männern Müdigkeit, Schlaf, Entspannungsphasen nach Stressperioden und Wetteränderungen (Turner *et al.*, 1995). Vingen *et al.* stellten in ihrer fragebogenbasierten Studie fest, dass Migränepatienten im Vergleich zu anderen Kopfschmerzpatienten am sensibelsten auf die Umweltfaktoren Licht, Lärm, Gerüche, Ernährung und physische Aktivität reagierten (Vingen *et al.*, 1999). In einer brasilianischen Studie an jugendlichen Migränepatienten wurden bei 91% ein oder mehrere Triggerfaktoren festgestellt. Auch hier standen Helligkeit, Wetterumschwung und olfaktorische Eindrücke an erster Stelle (Fraga *et al.*, 2013). Obwohl der Konsum von Alkohol immer wieder als Triggerfaktor diskutiert wird, konnte dies

in einer aktuellen Studie nur für einen sehr geringen Anteil der Migränepatienten bestätigt werden (Panconesi *et al.*, 2013).

Während einige Triggerfaktoren (Stress, unregelmäßige Ernährung, Schlafmangel) nicht sehr migränespezifisch sind und als solche auch von Patienten mit Spannungskopfschmerz angegeben werden, können andere schwerpunktmäßig der Migräne zugeordnet werden, nämlich Rauch, Gerüche, Licht und Wetterumschwung (Spierings *et al.*, 2001). Dem Passivrauchen wird ebenfalls eine eindeutige Triggerrolle zugesprochen (Lima *et al.*, 2011), in einer dänischen Studie von 2010 wird es sogar von 100% der Studienteilnehmer als Triggerfaktor angegeben (Hauge *et al.*, 2011). Tabakrauch enthält unter anderem Stickstoffmonoxid (NO) und Aldehyde wie Acrolein, deren Einfluss auf die meningeale Nozizeption u. a. in dieser Arbeit untersucht wird.

Auch wenn die Studien zum Thema Migräne und Einflussfaktoren aus der Umwelt des Patienten eher empirischen Charakter haben und eine gewisse Subjektivität nicht ausgeschlossen ist, so können sie doch helfen, Ideen und Ansätze zu gewinnen, über welche Systeme des Organismus ein pathophysiologischer Weg bis zum Entstehen des Kopfschmerzes führt bzw. welche Stoffe oder Rezeptoren eine Rolle spielen könnten. In präventiver Hinsicht könnte auch durch Vermeidung der Triggerfaktoren im Arbeitsumfeld den Patienten geholfen werden, indem wenigstens eine Reduktion der Attackenfrequenz erreicht wird (Friedman & De ver Dye, 2009).

1.4 Pathophysiologie

Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz beim Menschen als eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung verbunden ist oder mit den Worten einer solchen beschrieben wird.

Zur Frage wo diese (potentielle) Gewebeschädigung im Bereich des Kopfschmerzes zu suchen sei, führten Ray und Wolff schon im Jahre 1940 die

entscheidenden Schlüsselexperimente durch. Ihre Fragestellung dabei war, welche Reize an welchen anatomischen Strukturen notwendig sind, um Empfindungen im Kopf auszulösen. Sie versuchten dies zu beantworten, indem sie intraoperativ an Patienten nach Trepanation der Schädeldecke die Dura mater und andere intrakranielle Strukturen (v.a. Gefäße) mit mechanischen, chemischen oder elektrischen Stimuli reizten. Die Patienten waren bei Bewusstsein, so dass sie ihre Wahrnehmung wiedergeben konnten. Sie berichteten von schmerzhaften Empfindungen, wenn Arterien der Dura mater, größere arterielle intrazerebrale Gefäße oder der Sinus sagittalis superior gereizt wurden, wobei die Art des Stimulus keine Rolle spielte (Ray & Wolff, 1940). Dies war ein sehr früher Hinweis auf die heute unumstrittene Beteiligung des trigeminovaskulären Systems an der Entstehung von schmerzhaften intrakraniellen Empfindungen.

1.4.1 Anatomie des trigeminovaskulären Systems

Das trigeminovaskuläre System besteht aus den Nervenanteilen des Nervus trigeminus, die aus dem Ganglion trigeminale hervorgehen, und den von diesen innervierten intrakraniellen Gefäßen (Buzzi & Moskowitz, 1992).

Der Nervus trigeminus, der V. Hirnnerv, ist der größte Hirnnerv und verfügt über motorische und sensible Fasern. Er ist dabei auch der Hirnnerv mit dem größten sensiblen Innervationsfeld im Kopfbereich. Das Ganglion trigeminale ist in eine Duplikatur der Dura mater encephali eingelagert. Es enthält alle Perikarien der afferenten (sensiblen) Trigeminafasern außer der der propriozeptiven Afferenzen, die ihre Perikarien im Mittelhirn haben. Distal zweigen die drei Hauptäste des N. trigeminus, der N. ophthalmicus (V1), der N. maxillaris (V2) und der N. mandibularis (V3) ab. Alle drei entsenden dabei zu Beginn Rami meningei an die Dura mater (Nickel, 2003). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten die Nervenfasern der kranialen Dura mater in A δ - und C-Fasern klassifiziert und anhand der vorhandenen Vesikel afferenten oder autonomen Nervenfasern zugeordnet werden (Andres *et al.*, 1987; Messlinger, 1996; Strassman *et al.*, 2004). Die

wichtigsten afferenten Nerven der Dura mater im Bereich der mittleren Schädelgrube sind der Nervus spinosus, der als Ramus meningeus des N. mandibularis die mittlere Schädelgrube innerviert, und der Ramus tentorius des N. ophthalmicus, dessen rezeptive Felder vor allem im Tentorium cerebelli liegen. Durch die enge Verbindung mit dem Plexus caroticus internus werden der N. ophthalmicus und der N. maxillaris auch von sympathischen Fasern begleitet.

Die zur Versorgung der Hirnhäute wichtigste Arterie ist die A. meningea media, die aus der A. maxillaris entspringt, durch das Foramen spinosum in die Fossa cranii media eintritt und sich dort weiter verzweigt.

1.4.2 Schmerzentstehung

Die meningeale Nozizeption ist physiologisch gesehen der entscheidende Prozess bei der Entstehung von Kopfschmerzen. Da das Gehirn selbst nicht über Nozizeptoren verfügt, kann der Schmerz nur durch Aktivierung von Nozizeptoren der umliegenden Gewebe wie den Meningen oder der intrazerebralen Gefäße entstehen, sofern er eine periphere Ursache hat. Von den primären Afferenzen werden die Signale auf sekundäre Neurone im spinalen Trigeminuskern (v. a. im kaudalen Teil des Nucleus spinalis N. trigemini) synaptisch übertragen, deren Aktivierung beim Menschen höchstwahrscheinlich mit Kopfschmerzen einhergeht. Die nozizeptive Information wird dann entlang der medialen Schleife an den kontralateralen Thalamus weitergegeben und zu kortikalen Arealen projiziert, womit der Schmerz als solcher bewusst wird.

1.4.3 Relevante Botenstoffe

Im Bereich der Nervenendigungen können trigeminale Afferenzen als Antwort auf noxische Reize verschiedene Botenstoffe freisetzen. Calcitonin gene-related peptide (CGRP), Substanz P und Neurokinin A sind Neuropeptide, die im Perikaryon synthetisiert werden und durch axonalen Transport zu ihrem Freisetzungsort gelangen. Stickstoffmonoxid (NO) hingegen ist ein lösliches

Gas, dessen Bildung im ganzen Körper durch NO-Synthasen aus L-Arginin katalysiert wird und welches neben vielfältigen anderen Funktionen physiologisch eine wichtige Rolle als Vasodilatator spielt.

CGRP

Das aus 37 Aminosäuren aufgebaute Neuropeptid CGRP entsteht durch alternatives Splicing der mRNA aus demselben Gen, das in den Epithelkörperchen (Nebenschilddrüse) für die Bildung von Calcitonin codiert (Rosenfeld *et al.*, 1983). Somit gehört CGRP zur Calcitonin-Familie, ebenso wie Adrenomedullin und Amylin (Muff *et al.*, 1995). Es können zwei Isoformen des Peptids, das α -CGRP, welches vorwiegend im somatosensorischen Nervensystem vorkommt, und das β -CGRP, das schwerpunktmäßig im enterischen Nervensystem eine Rolle spielt, unterschieden werden (Mulder *et al.*, 1988).

Die Wirkungen von CGRP werden über CGRP-Rezeptoren vermittelt. Diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren setzen sich aus zwei Hauptkomponenten zusammen: Komponente 1 ist der sogenannte Calcitonin receptor-like receptor (CLR), der erst im Zusammenspiel mit Komponente 2, dem Receptor activity modifying protein 1 (RAMP1), spezifisch für CGRP wird (McLatchie *et al.*, 1998). Eine dritte Komponente, das Receptor component protein (RCP), ist ein Polypeptid, dessen Aufgabe die Aktivierung der Signaltransduktionskette des G-Proteins mit nachfolgender Bildung der Adenylatcyclase ist (Arulmani *et al.*, 2004). Letzten Endes ergibt nur die Kombination aller drei Komponenten (CLR, RAMP1 und RCP) einen voll funktionsfähigen CGRP-Rezeptor (Messlinger *et al.*, 2011).

Grundlegende immunhistochemische Untersuchungen an der Ratte zeigten, dass CGRP-immunpositive Fasern vor allem in der Nähe meningealer Gefäße verlaufen (Messlinger *et al.*, 1993). In darauf folgenden Untersuchungen zu Vorkommen und detaillierter Verteilung des CGRP-Rezeptors und seiner Einzelkomponenten im trigeminovaskulären System zeigte sich, dass in der kranialen Dura mater CLR- und RAMP1-Immunreaktivität in arteriellen

Gefäßen, Schwann-Zellen und mononukleären Zellen colokalisiert vorkommen, aber nicht in sensorischen Axonen. Im Ganglion trigeminale fand man eine Koexistenz von CLR- und RAMP1-Immunreaktivität auch in Schwannzellen und Satellitenzellen, in den Neuronen selbst dominierten CLR-immunopositive Strukturen, während RAMP1-Immunreaktivität seltener gefunden wurde. Insgesamt wurde Immunreaktivität für die CGRP-Rezeptorkomponenten hier aber nur in zentralen und nicht in peripheren Axonen gefunden. In der Medulla oblongata konnte immunhistochemisch der funktionelle CGRP-Rezeptor im Gegensatz zu peripheren Strukturen nur in neuronalen Strukturen gefunden werden und nicht in Astrozyten. Hier stellte sich CLR- zusammen mit RAMP1-Immunreaktivität in oberflächlichen Schichten des spinalen Trigeminuskerns dar, jedoch nur in Nervenfasern und nicht in den Zellkörpern, so dass davon ausgegangen werden kann, dass auf zentraler Ebene CGRP freisetzende, primäre afferente Nervenendigungen mit CGRP-Rezeptor exprimierenden Axonen kommunizieren (Lennerz *et al.*, 2008; Messlinger *et al.*, 2011).

CGRP wird eine tragende Rolle bei der Entstehung primärer Kopfschmerzkrankungen zugesprochen. Dabei steht zunächst seine stark vasodilatierende Wirkung an intrakraniellen Gefäßen im Vordergrund (Edvinsson *et al.*, 1987). Dass eine Aktivierung nozizeptiver Afferenzen zu CGRP-Freisetzung und in der Folge zu Vasodilatation und Erhöhung des Blutflusses in meningealen Gefäßen führt, konnte in mehreren tierexperimentellen Studien dargelegt werden (Goadsby *et al.*, 1988; Messlinger *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997). Hinweise, dass CGRP zur Entstehung primärer Kopfschmerzen beitragen könnte, lieferten aber vor allem auch klinische Studien. So stellte man bei Migränepatienten während akuter Kopfschmerzattacken erhöhte CGRP-Spiegel im Plasma der V. jugularis fest. CGRP erreichte sein Maximum in der ersten Stunde der Kopfschmerzattacke und kam nach deren Abklingen wieder annähernd auf das Basalniveau zurück (Goadsby *et al.*, 1990; Sarchielli *et al.*, 2000). Da man daraus noch nicht schließen kann, ob der erhöhte CGRP-Level Ursache oder Folge des

Kopfschmerzes ist, wurde in anderen Experimenten CGRP verabreicht. Dabei induzierte die Infusion von CGRP bei allen Migränepatienten Kopfschmerzattacken, die bei einem Teil der Patienten in ihrer Symptomatik der Migräne ähnelten, während in der Kontrollgruppe (Placebogruppe) nur ein Patient leichte Kopfschmerzen verspürte (Lassen *et al.*, 2002). Die CGRP-induzierten Kopfschmerzen ließen sich durch vorherige Gabe des CGRP-Antagonisten Olcegepant (BIBN4096BS) verhindern (Petersen *et al.*, 2005). Schließlich konnte in klinischen Phase-III Studien die therapeutische Wirksamkeit der CGRP-Antagonisten Olcegepant und Telcagepant (MK-0974) bei spontanen Migräneattacken gezeigt werden (Olesen *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2008). Die Entwicklung eines marktfähigen Medikamentes wurde jedoch aufgrund von Nebenwirkungen (Transaminasenerhöhung), die sich bei häufiger Gabe von Telcagepant zeigten, eingestellt. Es muss also an diesem anscheinend wirksamen Ansatzpunkt der CGRP-Rezeptorhemmung weiter geforscht werden, um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

NO/NO⁻

Stickstoffmonoxid (NO) spielt als bioaktives Molekül im Säugetierorganismus bei verschiedenen physiologischen Vorgängen eine Rolle, ist aber gleichzeitig ein hochreaktives Radikal, das auf Zellen als schädliches Agens wirken kann, und wird deshalb auch als Janus-Molekül bezeichnet. Da es sich um ein sehr kleines Molekül handelt, das nicht in Vesikeln gespeichert wird und noch dazu weder hydro- noch lipophob ist, kann es sich durch Diffusion sowohl intrazellulär als interzellulär frei bewegen. In seiner Eigenschaft als Radikal hat es allerdings eine kurze Halbwertszeit und oxidiert besonders in Anwesenheit von Sauerstoff rasch zu Nitrit und Nitrat.

Der Entdecker des als Endothelium-derived relaxing factor beschriebenen Signalmoleküls, der Nobelpreisträger Robert F. Furchgott, löste in den 1980er Jahren mit seinem Fund eine Welle von Experimenten mehrerer Arbeitsgruppen aus, die u. a. belegen konnten, dass es sich bei dem Molekül um NO als potenten Vasodilatator handelt (Ignarro, 1989; Feelisch *et al.*, 1994;

Furchgott, 1999). Inzwischen ist eine ganze Reihe weiterer Funktionen des Radikals belegt worden. Neben der Beteiligung an der Immunabwehr (Hibbs *et al.*, 1988; MacMicking *et al.*, 1997) und seiner antiapoptotischen Wirkung (Dimmeler & Zeiher, 1999) wird NO auch eine Rolle als Neurotransmitter zugesprochen (Brenman & Bredt, 1996; Garthwaite, 2008).

NO wird durch NO-Synthasen enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert. Es werden 3 Isoformen des Enzyms unterschieden, die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die von Neuronen gebildete neuronale NO-Synthase (nNOS) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die bei Entzündungen vermehrt gebildet wird. Als bekannter Rezeptor für NO fungiert vor allem die intrazelluläre lösliche Guanylatcyclase (sGC), die eine cGMP-abhängige Signalkaskade in Gang setzt, in deren Folge es u.a. zu Vasodilatation kommt. Daneben gibt es noch einen zweiten Signalweg, in dem NO reversibel an Cysteinreste von Proteinen bindet und so deren Funktion direkt verändert (Hess *et al.*, 2005). Der Mechanismus, der für die Vermittlung der Nozizeption in zentralen spinalen Neuronen entscheidend ist, scheint jedoch hauptsächlich auf dem sGC-cGMP-Signalweg zu beruhen (Meller & Gebhart, 1993). In der Peripherie wird NO-abhängige Nozizeption vermutlich unter Beteiligung von TRPA1- und TRPV1- Rezeptorkanälen vermittelt (Miyamoto *et al.*, 2009).

Ähnlich wie CGRP wird auch NO eine wichtige Rolle in der komplexen Pathophysiologie primärer Kopfschmerzerkrankungen zugesprochen. Bereits 1966 wurde die (allerdings anekdotisch schon viel früher bekannte) Beobachtung veröffentlicht, dass Arbeiterinnen einer Sprengstofffabrik, die unter anderem auch mit Nitroglycerin arbeiteten, vermehrt unter Kopfschmerzen und Migräne litten (Trainor & Jones, 1966). Nitroglycerin, chemisch genauer als Glyceroltrinitrat (GTN) bezeichnet, imitiert im Körper die Wirkungen von NO. Im Laufe der Jahre wurden die damals vermuteten Zusammenhänge schließlich wissenschaftlich erforscht und bestätigt. So wurden erhöhte Nitrit-Plasmaspiegel bei Migränepatienten während akuter Anfälle gemessen (Sarchielli *et al.*, 2000). Während der i.v. Infusion von GTN

wurden bei den meisten Migränepatienten, aber nur bei wenigen gesunden Probanden, leichte Kopfschmerzen ausgelöst. Während der Kopfschmerz bei gesunden Probanden rasch wieder verschwand, erlitten die Migränepatienten mehrere Stunden nach der Infusion eine weitere Kopfschmerzphase stärkerer Ausprägung, welche bei 50% der Probanden die Diagnosekriterien der IHS für Migräne erfüllte (Christiansen *et al.*, 1999).

Die Frage, ob NO in der Lage ist, CGRP freizusetzen, wurde von Strecker *et al.* (2002) *in vitro* untersucht. Am Halbschädelpräparat der Ratte (s. Methoden) konnte dabei ein signifikanter CGRP-Release sowohl durch Stimulation des Duragewebes mit dem NO-Donator Diethylamin-NONOate als auch durch Stimulation mit NO-Gas provoziert werden. Um die vasodilatative Wirkung des freigesetzten CGRP auch am lebenden Organismus zu zeigen, wurde der meningeale Blutfluss mittels Laser-Doppler-Flowmetrie registriert. Nach der topischen Applikation von NONOate und anderen NO-Donatoren (S-nitroso-N-Acetylpenicillamin oder N-ethyl-2-(1-ethyl-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino)-Ethenamine) ergab sich ein signifikanter Anstieg des Blutflusses, der nach Blockade der CGRP-Rezeptoren (vorherige Gabe von CGRP₈₋₃₇, des klassischen CGRP-Rezeptorantagonisten) vermindert wurde (Strecker *et al.*, 2002).

In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl CGRP als auch NO vasodilatative Effekte produzieren und Migräne auslösen können, läge die Schlussfolgerung nahe, dass der pathophysiologische Mechanismus der Migräneauslösung in der Vasodilatation zu finden sein müsse, doch spricht dagegen, dass andere Stoffe mit gefäßerweiternder Wirkung keine Migräne auszulösen vermögen. Das vasoaktive intestinale Polypeptid (VIP) hat beispielsweise ebenfalls eine beträchtliche vasodilatative Wirkung auf intrakranielle Gefäße und löst dennoch keine migräneartigen Kopfschmerzen aus (Rahmann *et al.*, 2008). Gegen diese einfache Erklärung spricht weiterhin, dass der NO-induzierte Kopfschmerz in seiner maximalen Ausprägung erst geraume Zeit nach dem nur sehr kurzfristig auftretenden vasodilatativen Effekt einsetzt (Messlinger, 2009).

In neuen Experimenten, welche die Erkenntnisse von Strecker et al. modifizieren und erweitern, konnte nun gezeigt werden, dass die CGRP-Freisetzung und Blutflusssteigerung nicht durch NO zustande kommt, sondern durch Nitroxyl (NO^- , HNO): Der NO-Donator NONOate ist weitgehend unwirksam, während der Nitroxyl-Donator Angeli's Salt (AS) CGRP freisetzt und den Blutfluss erhöht (Eberhardt *et al.*, 2014). Es wird dabei vermutet, dass die Wirkung von Nitroxyl hierbei vermutlich durch die Aktivierung von TRPA1-Rezeptorkanälen zustande kommt.

Bei Nitroxyl handelt es sich um eine noch verhältnismäßig wenig erforschte reaktive Stickstoffspezies (Fukuto *et al.*, 2008; Smulik *et al.*, 2014). HNO kann nicht direkt in biologischen Systemen untersucht werden, da es sofort in N_2O und H_2O zerfällt, so dass für Experimente nur die Möglichkeit besteht, von einem HNO-Donator Gebrauch zu machen. Der am häufigsten verwendete HNO-Donator ist Angeli's Salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$) (Fukuto *et al.*, 2008). Angeli's Salt (AS) wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

HNO reagiert bevorzugt mit Thiolgruppen, wobei die Besonderheit darin liegt, dass dabei sowohl Disulfide als auch Sulfonamide entstehen können. HNO kann aber auch mit NO oder O_2 reagieren, wobei bei letzterer Reaktion vor allem Peroxynitrit (ONOO^-) entsteht (Smulik *et al.*, 2014). Wie NO führt auch HNO zu einer Neuropeptidfreisetzung (u. a. CGRP) aus sensorischen Nervenfasern (Fukuto *et al.*, 2008).

1.4.4 TRPA1

In den letzten Jahren rückte die Gruppe der TRP-Rezeptorkanäle, deren Abkürzung sich aus der Familie der „Transient receptor potential channels“ ableitet, zunehmend in den Fokus der Schmerzforschung, da sich herausstellte, dass diese in den meisten Organen und Geweben bei der Perzeption noxischer Reize beteiligt sind. Es handelt sich um unselektive Kationenkanäle, die 6 Transmembrandomänen besitzen und aktuell über 50 Subtypen umfassen, welche in 7 Unterfamilien eingeteilt werden (Montell, 2005). Primäre sensorische Afferenzen exprimieren verschiedene TRP-Rezeptorkanäle, darunter vor allem Vertreter der Vanilloid-Subfamilie (TRPV), aber auch TRPM8 und TRPA1 (Edelmayer *et al.*, 2012). Der TRPA1-Rezeptorkanal ist der bisher einzig bekannte aus der Ankyrin-Unterfamilie. Er zeichnet sich durch eine große NH₂-Domäne mit 17 intrazellulären Ankyrin-Repeats aus. Der TRPA1-Kanal wurde neben seinem Vorkommen in Dorsalwurzelganglien, Nozizeptoren und im Ganglion trigeminale (Jordt *et al.*, 2004) u.a. in Zellen von Harnblase, Prostata, Arterien, Pankreas und Herz, in Epithelzellen und glatten Muskelzellen der Atemwege, in Odontoblasten und Fibroblasten identifiziert (Benemei *et al.*, 2013). TRPA1-exprimierende Neurone coexprimieren häufig andere TRP-Kanäle, vor allem TRPV1, und sind in der Lage, Neuropeptide wie CGRP freizusetzen (Benemei *et al.*, 2013). TRPA1-Rezeptorkanäle sind auch in einem Großteil der meningealen primären Afferenzen funktionell exprimiert (Dux *et al.*, 2012).

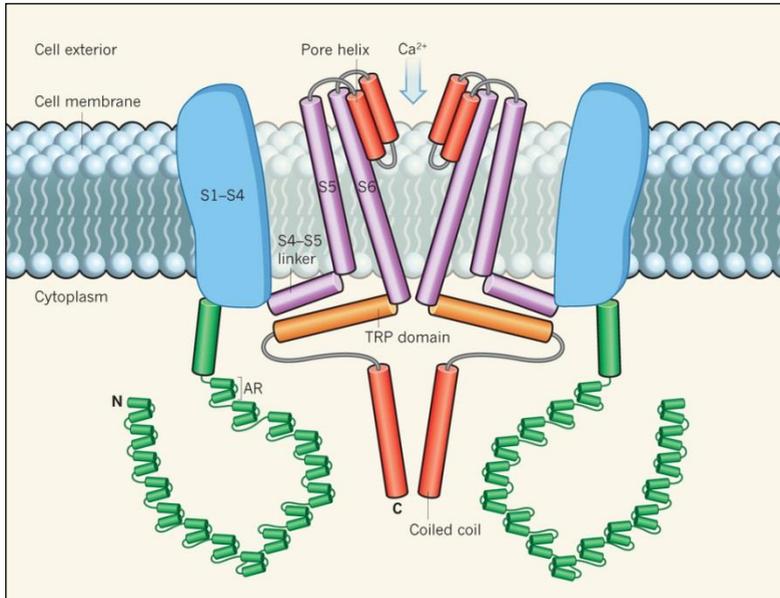


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der Schlüsselkomponenten des TRPA1-Rezeptorkanals (Clapham, 2015)

Die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors auf molekularer Ebene kann wahrscheinlich über unterschiedliche Mechanismen erfolgen: Einerseits über eine direkte kovalente Modifikation reaktiver Cysteinreste am zyttoplasmatischen N-Terminus des Rezeptors durch elektrophile Agonisten wie Acrolein (Hinman *et al.*, 2006) oder über eine konjugierte Addition der nukleophilen Thiolgruppe der Cysteinreste (Macpherson *et al.*, 2007). Die beiden Mechanismen unterscheiden sich am Ende in der Qualität der entstehenden Bindung. Die direkte Addition verläuft schnell, ist labil und reversibel. Die konjugierte Addition verläuft langsamer, ist aber thermodynamisch stabiler. Welcher Weg dabei gewählt wird, hängt wiederum

vom Agonisten ab. Während Acrylamid beispielsweise nur in der Lage ist, TRPA1 über eine konjugierte Addition zu aktivieren, können Acrolein und Zimtaldehyd beide Mechanismen auslösen, bevorzugen aber die direkte Bindung (Sadofsky *et al.*, 2011).

Agonisten des TRPA1-Rezeptors sind u.a. endogene Stoffwechselprodukte, die zum Beispiel bei oxidativem Stress entstehen (H_2O_2 , $15d-PGJ_2$). Sie aktivieren den TRPA1-Rezeptor und rufen *in vivo* Schmerzreaktionen hervor, die bei TRPA1-Knockout-Mäusen ausblieben (Andersson *et al.*, 2008).

Es hat sich herausgestellt, dass der TRPA1-Rezeptor von exogenen Agonisten wie diversen Geschmacksstoffen mit stechend-scharfem Charakter und einigen Umweltirritantien aktiviert wird. Zu ersteren gehören beispielsweise Senföl (Jordt *et al.*, 2004), Allicin (Bautista *et al.*, 2005), Zimtaldehyd (Bandell *et al.*, 2004), Gingerol und Thymol (Lee *et al.*, 2008). Von den Irritantien hat neben Formaldehyd, Chlor und Ammoniak vor allem Acrolein als potenter und spezifischer TRPA1-Agonist experimentelle Bedeutung. Durch Calcium-Imaging konnte bei Acroleineinwirkung ein deutlicher Calcium-Einstrom in TRPA1 exprimierende Zellen gemessen werden, welcher weder in TRPV1-, TRPV2- noch in TRPM8-exprimierenden Zellen zu wiederholen war. Auch fehlten Acrolein-induzierte Antworten in Präparaten aus TRPA1-Knockout-Mäusen, so dass sich TRPA1 als essentieller Rezeptor für die Wirkung von Acrolein darstellt (Bautista *et al.*, 2006). *In vivo* zeigten Wildtyp-Mäuse bei Exposition von Acrolein-Dämpfen im Verhalten keinen Unterschied zu TRPV1-Knockout-Mäusen (Symanowicz *et al.*, 2004).

Ob Acrolein Kopfschmerz oder Migräne auslösen kann, wurde bisher nicht untersucht. Acrolein (C_3H_4O) ist ein giftiger Stoff, dessen Dämpfe beim Verbrennen vieler organischer Substanzen wie pflanzlichen Ölen, Biodiesel, Wachs oder Tabak entstehen und somit im Alltag häufig eingeatmet werden. (Tabak-)Rauch wiederum ist ein häufig herausgestellter Triggerfaktor bei Migränepatienten (Spierings *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2011; Hauge *et al.*,

2011). In einer Studie wurde ein Zusammenhang zwischen intranasaler Applikation von Acrolein bei der Ratte und einer darauf folgenden ipsilateralen, CGRP- und TRPA1-vermittelten Vasodilatation meningealer Gefäße festgestellt (Kunkler *et al.*, 2011). Falls die Vasodilatation meningealer Gefäße die Kopfschmerzentstehung begünstigt, könnte ein Zusammenhang von TRPA1-Wirkungen mit den pathophysiologischen Mechanismen der Migräne bestehen. Eine Studie von Nassini *et al.* könnte in diese Richtung weisen. Umbellulone, der beim Einatmen Kopfschmerzen verursachende Duftstoff des kalifornischen Lorbeerbaumes, wurde als potenter TRPA1-Agonist identifiziert, welcher nach intranasaler Applikation bei Ratten eine dosisabhängige Blutflusserrhöhung der meningealen Gefäße auslöst (Nassini *et al.*, 2012).

Da eine wichtige Rolle des TRPA1-Rezeptors bei der meningealen Nozizeption zwar vermutet wird, aber noch nicht näher untersucht wurde, wählten wir diese Aufgabenstellung als Grundlage der vorliegenden Doktorarbeit. Entscheidend war es dabei, unterschiedliche Agonisten auf ihre TRPA1-Wirkung in den einzelnen Abschnitten des trigemino-vaskulären Systems, aber auch im komplexen neurophysiologischen Zusammenhang zu testen, da die meisten Untersuchungen, die bisher zur Funktionsweise des TRPA1 vorliegen, nur in isolierten Zellmodellen durchgeführt wurden.

1.5 Tiermodelle in der Kopfschmerzforschung

Schmerzen bei Tieren sicher zu erkennen und zu quantifizieren, ist schwierig. Legt man die Definition des Schmerzes der IASP zu Grunde, so kommt der „unangenehmen sensorischen und emotionalen Erfahrung“ bei der Interpretation im Hinblick auf das Tier eine zentrale Bedeutung zu – und zwar eine sehr subjektive, da die Erfahrung des Tieres nie in allen Facetten nachvollzogen werden kann. Wenn man jedoch davon ausgeht, dass der Zweck des physiologischen Prozesses „Schmerz“ bei Mensch und Tier derselbe ist, kann man daraus zumindest schlussfolgern, dass Tiere als Antwort auf einen schmerzhaften Stimulus eine sensorische Empfindung verspüren, welche mit charakteristischen Veränderungen der physiologischen

und biochemischen Abläufe des Organismus und des Verhaltens einhergehen (Landa et al., 2012). Doch kommen bei letzterem Aspekt, der Einstufung der Schmerzen von Tieren aufgrund ihres Verhaltens, noch weitere Schwierigkeiten hinzu. Erstens gibt es speziesspezifische Unterschiede, und viele Tierarten verbergen ihre Schmerzen so lange wie möglich, beispielsweise um keine Schwäche erkennen zu lassen und somit kein leichter Angriffspunkt gegenüber Feinden oder Konkurrenten im eigenen sozialen Umfeld zu sein. Zweitens ist die Einstufung immer subjektiv und führt zu unterschiedlichen Bewertungen abhängig vom Untersucher und dessen Expertise.

Zu den klassischen Indikatoren zur Identifikation von Schmerzen bei Tieren zählen neben den physiologischen Parametern wie Atem- und Herzfrequenz, Blutdruck und Körpergewicht die Verhaltensparameter Gruppenverhalten, Bewegung und Aktivität sowie Futter- und Wasseraufnahme. Doch muss man diese Zeichen sehr differenziert betrachten, um sich des kausalen Zusammenhangs mit einem Schmerzempfinden weitgehend sicher zu sein, da einerseits auch andere Ursachen zu Änderungen dieser Parameter führen können und andererseits auch hier je nach Parameter erhebliche speziesspezifische Unterschiede bereits im physiologischen Bereich zu beachten sind (Erhardt *et al.*, 2012). Da die Wissenschaft aber auf möglichst exakt definierte und messbare Parameter angewiesen ist, wird seit jeher versucht, Schemata zu etablieren, anhand derer Schmerzen bei Tieren so gut wie möglich gemessen werden können. Dabei muss berücksichtigt werden, um welchen Schmerztyp (nozizeptiv, inflammatorisch, neuropathisch, idiopathisch) es sich handelt und welche Gewebe hauptsächlich betroffen sind (Haut, Muskeln, Gelenke oder viszerale Organe) (Mogil, 2009). Um beispielsweise einen peripheren, oberflächlichen Hitzeschmerz und die Beeinflussung durch Analgetika zu messen, haben sich die Modelle des Hot-Plate-Tests und des Tail-Flick-Tests bewährt (D'amour & Smith, 1941; Tjølsen *et al.*, 1991). Für die Messung viszeraler Schmerzen werden häufig Versuchsanordnungen genutzt, die auf Dehnung der Organe beruhen (Ness &

Gebhart, 1988; Berkley *et al.*, 1995). Auch für Entzündungsschmerzen wie bei Arthritiden und neuropathischen Schmerzen wie bei der Trigeminusneuralgie gibt es eine Reihe von verhaltensbasierten Schmerzmodellen (Vos *et al.*, 1994; Malmberg & Basbaum, 1998; Neugebauer *et al.*, 2007).

Bei anderen Erkrankungen wie der Fibromyalgie oder auch den Kopfschmerzerkrankungen gibt es hingegen noch keine etablierten Schmerzmodelle auf Verhaltensbasis (Mogil, 2009). Um dennoch die Entstehung dieser Schmerzen erforschen zu können, versuchte man, die Erkenntnisse, die zum Beispiel im Rahmen von humanen Studien gewonnen worden waren, am tierischen Organismus nachzuvollziehen. Solange es nicht widerlegt ist, muss davon ausgegangen werden, dass Eingriffe und Manipulationen, die beim Menschen Schmerz und Leid auslösen, dies auch bei anderen Tieren tun. So besagt es auch das IV. US-Government Principle des Office of Laboratory Animal Welfare (Animals, 2011). Entsprechend basiert das auch in dieser Arbeit verwendete *In-vivo*-Modell zur extrazellulären Ableitung neuronaler Aktivität im trigeminalen System auf den Erkenntnissen von Ray und Wolff (Ray & Wolff, 1940), d.h. auf der Annahme, dass das trigeminale System von Ratte oder Maus in anatomischer und physiologischer Hinsicht demjenigen des Menschen soweit entspricht, dass sich experimentell gewonnene Ergebnisse weitestgehend übertragen lassen (Messlinger *et al.*, 2011). Die Tiermodelle setzen also auf der Ebene der Nozizeption an, die dem Bewusstsein des Schmerzes vorausgeht.

1.5.1 Messung neuronaler Aktivität im spinalen Trigeminuskern *in vivo*

Der Versuchsaufbau ähnelt im Prinzip demjenigen von Ray und Wolff, indem ein Trepanationsfenster den direkten Zugang zur Dura mater ermöglicht. Statt einer verbalen Antwort der humanen Probanden in den Experimenten von Ray und Wolff bedient man sich im Tierexperiment der Antwort der abgeleiteten trigeminalen Neurone, also der Aktivität gemessen als Aktionspotential-(AP-) Frequenz. *In vivo* können am besten extrazelluläre Ableitungen der

sekundären trigeminalen Neurone im Hirnstamm durchgeführt werden, es sind aber auch Ableitungen der Aktivität primärer Neurone im Ganglion trigeminale oder Ableitungen peripherer Afferenzen möglich (Bove & Moskowitz, 1997; Burstein *et al.*, 1998; Boada, 2013).

Durch Prüfung der extrakraniellen und der zugänglichen intrakraniellen Strukturen mit mechanischen, elektrischen oder chemischen Stimuli können die rezeptiven Felder der jeweils abgeleiteten Neurone charakterisiert und innerhalb des Innervationsgebietes der drei Trigeminae eingeordnet werden. Im Modell der meningealen Nozizeption werden nur Neurone für die Ableitung selektiert, die nachweislich afferenten Zustrom aus der Dura mater erhalten. Levy und Strassman 2002 charakterisierten 454 im Ganglion trigeminale der Ratte abgeleitete Units mit rezeptiven Feldern in der Dura mater und klassifizierten diese alle als Neurone mit C- und A δ -Fasern (Levy & Strassman, 2002; Boada, 2013). Die meisten sekundären Neurone im spinalen Trigeminalskern, die auf die Stimulation ihres rezeptiven Feldes in der Nähe meningealer Gefäße eine positive Reaktion zeigen, haben außerdem konvergenten Input aus dem Bereich der Gesichtshaut (Dostrovsky *et al.*, 1991; Burstein *et al.*, 1998; Schepelmann *et al.*, 1999). Dieser betrifft meistens die periorbitale Region, welche von Patienten mit anfallsartigen primären Kopfschmerzen besonders häufig als Schmerzlokalisierung beschrieben wird (Dostrovsky *et al.*, 1991; Hogenhuis & Bruyn, 1999).

Es gibt wissenschaftliche Hinweise darauf, dass es während der Migräneentstehung zu einer Sensibilisierung der beteiligten Neurone kommt, was man in komplementären Tiermodellen ausführlich untersucht hat (Burstein *et al.*, 1998). Die zentrale Sensibilisierung konnte an trigeminalen Hirnstammneuronen mit konvergentem Input aus der Dura mater und der periorbitalen Haut gezeigt werden. Durch chemische Stimulation der Dura mater wurden die sekundären Neurone sowohl kurzfristig als auch über einen Zeitraum von zehn Stunden sensibilisiert. Die Neurone reagierten dabei nicht nur signifikant stärker auf die mechanische Stimulation der Dura mater, sondern auch auf mechanische und thermische Stimulation der kutanen

rezeptiven Felder. Zusätzlich wurde eine Ausdehnung der duralen und kutanen rezeptiven Felder registriert (Burstein *et al.*, 1998).

Die periphere Sensibilisierung stellt sich ähnlich dar: Primäre trigeminale Neurone, welche in Ruhe zunächst mechanisch insensitiv sind, werden durch chemische Stimulation des meningealen rezeptiven Feldes schließlich mechanisch erregbar. Bei anderen bereits geringfügig mechanisch sensiblen Neuronen wurde durch die chemische Stimulation eine signifikant höhere mechanische Erregbarkeit erzeugt (Strassman *et al.*, 1996).

Auf die Migräne des Menschen übertragen könnte eine periphere und zentrale Sensibilisierung die Verstärkung des Schmerzes bei physischer Aktivität wie Bücken oder Husten erklären, die mit einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks einhergeht, aber auch die bei Migränepatienten häufig beschriebene kutane Allodynie im Kopfbereich während der Attacken (Burstein, 2001).

Um einerseits solche mechanischen Einflüsse zu imitieren und andererseits eine potentielle mechanische Sensibilisierung messen zu können, wurden in dieser Arbeit die *in vivo* Versuche zur Messung der neuronalen Aktivität im spinalen Trigeminuskern unter einer regelmäßigen mechanischen Stimulation der Dura mater durchgeführt.

1.5.2 Messung neuronaler Aktivität meningealer Afferenzen *in vitro*

Da das oben genannte *In-vivo*-Präparat ein sehr komplexes Modell ist, in welchem der Gesamtorganismus durch mannigfaltige Faktoren meist unvorhersehbaren Einfluss auf den Verlauf der Experimente nehmen kann und in welchem immer das Zusammenspiel mehrerer neuronaler Ebenen untersucht wird, benötigt man auch ein Präparat, an welchem gezielt die Ebene der primären Afferenzen untersucht werden kann. Da dies zudem keinen vitalen Organismus benötigt, ist es auch im Sinne des Tierschutzes zu bevorzugen, primäre Afferenzen *in vitro* zu untersuchen.

Lange bevor das hier verwendete Präparat der Einzelfaserableitung im Innervationsgebiet der Dura mater von Schwenger et al. beschrieben wurde, hatte man das Haut-Nervenpräparat als *in-vitro*-Modell entwickelt, um zum Beispiel chemorezeptive Eigenschaften von Nozizeptoren in ihrem natürlichen Gewebeverband unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen (Reeh, 1986; Schwenger *et al.*, 2007).

Durch Superfusion des isolierten Gewebes mit einer oxygenierten physiologischen Lösung wird die natürliche Umgebung der Zellen nach Entnahme aus dem Organismus weitgehend aufrechterhalten, so dass das Präparat über mehrere Stunden aufbewahrt und verwendet werden kann, ohne seine Eigenschaften zu verändern. Das Afferenzen-Präparat der Dura unterscheidet sich vom Haut-Nervenpräparat dadurch, dass der gesamte präparierte Nerv in die Elektrode eingesaugt und die Einzelfasermessung allein durch selektive Stimulation möglich gemacht wird, während beim Haut-Nervenpräparat der abgeleitete Nerv in Einzelfilamente aufgetrennt wird (Reeh, 1986; Schwenger *et al.*, 2007). Die *in vitro* Präparate können einerseits dazu dienen, Hypothesen im Hinblick auf potentiell weitergehende Untersuchung *in vivo* zu überprüfen. Andererseits können sie genutzt werden, um *in vivo* gemessene Effekte isoliert von anderen Einflussfaktoren zu untersuchen.

1.5.3 Messung des meningealen Blutflusses *in vivo*

Eine erste Hypothese, die die Kopfschmerzentstehung in Zusammenhang mit einem vaskulären Geschehen setzte, wurde von Wolff postuliert, der in der Phase der Aura eine arterielle Vasokonstriktion und in der Schmerzphase eine Vasodilatation intrakranieller Gefäße feststellte (Wolff, 1963). Im Laufe der Jahrzehnte entwickelten sich die technischen Möglichkeiten zur Untersuchung des zerebralen Blutflusses erheblich weiter und die Hypothese von Wolff wurde mehrfach modifiziert und angezweifelt. Aus wissenschaftlicher Sicht entstanden schließlich zwei Hypothesen: Die erste sah in der Migräneentstehung ein primär neuronales, die zweite ein primär vaskuläres

Geschehen. Heute geht man davon aus, dass es sich um einen komplexen Vorgang handelt, in welchem beide Hypothesen ineinander greifen (Frieberg, 1991), wobei dem CGRP eine wichtige Rolle zuzukommen scheint. Denn eine primär neuronale Stimulation z.B. des Ganglion trigeminale führt zu einer CGRP-Ausschüttung und einer daraus resultierenden Vasodilatation bzw. Blutflusserhöhung (Goadsby *et al.*, 1988; Messlinger *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997). Ebenso führt die Stimulation des Sinus sagittalis (und damit einhergehend der primären Afferenzen) bei Menschen zu Schmerzempfindung (Feindel *et al.*, 1960) und im Tierexperiment zu CGRP-Release (Zagami *et al.*, 1990) und zerebraler Blutflusserhöhung (Goadsby *et al.*, 1997). Hinzu kommt, dass klinische Studien in der Entwicklung von CGRP-Antagonisten wie dem MK-0974 als potentiell neuen Wirkstoff in der Migränebehandlung deren analgetische Wirksamkeit belegten (Ho *et al.*, 2008). So hat sich zum einen die quantitative Messung der CGRP-Freisetzung aus Strukturen der Dura mater inzwischen als eine Methode etabliert, um den Grad der möglichen Aktivierung meningealer Afferenzen einzuschätzen (Goadsby *et al.*, 1988; Ebersberger *et al.*, 1999; Bellamy *et al.*, 2006). Zum anderen werden Messungen des meningealen Blutflusses eingesetzt, um die Wirkung von potentiell in der Pathophysiologie des Kopfschmerzes relevanten Substanzen oder Rezeptoren auf die meningeale Nozizeption zu testen (Escott *et al.*, 1995; Messlinger *et al.*, 1995; Jansen-Olesen *et al.*, 1996). Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen den vaskulären Wirkungen von CGRP und den nozizeptiven Vorgängen bzw. der Schmerzentstehung bei Migräne und anderen Kopfschmerzen ist aber immer noch unbekannt. Deshalb ist es wichtig, Hypothesen hierzu immer von beiden Seiten (vaskulär/neuropeptiderg und neuronal/nozizeptiv) auf ihre Schlüssigkeit hin zu untersuchen. Entsprechend habe ich in meiner Dissertation auch die Wirkungen des zu untersuchenden TRPA1-Agonisten Acrolein auf das vaskuläre Geschehen in der Dura mater untersucht und mich dafür der weiter unten beschriebenen Methode der Laser-Doppler-Flowmetrie bedient.

2 Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es, die detaillierten pathophysiologischen Vorgänge der meningealen Nozizeption im Hinblick auf die bislang hypothetische Rolle von TRPA1-Rezeptoren in der Signalkaskade von NO, Nitroxyl und CGRP zu untersuchen. Ein weiterer Gesichtspunkt war dabei, den Ort zu bestimmen, wo diese Prozesse stattfinden, nämlich peripher in den Meningen oder zentral im spinalen Trigeminuskern, oder sowohl peripher als auch zentral. Es ergaben sich dabei folgende Fragestellungen:

- 1) Beeinflusst die mechanische Stimulation der Dura mater die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern (Sensibilisierung oder Desensibilisierung)?
- 2) Wie verhält sich die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern über einen längeren Zeitraum nach Aktivierung der Guanylatcyclyase sGC durch den „NO-Donator“ GTN?
- 3) Welche Wirkungen im Hinblick auf die meningeale Nozizeption hat die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors im trigeminovaskulären System?
 - a) Wie wirkt sich die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors durch den TRPA1-Agonisten Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern *in vivo* aus? Spielt der Applikationsort (Dura mater oder Medulla oblongata) eine Rolle?
 - b) Welche Wirkungen hat die Applikation von Senföl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern? Spielt der Ort der Applikation eine Rolle (peripher: Dura mater, zentral: Medulla oblongata)?

-
- c) Welche Wirkung hat die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors durch den TRPA1-Agonisten Acrolein auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminskern? Wo sind TRPA1-Rezeptoren lokalisiert, welche die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminskern beeinflussen (Dura mater, Ganglion trigeminale, Medulla oblongata)?
- d) Welche Wirkungen hat die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors durch Acrolein auf den meningealen Blutfluss? Kann der Effekt durch TRPA1-Antagonisten gehemmt werden?
- 4) Welche Wirkungen im Hinblick auf die meningeale Nozizeption hat die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors in Bezug auf die primären Afferenzen in der Dura mater?
- a) Wie wirkt sich die Aktivierung von TRPA1 durch Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen im *In-vitro*-Modell aus?
- b) Ist der Effekt spezifisch für TRPA1?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
Acrolein	Sigma, Taufkirchen
Agar-Agar Kobe 1	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Angeli's Salt ($\text{Na}_2(\text{ONNO}_2)$)	Cayman Chemical Company, USA
Carbogen (95% O_2 , 5 % CO_2)	Linde AG, München
CGRP ₈₋₃₇	Tocris, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Gallaminetriethiodide	Sigma, Taufkirchen
HC 030031	Tocris, UK
Kaliumchlorid (> 99,5%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Stickstoff (N_2)	Linde AG, München
Natriumchlorid (> 99%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (> 99,5%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (> 98%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe

Bezeichnung	Hersteller / Bezugsquelle
Natrium-Gluconat	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
α -D(+)-Glucosemonohydrat (> 99,5%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
D(+)-Saccharose (> 99,5%)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Senföl (Allylisothiocyanat (95 %))	Merck KGaA, Darmstadt
Trapanal [®] (Thiopental)	Nycomed KGaA, Schweiz (jetzt Takeda)

Tabelle 1: Chemikalienliste

3.1.2 Lösungen

Acrolein-Lösungen

Acrolein wurde zunächst in Aqua dest. als 100 mM Stammlösung angesetzt und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung auf die benötigten Konzentrationen von 100 μ M und 300 μ M weiterverdünnt. Die Lösungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aliquotiert, tiefgefroren und vor dem Versuch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Atropin-Sulfat-Lösung:

Die Atropin-Sulfat-Lösung wurde in der Menge für den wöchentlichen Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit physiologischer Kochsalzlösung angesetzt.

Ätzlösung zur Herstellung der Elektroden: Schwefelsäure

Agar-Agar-Lösung:

In 25 ml synthetische interstitielle Flüssigkeit (SIF) wurden in einem Becherglas 0,85 g pulverisiertes Agar-Agar mit einem Magnetrührer eingerührt und dabei bis zum Siedepunkt (95°C) erhitzt.

Angeli's Salt-Lösung:

Die AS- Lösung wurde wenige Minuten vor ihrer Anwendung frisch angesetzt. Es wurde dabei eine 1 mM Stammlösung aus der Festsubstanz und 15 mM NaOH hergestellt: Das Behältnis der Originalfestsubstanz wurde nach Wiederverschließen für 5 min mit Stickstoff begast, um die eingedrungene Raumluft und Luftfeuchtigkeit zu verdrängen, dann zur Aufbewahrung tiefgefroren. Die Verdünnung mit SIF für die gewünschte Endkonzentration erfolgte erst unmittelbar vor der Messung.

CGRP₈₋₃₇-Lösung:

Es wurde eine 100 µM Stammlösung in physiologischer Kochsalzlösung angesetzt, die nach Bedarf entsprechend mit NaCl weiter verdünnt wurde. Die Lösungen wurden in Eppendorf-Cups aliquotiert, tiefgefroren und vor dem Versuch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

Gallamine-Triethiodid-Lösung:

Es wurde eine 5 prozentige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

HC030031-Lösung:

Es wurde eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Die weitere Verdünnung erfolgte dann mit physiologischer Kochsalzlösung. Die 50 µM Lösungen wurden in Eppendorf-Cups aliquotiert, tiefgefroren und vor dem Versuch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

NaOH-Lösung 15 mM

PFA-Lösung (4% PFA, pH 7,4):

40 g Paraformaldehyd, 14,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 500 ml Aqua dest. Wurden auf ca. 60 °C erwärmt bis sich die Substanzen gelöst haben, dann 2,96 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ dazugegeben und auf einen 1 l mit Aqua dest. Aufgefüllt. Schließlich wurde der pH-Wert überprüft und ggf. eingestellt.

Senföi-Lösungen:

Es wurde eine 1 M Stammlösung in Ethanol hergestellt. Die weiteren Verdünnungen erfolgten mit SIF am Tag des Gebrauchs.

SIF-Lösung:

In dem der benötigten Menge SIF entsprechenden Volumen entmineralisierten Wassers wurden 107,8 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 0,69 mM MgSO_4 , 9,64 mM NaHCO_3 , 1,53 mM NaH_2PO_4 , 7,6 mM Na-Glukonat, 5,55 mM $\alpha\text{-D}(+)\text{-Glukosemonohydrat}$ und 7,6 mM D(+)-Saccharose aufgelöst und durch Begasung mit Carbogen (95% O_2 und 5% CO_2) auf einen pH von 7,4 eingestellt. Am Schluss wurden noch 1,53 mM Calciumchloriddihydrat darin gelöst und die Lösung nochmals mit Carbogen begast.

Trapanal-Lösung:

Es wurde eine 6-prozentige Lösung in Aqua dest. hergestellt. Die Lösung wurde in Eppendorf-Cups aliquotiert, tiefgefroren und vor dem Versuch bei Zimmertemperatur aufgetaut.

3.1.3 Geräte und Laborbedarf

Karbonfaserelektroden

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
Stecker LS225	2 mm	Multi-Contact-AG, Weil am Rhein
Kanüle BD Microlance 3	21 G	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Silberdraht	15 W	Science Products GmbH, Hofheim
Carbonfasern		FAU Erlangen
Glaskapillaren	GB150-8P	Science Products GmbH, Hofheim
Silberleitlack		Dr. Ropertz GmbH, München
Ätzlösung und Ätzvorrichtung	0,1 M H ₂ SO ₄ + K ₂ Cr ₂ O ₇	FAU Erlangen
Klebstoff „Plus Schnellfest“	2-Komponenten- Epoxidkleber	UHU GmbH & Co. KG, Bühl,
Glaskapillaren- Puller		Narishige Scientific Instrument, Tokyo, Japan
Metallfräse, LötKolben		
Saugpumpe Kompressor/ADEB 56 N4R3Q4		AEG Electric Tools GmbH, Winnenden
Mikroskop		

Tabelle 2: Geräte und Materialien zur Herstellung der Karbonfaserelektroden

In vivo Versuchsanordnung

Bezeichnung	Hersteller
Blutdruckmessgerät/ Pressure Monitor BP-1	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Blutdrucksensor/ Blood Pressure Transducer BLPR(2)	World Precision Instruments, Sarasota, USA
Vorverstärker	FAU Erlangen
Analog-Digital-Wandler/ Micro 1401	Cambridge Electronic Design, Cambridge, England
Temperaturmessfühler/ FMI- TMF-3403	Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
Wärmeplatte/ EHE-3401-280/140/11	Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
Temperatur-Kontroll- Modul/TKM0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim, Deutschland
Laserprobes	Moor Instruments, Remagen

Tabelle 3: Geräteliste für die *in vivo* Experimente

***In vitro* Versuchsanordnung**

Bezeichnung	Eigenschaften	Hersteller
Verstärker Axopatch 200A		Axon instruments (jetzt: Mlecular Devices), USA
Analog-Digital-Wandler/ Micro 1401		Cambridge Electronic Design, Cambridge, England
Peltier Heizelement		FAU Erlangen
Thermometer/Universal- Anzeigegerät	GIR/GIA	Greisinger-electronic GmbH, Regenstauf
Heizung	Nemic-Lambda ZUP 20-20	
Elektrostimulator		FAU Erlangen
Schlauchpumpe und Zubehör	OEM-Antrieb	Watson Marlow, Rommerskirchen
Puller		Sutter Instruments, USA
Magnetrührer	IKA [®] RH-KT/C	IKA [®] -Werke GmbH & Co KG, Staufen
Micromanipulator		Wagner, Schöffengrund/Wetzlar
Mikroskop	MZ FI III 1.6 PLAN APO x 0,63	Leica Microsystems, Wetzlar
Okulare	10445111 10x/21 B	Leica Microsystems, Wetzlar

Tabelle 4: Geräteliste für die *in vitro* Experimente

3.1.4 Software

Elektrophysiologie:	Spike 2 (Cambridge Electronic Design Ltd, U.K.)
Flowmessungen:	DRT (Moor Instruments, Remagen)
Textverarbeitung:	MS Word 2003 und 2010
Tabellenkalkulation:	MS Excel 2003 (Microsoft Corp., USA)
Grafiken:	Origin 7 und 9 (OriginLab Corp., Massachusetts, USA) Corel Draw XVI (Corel Corporation, Kanada)
Statistik:	Statistica 7.0 (StatSoft Europe GmbH, Hamburg)

3.2 Methoden

3.2.1 *In vivo* Experimente

Versuchstiere

Alle *in vivo* Experimente wurden mit Genehmigung des Tierversuchsvorhabens durch die Bezirksregierung Mittelfranken (Tierversuchsanträge Nr. 54-2532.1-23/08 vom 24.11.2008 mit Verlängerung vom 02.03.2011) und Nr. 54-2532.1-21/12 vom 20.08.2012 in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und den Richtlinien der IASP (International Association for the Study of Pain) durchgeführt. Für die Versuche wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 280 g bis 460 g (Median 320 g) aus institutseigener Zucht verwendet. Die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt im hauseigenen Tierstall in einem separaten Raum gehalten. Dieser war klimatisiert, so dass eine Temperatur von 22°C und eine Luftfeuchtigkeit von circa 50% herrschten, und durch eine elektronisch gesteuerte Lichtenlage entsprechend eines künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden beleuchtet. Die Tiere wurden mit Futterpellets ad libitum gefüttert. Trinkwasser stand ständig zur freien Verfügung.

Vorbereitung der Tiere und Präparation

Die Ratten wurden im Tierstall aus ihrem Käfig entnommen, gewogen und nach Dokumentation in einem eigenen mit Zellstoff ausgelegten Transportkäfig in das Labor gebracht.

Während jedes Versuchs wurde ein Narkose- und Versuchsprotokoll geführt.

Anästhesie 1

Die Tiere wurden zur Einleitung der Allgemeinanästhesie in eine Narkosebox umgesetzt, die anflutend mit 4% Isofluran (Forene® 100%, Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) und 20% Sauerstoff beschickt wurde. Sobald das Tier schlief und keine Reflexe mehr zeigte, wurde die Narkose über eine Maske mit 2% Isofluran aufrechterhalten.

Um zu vermeiden, dass die Körpertemperatur unter Narkosebedingungen absank, lag das Versuchstier auf einer Heizplatte, die durch einen rektalen Temperaturfühler rückgekoppelt eine konstante Körpertemperatur von 37,6°C +/- 0,1°C gewährleistete. Die Augen der Ratte wurden mit Augensalbe (Bepanthen®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) vor Austrocknung geschützt. Dies wurde nach Bedarf im Laufe des Experiments wiederholt. Der Kopf im Bereich des Os parietale und der Nacken wurden rasiert.

Gefäßpräparation

Parallel zur Leiste wurde ein 2 cm großer Hautschnitt gesetzt und durch stumpfe Separation der Muskelschichten der Blick auf die Arteria und Vena femoralis sowie auf das Ligamentum inguinale freigelegt. Die Öffnung wurde mit einem Wundspreizer fixiert. Das weitere Vorgehen erfolgte unter dem Mikroskop. Nachdem die Gefäße vom Bindegewebe gelöst worden waren, wurden größere in die Tiefe ziehende Seitenäste der Gefäße abgebunden. Zuerst wurde die Vene katheterisiert. Dafür wurde je eine Ligatur proximal und distal vorgelegt. Dann wurde die Vene proximal gestaut, die distale Ligatur zugezogen und das Gefäß mit den Fadenenden gespannt. Es folgte eine Inzision im distalen Drittel des Gefäßes mit einer Federschere. Der mit isotoner NaCl-Lösung gefüllte Katheter konnte nun in die Vene eingeführt und bis zum Clip vorgeschoben werden. Nach Entfernen der Klemme wurde der Katheter bis unter das Ligamentum inguinale vorgeschoben, auf Durchgängigkeit geprüft und mit den vorgelegten Ligaturen fixiert. Anschließend wurde genauso mit der Arterie verfahren, nur dass hier zum Zweck der Blutstauung zuerst die distale Ligatur festgezogen und danach mit dem Clip das Gefäß

proximal abgeklemmt wurde. Der Hautschnitt wurde mit Michelklemmen verschlossen.

Intubation

Um während des mehrere Stunden dauernden Experimentes eine möglichst sichere Narkoseführung zu gewährleisten, wurde das Tier beatmet. Dazu wurde das Tier vorübergehend in Bauchlage gelagert und die Isoflurankonzentration für circa eine Minute auf 3,5% erhöht, um die Narkose für die folgende Intubation zu vertiefen, da zum Einführen des Tubus die Maske für kurze Zeit abgenommen werden musste. Die Ratte wurde zügig mit den oberen Incisivi an einem selbstgebauten Gestell so aufgehängt, dass der Nacken überstreckt war. Mit einer Punktlampe wurde von außen der Larynx beleuchtet. Mithilfe eines selbstgebauten Spekulum wurde das Maul geöffnet und die herausgezogene Zunge gegen den Maulhöhlenboden gedrückt, sodass der Blick auf die Stimmritzen frei war. Der Tubus wurde nun in einem Moment der Inspiration durch die geöffneten Stimmritzen in die Trachea eingeführt und behutsam vorgeschoben. Als Tubus wurde ein Vasuflo-Venenverweilkatheter verwendet, der an seinem Luer-Anschluss mit einem Leukoplastfähnchen versehen war, mit welchem er über eine Ligatur am Maulwinkel der Ratte fixiert wurde. Die korrekte Position des Tubus wurde mittels eines Dentalspiegels überprüft. Vor dem Umsetzen des Tieres an den elektrophysiologischen Arbeitsplatz wurde seröses Sekret, das durch Irritationen bei der Intubation entstanden war, aus dem Tubus abgesaugt, um eine Verlegung des Tubus zu vermeiden.

Umsetzen der Tiere und Anästhesie 2

Das vorbereitete Tier wurde zum Experimentiertisch gebracht und sofort an die Beatmungspumpe mit Inhalationsnarkoseeinrichtung angeschlossen. Die Isoflurankonzentration wurde hierbei für einige Minuten auf 2,5% eingestellt. Zuerst wurden der expiratorische CO₂-Wert und der Atemwiderstand überprüft, eine Temperatursonde anal eingeführt und der Arterienkatheter mit dem Transducer der Blutdruckmessung verbunden. Der Arterienkatheter wurde ab diesem Zeitpunkt bis zum Ende des Experimentes permanent mit heparinhaltiger physiologischer Kochsalzlösung perfundiert (0,25 ml/h).

Der Kopf des Tieres wurde für die elektrophysiologischen Ableitungen in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt. Zwei Metallstäbe in den äußeren Gehörgänge verhinderten die Seitwärtsbewegung des Kopfes, eine horizontale Metallstange hinter den Incisivi und ein Nasenbügel, der an dieser Stange befestigt war, stabilisierten den Kopf in der Vertikalen. Während des gesamten Prozesses wurde permanent auf Veränderung des Atemwiderstandes und des Blutdrucks geachtet.

Trepanation und Eröffnung des Hirnstamms

Es wurde ein 5 cm langer, sagittaler Hautschnitt entlang der Medianlinie des Kopfes vom Nacken bis zur Stirn angelegt, und anschließend die Hautlappen seitlich mit Haltefäden weggespannt. Das rechte Os parietale wurde komplett von Bindegewebe und Periost befreit.

Unter dem Mikroskop wurde das Os parietale mit einem Dentalbohrer trepaniert. Dabei wurde permanent mit physiologischer Kochsalzlösung gekühlt und entstehendes Knochenmehl entfernt, um ein Überhitzen des Gewebes durch den Trepanationsvorgang zu vermeiden. Sobald der Knochen so dünn war, dass die meningealen Gefäße darunter sichtbar wurden, wurde er an einer gefäßfreien Stelle mit einer spitzen Pinzette perforiert und von dieser Stelle aus abgehoben, um die Dura mater im gesamten Bereich des

rechten Os parietale freizulegen. Zum Schutz vor Austrocknung wurde die Dura mater mit in physiologischer Kochsalzlösung getränkter Gaze abgedeckt.

Für den Zugang zur Medulla oblongata wurde die Nackenmuskulatur in der Medianen entlang der Faszien gespalten und ihre Ansätze am Okziput abgetrennt, so dass nach dem Einsetzen eines Wundspreizers der Blick auf die Membrana atlanto-occipitalis frei lag. Diese wurde mit einem Skalpell so eingeschnitten, dass sie zur Seite weggeklappt und mit einer Insektennadel fixiert werden konnte. Gegebenenfalls wurde noch ein Teil des Atlas entfernt, um das Ableitfeld nach kaudal (bis C2) zu erweitern. Während der Präparation auftretende Blutungen wurden je nach Lokalisation und Stärke mit Elektrokoagulation, Lysostypt oder Knochenwachs gestillt.

Besonderheiten der einzelnen Versuchsreihen

Versuchsreihe mit Injektion in das Ganglion trigeminale

Nach Entfernung des Nasenbügels wurde eine feine Kanüle (27G), die über einen Silikonschlauch (Durchmesser: 0,7 mm) mit einer 50 µl Hamiltonspritze verbunden war, durch das Foramen infraorbitale und den Canalis infraorbitalis in das Ganglion trigeminale eingeführt. Das Foramen infraorbitale liegt medial des palpierbaren Processus zygomaticus. Sobald die eingeführte Nadel auf einen knöchernen Widerstand stieß, wurde sie um einige Millimeter zurückgezogen, um sie dann in einem Winkel von circa 10 Grad nach medioventral wenige Millimeter tiefer vorzuschieben. Am Versuchsende wurde der blaue Azofarbstoff Pontamine Sky Blue durch den Katheter injiziert und am freigelegten Ganglion überprüft, ob die Injektionsnadel korrekt im Ganglion lag.

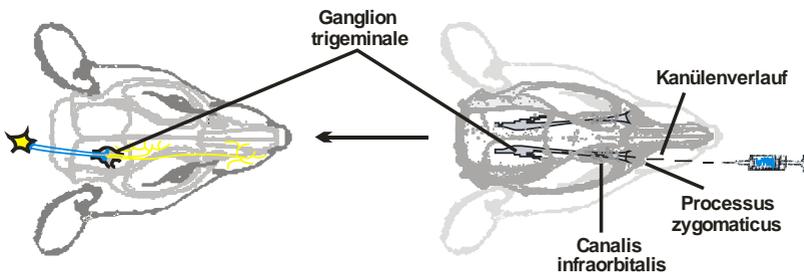


Abbildung 2:

Schema zur Injektion ins Ganglion trigeminale

Grafik: S. Koulchitsky

Versuchsreihe mit topischer Applikation auf die Medulla oblongata

Ein Katheter wurde an einem der Haltefäden der Kopfhaut, an der am Okziput ansetzende Sehne der oberflächlichen Nackenmuskulatur und in der linken rostralen Ecke der Membrana atlanto-occipitalis dreipunktfixiert und so weit vorgeschoben, dass das Ende des Katheters möglichst nah über der Medulla oblongata lag, diese aber nicht berührte. Um eine Verrutschen zu vermeiden, wurde der Katheter zusätzlich an der Nackenmuskelfaszie mit Gewebekleber Histoacryl® fixiert. Über den Luer-Anschluss des Katheters konnten im Experiment die Substanzen kontrolliert appliziert werden.

Versuchsreihe zur Messung des Blutflusses

Hier wurde der Hirnstamm nicht eröffnet. Messungen wurden nur durchgeführt, wenn die Dura mater ohne jegliche Beeinträchtigung durch Blutungen präpariert werden konnte.

Elektrophysiologische Ableitung

Bau der Elektroden

Die Karbonfaser-Glaselektroden zur elektrophysiologischen Ableitung *in vivo* wurden selbst gebaut.

Durch eine abgefräste Spitze einer Kanüle wurde ein abisolierter Silberdraht gefädelt und am oberen Ende umgeschlagen. Das Kanülenstück diente in einem späteren Arbeitsschritt zur Stabilisierung, der umgeschlagene Draht als Lötstelle. Im nächsten Schritt wurde die Einheit an einen vergoldeten LS1-S Stecker (1 mm, Fa. Multi-Contact) gelötet, an welchem später der Vorverstärker angeschlossen wurde. An das untere Drittel des Drahtes wurde nun eine feine Karbonfaser mit Silberleitlack angeklebt. Sobald die Verbindung getrocknet war, wurde die an dem Draht befestigte Karbonfaser durch Unterdruck in eine Glaskapillare eingesaut. Die Karbonfaser sollte noch mindestens 0,5 cm über das Ende der Glaskapillare hinausreichen. Dann wurde die Kapillare über den Stecker geschoben und mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers fixiert. Nach dem Aushärten des Klebstoffs wurde die Kapillare in einem Elektrodenpuller so ausgezogen, dass die entstandene Spitze die überstehende Karbonfaser mit einschmolz. Als letzter Schritt wurde die überstehende Karbonfaser unter dem Mikroskop mit Schwefelsäure soweit elektrolytisch zurückgeätzt, dass nur noch eine minimale Spitze zu erkennen war.



Abbildung 3:

Schematischer Aufbau der Karbonfaserelektroden

Installation der Ableitung

Zuerst wurde die Referenzelektrode in die Nackenmuskulatur eingesetzt. Die Kohlenfaser-Glaselektrode wurde in einen in drei zueinander senkrecht stehenden Ebenen beweglichen Mikrostepper eingespannt und am Vorverstärker angeschlossen. Die abgeleiteten Signale wurden verstärkt, gefiltert, über einen Analog-Digitalwandler (CED 1401) registriert und mit der Software Spike 2.6 aufgezeichnet. Parallel zum elektrischen Signal wurden der mittlere Blutdruck, der expiratorische CO₂-Wert, die Kraft des Mechanostimulators, mechanische bzw. elektrische Impulse sowie die Kommentare zum Versuchsverlauf aufgenommen. Mit dem Mikrostepper wurde die Ableitelektrode unter mikroskopischer Kontrolle kontinuierlich abgesenkt, bis die Spitze gerade die Oberfläche der Medulla berührte, dann die Referenzskala des Steppers auf Null justiert, so dass später die Tiefe der Ableitstelle im spinalen Trigemuskern abgelesen werden konnte. Durch das Gewebe wurde die Elektrode in Einzelschritten von je 2,5 µm bewegt.

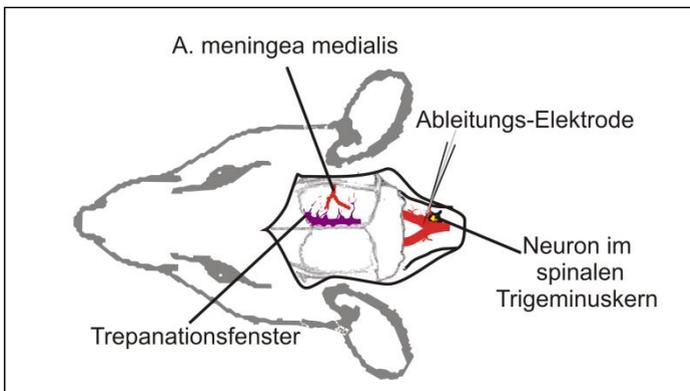


Abbildung 4:

Schema der elektrophysiologischen Ableitung *in vivo*

Grafik: S. Koulchitsky, mod.

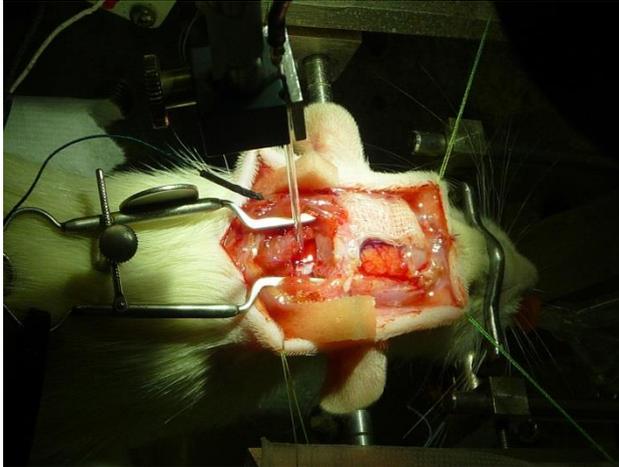


Abbildung 5:

Übersicht Standardpräparation zur elektrophysiologischen Ableitung
in vivo

Auffinden eines geeigneten Neurons

Um ein geeignetes Neuron aufzufinden, wurde zuerst im Gebiet mit der höchsten Trefferwahrscheinlichkeit gesucht. Dieses erstreckt sich ungefähr auf die laterale Hälfte eines von der Höhe der Aufzweigung der Haupthirnstammvene nach caudal gedachten Rechtecks. Es wurde eine gefäßnahe Einstichstelle bevorzugt. Nun wurde die Elektrodenspitze in Schritten von circa 5 bis 10 μm in die Tiefe vorgetrieben und dabei faziale Strukturen und die Dura mater im Gebiet der Trepanation mit einem von Frey Haar der Stärke 11,8 mN palpirt, um rezeptive Felder aufzufinden. Sobald sich ein Hinweis auf ein Neuron mit rezeptivem Feld in der Dura mater ergab, wurde die Ableittiefe so lange korrigiert, bis das Signal am deutlichsten war.

Charakterisierung des Neurons

Zur Charakterisierung des Neurons wurde vor Beginn der Messungen die Ausdehnung der rezeptiven Felder auf der Dura mater mit von Frey-Filamenten und im fazialen Bereich mit Glasstäbchen ausgetestet. Die mechanische Schwelle wurde ebenfalls mit von Frey-Filamenten in absteigender Stärke bestimmt. Am Ende des Experiments wurden die elektrische Schwelle und die Latenz bei elektrischer Stimulation gemessen. Dadurch konnte der afferente Zustrom der Neurone durch langsame (C-) und schnellere (A δ -) Fasern abgeschätzt werden. Um die Lage des Neurons im Hirnstamm genauer zu bestimmen, wurden neben der Tiefe auch die x-y-Koordinaten der Ableitstelle in Bezug auf den Obex bestimmt.

Einsatz des Mechanostimulators

Für eine zuverlässige Messung der zentralen neuronalen Aktivität im spinalen Trigemuskern *in vivo* ist entscheidend, dass die abgeleiteten Neurone während des gesamten Experiments Input von ihren peripheren Afferenzen in der Dura mater erhalten, damit die Antworten auch bei Größenänderungen der Aktionspotentiale eindeutig identifiziert werden können. Dies wurde durch regelmäßige mechanische Stimulation des rezeptiven Feldes in der Dura mater erreicht. Außerdem stellen die mechanisch evozierten Antworten einen zusätzlichen Parameter dar, der möglicherweise unabhängig von der Spontanaktivität moduliert wird (z.B. bei Sensibilisierung ohne Veränderung der Spontanaktivität).

War ein geeignetes Neuron charakterisiert, wurde der Mechanostimulator installiert. Er wurde so eingestellt, dass er mit konstanter Kraft alle 60 Sekunden für 1 Sekunde auf das rezeptive Feld in der Dura mater drückte. Die Kraft wurde so gewählt, dass über den gesamten Versuchszeitraum hinweg das Neuron bei jedem Stimulus zuverlässig aktiviert wurde. Der Mechanostimulator wurde kontrolliert über das Kraftmessgerät durch das Spike 2 Programm des CED Power 1401 gesteuert.

Versuchsprotokolle

Bei allen Versuchsreihen wurde zunächst die Grundaktivität lediglich unter Einfluss der mechanischen Stimulation für eine Dauer von mindestens 20 Minuten aufgezeichnet, um einen möglichst stabilen Kontrollwert zu erhalten.

Um auszuschließen, dass Änderungen der neuronalen Aktivität allein durch die Applikation oder durch die Lösungssubstanzen hervorgerufen wurden, wurde bei allen Experimenten mit lokaler Applikation der Substanzen ein entsprechendes Vehikel vor der Testsubstanz auf gleiche Art und Weise appliziert. Im Intervall während und kurz nach der topischen bzw. intraganglionären Applikation von Substanzen (Dauer 1 oder 2 min) wurde die Aktivität nicht ausgewertet, um Artefakte zu vermeiden.

Infusion von GTN

Über einen Zeitraum von 2 h wurde mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/h der sGC-Aktivator GTN in einer Konzentration von 250 µg/kg/h intravenös infundiert. Die Postkontrolle wurde über weitere 30 Minuten aufgezeichnet. Es wurden 6 Experimente durchgeführt.

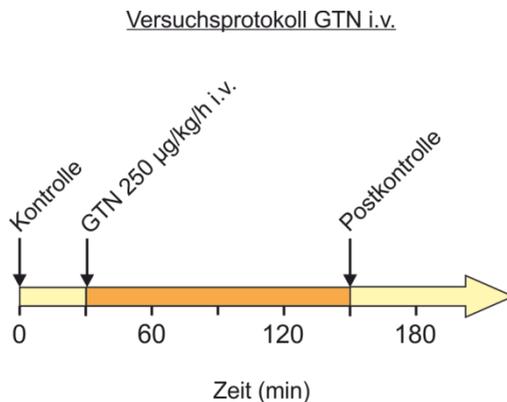


Abbildung 6:

Ablaufschema der Versuchsreihe mit GTN-Infusion

Angeli's Salt: topische Applikation Dura mater und Medulla oblongata

In dieser Versuchsreihe wurden drei Protokolle kombiniert durchgeführt. Nach der Kontrollphase wurde für das erste Protokoll für je 10 min 0,1 ml SIF als Vehikel und im Anschluss ebenso viel Acrolein 300 μ M auf den Hirnstamm appliziert. Nach dem Auswaschprozess und einer Pause von 15 min wurden für jeweils 5 min zuerst SIF und dann NaOH als Vehikel für Angeli's Salt auf die Dura mater pipettiert. Nach einem weiteren Waschvorgang und einer 5-minütigen Pause wurde 300 μ M Angeli's Salt appliziert und nach weiteren 5 min ausgewaschen. Die applizierte Menge betrug immer 100 μ l. Nach weiteren 20 min Wartezeit folgte Angeli's Salt auf den Hirnstamm in analoger Reihenfolge wie bei der Dura-Applikation, jedoch wurde die Lösung zunächst in einer Konzentration von 600 μ M angesetzt, sodass bei der Vermischung mit der vorhandenen Liquormenge noch eine ausreichende Konzentration an wirksamer Substanz in der Flüssigkeit vorhanden war.

Versuchsprotokoll Angeli's Salt Dura mater *in vivo*

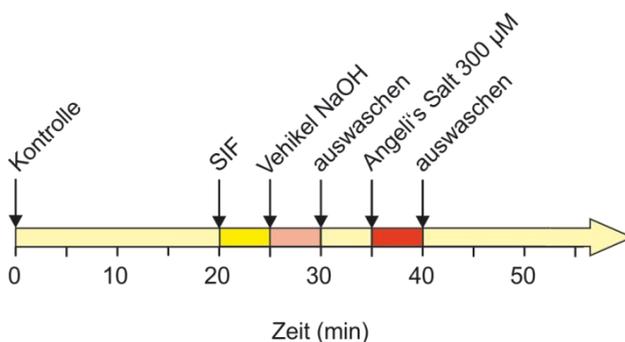


Abbildung 7:

Ablaufschema zur Versuchsreihe mit Applikation von Angeli's Salt auf die Dura mater *in vivo*

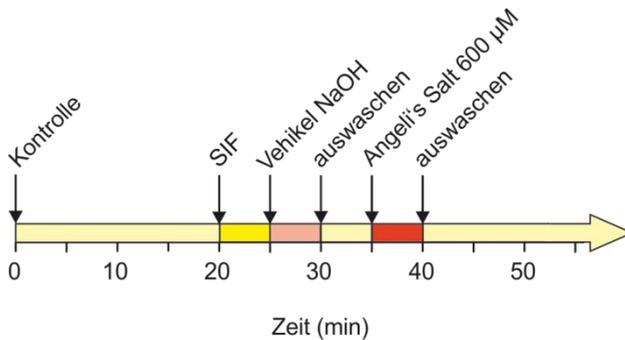


Abbildung 8:

Ablaufschema zur Versuchsreihe mit Applikation von Angeli's Salt auf die Medulla oblongata *in vivo*

Von insgesamt 12 Experimenten wurde bei 6 prinzipiell in der Reihenfolge Acrolein Hirnstamm, AS Dura, AS Hirnstamm verfahren. Von diesen 6 wiederum konnten bei einem Experiment nur die Protokolle Acrolein und AS Dura durchgeführt werden und bei einem weiteren ausschließlich das Acrolein-Protokoll.

Bei den anderen 6 Experimenten wurde mit dem Protokoll AS Dura begonnen und mit Acrolein und darauffolgend AS Hirnstamm weiterverfahren. Hier konnte bei einem Experiment die Acrolein-Messung nicht durchgeführt werden. Somit wurden das Acrolein- und das AS-Dura-Protokoll mit $n = 11$ und das AS-Hirnstamm-Protokoll mit $n = 9$ Experimenten durchgeführt.

Senföl: topische Applikation

In diesen Experimenten wurde die Wirkung von Senföl (SÖ) bei topischer Applikation auf die Dura mater und den Hirnstamm untersucht. Im Abstand von jeweils 15 min wurden auf die Dura jeweils 50 µl SIF, SÖ 1×10^{-4} M und SÖ 5×10^{-4} M appliziert, wobei nach jeder SÖ-Gabe ein Waschschrift und eine 15-minütige Wartezeit zwischengeschaltet wurden. Nach Auswaschen der Substanz folgte eine 30-minütige Pause, bevor mit den Hirnstammapplikationen begonnen wurde. Diese erfolgte analog zum Protokoll der Duraapplikation, außer dass statt der ansteigenden Konzentration von SÖ, beides Mal die hohe Konzentration von 5×10^{-4} M appliziert wurde und die applizierte Menge 100 µl betrug. Es wurden 11 Experimente durchgeführt, wobei in 3 Experimenten nur die Hirnstammwirkung gemessen wurde, so dass $n = 9$ Experimente zur Auswertung der peripheren Wirkung und $n = 11$ Experimente zur Auswertung der zentralen Wirkung von SÖ zur Verfügung standen.

Versuchsprotokoll Senföl

■ = Waschen mit SIF

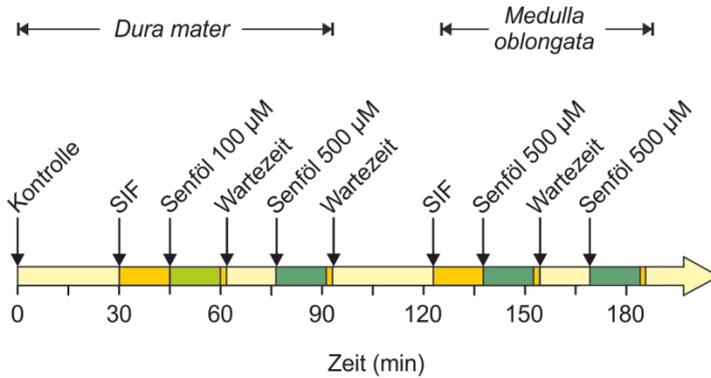


Abbildung 9:

Ablaufschema zu den Versuchsreihen mit Applikation von Senföl auf die Dura mater und auf die Medulla oblongata

Acrolein: topische Applikation auf die Dura mater

Je 50 μl der Substanzlösungen wurden auf die Dura mater pipettiert, als Vehikel wurde SIF verwendet. Nach 10 min wurde zunächst 100 μM Acrolein appliziert, nach weiteren 10 min und einem Waschschrift 300 μM Acrolein. Dieses wurde nach 10 min ausgewaschen und es folgte eine Postkontrolle über 20 min.

Versuchsprotokoll Acrolein Dura mater

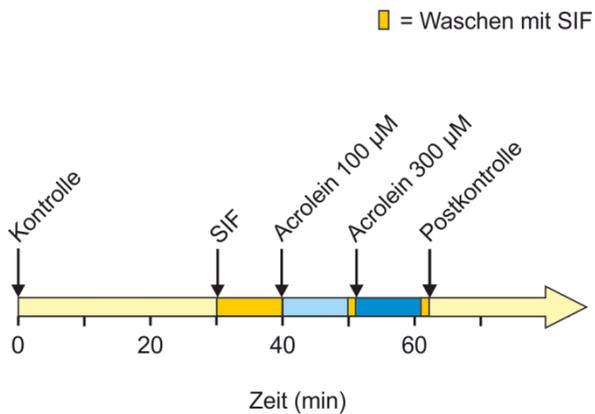


Abbildung 10:

Ablaufschema der Versuchsreihe mit topischer Applikation von Acrolein auf die Dura mater

Acrolein: Injektion in das Ganglion trigeminale

Die benötigten Substanzen wurden in Volumina von 20 µl in umgekehrter Reihenfolge ihrer späteren Applikation nacheinander in die Hamiltonspritze aufgezogen, jeweils durch eine kleine Luftblase voneinander getrennt.

Nach der Kontrollzeit wurden im Abstand von 30 min zuerst SIF als Vehikel und anschließend Acrolein 300 µM gleichmäßig über den Zeitraum einer Minute manuell injiziert.

Von insgesamt 6 Versuchen wurde bei n = 4 das Ganglion zentral getroffen, bei n = 2 wurden die Substanzen knapp paraganglionär appliziert.

Versuchsprotokoll Acrolein Ganglion trigeminale

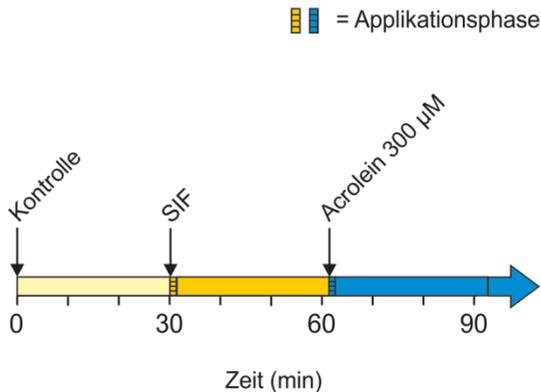


Abbildung 11:

Ablaufschema zur Versuchsreihe mit Injektion von Acrolein ins G. trigeminale

Acrolein: topische Applikation Medulla oblongata

Analog zur topischen Applikation auf die Dura mater wurden in dieser Versuchsreihe Zeitintervalle à 10 min pro Versuchsschritt gewählt. Es wurde hier direkt die höhere Konzentration von 300 µM appliziert.

Versuchsprotokoll Acrolein Medulla oblongata

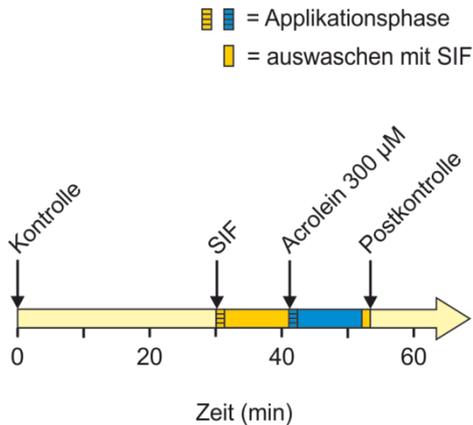


Abbildung 12:

Ablaufschema zur Versuchsreihe mit Applikation von Acrolein auf die Medulla oblongata

Laser-Doppler-Flowmetrie

Die Laser-Doppler-Flowmetrie ist eine nichtinvasive Methode zur kontinuierlichen Messung des Blutflusses und wird in verschiedensten Geweben vor allem im Bereich der Mikrozirkulation angewendet. Das Prinzip beruht darauf, dass die Frequenzänderung gemessen wird, die ein Laserstrahl bei Reflexion durch an einem sich bewegenden Objekt, wie zum Beispiel den Erythrozyten im Blut, erfährt. Diese Frequenzänderung ist abhängig von der Geschwindigkeit des sich bewegenden Teilchens. Die Laserprobes (Lichtleiter) senden dazu monochromatisches Licht aus, das von einem Low-Power-Laser generiert wird.

Es wurden pro Versuch ein bis zwei 1 mm dicke Lichtleiter (sog. Nadelprobes) auf kleine Seitenäste der Arteria meningea media gesetzt. Es wurden nur Arterien ausgewählt, an denen ein basaler Blutfluss von über 100 AU (arbitrary units, entsprechend einer Signalstärke von 100 mV am Laser-Doppler-Flowmeter) gemessen werden konnte.

Der Blutfluss wurde zunächst für 30 min unter dem Einfluss von SIF zur Benetzung der freiliegenden Dura mater gemessen. Es folgten je 15 min Acrolein 100 μM und Acrolein 300 μM (applizierte Menge 50 μl). Nach 30 min Pause folgte die wiederholte Gabe von Acrolein 300 μM nach vorhergehender Gabe von HC030031 50 μM . Nach weiteren 30 min wurde die Applikation nach erfolgter Gabe von CGRP₈₋₃₇ wiederholt. Nach Ende der Messperioden und vor Beginn der Wartezeiten wurden die Substanzen mit SIF ausgewaschen.

Es wurde der Blutfluss an 13 arteriellen Gefäßen gemessen.

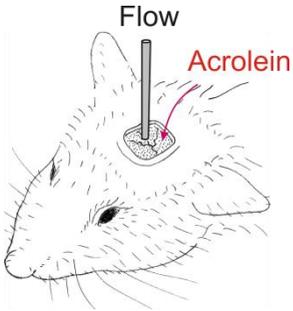


Abbildung 13:

Schema für die Messung des meningealen Blutflusses *in vivo*

Grafik: K. Meßlinger

Versuchsprotokoll Blutflussmessung

- = Waschen mit SIF
- = HC030031 50 μM
- = CGRP₈₋₃₇ 100 μM

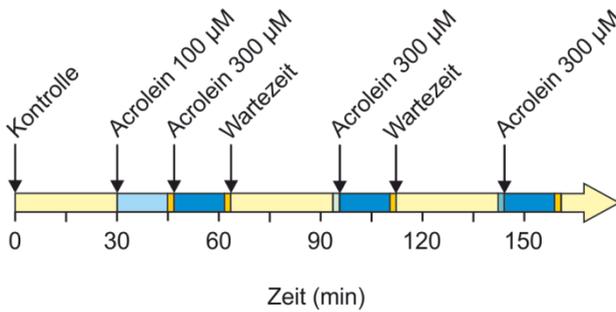


Abbildung 14:

Ablaufschema zur Versuchsreihe der meningealen Blutflussmessung unter topischer Applikation von Acrolein auf die Dura mater

3.2.2 *In vitro* Experimente

Versuchstiere

Da die Tiere nur zur Gewebeentnahme dienten, unterlagen sie keinem genehmigungspflichtigen Tierversuchsvorhaben.

Es wurden männliche und weibliche Mäuse mit einem Gewicht von 17 bis 33 g aus institutseigener Zucht verwendet. Dabei gab es drei sich im Genotyp unterscheidende Versuchsgruppen: Für Gruppe 1 wurden C57Bl6 Mäuse verwendet, welche die Wildtyp-Kontrolle darstellten, Gruppe 2 bestand aus TRPA1-Knockout-Mäusen und Gruppe 3 aus TRPA1/TRPV1-Doppelknockout-Mäusen. Die Haltung der Tiere fand unter gleichem Management wie für die Ratten beschrieben statt. Die Mäuse wurden durch Inhalation einer Überdosis Kohlendioxid getötet. Direkt im Anschluss wurde der Kopf mit einer Schere abgesetzt und bis zur weiteren Präparation in ein Becherglas mit SIF gegeben.

Erstellung des Halbschädelpräparates

Das Fell des Kopfes wurde komplett abgezogen, die Mandibula auf Höhe der Articulatio temporomandibularis mit einer Schere abgesetzt und die Augen entfernt. Der Schädel wurde daraufhin mit dem Skalpell bzw. Raspatorium und Turmpinzetten von sämtlicher Muskulatur und Bindegewebe befreit, wobei besonders im Bereich des Gehörganges mit großer Vorsicht gearbeitet wurde, um Fissuren zu vermeiden, da hier die knorpeligen und knöchernen Strukturen am Mäuseschädel sehr dünn sind. Das Palatinum molle wurde entfernt. Anschließend wurde das Cranium mitsamt Gehirn in der Medianlinie entlang der Sutura sagittalis geteilt. Cerebrum und Cerebellum einschließlich Arachnoidea und Pia mater wurden mit der stumpfen Seite des Raspatoriums so aus der Schädelhöhle herausgelöst, dass die Dura mater nicht berührt und das Tentorium cerebelli nicht in Mitleidenschaft gezogen wurde. Nach Abschluss der Präparation wurden die Schädelhälften unverzüglich in frischer SIF gelagert.

Um die Präparate später fixieren zu können, wurde zuerst eine Agar-Agar-Lösung hergestellt, die dann in zwei eigens für dieses Versuchssetup angefertigte Plexiglas®-Kammern gegossen wurde. War diese ungefähr auf Körpertemperatur abgekühlt, wurden die Schädelhälften auf den extrakraniellen Flächen vorsichtig abgetrocknet und in den Agar eingebettet, sodass die mediane Schnittfläche mit der Agaroberfläche eine Ebene bildete und die halbierte Schädelhöhle nun das eigentliche Gewebebad darstellte. Um ein schnelles Erstarren des Agars zu erreichen und das Gewebe vor Austrocknung zu schützen, wurden die Schädelhöhle und das verbleibende Volumen der Kammer sofort mit frischer SIF aufgefüllt. Nach Erstarren des Agars wurde die komplette Flüssigkeit nochmals gegen frische SIF ausgetauscht. Das vorhandene Volumen an SIF wurde für jede Kammer gemessen und notiert, um daraus später die benötigte Menge an Testsubstanz zum Erreichen der benötigten Endkonzentrationen berechnen zu können.

Versuchsaufbau und elektrische Ableitung

Die vorbereiteten Kammern mit den Halbschädelpräparaten wurden am Setup magnetisch auf einem Metallplateau fixiert. Durch eine runde Aussparung in der Metallplatte wurde das Präparat von unten mit einer LED-Lampe durchleuchtet, sodass man selbst feinste Strukturen wie in der Dura mater verlaufende Nerven und Gefäße beim Blick durch das Stereomikroskop erkennen konnte. Das Gewebebad wurde an ein Kreislaufsystem angeschlossen, welches mittels einer Pumpe permanent frische SIF auf einer Seite in das Bad einspülte und auf der anderen entsprechend Flüssigkeit absaugte. Ein Temperaturfühler maß laufend die Temperatur der Badflüssigkeit. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dies hatte den Vorteil, dass Temperaturschwankungen durch Ein- und Ausschalten des Flüssigkeitskreislaufes minimiert wurden. Außerdem ist die Halbwertszeit von Angeli's Salt bei Raumtemperatur größer, sodass HNO über einen längeren Zeitraum auf das Gewebe einwirken konnte als es bei Körpertemperatur der Fall gewesen wäre.

Zur Präparation der Nervenfasern wurde zunächst das Ganglion trigeminale vorsichtig aus der Dura-Duplikation herausgelöst, sodass die im verbleibenden Durasegel verlaufenden Nerven im Kontrast des Unterlichts zu erkennen waren. Mit Hilfe feinsten Kanülen wurden diese an ihrem proximalen Ende aus der Dura gelöst und mit einem durch eine Spritze erzeugten Unterdruck in die Ableitelektrode eingesaugt. Die Elektrode bestand aus einer ausgezogenen Glaskapillare und einem mit AgCl beschichteten Draht, über welchen die Glaspipette geschoben und mit einer abgedichteten Schraubvorrichtung fixiert wurde. Je nach Kaliber des präparierten Nervs wurde die Spitze der Elektrode dann mit einer Kanüle unter mikroskopischer Sichtkontrolle auf entsprechender Höhe abgebrochen, sodass der Nerv exakt hinein passte und dicht an der Kapillarenwand anlag. Es wurden sowohl Afferenzen des Nervus spinosus als auch des Nervus tentorius abgeleitet. Die Referenzelektrode aus Silberdraht wurde in eine vorgebohrte Kontaktstelle in der Plexiglas[®]-Kammer gesteckt. Das neuronale Signal wurde verstärkt, mit einem 5 Hz-Tiefpassfilter gefiltert, digitalisiert, auf dem Computer visualisiert und gespeichert. Das Signal wurde auch akustisch dargestellt.

Während der Bearbeitung der ersten Schädelhälfte wurde die andere, fixierte und mit SIF bedeckte Hälfte bei Raumtemperatur gelagert. Wie schon von De Col et al. festgestellt, konnte auch in dieser Arbeit kein Einfluss auf die Ergebnisse durch die etwa dreistündige Lagerung festgestellt werden (De Col et al., 2012).

Auffinden und Charakterisierung der Nervenfasern

Rezeptive Felder des abzuleitenden Nervs wurde mechanisch durch Abtasten der Dura mater mit einem von Frey-Haar (Stärke 0,9 mN) detektiert und grob eingegrenzt. Innerhalb des rezeptiven Feldes wurde mit einzelnen kontrollierten elektrischen Stimuli (15-50 μ A) ein Punkt ausgewählt, an dem eine einzelne oder möglichst wenige Nervenfasern aktiviert werden konnten. Hierzu wurde eine bipolare Reizelektrode verwendet, deren Kathode mit minimalem Druck die Dura berührte. In einigen Experimenten gelang es, mit

der elektrischen Stimulation mehrere Fasern zu aktivieren. Waren diese hinsichtlich Latenz und Amplitude des Aktionspotentials deutlich voneinander unterscheidbar, wurden die Messungen an diesen Fasern synchron durchgeführt.

Von den Fasern wurde die elektrische Schwelle bestimmt (Stromstärke, bei der zu über 50 % ein AP ausgelöst wird) und die Leitungsgeschwindigkeit ermittelt. Die Leitungsgeschwindigkeit wurde aus der Latenz und dem Abstand zwischen dem rezeptiven Feld und der Ableitstelle errechnet.

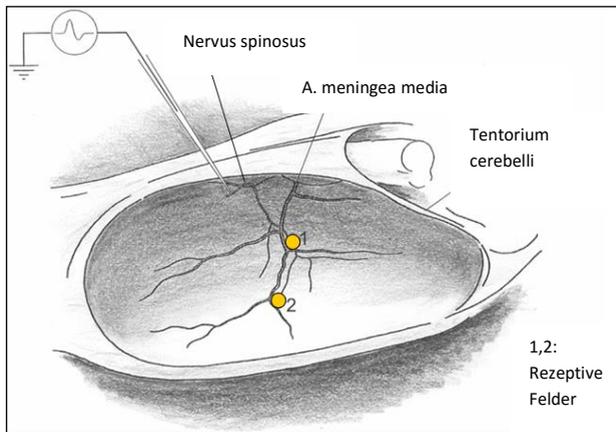


Abbildung 15:

Schema der elektrophysiologischen Ableitung am Halbschädelpräparat

Grafik: R. De Col

Versuchsprotokolle

Bei allen Experimenten wurden die Fasern konstant mit 0,25 Hz elektrisch stimuliert, wobei die Stromstärke des Stimulus zwischen dem 1,3- und dem 1,5-fachen Wert der gemessenen elektrischen Schwelle lag, um eine sichere Antwort auf den Reiz auch bei möglicherweise auftretenden Desensibilisierungseffekten zu erhalten.

Ebenso wurde bei allen Experimenten eine Kontrollzeit von 15 min aufgezeichnet, um sicherzustellen, dass die Fasern stabil antworteten. Anschließend wurde in 5 min-Intervallen getestet, ob das Anhalten und wieder Starten des Flüssigkeitskreislaufes einen Einfluss auf die Aktivität haben könnte, da für die Gabe und das Auswaschen der Testsubstanzen ebenfalls ein Stoppen und Starten des Kreislaufs nötig war.

Die Testsubstanz Angeli's Salt (AS) musste in NaOH gelöst werden, um bis zum Kontakt mit der Pufferlösung stabil zu bleiben. Um einen Effekt durch NaOH auszuschließen, wurde dieses in jedem Experiment in identischer Weise wie die spätere AS-Gabe appliziert und wieder ausgewaschen. Das AS wurde bei angehaltenem Flüssigkeitskreislauf in das Gewebepad pipettiert. Die benötigte Menge der 1 mM Stammlösung wurde für das Gewebepadvolumen individuell berechnet, um eine 300 μ M Endkonzentration im Bad zu erreichen.

Versuchsprotokoll Angeli's Salt *in vitro*

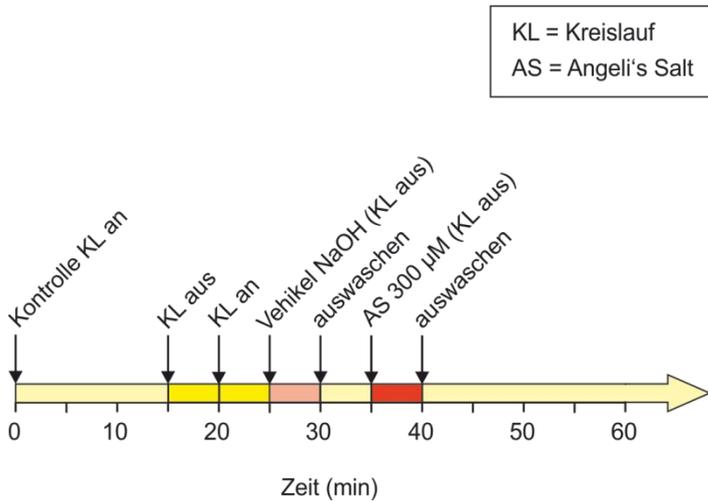


Abbildung 16:

Ablaufschema der *in vitro* Experimente

Die 3 Versuchsreihen unterschieden sich dabei lediglich durch die Genotypvarianten der Versuchstiere.

Folgende Anzahl an Fasern wurde jeweils gemessen:

C57Bl6: n = 13 in 10 Versuchen

TRPA1 $-/-$: n = 11 in 10 Versuchen

TRPA1/TRPV1 \neq : n = 13 in 8 Versuchen

3.3 Auswertung und Statistik

3.3.1 Auswertung der *in vivo* Experimente

Auswertung der neuronalen Aktivität

Die Aktivität der Neurone wurden mit dem Computerprogramm Spike 2 ausgewertet. Da es sich um eine extrazelluläre Ableitung handelt, wurden in der Regel neben dem untersuchten Neuron noch andere Units mitregistriert. Das abgeleitete Neuron wurde anhand der Eigenschaften seiner Aktionspotentiale (Amplitude, Länge und Form) charakterisiert. Anschließend wurden von dem Programm in einem Suchlauf alle APs auf Übereinstimmung mit den APs des charakterisierten Neurons überprüft und entsprechend zugeordnet.

Die so gereinigte Aktivität wurde minutenweise zusammengefasst, jeweils beginnend mit der Sekunde eines mechanischen Stimulus. Da davon auszugehen ist, dass die Spontanaktivität auch während der Stimulation weiter besteht, musste die Ableitung zuerst bereinigt werden. Die Spontanaktivität wurde zunächst im Zeitraum von einer Sekunde vor Beginn des Stimulus und einer Sekunde nach Ende des Stimulus gemittelt und als Spontanaktivität von der Gesamtaktivität des Stimulus subtrahiert, somit die reine mechanisch evozierte Aktivität errechnet. Diese wurde schließlich von der Minutenaktivität subtrahiert, um die reine Spontanaktivität zu erhalten.

Auswertung des meningealen Blutflusses

Die Auswertung der meningealen Blutflussmessungen erfolgte primär über die DRT Software, mit der die Messungen auch aufgezeichnet wurden. Hier wurde der Flow in 5-Minuten-Intervallen gemittelt und in MS Excel übertragen.

3.3.2 Auswertung der *in vitro* Experimente

Unter Ruhebedingungen waren die meisten Units nicht oder nur wenig spontanaktiv. Da sich die Wirkung der Testsubstanz aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit in einem Zeitraum weniger Sekunden abspielte, wurden als primäre Messintervalle 10 Sekunden gewählt, welche dann auf Minutenintervalle hochgerechnet werden konnte. Die Auswahl und Charakterisierung der einzelnen Fasern erfolgte anhand der gleichen Kriterien wie bei den APs der Versuche *in vivo*. Als zusätzliches Kriterium wurde die konstante Latenz nach den regelmäßigen elektrischen Stimuli herangezogen.

3.3.3 Statistik

Die Daten wurden mit Statistica 7.1 und Microsoft Excel ausgewertet.

Bei den elektrophysiologischen Versuchen und den Flow-Messungen wurden die Datenblöcke mittels eindimensionaler Varianzanalyse (One-way repeated measures ANOVA) miteinander verglichen. Abweichungen von den Mittelwerten wurden als Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

Bei den Experimenten *in vitro* wurde der Anstieg der neuronalen Aktivität (Differenz zur Aktivität vor dem Stimulus) mittels Student t-Test analysiert.

Statistisch signifikante Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ angenommen.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Origin 7 und 9 in Verbindung mit Corel Draw XVI verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der abgeleiteten Neurone im *in vivo* Modell

Es wurde von insgesamt 57 Neuronen aus dem rechten spinalen Trigemuskern von 52 männlichen Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 280 bis 460 g abgeleitet. 52 Neurone wurden durch Bestimmung ihrer rezeptiven Felder in der Dura mater und in extrakraniellen Strukturen sowie ihrer mechanischen Schwelle und ihrer Lokalisation im Hirnstamm charakterisiert.

Verteilung der rezeptiven Felder

Alle gemessenen Neurone verfügten über ein mechanisch sensitives, rezeptives Feld in der Dura mater. Diese rezeptiven Felder unterschieden sich in ihrer Ausprägung und Lokalisation innerhalb des trepanierten Bereiches. Nur sehr selten (bei 3 von 52 Neuronen) war der komplette Bereich mechanosensitiv. Am häufigsten fanden sich die rezeptiven Felder im rostralateralen und caudomedialen Bereich des Trepanationsgebietes. Von den 52 Neuronen verfügten 49 über faziale rezeptive Felder. Die Zuordnung zu den drei Trigeminasästen ergab, dass 23 Neurone mechanisch sensitiven Input sowohl vom ophthalmischen (V1) als auch vom maxillären Gebiet (V2) hatten. 16 Neurone erhielten reinen Input von V1 und 10 Neurone waren isoliert V2 zuzuordnen. Bei 21 Neuronen war die Cornea an den rezeptiven Feldern beteiligt. 38 Neurone erhielten konvergenten Input aus dem Periost rostral des Trepanationsfeldes. 39 Neurone erhielten afferenten Zustrom vom M. temporalis und 32 von der Nackenmuskulatur.

Mechanische Schwelle

Mit einem standardisierten Satz an von Frey Filamenten wurde die mechanische Schwelle in den rezeptiven Feldern der Dura mater untersucht.

Die Schwellen reichten von 0,98 mN bis 11,8 mN mit einem Median von 4,9 mN.

Lokalisation im Hirnstamm

Nach Ende der Messung wurde mit Hilfe des Mikrosteppers die Position des abgeleiteten Neurons in Bezug zum Obex bestimmt. Die Neurone lagen zwischen 1,11 und 3,40 mm (Mittel: 2,13 mm) hinter dem Obex und zwischen 0,6 und 2,54 mm (Mittel: 1,42 mm) lateral von der Mittellinie des Hirnstamms auf der ipsilateralen Seite. Die Ableittiefe in Bezug auf die Oberfläche des Hirnstamms lag zwischen 200 und 1311 μm (Mittel: 732 μm , Median: 747 μm).

Latenz und elektrische Schwelle

Die Bestimmung der Latenz und der elektrischen Schwelle ist bei den durchgeführten extrazellulären Ableitungen nicht immer präzise möglich. Eine Berechnung der Nervenleitgeschwindigkeit kann aufgrund der unbekanntem Faserverlaufs zwischen duralem rezeptivem Feld und dem Nucleus spinalis des N. trigeminus nur als Anhaltspunkt gesehen werden. Von 27 Neuronen konnten beide Parameter gemessen werden. Die elektrischen Schwellen reichten von 0,06 bis 4,02 mA. Im Mittel lagen sie bei 1,08 mA (Median: 0,76 mA). Die durchschnittliche Latenz der gemessenen Zellen lag bei 16,5 ms (Median: 12 ms). Die kleinste Latenz betrug 8 ms, die größte 60 ms. Zur Abschätzung der Leitungsgeschwindigkeit wurde eine ungefähre Distanz von 25 mm zwischen Dura mater und Trigeminskern angenommen, um so die afferenten Fasern der A δ - und C-Klasse zuzuordnen, welche zur Entladung der Neurone führten. Unter der Annahme einer synaptischen Transmissionszeit von etwa 1 ms ergeben sich damit Leitungsgeschwindigkeiten zwischen 0,4 m/s und 3,6 m/s, d.h. bei einer angenommenen Grenze von 2,5 m/s zwischen C- und A δ -Fasern wurden die Neurone von C- und A δ -Fasern angetrieben.

4.2 Einfluss der mechanischen Stimulation der Dura mater auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern

Von 52 Experimenten wurde zunächst die 20-minütige Kontrollzeit ausgewertet, um zu überprüfen, ob die mechanische Reizung (Frequenz 1/min, Impulsdauer 1 s) alleine einen sensibilisierenden oder desensibilisierenden Einfluss auf die Spontanaktivität der abgeleiteten Neurone hatte. Die Spontanaktivität wurde in Minuten-Intervallen gemittelt. Im Ergebnis wirkte sich der Stimulus nicht auf die Stabilität der Grundaktivität der gemessenen Neurone aus. Leichte Schwankungen sind erkennbar, aber nicht signifikant.

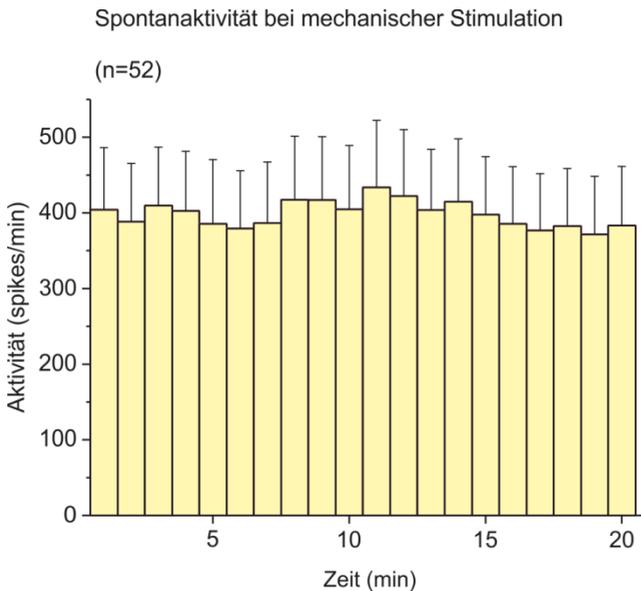


Abbildung 17:

Verhalten der Spontanaktivität während der Kontrollperioden unter mechanischer Stimulation der Dura mater

4.3 Wirkung des sGC-Aktivators GTN auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigemuskern

Die 120-minütige GTN-Infusion führte zu einer Zunahme der Spontanaktivität, die zwischen der 31. und der 60. Minute nach Beginn der Infusion statistisch signifikant wurde (Wilcoxon Matched Pairs Test ($p < 0,05$)). In der zweiten Stunde nach Beginn der Infusion zeigte sich ein Rückgang der Spontanaktivität bis etwa zum Ausgangsniveau.

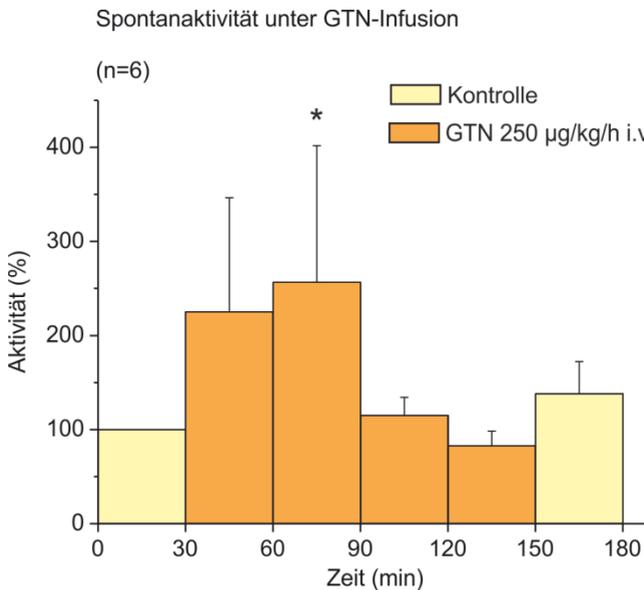


Abbildung 18:

Spontanaktivität bei zweistündiger GTN-Infusion;
Anstieg der Aktivität in der ersten Stunde (* = $p < 0,05$)

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigte bis zur 60. Minute nach Beginn der GTN-Infusion lediglich einen minimalen Anstieg (Sensibilisierungstendenz), jedoch in der zweiten Stunde der Infusion einen Abfall der Aktivität (Desensibilisierung), welcher 90 min nach der Infusion statistisch signifikant war (Wilcoxon Matched Pairs Test ($p < 0,05$)). In der Postkontrollperiode wurde wie bei der Spontanaktivität wieder in etwa das Ausgangsniveau erreicht.

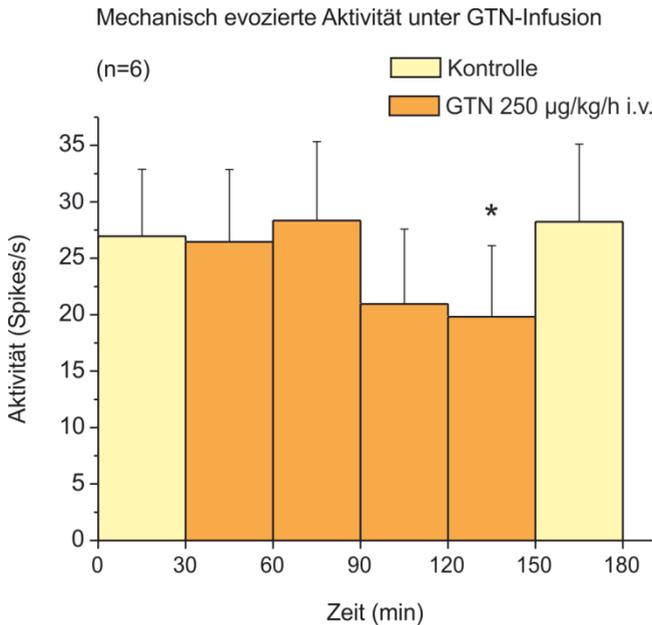


Abbildung 19:

Mechanisch evozierte Aktivität bei zweistündiger GTN-Infusion;
Desensibilisierungseffekt in der zweiten Stunde (* = $p < 0,05$)

4.4 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigemuskern

In dieser Versuchsreihe sollten die Effekte einer TRPA1-Aktivierung durch Nitroxyl auf die neuronale Aktivität trigeminaler Neurone *in vivo* untersucht werden. Eine Lösung von Angeli's Salt (als HNO-Donator) wurde dabei direkt auf den zu untersuchenden Wirkort topisch appliziert.

4.4.1 Wirkung von Nitroxyl bei topischer Applikation auf die Dura mater

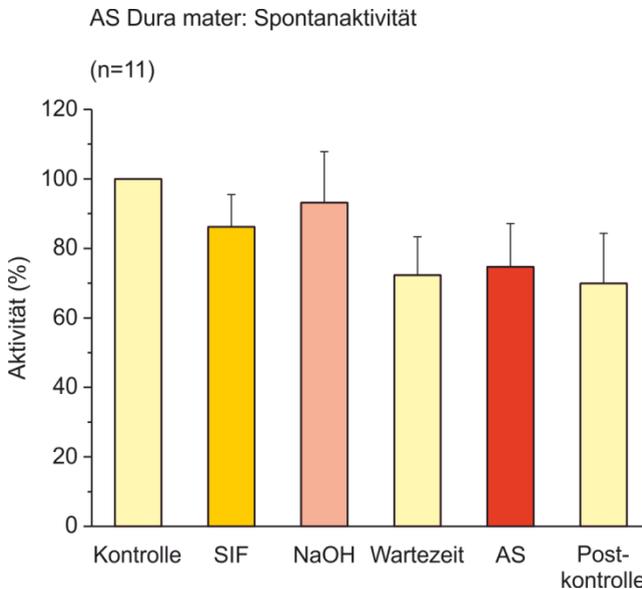


Abbildung 20:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Angeli's Salt (300 μ M) auf die Dura mater; Minutenaktivität auf 5 min gemittelt und normiert

Es gab keinen statistisch signifikanten Effekt, der auf eine durch die Nitroxygabe verursachte Aktivierung oder darauf folgende Inaktivierung der zentralen trigeminalen Neurone hinweisen könnte.

Auch die Auswertung der mechanisch evozierten Aktivität zeigt ein stabiles Aktivitätsniveau:

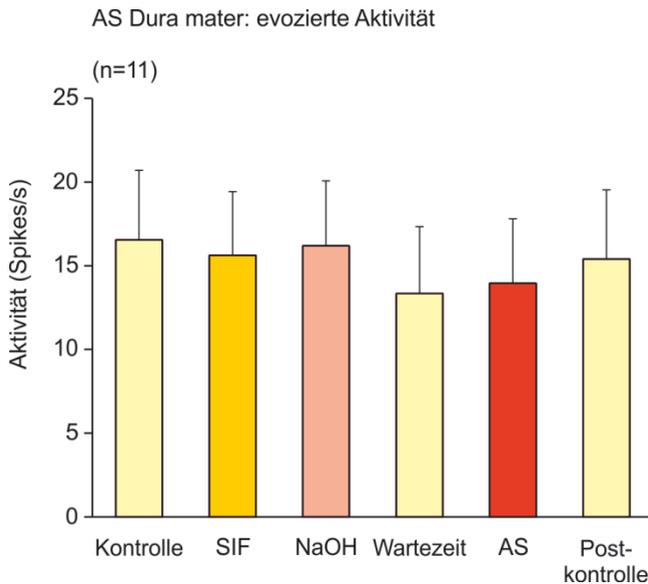


Abbildung 21:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Angeli's Salt (300 μ M) auf die Dura mater; Sekundenaktivität über 5-Stimulationen gemittelt

4.4.2 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone bei topischer Applikation auf den Hirnstamm

Auch bei der zentralen Applikation gab es keinen statistisch signifikanten Effekt, der auf eine Aktivierung oder darauf folgende Inaktivierung durch die topische Gabe von Nitroxyl auf die Medulla oblongata hinweisen könnte.

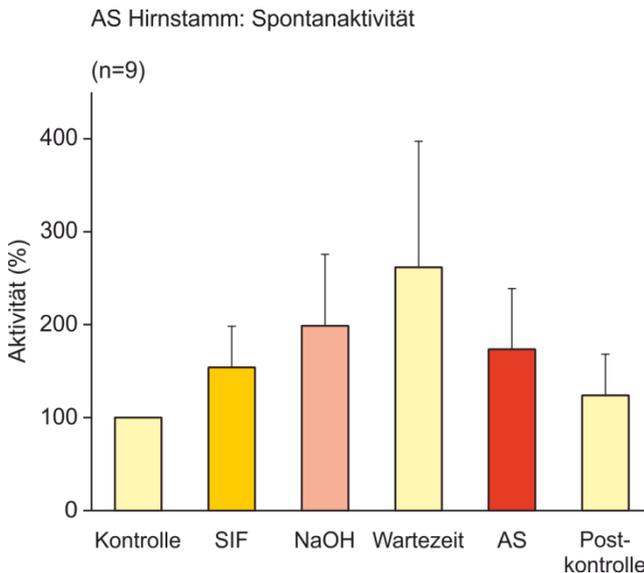


Abbildung 22:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Angeli's Salt (600 μ M) auf die Medulla oblongata; Minutenaktivität über 5 min gemittelt und normiert

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigt sich ebenfalls stabil.

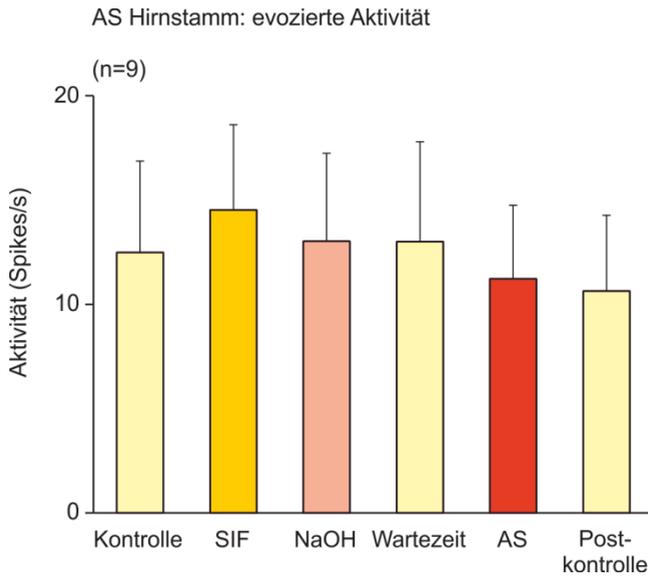


Abbildung 23:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Angeli's Salt ($600 \mu\text{M}$) auf die Medulla oblongata; Sekundenaktivität über 5 Stimulationen gemittelt

4.5 Wirkung von Senföl auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone

4.5.1 Wirkung von Senföl bei topischer Applikation auf die Dura mater

Bei 12 Experimenten konnte weder ein signifikanter Effekt durch die niedrige Konzentration noch durch die höhere Konzentration von Senföl bei topischer Applikation auf die Dura mater festgestellt werden.

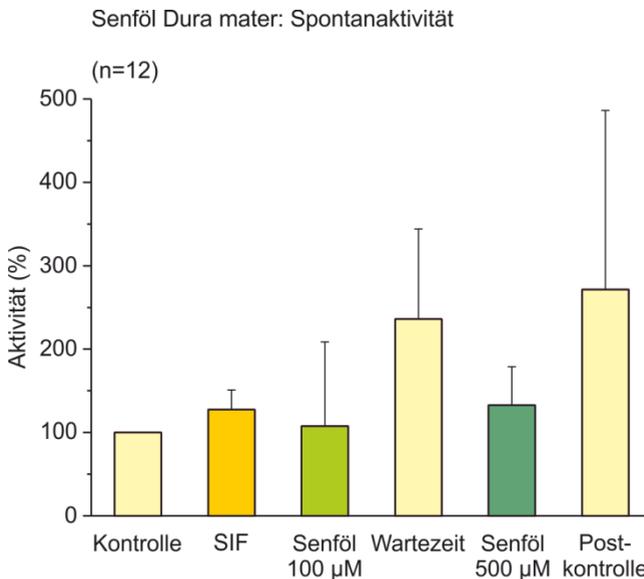


Abbildung 24:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Senföl auf die Dura mater; Minutenaktivität über 15 Minuten gemittelt und normiert

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigte sich bis einschließlich der Applikation der niedrigeren Konzentration relativ stabil. Nach Applikation der höheren Konzentration zeigt hier die Aktivität im Mittel eine abnehmende Tendenz.

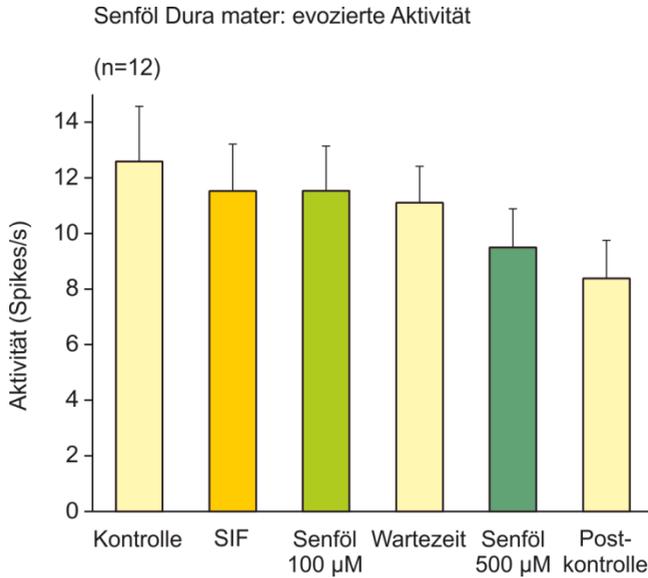


Abbildung 25:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Senföl auf die Dura mater; Sekundenaktivität über 15 Stimulationen gemittelt

4.5.2 Wirkung von Senföl bei topischer Applikation auf den Hirnstamm

Bei den Experimenten mit zentraler Applikation wurde direkt mit der höheren Konzentration (5×10^{-4} M) gearbeitet. Ein signifikanter Effekt trat nicht auf.

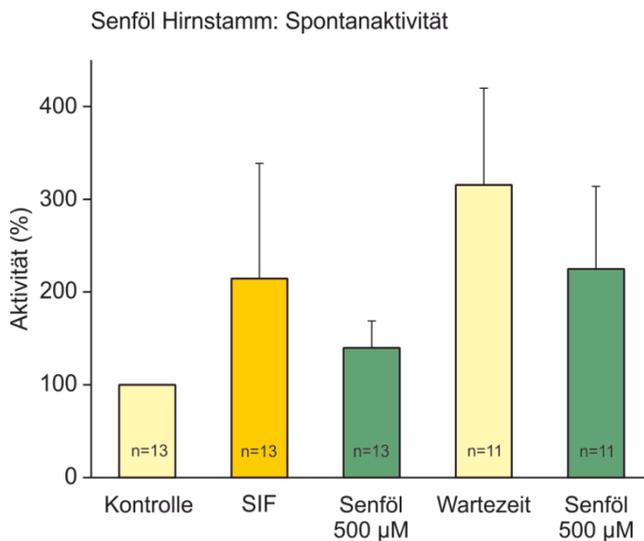


Abbildung 26:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Senföl auf die Medulla oblongata, Minutenaktivität über 15 Minuten gemittelt und normiert

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigt im Mittel ebenfalls keine Veränderung nach der Senfölapplikation.

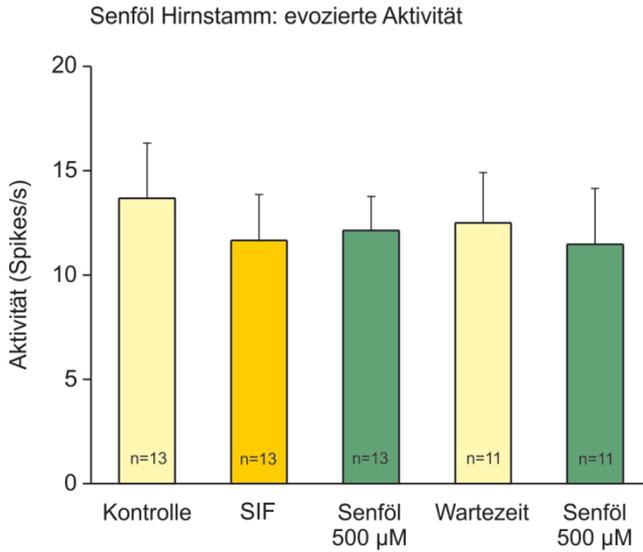


Abbildung 27:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Senföl auf die Medulla oblongata; Sekundenaktivität über 15 Stimulationen gemittelt

4.6 Wirkung von Acrolein auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone

4.6.1 Wirkung von Acrolein bei topischer Applikation auf die Dura mater

Es konnte weder bezüglich der Spontanaktivität noch der evozierten Aktivität eine signifikante Änderung des Aktivitätsniveaus gemessen werden. Tendenziell ist ein verzögerter Anstieg der Spontanaktivität in den 20 Minuten nach der Einwirkzeit von 300 μM Acrolein zu erkennen. Aufgrund der starken Streuung erreicht dieser aber keine statistische Signifikanz.

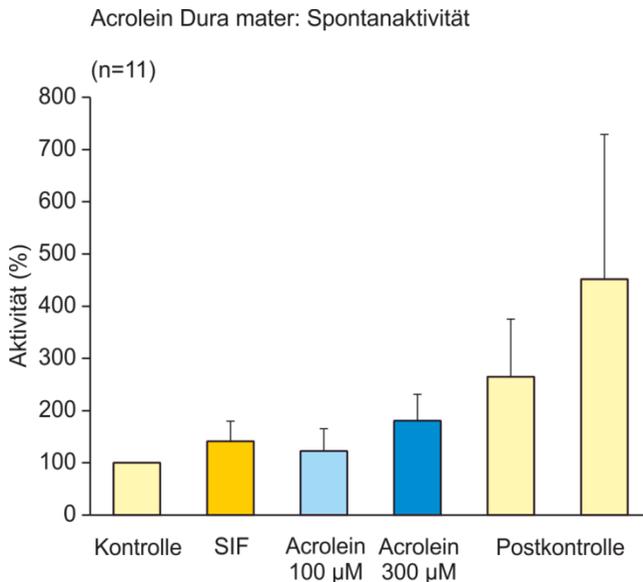


Abbildung 28:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Acrolein auf die Dura mater; Minutenaktivität über 10 Minuten gemittelt und normiert

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigte bei topischer Gabe von Acrolein auf die Dura mater bei steigender Konzentration eine abnehmende Tendenz.

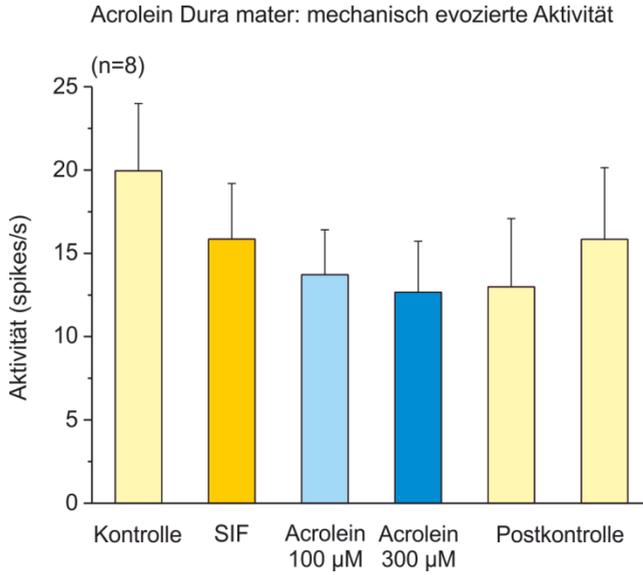


Abbildung 29:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Acrolein auf die Dura mater; Sekundenaktivität über 10 Stimulationen gemittelt

4.6.2 Wirkung von Acrolein bei Injektion ins Ganglion trigeminale

Der TRPA1-Agonist wurde in dieser Versuchsreihe direkt ($n = 4$) oder an das Ganglion trigeminale ($n = 2$) injiziert. Es konnte keine signifikante Veränderung der neuronalen Aktivität festgestellt werden.

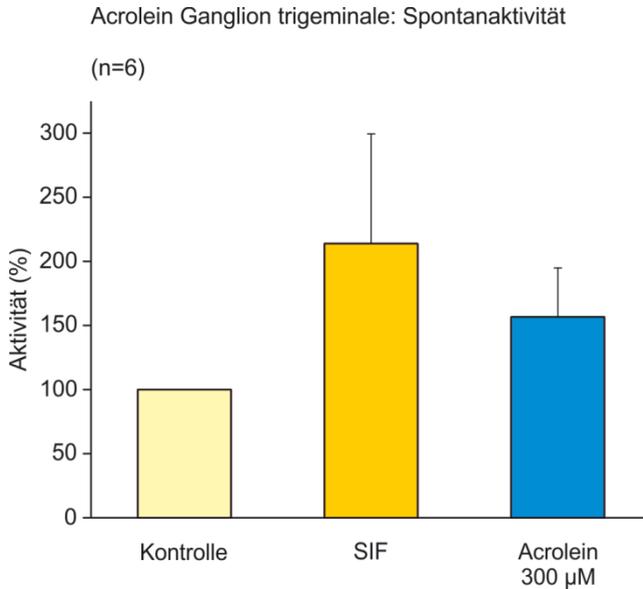


Abbildung 30:

Spontanaktivität bei Injektion von Acrolein ins Ganglion trigeminale; Minutenaktivität über 20 Minuten gemittelt und normiert

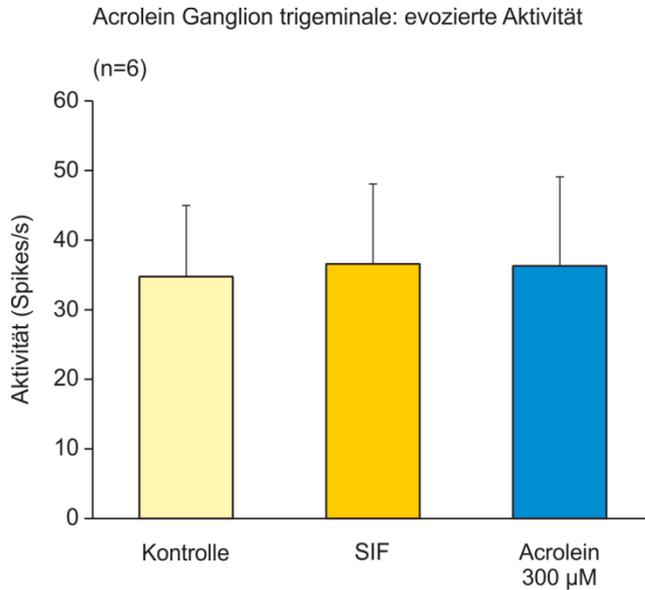


Abbildung 31:

Mechanisch evozierte Aktivität bei Injektion von Acrolein ins Ganglion trigeminale; Sekundenaktivität über 20 Stimulationen gemittelt

4.6.3 Wirkung von Acrolein bei topischer Applikation auf den Hirnstamm

Acrolein (300 μM) wurde in dieser Versuchsreihe topisch auf die betreffende Region des Hirnstammes appliziert. Es ergab sich wie bei der peripheren Gabe eine Tendenz in Richtung eines verzögerten, statistisch nicht signifikanten Anstiegs der Spontanaktivität.

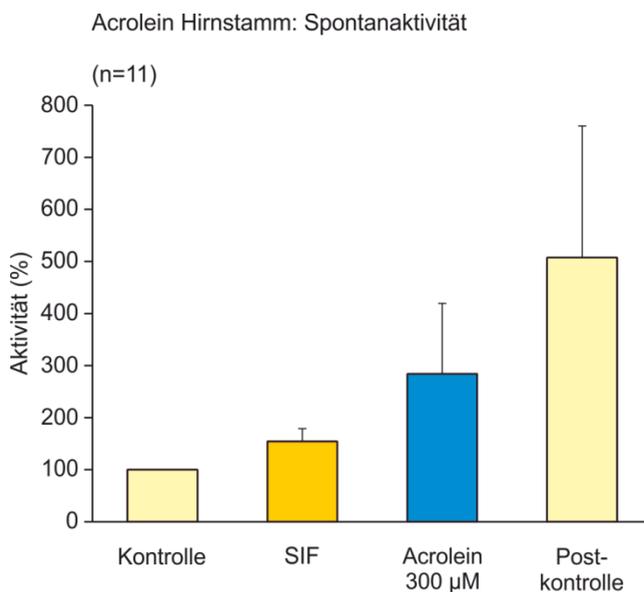


Abbildung 32:

Spontanaktivität bei topischer Applikation von Acrolein auf die Medulla oblongata; Minutenaktivität über 10 Minuten gemittelt und normiert

Die mechanisch evozierte Aktivität blieb bei topischer Applikation auf den Hirnstamm stabil.

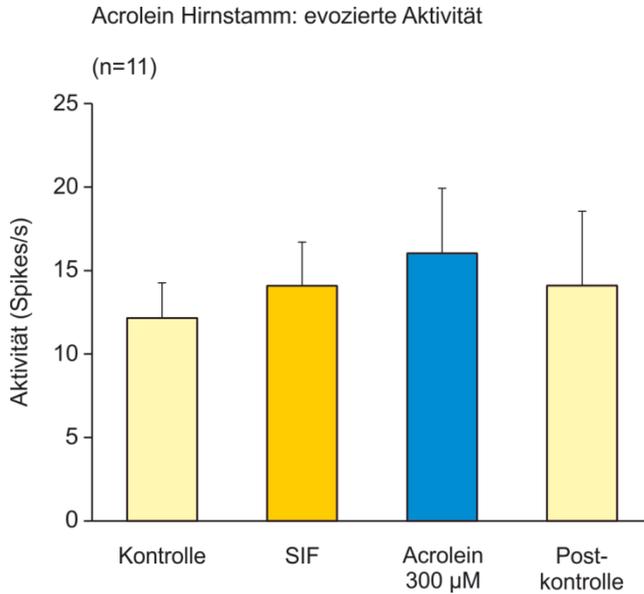


Abbildung 33:

Mechanisch evozierte Aktivität bei topischer Applikation von Acrolein auf die Medulla oblongata; Sekundenaktivität über 10 Stimulationen gemittelt

4.6.4 Wirkung von Acrolein auf den meningealen Blutfluss

Um die Wirkung von Acrolein *in vivo* auf primäre peptiderge Afferenzen der Dura mater zu untersuchen, wurde an 7 Tieren der meningeale Blutfluss im Bereich von insgesamt 13 arteriellen Gefäßen der Dura mater gemessen.

Die topische Applikation von 100 und 300 μM Acrolein auf die Dura mater führte zu einem dosisabhängigen Anstieg des Blutflusses, der bei 300 μM statistisch signifikant war.

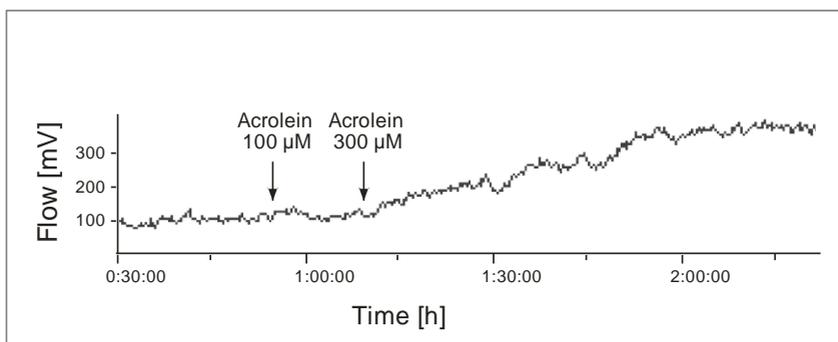


Abbildung 34:

Beispiel für die Wirkung von Acrolein auf den meningealen Blutfluss bei fortlaufender Messung

Nach Auswaschen der Substanz, einer halbstündigen Ruhephase und anschließender zweiminütiger Einwirkzeit des TRPA1-Antagonisten HC0300031 (50 μ M) blieb der Blutflussanstieg aus, ebenso nach vorhergehender Applikation des CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇

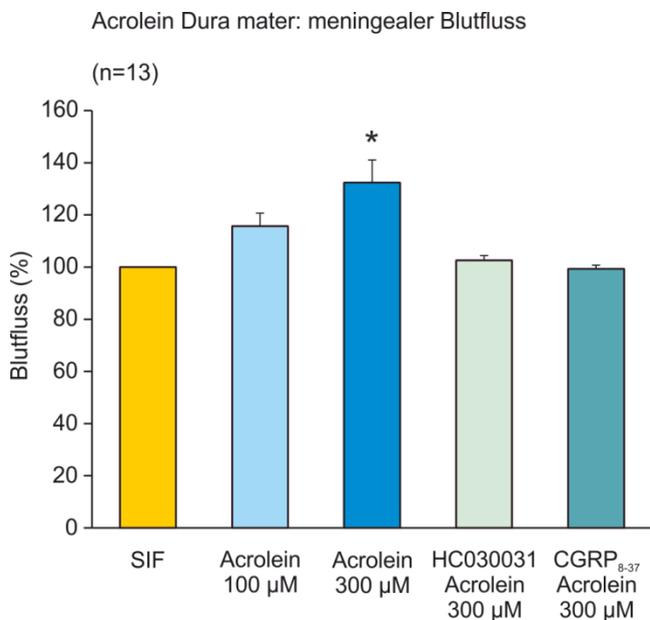


Abbildung 35:

Meningealer Blutfluss bei kumulativer Applikation von 100 μ M und 300 μ M Acrolein auf die Dura mater (* = $p < 0,001$); Blutfluss über 15 Minuten (Applikationen ohne Blocker) bzw. 10 Minuten (Applikationen nach vorhergehender Blockergabe) gemittelt und normiert

4.7 Charakterisierung meningealer Afferenzen im *in vitro* Modell

Von 19 Mäusen (15 männlich, 4 weiblich) mit einem Gewicht von 17 g - 33 g wurden insgesamt 37 afferente Fasern aus dem N. spinosus und dem N. tentorius abgeleitet, davon 13 C-Fasern und 24 A δ -Fasern (Nervenleitungsgeschwindigkeiten < 2,5 bzw. \geq 2,5 m/s) Alle Fasern waren mechanosensitiv bei Reizung mit einem von Frey-Filament der Stärke 3 mN.

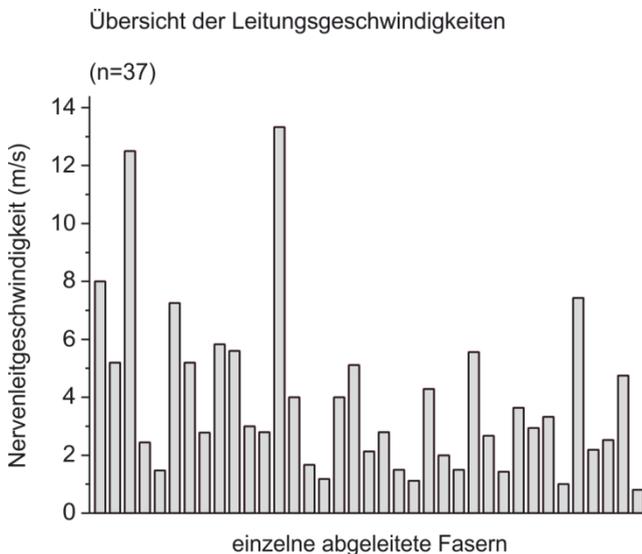


Abbildung 36:

Verteilung der Nervenleitungsgeschwindigkeiten.

Die meisten Fasern sind der Klasse der A δ ($v \geq 2,5$ m/s) zuzuordnen.

C57Bl6 – Wildtypkontrolle

Aus 7 Versuchstieren (5 m, 2 w) wurden 13 Einzelfasern gemessen, 2 C- und 11 A δ -Fasern. 12 Afferenzen waren dem N. tentorius zuzuordnen, 1 Faser dem N. spinosus. Zur Lage der rezeptiven Felder s. Tab. 5. Von 10 Fasern wurde die elektrische Schwelle bestimmt. Diese lag zwischen 10 μ A und 35 μ A (Mittel 26,2 μ A).

TRPA1-Knockout-Mäuse

Aus 7 Versuchstieren (6 m, 1 w) wurden 11 Einzelfasern gemessen, 6 C- und 5 A δ -Fasern. 7 Afferenzen waren dem N. tentorius zuzuordnen, 2 dem N. spinosus. Bei den zwei restlichen war eine genaue Zuordnung nicht möglich. Zur Lage der rezeptiven Felder s. Tab. 6. Die elektrische Schwelle aller Fasern lag zwischen 15 μ A und 38 μ A (Mittel 24,3 μ A).

TRPA1/TRPV1-Knockout-Mäuse

Aus 5 Versuchstieren (4 m, 1 w), wurden 13 Einzelfasern gemessen wurden, 5 C- und 8 A δ -Fasern. 7 Afferenzen waren dem N. tentorius zuzuordnen, 2 dem N. spinosus, bei den zwei restlichen war eine genaue Zuordnung nicht möglich. Zur Lage der rezeptiven Felder s. Tab. 7. Die elektrische Schwelle aller Fasern lag zwischen 15 μ A und 38 μ A (Mittel 24,3 μ A).

4.8 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen im *in vitro* Modell

Die Applikation von Angeli's Salt (AS) in das Gewebebad des Halbschädelpräparates wurde so eingestellt, dass eine 300 μM Endkonzentration an Nitroxyl im Gewebebad vorlag. Es wurde untersucht, inwieweit die Grundaktivität der Faser durch die Aktivierung des TRPA1-Rezeptors mit Nitroxyl, welches die Ausgangssubstanz AS in pH-neutraler Lösung spontan freisetzt, beeinflusst wird. Die Auswertung der neuronalen Aktivität erfolgte in 1- und 5-Minuten-Blöcken. Die Statistik wurde anhand der 5-Minuten-Blöcke erstellt.

4.8.1 Stabilität der Kontrollen und Einfluss des Vehikels

Aufgrund der schnell einsetzenden Reaktion von AS mit SIF im Gewebebad konnte die Substanz nicht bei laufendem Flüssigkeitskreislauf eingewaschen werden. Deshalb wurde der Kreislauf jeweils 1 min vor den Applikationen gestoppt und zum Auswaschen der Substanzen wieder eingeschaltet. Um einen Einfluss dieses Vorganges auf die Aktivität der Fasern auszuschließen, wurde dies im Rahmen der Kontrollphase berücksichtigt. Die neuronale Aktivität während der Kontrollen zeigte sich stabil.

Da die AS-Stammlösung im stark alkalischen Bereich lag (15 mM NaOH) wurde auch eine potentielle Wirkung der mit dem Gewebepräparat in Berührung kommenden Menge an NaOH im Rahmen einer Vehikelkontrolle überprüft.

4.8.2 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei C57Bl6 Mäusen

Von 13 Fasern zeigten 10 in der ersten Minute der 5-minütigen Einwirkzeit eine Aktivitätssteigerung um über 100 % im Vergleich zur Minute vor der Applikation. Zwei Fasern steigerten ihre Aktivität sogar um über das Zehnfache des Ausgangswertes. Zwei Fasern erreichten die maximale Aktionspotential-Frequenz erst verzögert in der zweiten Minute der Einwirkzeit, während bei allen anderen hier die Aktivität entweder bereits erloschen war oder merklich

zurückging. 12 Fasern waren spätestens ab der vierten Minute der Einwirkzeit nicht mehr elektrisch aktivierbar. Nur eine Faser blieb zwar weiterhin aktivierbar, war aber desensibilisiert. Im Mittel konnte eine ca. 6-fache Erhöhung der Aktivität in der ersten Minute nach Applikation im Vergleich zur Grundaktivität von 15 spikes/min gemessen werden. Eine Übersicht über die Minutenaktivitäten ist in den Tabellen 8-10 im Anhang dargestellt. Bezogen auf die der Statistik zugrunde liegenden 5-Minuten-Intervalle ergibt sich eine Aktivitätssteigerung um das 1,5-Fache. Dieser Anstieg ist statistisch nicht signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p > 0,05$) / (ANOVA mit Fischer LSD Test ($p < 0,05$), der Desensibilisierungseffekt ist hingegen deutlich signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p < 0,05$).

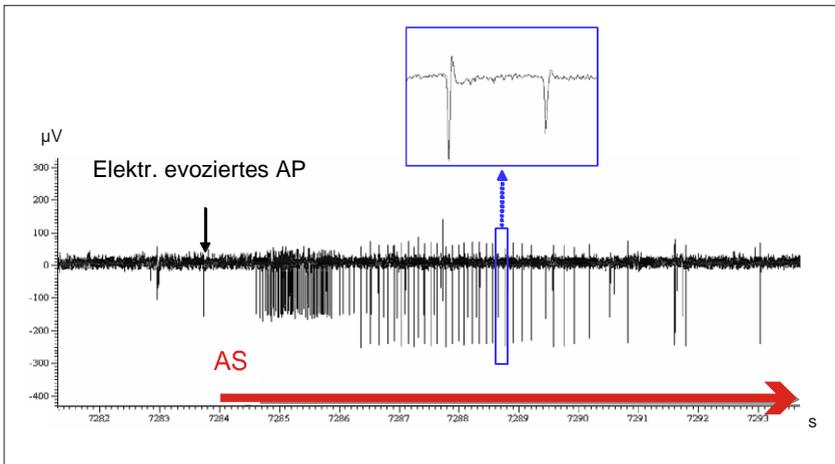


Abbildung 37:

Beispiel für die Aktivierung von zwei primären Afferenzen durch AS. Neben der durch regelmäßige elektrische Reize „getrackten“ Unit, die bereits in der ersten Sekunde nach Einwaschen von AS entlädt, wird eine zweite Unit mit größerer Amplitude nach gut zwei Sekunden aktiviert.

AS *in vitro*: C57Bl6 - Wildtypkontrolle

(n = 13)

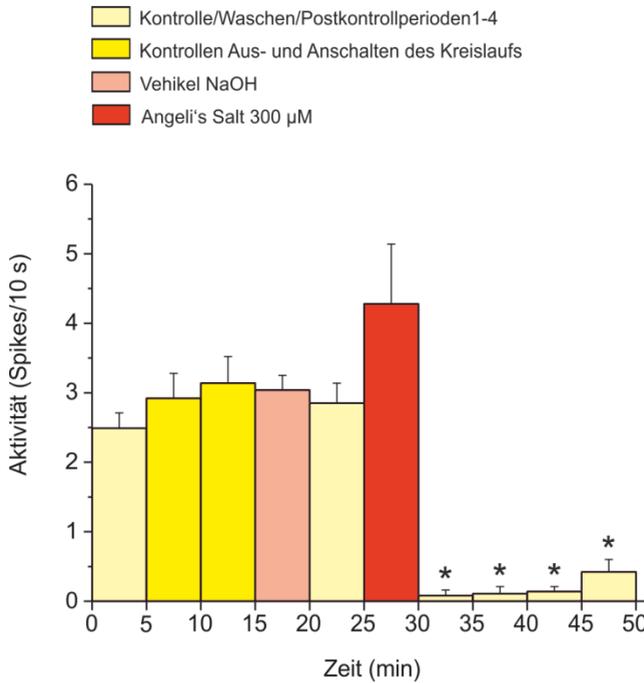


Abbildung 38:

Neuronale Aktivität meningealer Afferenzen *in vitro* bei Applikation von 300 µM Angeli's Salt; Aktionspotentiale pro 10 s über 5 Minuten gemittelt. Deutlicher Desensibilisierungseffekt aller Postkontrollperioden unmittelbar nach kurzer Aktivierung der Fasern (* = $p < 0,05$).

4.8.3 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei TRPA1-Knockout-Mäusen

Wider Erwarten zeigten 11 von 12 Fasern aus den TRPA1 -/- Mäusen in der ersten Minute der 5-minütigen Einwirkzeit eine Aktivitätssteigerung um über 100 % im Vergleich zur Minute vor der Applikation. 7 Fasern steigerten ihre Aktivität um mehr als das Zehnfache des Ausgangswertes. Bis auf eine Faser erreichen alle ihren Aktivitätsgipfel direkt in der ersten Minute nach Applikation. Drei Fasern blieben auch nach der Applikation weiterhin elektrisch aktivierbar, die restlichen waren vollständig desensibilisiert. Bezogen auf die der Statistik zugrunde liegenden 5-Minuten-Intervalle ergibt sich eine Aktivitätssteigerung um das 2,7-fache. Dieser Anstieg ist statistisch signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p < 0,05$), der Desensibilisierungseffekt ist ebenfalls statistisch signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p < 0,05$)).

AS *in vitro*: TRPA1-Knockout

(n = 12)

- Kontrolle/Waschen/Postkontrollperioden 1-4
- Kontrollen Aus- und Anschalten des Kreislaufs
- Vehikel NaOH
- Angeli's Salt 300 μ M

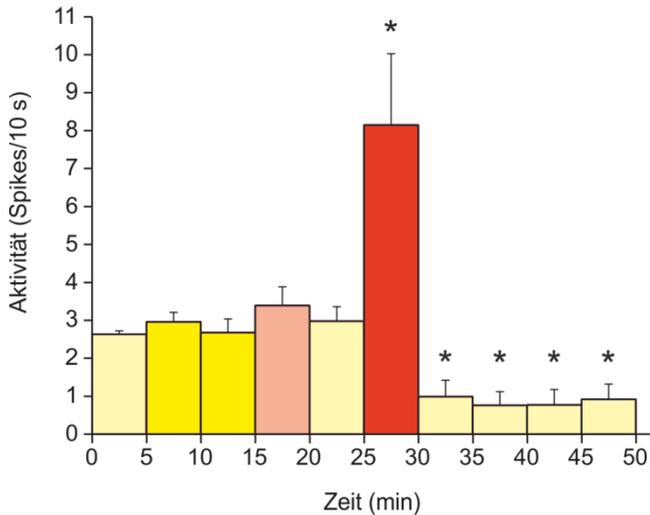


Abbildung 39:

Neuronale Aktivität meningealer Afferenzen *in vitro* bei Applikation von 300 μ M Angeli's Salt; Aktionspotentiale pro 10 s über 5 Minuten gemittelt. Signifikante Aktivierung mit daran anschließender Desensibilisierung der Fasern über alle Postkontrollperioden (* = $p < 0,05$).

4.8.4 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen bei TRPA1-/TRPV1-Doppelknockout-Mäusen

8 von 13 Fasern zeigten in der ersten Minute der 5-minütigen Einwirkzeit eine Aktivitätssteigerung um über 100 % im Vergleich zur Minute vor der Applikation von Angeli's Salt. 5 Fasern steigerten ihre Aktivität um mehr als das Zehnfache des Ausgangswertes. 11 Fasern erreichten ihren Aktivitätsgipfel direkt in der ersten Minute nach Applikation. 5 Fasern blieben auch nach der Applikation weiterhin aktivierbar, die restlichen waren vollständig desensibilisiert. Bezogen auf die der Statistik zugrunde liegenden 5-Minuten-Intervalle ergibt sich eine Aktivitätssteigerung um das 2,6-fache. Dieser Anstieg ist statistisch deutlich signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p < 0,05$)), der Desensibilisierungseffekt ist ebenfalls statistisch signifikant (ANOVA mit Tukey HSD Test ($p < 0,05$)).

AS *in vitro*: TRPA1/TRPV1-Doppelknockout

(n = 13)

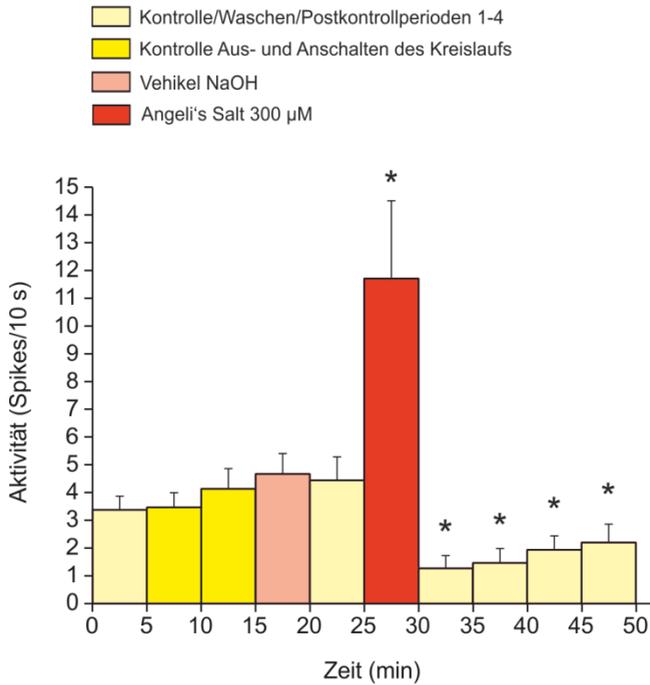


Abbildung 40:

Neuronale Aktivität meningealer Afferenzen *in vitro* bei Applikation von 300 μ M Angeli's Salt; Aktionspotentiale pro 10 s über 5 Minuten gemittelt. Signifikante Aktivierung mit daran anschließender Desensibilisierung der Fasern über alle Postkontrollperioden (* = $p < 0,05$).

4.8.5 Vergleich der Aktivitätssteigerung zwischen den drei Genotypen

Bei allen drei Genotypgruppen war ein signifikanter Anstieg der neuronalen Aktivität unmittelbar nach der Gabe von AS zu verzeichnen. Die Intensität des Anstiegs schien sich jedoch zwischen den Gruppen zu unterscheiden. Der statistische Vergleich zeigt einen signifikant stärkeren Anstieg der neuronalen Aktivität der TRPA1/TRPV1-Doppelknockout-Gruppe gegenüber der C57Bl6-Wildtypkontrolle (T-test, $df = 23$, $p < 0,05$). Der Unterschied zwischen der TRPA1-Knockoutgruppe und der C57Bl6-Wildtypkontrolle ist knapp nicht signifikant (T-test, $df = 24$, $p = 0,06$).

Der Vergleich nach der Applikation von AS zwischen den drei Genotypen zeigte eine tendenziell stärkere Desensibilisierung bei den Knockoutgruppen, welche wiederum bei den Doppelknockouttieren am deutlichsten schien. Diese verfehlten hier die Signifikanz gegenüber der C57Bl6-Wildtypkontrolle jedoch knapp (T-test, $df = 24$, $p = 0,056$).

Anstieg der Aktivität unter Angeli's Salt

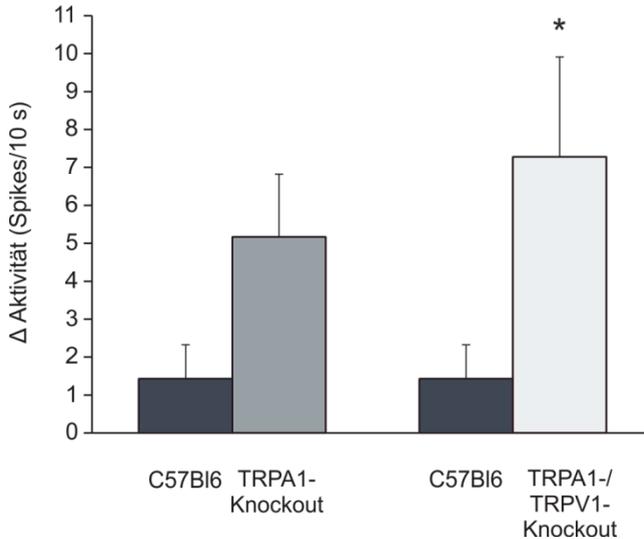


Abbildung 41:

Vergleich der Spontanaktivität nach der Angeli's Salt-Applikation (300 μ M) *in vitro* zwischen den Knockout-Gruppen und der Wildtypkontrolle. Dargestellt ist jeweils die Differenz der Spontanaktivität zwischen den 5 Minuten vor der Applikation und den 5 Minuten Einwirkzeit.

Der Unterschied zwischen der Wildtypgruppe und der Doppelknockoutgruppe erweist sich als signifikant (* = $p < 0,05$).

Desensibilisierung durch Angeli's Salt

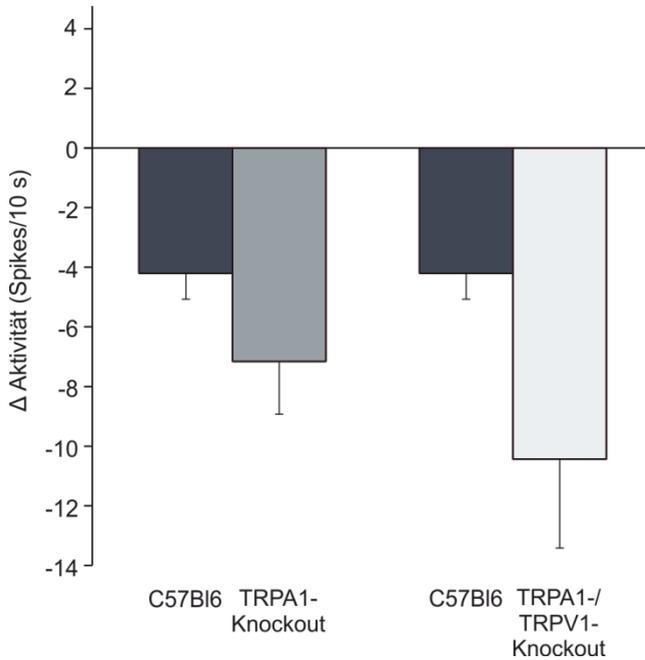


Abbildung 42:

Vergleich der Abnahme der Spontanaktivität infolge der Angeli's Salt Applikation ($300 \mu\text{M}$) *in vitro* zwischen den Knockout-Gruppen und der Wildtypkontrolle. Dargestellt ist jeweils die Differenz der Spontanaktivität in den 5 Minuten Einwirkzeit und den ersten 5 Minuten der Postkontrolle.

5 Diskussion

In dieser Arbeit sollten anhand von zwei Kopfschmerzmodellen (*in vivo* und *in vitro*) die Rolle des TRPA1-Rezeptor-Kanals sowie die zentralen und peripheren Wirkungen von Metaboliten des Stickstoffmonoxidstoffwechsels bei der meningealen Nozizeption und Kopfschmerzentstehung untersucht werden. Die *in vivo* Experimente wurden vor allem in Form von extrazellulären Ableitung von Neuronen mit rezeptiven Feldern in der Dura mater im caudalen spinalen Trigeminuskern durchgeführt, da die Aktivität dieser Neurone ein bewährter Parameter zur Messung der meningealen Nozizeption ist, für die eine Korrelation mit Kopfschmerzen angenommen wird (Knight & Goadsby, 2001; Zhang *et al.*, 2011). Die *in vitro* Experimente dienten zur isolierten Untersuchung der primären meningealen Afferenzen und wurden mittels Einzelfaserableitungen am Halbschädelpräparat der Maus in Anlehnung an Schwenger *et al.* durchgeführt (Schwenger *et al.*, 2007).

5.1 Wirkung einer Langzeitinfusion von Nitroglycerin (GTN)

Obwohl dem CGRP als auch NO-Metaboliten eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Migräneentstehung zugesprochen wird, sind die kausalen Zusammenhänge kaum geklärt (Messlinger *et al.*, 2012). Die Annahme, dass der NO-Metabolismus an den nozizeptiven Mechanismen primärer Kopfschmerzen beteiligt ist, hat sich aus mehreren klinischen und tierexperimentellen Studien ergeben. So stellte man fest, dass eine 20-minütige Infusion von 0,5 µg/kg/min Nitroglycerin bei den meisten Migränepatienten, aber nicht bei gesunden Kontrollpersonen, einen verzögerten migräneartigen Kopfschmerz auslöst. Sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen wurde durch GTN-Infusion ein unmittelbar auftretender Kopfschmerz provoziert, jedoch war dieser bei den Migränepatienten stärker und länger anhaltend (Olesen *et al.*, 1993). Zudem traten bei den Migränepatienten wie auch bei Patienten mit

chronischem Spannungskopfschmerz nach der GTN-Infusion mit mehrstündiger Verzögerung Kopfschmerzen auf, die denen ihrer primären Kopfschmerzerkrankung ähnlich war (Ashina *et al.*, 2000). Ebenso wurden bei Patienten mit Clusterkopfschmerz durch sublinguale GTN-Gabe Clusterkopfschmerzattacken provoziert (Ekbohm K, 1968). Umgekehrt konnte nach Gabe eines unspezifischen NO-Synthase-Blockers (Hemmung der endogenen NO-Produktion) eine Schmerzlinderung bei Migränepatienten erzielt werden (Lassen *et al.*, 1997). Zu diesen klinischen Beobachtungen passen Ergebnisse aus einem tierexperimentellen Kopfschmerzmodell. Sowohl GTN- als auch Natriumnitroprussid (SNP)-Infusion führten *in vivo* bei Ratten zu einer gesteigerten Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone mit Input aus der Dura mater, die ebenfalls biphasisch sein kann (Koulchitsky *et al.*, 2009). Umgekehrt konnte die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone durch die Infusion des unspezifischen NO-Synthase-Inhibitors L-NAME signifikant gesenkt werden (De Col *et al.*, 2003). Nach wie vor ist ungeklärt, wie es zu den zwei zeitlich versetzten Phasen der Kopfschmerzen bzw. der neuronalen Aktivierung bei Gabe von NO-Donatoren kommt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Effekte nicht (nur) auf NO selbst, sondern (auch) auf seinem Metaboliten HNO/NO^- - beispielsweise über TRP-Rezeptor-gekoppelte Signalkaskaden - beruhen (Messlinger *et al.*, 2012). Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirkung von HNO/NO^- sowohl auf zentrale trigeminale Neurone *in vivo* als auch auf primäre Afferenzen *in vitro* untersucht. Als Basis zum Themenkomplex NO – HNO/NO^- wurde eine Versuchsreihe *in vivo* zur Wirkung einer langandauernden GTN-Infusion auf die Aktivität sekundärer trigeminaler Neurone mit Input aus nozizeptiven Afferenzen der Dura mater durchgeführt und bereits publiziert (Feistel *et al.*, 2013). Zusätzlich zur Spontanaktivität wurde die Entwicklung der mechanisch evozierten Aktivität ausgewertet. Hinsichtlich der Spontanaktivität zeigte sich in der ersten Stunde nach Beginn der Infusion ein Aktivitätsanstieg, welcher in der zweiten halben Stunde statistisch signifikant wurde. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Koulchitsky (Koulchitsky *et al.*, 2009). In deren Studie wurde GTN unter den

gleichen Parametern (250 µg/kg/h) infundiert, die Experimente unterschieden sich jedoch in dem Fehlen der regelmäßigen mechanischen Stimulation der Dura mater sowie dem Fehlen einer Postkontrollperiode von der Versuchsreihe für die vorliegende Arbeit. Im weiteren Verlauf der Experimente ergab die Auswertung einen Abfall der Spontanaktivität bis unter das Ausgangsniveau der Kontrollperiode, wenn dieser auch nicht signifikant war. In der darauf folgenden halben Stunde der Postkontrolle ohne Infusion nivellierte sich die Aktivität im Mittel wieder auf das Ausgangsniveau vor der Infusion. Dies entspricht den weiteren Ergebnissen von Feistel *et al.*, wo nach vorhergehender Vehikelinfusion ebenfalls während der ersten Stunde der GTN-Infusion ein signifikanter Aktivitätsanstieg auftrat, welcher von einem Aktivitätsabfall in der zweiten Stunde gefolgt wurde (Feistel *et al.*, 2013). In der Arbeit von Koulchitsky *et al.* wurde jedoch kein Abfall der Aktivität während der zweistündigen Infusion festgestellt (Koulchitsky *et al.*, 2009).

Es ist bekannt, dass sich bei Migräneanfällen die Schmerzintensität unter physischer Aktivität verstärkt (Blau & Dexter, 1981), was auch ein Diagnosekriterium für Migräne in den Leitlinien der IHS darstellt. Deshalb wurde bei den Experimenten *in vivo* nicht nur die spontane, sondern auch die durch Druck auf die Dura mater ausgelöste mechanisch evozierte Aktivität der zentralen Neurone gemessen. Die mechanische Stimulation sollte demnach auch dazu dienen, Bewegungen des Kopfes und die damit verbundenen mechanischen Druckänderungen nachzuahmen. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass TRPA1-Rezeptorkanäle eine wichtige Rolle bei Vorgängen der Mechanosensitivität spielen (Kwan *et al.*, 2006, 2009; Kindt *et al.*, 2007). Da anhand der Ergebnisse von Koulchitsky *et al.*, bereits mit einer Steigerung der Spontanaktivität als Reaktion auf die GTN-Infusion zu rechnen war, stellte sich die Frage, ob GTN möglicherweise auch eine Veränderung der Mechanosensitivität bewirkt.

Die mechanisch evozierte Aktivität zeigte bis zur 60. Minute nach Beginn der GTN-Infusion lediglich einen minimalen Anstieg (Sensibilisierung), jedoch in der zweiten Stunde der Infusion einen signifikanten Abfall der Aktivität

(Desensibilisierung). In der Postkontrollperiode wurde wie bei der Spontanaktivität wieder etwa das Ausgangsniveau erreicht. Somit scheint der Desensibilisierungseffekt reversibel zu sein und die mechanische Sensibilität scheint auf ähnliche Weise von der GTN-Infusion beeinflusst zu werden wie die Spontanaktivität. Hierbei kann es sich um einen rein zentralen Effekt handeln, jedoch kann ein gleichzeitiger peripherer Effekt nicht ausgeschlossen werden. Schon lange ist bekannt, dass Langzeit-Applikationen von GTN einen Toleranzeffekt der Gefäße zur Folge haben, zu dessen Entstehungsmechanismus es diverse, jedoch keine hinreichend bestätigte Hypothesen gibt (Fung, 2004). Es ist anzunehmen, dass das Absinken der Aktivität in der zweiten Stunde der Infusion mit einem negativen Feedbackmechanismus zusammenhängt. So ist bekannt, dass gesteigerte NO- und somit höhere cGMP-Spiegel zu einer Herabregulation des NO-Rezeptors sGC führen können (Krumenacker *et al.*, 2004). Ebenso wurde in immunhistochemischen Untersuchungen festgestellt, dass eine GTN-Infusion über einen längeren Zeitraum sGC in trigeminalen Neuronen herabreguliert (Seiler *et al.*, 2013). Inwiefern diese Änderungen auf zellulärer Ebene im Detail mit den Veränderungen der neuronalen Aktivität im Organismus zusammenhängen, bleibt allerdings noch genauer zu klären.

5.2 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminskern *in vivo*

Da in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde, dass nicht NO selbst, sondern dessen Redoxprodukt Nitroxyl (HNO) durch Zusammenwirken von NO mit H₂S eine Aktivierung des TRPA1-Rezeptors bewirkt (Eberhardt *et al.*, 2014), sollten in dieser Versuchsreihe Effekte einer TRPA1-Aktivierung durch Nitroxyl auf die neuronale Aktivität trigeminaler Neurone *in vivo* untersucht werden. Da Nitroxyl in neutraler Lösung und damit bei systemischer Gabe nicht stabil ist, wurde eine Lösung von Angeli's Salt als HNO-Donator direkt auf den zu untersuchenden Wirkort topisch appliziert. Weder bei peripherer Applikation auf die Dura mater noch bei zentraler Applikation auf die Medulla

oblongata konnten signifikante Wirkungen auf die Aktivität der abgeleiteten trigeminalen Neurone festgestellt werden. Die Auswertung der mechanisch evozierten Aktivität zeigte keine Hinweise auf sensibilisierende oder desensibilisierende Effekte. Eberhardt et al. hatten in ihren *in vitro* Studien jedoch eindeutig festgestellt, dass AS TRPA1-Rezeptoren zu aktivieren vermag. In Patch-Clamp-Versuchen konnten nach AS-Applikation in TRPA1-positiven Hamster-Ovarialzellen Ströme gemessen werden, welche durch den TRPA1-Antagonisten HC030031 blockierbar waren. Im Calcium-Imaging wurde die Reaktion von Neuronen aus Dorsalwurzelganglien (DRG) von Wildtyp-Mäusen und TRPA1-defizienten (-/-) Mäusen nach Stimulation mit AS und dem TRPA1-Agonisten Allylisoithiocyanat verglichen. Beide Substanzen bewirkten im Wildtyp ein vergleichbares Calcium-Signal, das durch den Antagonisten HC030031 blockierbar war und in Zellen von TRPA1^{-/-}-Mäusen ausblieb, was den Schluss nahelegt, dass es sich bei dem durch HNO aktivierten Rezeptorkanal um den Typ TRPA1 handelt, der auch Calcium leitet. NO hingegen hatte keinen nennenswerten Effekt auf die intrazelluläre Calciumkonzentration. Als Folge dieser Aktivierung kommt es zu einer CGRP-Freisetzung und Vasodilatation (Eberhardt *et al.*, 2014). Ob dies auch zu einer messbaren neuronalen Aktivierung in Form von Aktionspotentialen in sekundären Neuronen führt, ist nach den Ergebnissen der *in vivo* Experimente noch unklar. Die negativen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können zum einen in der extrem kurzen Halbwertszeit von AS/HNO begründet sein, da vor der Applikation erst ein Anmischen der alkalischen Stammlösung in SIF erfolgen muss und somit die Dauer bis zum Erreichen des Wirkortes von HNO möglicherweise zu lang ist, insbesondere da der genaue Wirkort nicht bekannt ist. Sollte es sich um einen zentralen Effekt handeln, wäre die Wahrscheinlichkeit, dass eine wirksame Konzentration den Wirkort durch Diffusion erreicht, selbst bei topischer Applikation auf den Hirnstamm sehr gering. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es zwar zu einer Aktivierung des Rezeptorkanals in primären trigeminalen Afferenzen kommt, diese aber nicht zum Entstehen von Aktionspotentialen in den sekundären

Neuronen führt oder der Organismus durch regulative Mechanismen der Aktivierung entgegensteuert, so dass diese letzten Endes im Gesamtsystem nicht messbar ist. Die isolierte Wirkung an primären Afferenzen wurde deshalb in den *in vitro* Experimenten untersucht.

5.3 Wirkung der TRPA1-Agonisten Senföl und Acrolein auf die Aktivität sekundärer Neurone im spinalen Trigeminuskern *in vivo*

In den Experimenten mit Nitroxyl als TRPA1-Agonist konnte keine Änderung der Aktivität der sekundären Neurone im spinalen Trigeminuskern nachgewiesen werden. Da es sich bei Nitroxyl jedoch um ein instabiles Molekül handelt, wurden die Versuchsreihen mit anderen TRPA1-Agonisten, zunächst Senföl, durchgeführt. Senföl ist in Konzentrationen > 100 μM *in vitro* auf zellulärer Ebene auch ein Aktivator von TRPV1 (Everaerts *et al.*, 2011). In bisher unveröffentlichten Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung von Senföl auf meningeale primäre Afferenzen *in vitro* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Senföl in Konzentration von 100 μM bis 500 μM zu einem dosisabhängigen Anstieg der neuronalen Aktivität (Steigerung der Entladungsrate) und einer erhöhten elektrischen Schwelle der untersuchten Afferenzen führt. Der Anstieg der neuronalen Aktivität trat in Präparaten von TRPV1^{-/-}-Mäusen nicht auf, sodass der Effekt in diesem Fall TRPV1-vermittelt zu sein scheint.

Dennoch wurden für die *in vivo* Experimente Lösungen mit Ausgangskonzentrationen von 100 μM und 500 μM Senföl gewählt, da sich die Bedingungen *in vivo* durch längere Diffusionstrecken und anderen Einflüssen des Organismus deutlich von den vereinfachten *in vitro* Bedingungen unterscheiden. Trotz der höher angesetzten Konzentrationen konnte bei den Experimenten mit topischer Applikation auf die Dura mater und die Medulla

oblongata keine Veränderung der neuronalen Aktivität in den sekundären Neuronen gemessen werden.

In einer weiteren Versuchsreihe mit dem spezifischen TRPA1-Agonisten Acrolein wurde getestet, ob sich diese Beobachtungen bestätigen lassen. Bei peripherer Applikation auf die Dura mater trat in der Tendenz eine zeitlich verzögerte Aktivierung auf. Bei Acrolein-Applikation auf die Medulla oblongata konnte ebenfalls tendenziell eine Aktivitätszunahme beobachtet werden. Auch Bei Applikation direkt ins Ganglion trigeminale hingegen blieb die neuronale Aktivität stabil. Es wurde in den einzelnen Experimenten lediglich ein kurzfristiger mechanischer Effekt durch das injizierte Volumen beobachtet, vergleichbar mit den Beobachtungen von Covasala et al. (Covasala *et al.*, 2012).

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte noch unveröffentlichte *in vitro* Experimente zeigen, dass Acrolein im Halbschädelpräparat im Gegensatz zu Senföl nicht in der Lage ist, Aktionspotentiale an meningealen Afferenzen auszulösen. Jedoch wurde in allen Experimenten außer bei TRPA1^{-/-}-Mäusen ein Anstieg der elektrischen Schwelle gemessen. In anderen Experimenten konnte ein acroleininduzierter TRPA1-abhängiger, signifikanter CGRP-Release aus der Dura mater gemessen werden. Dieser Effekt entspricht den Ergebnissen von Kunkler et al., die einen signifikanten CGRP-Release aus kultivierten trigeminalen Neuronen der Ratte nach Exposition von Acrolein (30 µM) und Senföl (100 µM) beobachteten, wobei beide Effekte mit HC030031 hemmbar waren und somit als TRPA1-abhängig angesehen werden (Kunkler *et al.*, 2011).

5.4 Wirkung des TRPA1-Agonisten Acrolein auf den meningealen Blutfluss

Ausgehend von den oben genannten Erkenntnissen, dass Acrolein *in vitro* eine TRPA1-vermittelte CGRP-Freisetzung in der Dura mater hervorrufen kann, sollte in den Experimenten dieser Arbeit die Wirkung von Acrolein auf

die Neuropeptidfreisetzung aus primären peptidergen Afferenzen der Dura mater und damit die Durchblutung auch *in vivo* untersucht werden. Da bei einer CGRP-Freisetzung in den Meningen eine vasodilatatorische Wirkung auf Arterien zu erwarten ist, wie es in verschiedenen Studien sowohl *in vitro* an humanen meningealen Arterien (Gupta *et al.*, 2006) als auch *in vivo* an meningealen Arterien der Ratte (Messlinger *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997) gezeigt werden konnte, wurde hierfür der meningeale Blutfluss im Bereich arterieller Gefäße der Dura mater gemessen. Die Ergebnisse bestätigten die Schlussfolgerung aus den *in vitro* Experimenten. Topische Applikation von 300 μM Acrolein führte zu einem signifikanten Anstieg des meningealen Blutflusses, der nach Gabe des TRPA1-Antagonisten HC030031 oder des CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇ ausblieb.

Seit einigen Jahren liegen bereits eindeutige Hinweise darauf vor, dass die NO- und die CGRP-vermittelte Vasodilatation in einem Zusammenhang stehen (Messlinger *et al.*, 2000; Akerman *et al.*, 2002; Strecker *et al.*, 2002), auch wenn der genaue Mechanismus noch nicht erklärt werden konnte. Ebenso ist schon länger bekannt, dass auch Nitroxyl (HNO) gefäßerweiternd wirken kann (Ellis *et al.*, 2000). Wie oben bereits diskutiert, aktiviert HNO TRPA1-Rezeptoren, so dass der Kanal geöffnet wird und einen Ca^{2+} -Einstrom ermöglicht, wodurch wiederum eine CGRP-Freisetzung an primären Afferenzen ausgelöst wird (Eberhardt *et al.*, 2014). Wie ebenfalls bereits diskutiert, entsteht HNO aus dem Zusammenwirken von NO und H_2S (Eberhardt *et al.*, 2014; Dux *et al.*, 2015). Eine Untersuchung an Herzkranzgefäßen der Ratte bestätigt zwar nach AS-Applikation eine HNO-induzierte Erhöhung des Blutflusses, konnte jedoch im Gegensatz zu den Experimenten an den Meningen keine CGRP- oder NO-Abhängigkeit feststellen (Chin *et al.*, 2014). Allerdings wurde in dieser Arbeit die Rolle von TRPA1 nicht untersucht. Eberhardt *et al.* zeigten, dass bei topischer Applikation von AS eine TRPA1-abhängige Blutflusserhöhung in den meningealen Arterien induzierbar ist (Eberhardt *et al.*, 2014). Dux *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass durch topische Applikation eines anderen HNO-

Donators (DEANONOate) auf die Dura mater ebenfalls ein Anstieg des meningealen Blutflusses entsteht, der CGRP- und TRPA1-abhängig ist (Dux *et al.*, 2015).

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Wirkung von Acrolein auf den meningealen Blutfluss und die Rolle von TRPA1-Rezeptoren bestätigen schließlich, dass die Schlussfolgerungen aus den *in vitro* Arbeiten von Kunkler *et al.* an trigeminalen Neuronen (Kunkler *et al.*, 2011) auf die *in vivo* Bedingungen übertragbar sind und der Effekt der Vasodilatation/Blutflusserhöhung bei Stimulation der Dura mater über einen CGRP-TRPA1-abhängigen Signalweg vermittelt wird. Somit ist auch die Schlussfolgerung möglich, dass TRPA1-Rezeptoren in der Dura mater aktivierbar sind, obwohl die Aktivierung in Form von fortgeleiteter neuronaler Aktivität in den elektrophysiologischen Experimenten dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte.

Auf molekularer Ebene betrachtet könnte eine Erklärung für den beobachteten Effekt darin liegen, dass es sich bei dem Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle durch den TRPA1-Rezeptorkanal um einen langsamen Einstrom handelt, der zwar ausreichend ist, um einen Ca^{2+} -abhängigen CGRP-Release auszulösen, aber nicht schnell genug, um genügend spannungsabhängige Natriumkanäle so zu aktivieren, dass Aktionspotentiale ausgelöst werden. Möglicherweise wird stattdessen durch einen langsamen Ca^{2+} -Einstrom ein Teil der spannungsabhängigen Natriumkanäle zwar aktiviert, befindet sich aber daraufhin im nicht aktivierbaren Zustand, so dass die für Aktionspotentiale benötigte Summe an Kanälen nie ausreicht. Eine deutliche Abhängigkeit der Wirkung von AS von extrazellulär vorhandenem Calcium wurde bereits in anderen Untersuchungen festgestellt (Pouokam *et al.*, 2013). Auch die anderen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe aus den elektrophysiologischen Experimenten mit Acrolein am Halbschädelpräparat der Ratte passen zu dieser Erklärung. Auch hier konnte keine Erregung der Nervenfasern in Form von Aktionspotentialen gemessen werden, stattdessen weist ein Anstieg der elektrischen Aktivierungsschwelle auf einen hemmenden Effekt hin. Einige

weitere Experimente, auch auf zellulärer Ebene werden jedoch nötig sein, um diese Hypothese zu bestätigen.

Durch welche Liganden die Aktivierung der TRPA1-Rezeptoren jeweils unter physiologischen bzw. pathophysiologischen Umständen letzten Endes erfolgt und ob die Wirkungen über die Blutflusserrhöhung hinaus tatsächlich zur Entstehung von Kopfschmerzen beitragen, bleibt weiterhin offen.

5.5 Wirkung von Nitroxyl auf die Aktivität primärer Afferenzen im *In-vitro*-Modell

Obwohl die Aktivierung der TRPA1-CGRP-Signalkaskade mit mehreren TRPA1-Agonisten *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen werden konnte, fehlte bisher die Antwort auf die Frage, ob über TRPA1 nozizeptive Afferenzen des meningealen Systems in ihrer neuronalen Aktivität beeinflusst werden können. Diese Antwort konnte in der vorliegenden Arbeit erbracht werden. Zweifellos wird durch die Aktivierung von TRPA1 und den Calcium-Einstrom auch CGRP aus primären Afferenzen freigesetzt (Eberhardt *et al.*, 2014), was sich auch im steigenden Blutfluss der vorliegenden Experimente zeigt. Allerdings konnte bisher kein Hinweis darauf gefunden werden, dass CGRP selbst zu einer Aktivierung von nozizeptiven meningealen Afferenzen oder trigeminalen Hirnstammneuronen führt (Levy *et al.*, 2005; Bhatt *et al.*, 2014), welche als Grundvoraussetzung für die Entstehung des Kopfschmerzes angesehen wird. Dennoch waren und sind CGRP-Rezeptor-Antagonisten oder monoklonale CGRP-Antikörper als vielversprechende Migränetherapeutika Gegenstand der Forschung und klinischer Prüfungen (Edvinsson, 2001, 2015; Bigal *et al.*, 2015). Ihre exakte Wirkweise ist aber noch zu klären. In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus innerhalb der Signalkaskade auf der Frage, ob es möglich ist, durch die direkte Aktivierung von TRPA1 direkt oder indirekt eine Aktivierung meningealer nozizeptiver Nerven mit fortgeleiteter Aktivität auszulösen. Da die Experimente dieser Arbeit mit verschiedenen TRPA1-Agonisten *in vivo* keine Erregung der sekundären Trigemini-neurone zeigten, bei Experimenten an Zellen jedoch TRPA1-abhängige Ströme gemessen

werden konnten (Jordt *et al.*, 2004; Macpherson *et al.*, 2005, 2007; Bautista *et al.*, 2006; Eberhardt *et al.*, 2014), wurde die Wirkung des TRPA1-Agonisten HNO, durch Applikation des HNO-Donators Angeli's Salt (AS), auf die neuronale Aktivität der primären Afferenzen im Halbschädelpräparat an Einzelfasern untersucht. Entscheidend ist dabei, dass die Applikation von AS hier ohne Zeitverlust möglich war, was einen der möglichen Gründe für die Wirkungslosigkeit von HNO aufgrund der äußerst kurzen Halbwertszeit bei den *in vivo* Experimenten darstellen könnte. In den *in vitro* Experimenten konnte eine starke, nach Applikation des AS unmittelbar einsetzende fortgeleitete Aktivierung der afferenten Nervenfasern beobachtet werden. Der rasche Wirkungseintritt kann in der schnellen Diffusion von HNO begründet sein (Fukuto *et al.*, 2008). Wie sich in den Experimenten mit TRPA1-defizienten und TRPA1/TRPV1-defizienten Mäusen herausstellte, war dieser Effekt jedoch nicht auf die Rolle von TRPA1 zurückzuführen, da der Effekt bei den TRPA1-Knockout-Tieren tendenziell sogar noch stärker auftrat, und bei den TRPA1/TRPV1-Doppelknockout-Tieren war der Effekt sogar signifikant stärker als bei der Wildtypgruppe. Ebenso erschien die auf die überschießende Aktivität folgende Desensibilisierung bei den Knockout-Tieren stärker als bei den Wildtypen. Dabei gilt es aber auch zu bedenken, dass bei Knockout-Tieren andere (genetische) Kompensationsmechanismen auftreten können, welche wir nicht abschätzen und berechnen können.

Welcher andere Kanal oder welches Zusammenspiel von Kanälen für die starke Aktivierung letztendlich verantwortlich ist, bleibt vorerst völlig unklar, es gibt aber beispielsweise Hinweise darauf, dass HNO in der Submucosa des Dickdarms K^+ -Kanäle und die Na^+ - K^+ -Pumpe zu aktivieren vermag (Pouokam *et al.*, 2013). Auch aus anderen Quellen ist bekannt, dass HNO/NO- auch spannungsabhängige K^+ -Kanäle aktivieren kann (Irvine *et al.*, 2003), doch deren alleinige Aktivierung löst kein Aktionspotential aus, sondern trägt in physiologischer Funktion zu Re- bzw. Hyperpolarisation der Zellmembran bei.

Eine Erklärung für die auf die außerordentlich starke Aktivierung folgende und nur in seltenen Fällen reversible, komplette Desensibilisierung könnte sowohl

eine Hemmung der Na⁺-K⁺-Pumpe als auch ein zytotoxischer Effekt sein. Unter aeroben Bedingungen im extrazellulären Milieu kann HNO mit Sauerstoff zu Peroxinitrit (ONOO⁻) reagieren, welches ein potentes Zellgift darstellt (Smulik *et al.*, 2014) und u. a. Störungen an Membrankanälen (z. B. Na⁺-K⁺-Pumpe, Natrium- und Calcium-Kanäle) verursachen kann (Szabó *et al.*, 2007). Vielleicht hat die depolarisierende Wirkung der Na⁺-K⁺-Pumpen-Hemmung zu einer verstärkten Erregung beigetragen. Die bei dieser Aktivierung beteiligten Strukturen im Bereich der meningealen Afferenzen zu identifizieren, bleibt folglich Gegenstand zukünftiger Forschung.

5.6 Die Rolle des TRPA1-Rezeptor-Kanals und seiner Agonisten bei der meningealen Nozizeption und der Kopfschmerzentstehung

Der TRPA1-Rezeptorkanal spielt eine Rolle bei der durch verschiedenartige Stimuli (chemisch, thermisch, mechanisch) ausgelösten Nozizeption in der Peripherie (Jordt *et al.*, 2004; Bandell *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006). Immunhistochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass TRPA1-positive Fasern und Nervenendigungen primärer sensorischer Afferenzen in hoher Dichte in den oberflächlichen Schichten des Nucleus caudalis des N. trigeminus sowie im Dorsalhorn vorkommen (Kim *et al.*, 2010). Welche Funktion zentrale TRPA1-Rezeptoren bei der Nozizeption jedoch genau haben und wie die pathophysiologischen Vorgänge ablaufen, ist noch ungeklärt (Andersson *et al.*, 2011). Grundsätzlich liegen für eine Beteiligung des TRPA1-Rezeptorkanals bei der meningealen Nozizeption Hinweise aus unterschiedlichen Richtungen vor. Einerseits werden ausgehend von empirischen Beobachtungen Umweltirritantien wie Rauch oder schlechte Luft, welche u. a. sehr spezifische TRPA1-Agonisten z. B. Acrolein enthalten, als Triggerfaktoren der Kopfschmerzentstehung angesehen (Friedman & De ver Dye, 2009). Hierzu gibt es mittlerweile auch erste Untersuchungen, die diese Vorstellung auf experimenteller Ebene bestärken (Kunkler *et al.*, 2011). Andererseits werden seit Jahren die Rolle von NO und dessen

pathophysiologischer Mechanismus bei der Migräneentstehung erforscht. Neueste Untersuchungen werfen die Hypothese auf, dass nicht NO selbst sondern HNO/NO⁻, welches durch eine Reaktion von NO mit H₂S entsteht, die entscheidende Rolle spielt (Eberhardt *et al.*, 2014). HNO wiederum ist ebenfalls ein TRPA1-Agonist. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung der meningealen TRPA1-Rezeptoren Kopfschmerzen auslösen oder zu einer Verstärkung der Kopfschmerzen beitragen könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können diese Hypothese jedoch nicht bestätigen. In den bereits bekannten Untersuchungen von Kunkler (Kunkler *et al.*, 2011) und Eberhardt (Eberhardt *et al.*, 2014) sowie in noch unveröffentlichten Experimenten unserer Arbeitsgruppe (Denner *et al.*) konnten zwar aktivierende Effekte auf lokaler Ebene wie Membrandepolarisation und CGRP-Release nachgewiesen werden, diese setzen sich jedoch nicht wie erwartet in Form verstärkter fortgeleiteter Aktivität im nozizeptiven trigeminalen System fort. Stattdessen ergeben sich aus den Ergebnissen Anhaltspunkte dafür, dass TRPA1 im Hinblick auf fortgeleitete neuronale Aktivität sogar eine hemmende Funktion hat, da in den noch unveröffentlichten Experimenten von Denner *et al.* bei einer Aktivierung durch Acrolein im Halbschädelpräparat der Ratte keine Aktionspotentiale, dafür aber eine signifikante und TRPA1-abhängige Erhöhung der elektrischen Schwelle gemessen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit wurde bei den Experimenten am Halbschädelpräparat der Maus festgestellt, dass Angeli's Salt (bzw. Nitroxyl) eine kurz anhaltende aber starke fortgeleitete Aktivität an meningealen Afferenzen auslöst, welche bei TRPA1-Knockout-Tieren, sowie bei TRPA1/TRPV1-Doppelknockout-Tieren sogar noch stärker erscheint, so als ob hier ein Gegenregulationsmechanismus fehlen würde. Diese Beobachtungen widersprechen der Hypothese, dass die HNO-TRPA1-CGRP-Signalkaskade Kopfschmerzen auslöst (Dux *et al.*, 2015). Es wäre in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse auch denkbar, dass AS (bzw. Nitroxyl) sowohl TRPA1 als auch einen weiteren unbekanntem Rezeptor aktiviert, wobei letzterer für die verstärkte, fortgeleitete Aktivität im trigeminalen

nozizeptiven System verantwortlich ist, dabei aber physiologischerweise durch die parallele Aktivierung von TRPA1 gedämpft wird. Etwas weiter gedacht könnte man sogar annehmen, dass die Aktivierung von TRPA1 einen analgetischen Effekt haben könnte. Für HNO wurde eine solche Beobachtung im Zusammenhang mit entzündlich bedingter mechanischer Hyperalgesie bereits beschrieben, auch wenn dabei ein Zusammenhang mit TRPA1 nicht untersucht wurde. Der Effekt wurde in diesem Fall über ATP-sensitive K⁺-Kanäle vermittelt und war Opioid-Rezeptor-unabhängig (Zarpelon *et al.*, 2013). Für die Theorie einer antinozizeptiven Funktion sprechen insbesondere auch die Ergebnisse von Andersson *et al.* (Andersson *et al.*, 2011). Anhand von Verhaltensstudien kombiniert mit elektrophysiologischen und immunhistochemischen Experimenten stellten sie fest, dass die Aktivierung zentraler TRPA1-Rezeptoren (sowohl mit elektrophilen Acetaminophen-Metaboliten als auch mit dem einem nicht-elektrophilen Cannabinoid) mit antinozizeptiven Effekten einhergeht und dass dies möglicherweise sogar einen entscheidenden Punkt bezüglich der analgetischen Wirkung von Acetaminophen darstellt.

Ob es sich bei TRPA1 also um einen nozizeptiven oder antinozizeptiv wirksamen Rezeptorkanal handelt, oder ob sich die Funktion möglicherweise abhängig vom Ort der Expression unterscheidet, wäre durch weitere Forschungen zu klären. Ebenso bleibt die Frage zu klären, welcher Rezeptor für die starke Aktivierung der meningealen Afferenzen durch Angeli's Salt/Nitroxyl verantwortlich ist, da es sich hier eindeutig nicht wie ursprünglich vermutet um TRPA1 handeln kann.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von zwei elektrophysiologischen Tiermodellen die Rolle des TRPA1-Rezeptorkanals sowie die Wirkung von Metaboliten des Stickstoffmonoxidstoffwechsels bei der meningealen Nozizeption als Grundlagen der Kopfschmerzentstehung untersucht.

In einem *in vivo* Präparat an der narkotisierten Ratte wurde die Aktivität von sekundären Neuronen im spinalen Trigeminskern mit mechanorezeptivem afferenten Zustrom aus den Meningen untersucht. Die TRPA1-Rezeptoragonisten Nitroxyl (Angeli's Salt), Acrolein und Senföl wurden dabei peripher auf die freigelegte Dura mater encephali als auch zentral auf die Medulla oblongata appliziert. Acrolein wurde zudem direkt in das Ganglion trigeminale injiziert. Die Ergebnisse zeigten generell keine signifikanten Änderungen der Spontanaktivität und der mechanisch evozierten Aktivität. Lediglich bei topischer Applikation von 300 μ M Acrolein auf die Dura mater oder den Hirnstamm zeigte sich tendenziell eine Zunahme der Spontanaktivität. Die gleiche Behandlung der Dura mater bewirkte einen signifikanten Anstieg des meningealen Blutflusses, welcher sowohl durch den TRPA1-Antagonisten HC030031 als auch durch den CGRP-Rezeptorantagonisten CGRP₈₋₃₇ gehemmt wurde.

Um die lokale Wirkung von Nitroxyl auf die primären Afferenzen in der Dura mater zu untersuchen, wurden *in vitro* Einzelfaserableitungen an Halbschädelpräparaten der Maus (C57Bl6) durchgeführt. Zur Überprüfung der TRPA1-Spezifität wurden die Experimente an TRPA1-Knockout-Mäusen und an TRPA1/TRPV1-Doppelknockout-Mäusen wiederholt. Die Ergebnisse zeigten einen kurzen heftigen Anstieg der neuronalen Aktivität gefolgt von einer Desensibilisierung der afferenten Fasern. Die Aktivierung schien jedoch nicht TRPA1-abhängig zu sein. Ein Vergleich der Intensität des Aktivitätsanstieges zwischen den Genotypen zeigte, dass dieser bei der

Doppelknockoutgruppe statistisch signifikant stärker ausfiel als bei der Wildtypgruppe.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht die Vermutung, dass eine alleinige Aktivierung der TRPA1-Rezeptoren meningealer Afferenzen Kopfschmerzen auslösen oder zu einer Verstärkung der Kopfschmerzen beitragen könnte. Die aktivierenden Effekte von Acrolein und anderer TRPA1-Agonisten auf die Endigungen primärer Afferenzen, die zum Blutflussanstieg in der Dura mater führen, bewirken keine relevante Aktivierung der Neurone im spinalen Trigeminuskern. Stattdessen ergeben sich aus den Ergebnissen Anhaltspunkte dafür, dass TRPA1-Aktivierung im trigeminalen nozizeptiven System sogar eine hemmende Funktion haben könnte.

7 Summary

The aim of the present study was to examine the role of TRPA1 receptor channels and nitric oxide metabolites in meningeal nociception underlying the generation of headaches in two electrophysiological animal models.

In vivo the activity of spinal trigeminal neurons with afferent input from the dura mater was recorded in anesthetized rats. The TRPA1 agonists nitroxyl (Angeli's Salt), acrolein and mustard oil were applied to the exposed dura mater as well as to the medulla oblongata. Acrolein was also injected directly into the trigeminal ganglion. The results showed generally no significant changes in spontaneous activity or in mechanically evoked activity. Only after topical application of 300 μ M acrolein onto the dura mater or the brain stem the spontaneous activity tended to increase. The same treatment of the dura mater caused a significant increase in meningeal blood flow, which was inhibited by the TRPA1 antagonist HC030031 or the CGRP receptor antagonist CGRP₈₋₃₇.

To investigate the local effects of nitroxyl on the primary meningeal afferents, single fiber recordings were performed using half-skull preparations of mice (C57Bl6) *in vitro*. To verify if the observed effects depend on TRPA1 the experiments were repeated with TRPA1 knockout mice and TRPA1/TRPV1 double-knockout mice. The results showed a short-lasting vigorous increase in neuronal activity followed by a desensitization of the afferent fibers. However, the activation was not TRPA1-dependent. The increase in activity was statistically stronger for the TRPA1/TRPV1 double-knockout group compared to the wild-type group.

Overall, the results of this study do not confirm the assumption that activation of trigeminal TRPA1 receptor channels triggers the generation of headaches or contributes to its aggravation. The activation of primary meningeal afferents by TRPA1 agonist causing increased meningeal blood flow does not significantly increase the activity of trigeminal second order neurons *in vivo*. Instead, there

is evidence that TRPA1 activation may have an inhibitory function in the nociceptive trigeminal system.

8 Literaturverzeichnis

- Akerman S, Williamson DJ, Kaube H & Goadsby PJ (2002). Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *Br J Pharmacol* **137**, 62–68.
- Andersson DA, Gentry C, Alenmyr L, Killander D, Lewis SE, Andersson A, Bucher B, Galzi J-L, Sterner O, Bevan S, Högestätt ED & Zygmunt PM (2011). TRPA1 mediates spinal antinociception induced by acetaminophen and the cannabinoid $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol. *Nat Commun* **2**, 551.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S & Bevan S (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**, 2485–2494.
- Andres KH, von Düring M, Muszynski K & Schmidt RF (1987). Nerve fibres and their terminals of the dura mater encephali of the rat. *Anat Embryol (Berl)* **175**, 289–301.
- Animals NRC (US) C for the U of the G for the C and U of L (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> [Accessed November 5, 2015].
- Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalón CM & Saxena PR (2004). Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *Eur J Pharmacol* **500**, 315–330.
- Ashina M, Bendtsen L, Jensen R & Olesen J (2000). Nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache. *Brain J Neurol* **123 (Pt 9)**, 1830–1837.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ & Patapoutian A (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* **41**, 849–857.
- Bautista DM, Jordt S-E, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI & Julius D (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269–1282.
- Bautista DM, Movahed P, Hinman A, Axelsson HE, Sterner O, Högestätt ED, Julius D, Jordt S-E & Zygmunt PM (2005). Pungent products from

garlic activate the sensory ion channel TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12248–12252.

- Bellamy JL, Cady RK & Durham PL (2006). Salivary levels of CGRP and VIP in rhinosinusitis and migraine patients. *Headache* **46**, 24–33.
- Benemei S, De Cesaris F, Fusi C, Rossi E, Lupi C & Geppetti P (2013). TRPA1 and other TRP channels in migraine. *J Headache Pain* **14**, 71.
- Berkley KJ, Wood E, Scofield SL & Little M (1995). Behavioral responses to uterine or vaginal distension in the rat. *Pain* **61**, 121–131.
- Bhatt D, Ramachandran R, Christensen S, Gupta S, Jansen-Olesen I & Olesen J (2014). EHMTI-0117. CGRP infusion in awake rats does not increase expression of immediate early genes, c-fos and zif268, in the trigeminal nucleus caudalis. *J Headache Pain* **15**, A1.
- Bigal ME, Walter S & Rapoport AM (2015). Therapeutic antibodies against CGRP or its receptor. *Br J Clin Pharmacol* n/a – n/a.
- Blau JN & Dexter SL (1981). The site of pain origin during migraine attacks. *Cephalgia Int J Headache* **1**, 143–147.
- Boada MD (2013). Relationship between electrophysiological signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. *J Neurophysiol* **109**, 749–757.
- Bove GM & Moskowitz MA (1997). Primary afferent neurons innervating guinea pig dura. *J Neurophysiol* **77**, 299–308.
- Brenman JE & Bredt DS (1996). Nitric oxide signaling in the nervous system. *Methods Enzymol* **269**, 119–129.
- Burstein R (2001). Deconstructing migraine headache into peripheral and central sensitization. *Pain* **89**, 107–110.
- Burstein R, Yamamura H, Malick A & Strassman AM (1998). Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons. *J Neurophysiol* **79**, 964–982.
- Buse DC, Loder EW, Gorman JA, Stewart WF, Reed ML, Fanning KM, Serrano D & Lipton RB (2013). Sex Differences in the Prevalence, Symptoms, and Associated Features of Migraine, Probable Migraine

and Other Severe Headache: Results of the American Migraine Prevalence and Prevention (AMPP) Study. *Headache J Head Face Pain* **53**, 1278–1299.

Buzzi MG & Moskowitz MA (1992). The trigemino-vascular system and migraine. *Pathol Biol (Paris)* **40**, 313–317.

Chin KY, Qin C, Cao N, Kemp-Harper BK, Woodman OL & Ritchie RH (2014). The concomitant coronary vasodilator and positive inotropic actions of the nitroxyl donor Angeli's salt in the intact rat heart: contribution of soluble guanylyl cyclase-dependent and -independent mechanisms. *Br J Pharmacol* **171**, 1722–1734.

Christiansen I, Thomsen LL, Daugaard D, Ulrich V & Olesen J (1999). Glycerol Trinitrate Induces Attacks of Migraine Without Aura in Sufferers of Migraine with Aura. *Cephalalgia* **19**, 660–667.

Clapham DE (2015). Structural biology: Pain-sensing TRPA1 channel resolved. *Nature* **520**, 439–441.

Covasala O, Stirn SL, Albrecht S, De Col R & Messlinger K (2012). Calcitonin gene-related peptide receptors in rat trigeminal ganglion do not control spinal trigeminal activity. *J Neurophysiol* **108**, 431–440.

D'amour FE & Smith DL (1941). A Method for Determining Loss of Pain Sensation. *J Pharmacol Exp Ther* **72**, 74–79.

De Col R, Koulchitsky SV & Messlinger KB (2003). Nitric oxide synthase inhibition lowers activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus. *Neuroreport* **14**, 229–232.

De Col R, Messlinger K & Carr RW (2012). Repetitive activity slows axonal conduction velocity and concomitantly increases mechanical activation threshold in single axons of the rat cranial dura. *J Physiol* **590**, 725–736.

Dimmeler S & Zeiher AM (1999). Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* **6**, 964–968.

Dostrovsky JO, Davis KD & Kawakita K (1991). Central mechanisms of vascular headaches. *Can J Physiol Pharmacol* **69**, 652–658.

Dux M, Sántha P & Jancsó G (2012). The role of chemosensitive afferent nerves and TRP ion channels in the pathomechanism of headaches. *Pflüg Arch Eur J Physiol* **464**, 239–248.

-
- Dux M, Will C, Vogler B, Filipovic MR & Messlinger K (2015). Meningeal blood flow is controlled by H₂S-NO crosstalk activating HNO-TRPA1-CGRP signalling. *Br J Pharmacol*; DOI: 10.1111/bph.13164.
- Eberhardt M et al. (2014). H₂S and NO cooperatively regulate vascular tone by activating a neuroendocrine HNO-TRPA1-CGRP signalling pathway. *Nat Commun* **5**, 4381.
- Ebersberger A, Aeverbeck B, Messlinger K & Reeh PW (1999). Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E₂ from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience* **89**, 901–907.
- Edelmayer RM, Le LN, Yan J, Wei X, Nassini R, Materazzi S, Preti D, Appendino G, Geppetti P, Dodick DW, Vanderah TW, Porreca F & Dussor G (2012). Activation of TRPA1 on dural afferents: a potential mechanism of headache pain. *Pain* **153**, 1949–1958.
- Edvinsson L (2001). Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and the pathophysiology of headache: therapeutic implications. *CNS Drugs* **15**, 745–753.
- Edvinsson L (2015). CGRP receptor antagonists and antibodies against CGRP and its receptor in migraine treatment. *Br J Clin Pharmacol* n/a – n/a.
- Edvinsson L, Ekman R, Jansen I, McCulloch J & Uddman R (1987). Calcitonin gene-related peptide and cerebral blood vessels: distribution and vasomotor effects. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **7**, 720–728.
- Ekbom K (1968). Nitroglycerin as a provocative agent: In cluster headache. *Arch Neurol* **19**, 487–493.
- Ellis A, Guang Li C & Rand MJ (2000). Differential actions of L-cysteine on responses to nitric oxide, nitroxyl anions and EDRF in the rat aorta. *Br J Pharmacol* **129**, 315–322.
- Erhardt W, Kölle P, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (2012). *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Schattauer Verlag.
- Escott KJ, Beattie DT, Connor HE & Brain SD (1995). Trigeminal ganglion stimulation increases facial skin blood flow in the rat: a major role for calcitonin gene-related peptide. *Brain Res* **669**, 93–99.

-
- Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T & Talavera K (2011). The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol CB* **21**, 316–321.
- Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A & Moncada S (1994). Understanding the controversy over the identity of EDRF. *Nature* **368**, 62–65.
- Feindel W, Penfield W & McNAUGHTON F (1960). The tentorial nerves and localization of intracranial pain in man. *Neurology* **10**, 555–563.
- Feistel S, Albrecht S & Messlinger K (2013). The calcitonin gene-related peptide receptor antagonist MK-8825 decreases spinal trigeminal activity during nitroglycerin infusion. *J Headache Pain* **14**, 93.
- Fraga MDB, Pinho RS, Andreoni S, Vitalle MS de S, Fisberg M, Peres MFP, Vilanova LCP & Masruha MR (2013). Trigger factors mainly from the environmental type are reported by adolescents with migraine. *Arq Neuropsiquiatr* **71**, 290–293.
- Friberg L (1991). Cerebral blood flow changes in migraine: methods, observations and hypotheses. *J Neurol* **238 Suppl 1**, S12–S17.
- Friedman DI & De ver Dye T (2009). Migraine and the environment. *Headache* **49**, 941–952.
- Fukuto JM, Jackson MI, Kaludercic N & Paolucci N (2008). Examining nitroxyl in biological systems. *Methods Enzymol* **440**, 411–431.
- Fung H-L (2004). BIOCHEMICAL MECHANISM OF NITROGLYCERIN ACTION AND TOLERANCE: Is This Old Mystery Solved? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**, 67–85.
- Furchgott RF (1999). Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide. *Biosci Rep* **19**, 235–251.
- Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci* **27**, 2783–2802.
- Goadsby PJ, Edvinsson L & Ekman R (1988). Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol* **23**, 193–196.

-
- Goadsby PJ, Edvinsson L & Ekman R (1990). Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* **28**, 183–187.
- Goadsby PJ, Knight YE, Hoskin KL & Butler P (1997). Stimulation of an intracranial trigeminally-innervated structure selectively increases cerebral blood flow. *Brain Res* **751**, 247–252.
- Gupta S, Mehrotra S, Avezaat CJJ, Villalón CM, Saxena PR & MaassenVanDenBrink A (2006). Characterisation of CGRP receptors in the human isolated middle meningeal artery. *Life Sci* **79**, 265–271.
- Hauge AW, Kirchmann M & Olesen J (2011). Characterization of consistent triggers of migraine with aura. *Cephalalgia Int J Headache* **31**, 416–438.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim S-O, Marshall HE & Stamler JS (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 150–166.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z & Rachlin EM (1988). Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 87–94.
- Hinman A, Chuang H-H, Bautista DM & Julius D (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19564–19568.
- Hogenhuis LA & Bruyn GW (1999). Periorbital pain: a clinical review. *Cephalalgia Int J Headache* **19 Suppl 25**, 31–32.
- Ho TW, Mannix LK, Fan X, Assaid C, Furtek C, Jones CJ, Lines CR, Rapoport AM & MK-0974 Protocol 004 study group (2008). Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine. *Neurology* **70**, 1304–1312.
- Ignarro LJ (1989). Endothelium-derived nitric oxide: actions and properties. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **3**, 31–36.
- Irvine JC, Favaloro JL & Kemp-Harper BK (2003). NO- Activates Soluble Guanylate Cyclase and Kv Channels to Vasodilate Resistance Arteries. *Hypertension* **41**, 1301–1307.
- Jansen-Olesen I, Mortensen A & Edvinsson L (1996). Calcitonin gene-related peptide is released from capsaicin-sensitive nerve fibres and induces

vasodilatation of human cerebral arteries concomitant with activation of adenylyl cyclase. *Cephalalgia Int J Headache* **16**, 310–316.

Jordt S-E, Bautista DM, Chuang H-H, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID & Julius D (2004). Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260–265.

Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK & Bae YC (2010). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol* **518**, 687–698.

Kindt KS, Viswanath V, Macpherson L, Quast K, Hu H, Patapoutian A & Schafer WR (2007). *Caenorhabditis elegans* TRPA-1 functions in mechanosensation. *Nat Neurosci* **10**, 568–577.

Knight YE & Goadsby PJ (2001). The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine? *Neuroscience* **106**, 793–800.

Koulchitsky S, Fischer MJM & Messlinger K (2009). Calcitonin gene-related peptide receptor inhibition reduces neuronal activity induced by prolonged increase in nitric oxide in the rat spinal trigeminal nucleus. *Cephalalgia Int J Headache* **29**, 408–417.

Krumenacker JS, Hanafy KA & Murad F (2004). Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull* **62**, 505–515.

Kunkler PE, Ballard CJ, Oxford GS & Hurley JH (2011). TRPA1 receptors mediate environmental irritant-induced meningeal vasodilatation. *Pain* **152**, 38–44.

Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ & Corey DP (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* **50**, 277–289.

Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL & Stucky CL (2009). TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **29**, 4808–4819.

Landa L et al. (2012). Pain in domestic animals and how to assess it: a review. *Vet Med (Praha)* **57**, 185–192.

-
- Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V & Olesen J (1997). Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* **349**, 401–402.
- Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB, Iversen HK, Sperling B & Olesen J (2002). CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia Int J Headache* **22**, 54–61.
- Lee SP, Buber MT, Yang Q, Cerne R, Cortés RY, Sprous DG & Bryant RW (2008). Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel. *Br J Pharmacol* **153**, 1739–1749.
- Lennerz JK, Rühle V, Ceppa EP, Neuhuber WL, Bunnett NW, Grady EF & Messlinger K (2008). Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution. *J Comp Neurol* **507**, 1277–1299.
- Levy D, Burstein R & Strassman AM (2005). Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine. *Ann Neurol* **58**, 698–705.
- Levy D & Strassman AM (2002). Mechanical response properties of A and C primary afferent neurons innervating the rat intracranial dura. *J Neurophysiol* **88**, 3021–3031.
- Lima AM de, Sapienza GB, Giraud V de O & Fragoso YD (2011). Odors as triggering and worsening factors for migraine in men. *Arq Neuropsiquiatr* **69**, 324–327.
- MacMicking J, Xie QW & Nathan C (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* **15**, 323–350.
- Macpherson LJ, Dubin AE, Evans MJ, Marr F, Schultz PG, Cravatt BF & Patapoutian A (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature* **445**, 541–545.
- Macpherson LJ, Geierstanger BH, Viswanath V, Bandell M, Eid SR, Hwang S & Patapoutian A (2005). The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Curr Biol* **15**, 929–934.
- Malmberg AB & Basbaum AI (1998). Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain* **76**, 215–222.

-
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG & Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333–339.
- Meller ST & Gebhart GF (1993). Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain* **52**, 127–136.
- Messlinger K (1996). Functional morphology of nociceptive and other fine sensory endings (free nerve endings) in different tissues. *Prog Brain Res* **113**, 273–298.
- Messlinger K (2009). Migraine: where and how does the pain originate? *Exp Brain Res* **196**, 179–193.
- Messlinger K, Fischer MJM & Lennerz JK (2011). Neuropeptide effects in the trigeminal system: pathophysiology and clinical relevance in migraine. *Keio J Med* **60**, 82–89.
- Messlinger K, Hanesch U, Baumgärtel M, Trost B & Schmidt RF (1993). Innervation of the dura mater encephali of cat and rat: ultrastructure and calcitonin gene-related peptide-like and substance P-like immunoreactivity. *Anat Embryol (Berl)* **188**, 219–237.
- Messlinger K, Hanesch U, Kurosawa M, Pawlak M & Schmidt RF (1995). Calcitonin gene related peptide released from dural nerve fibers mediates increase of meningeal blood flow in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* **73**, 1020–1024.
- Messlinger K, Lennerz JK, Eberhardt M & Fischer MJM (2012). CGRP and NO in the trigeminal system: mechanisms and role in headache generation. *Headache* **52**, 1411–1427.
- Messlinger K, Suzuki A, Pawlak M, Zehnter A & Schmidt RF (2000). Involvement of nitric oxide in the modulation of dural arterial blood flow in the rat. *Br J Pharmacol* **129**, 1397–1404.
- Miyamoto T, Dubin AE, Petrus MJ & Patapoutian A (2009). TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* **4**, e7596.
- Mogil JS (2009). Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* **10**, 283–294.

-
- Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* **2005**, re3.
- Muff R, Born W & Fischer JA (1995). Calcitonin, calcitonin gene-related peptide, adrenomedullin and amylin: homologous peptides, separate receptors and overlapping biological actions. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* **133**, 17–20.
- Mulderry PK, Ghatei MA, Spokes RA, Jones PM, Pierson AM, Hamid QA, Kanse S, Amara SG, Burrin JM & Legon S (1988). Differential expression of alpha-CGRP and beta-CGRP by primary sensory neurons and enteric autonomic neurons of the rat. *Neuroscience* **25**, 195–205.
- Nassini R, Materazzi S, Vriens J, Prenen J, Benemei S, De Siena G, la Marca G, Andrè E, Preti D, Avonto C, Sadofsky L, Di Marzo V, De Petrocellis L, Dussor G, Porreca F, Tagliabatella-Scafati O, Appendino G, Nilius B & Geppetti P (2012). The “headache tree” via umbellulone and TRPA1 activates the trigeminovascular system. *Brain J Neurol* **135**, 376–390.
- Ness TJ & Gebhart GF (1988). Colorectal distension as a noxious visceral stimulus: physiologic and pharmacologic characterization of pseudodafferent reflexes in the rat. *Brain Res* **450**, 153–169.
- Neugebauer V, Han JS, Adwanikar H, Fu Y & Ji G (2007). Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain* **3**, 8.
- Nickel R (2003). *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV: Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen*, 4., unveränderte Auflage. Enke, Stuttgart.
- Olesen J, Diener H-C, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, Pollentier S, Lesko LM & BIBN 4096 BS Clinical Proof of Concept Study Group (2004). Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* **350**, 1104–1110.
- Olesen J, Iversen HK & Thomsen LL (1993). Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport* **4**, 1027–1030.
- Panconesi A, Franchini M, Bartolozzi ML, Mugnai S & Guidi L (2013). Alcoholic drinks as triggers in primary headaches. *Pain Med Malden Mass* **14**, 1254–1259.

-
- Petersen KA, Lassen LH, Birk S, Lesko L & Olesen J (2005). BIBN4096BS antagonizes human alpha-calcitonin gene related peptide-induced headache and extracerebral artery dilatation. *Clin Pharmacol Ther* **77**, 202–213.
- Pouokam E, Bell A & Diener M (2013). Actions of Angeli's salt, a nitroxyl (HNO) donor, on ion transport across mucosa-submucosa preparations from rat distal colon. *Eur J Pharmacol* **715**, 133–141.
- Rahmann A, Wienecke T, Hansen JM, Fahrenkrug J, Olesen J & Ashina M (2008). Vasoactive Intestinal Peptide Causes Marked Cephalic Vasodilation, but does not Induce Migraine. *Cephalalgia* **28**, 226–236.
- Rasmussen BK (2001). Epidemiology of headache. *Cephalalgia Int J Headache* **21**, 774–777.
- Ray BS & Wolff HG (1940). Experimental studies on headache: Pain-sensitive structures of the head and their significance in headache. *Arch Surg* **41**, 813–856.
- Reeh PW (1986). Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* **66**, 141–146.
- Rosenfeld MG, Mermod JJ, Amara SG, Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW & Evans RM (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* **304**, 129–135.
- Sadofsky LR, Boa AN, Maher SA, Birrell MA, Belvisi MG & Morice AH (2011). TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc* **63**, 30–36.
- Sarchielli P, Alberti A, Codini M, Floridi A & Gallai V (2000). Nitric oxide metabolites, prostaglandins and trigeminal vasoactive peptides in internal jugular vein blood during spontaneous migraine attacks. *Cephalalgia Int J Headache* **20**, 907–918.
- Schepelmann K, Ebersberger A, Pawlak M, Oppmann M & Messlinger K (1999). Response properties of trigeminal brain stem neurons with input from dura mater encephali in the rat. *Neuroscience* **90**, 543–554.
- Schwenger N, Dux M, de Col R, Carr R & Messlinger K (2007). Interaction of calcitonin gene-related peptide, nitric oxide and histamine release in

neurogenic blood flow and afferent activation in the rat cranial dura mater. *Cephalalgia Int J Headache* **27**, 481–491.

- Seiler K, Nusser JI, Lennerz JK, Neuhuber WL & Messlinger K (2013). Changes in calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptor component and nitric oxide receptor (sGC) immunoreactivity in rat trigeminal ganglion following glyceroltrinitrate pretreatment. *J Headache Pain* **14**, 74.
- Smulik R, Dębski D, Zielonka J, Michałowski B, Adamus J, Marcinek A, Kalyanaraman B & Sikora A (2014). Nitroxyl (HNO) Reacts with Molecular Oxygen and Forms Peroxynitrite at Physiological pH BIOLOGICAL IMPLICATIONS. *J Biol Chem* **289**, 35570–35581.
- Spierings EL, Ranke AH & Honkoop PC (2001). Precipitating and aggravating factors of migraine versus tension-type headache. *Headache* **41**, 554–558.
- Strassman AM, Raymond SA & Burstein R (1996). Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature* **384**, 560–564.
- Strassman AM, Weissner W, Williams M, Ali S & Levy D (2004). Axon diameters and intradural trajectories of the dural innervation in the rat. *J Comp Neurol* **473**, 364–376.
- Strecker T, Dux M & Messlinger K (2002). Nitric oxide releases calcitonin-gene-related peptide from rat dura mater encephali promoting increases in meningeal blood flow. *J Vasc Res* **39**, 489–496.
- Symanowicz PT, Gianutsos G & Morris JB (2004). Lack of role for the vanilloid receptor in response to several inspired irritant air pollutants in the C57Bl/6J mouse. *Neurosci Lett* **362**, 150–153.
- Szabó C, Ischiropoulos H & Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 662–680.
- Tjølsen A, Rosland JH, Berge OG & Hole K (1991). The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods* **25**, 241–250.
- Trainor DC & Jones RC (1966). Headaches in explosive magazine workers. *Arch Environ Health* **12**, 231–234.

-
- Turner LC, Molgaard CA, Gardner CH, Rothrock JF & Stang PE (1995). Migraine Trigger Factors in a Non-Clinical Mexican-American Population in San Diego County: Implications for Etiology. *Cephalalgia* **15**, 523–530.
- Villalón CM, Centurión D, Valdivia LF, de Vries P & Saxena PR (2003). Migraine: pathophysiology, pharmacology, treatment and future trends. *Curr Vasc Pharmacol* **1**, 71–84.
- Vingen JV, Sand T & Stovner LJ (1999). Sensitivity to Various Stimuli in Primary Headaches: A Questionnaire Study. *Headache J Head Face Pain* **39**, 552–558.
- Vos BP, Strassman AM & Maciewicz RJ (1994). Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **14**, 2708–2723.
- Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG & Shephard SL (1997). Intravital microscope studies on the effects of neurokinin agonists and calcitonin gene-related peptide on dural vessel diameter in the anaesthetized rat. *Cephalalgia Int J Headache* **17**, 518–524.
- Wolff HG (1963). *Headache and other Pain*. Oxford University Press.
- Zagami AS, Goadsby PJ & Edvinsson L (1990). Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides. *Neuropeptides* **16**, 69–75.
- Zarpelon AC, Souza GR, Cunha TM, Schivo IRS, Marchesi M, Casagrande R, Pinge-Filho P, Cunha FQ, Ferreira SH, Miranda KM & Verri Jr. WA (2013). The nitroxyl donor, Angeli's salt, inhibits inflammatory hyperalgesia in rats. *Neuropharmacology* **71**, 1–9.
- Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M & Burstein R (2011). Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression. *Ann Neurol* **69**, 855–865.

9 Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen und mich stets unterstützt haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karl Meßlinger für die Überlassung des Themas, für die mir jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit sowie die zur Verfügung gestellte Finanzierung. Das gute Klima in der Arbeitsgruppe, der fachliche, praktische und persönliche Beistand in allen Phasen, haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen!

Herrn Prof. Dr. Martin Diener danke ich für die Zusage und Ermöglichung der Erstellung einer externen Doktorarbeit und das damit überbrachte Vertrauen in mich und die ganze Arbeitsgruppe in Erlangen. Vielen Dank für die unkomplizierte, angenehme und gute Betreuung!

Dr. Roberto de Col, Dr. Michael Übner und Ann-Catherine Denner danke ich für die gute Einarbeitung und Unterstützung am *in vitro* Setup und bei der Software Spike 2.

Herrn PD Dr. Michael J. M. Fischer gilt mein herzlicher Dank insbesondere für die wertvolle Hilfe im Umgang mit jeglicher Software und bei fachlichen Fragen jeder Art! Vielen Dank auch für die hervorragenden Doktorandenseminare!

Frau Jana Schramm und Frau Birgit Vogler danke ich herzlich für die hervorragende Einarbeitung, die Hilfe bei den Präparationen und ganz besonders für die große und flexible Hilfsbereitschaft, die angefallenen Überstunden sowie die stete seelisch-moralische Unterstützung!

Einen besonders großen Dank an meine Eltern und Thomas – für Alles!!

10 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten 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.

11 Anhang

Unit	Genotyp	rezept. Feld	Nerv	Latenz (s)	el. Schwelle (μA)	Strecke (m)	V (m/s)	Klasse
1	C57Bl6	caudolateral	N. tentorius	0.004	30	0.032	8.00	A δ
2	C57Bl6	caudolateral	N. tentorius	0.003	35	0.013	5.20	A δ
3	C57Bl6	caudal	N. tentorius	0.002	15	0.025	12.50	A δ
4	C57Bl6	caudosagittal	N. tentorius	0.005	29	0.011	2.44	C
5	C57Bl6	caudosagittal	N. tentorius	0.008	35	0.011	1.47	C
6	C57Bl6	caudosagittal	N. tentorius	0.004	35	0.029	7.25	A δ
7	C57Bl6	caudal	N. tentorius	0.005	25	0.026	5.20	A δ
8	C57Bl6	caudosagittal	N. tentorius	0.009	23	0.025	2.78	A δ
9	C57Bl6	caudosagittal	N. tentorius	0.006	25	0.035	5.83	A δ
10	C57Bl6	sagittal	N. tentorius	0.008	nicht bestimmt	0.042	5.60	A δ
11	C57Bl6	sagittal	N. tentorius	0.014	nicht bestimmt	0.042	3.00	A δ
12	C57Bl6	sagittal	N. tentorius	0.015	nicht bestimmt	0.042	2.80	A δ
13	C57Bl6	laterosagittal	N. spinosus	0.004	10	0.053	13.33	A δ

Tabelle 5: Eigenschaften der abgeleiteten Fasern von C57Bl6-Gruppe

Unit	Genotyp	Rezept. Feld	Nerv	Latenz (s)	EI. Schwelle (μ A)	Strecke (m)	V (m/s)	Klasse
1	TRPA1 -/-	laterozentral	N. spinosus	0.008	35	0.030	4.00	A δ
2	TRPA1 -/-	caudal	N. tentorius	0.003	38	0.005	1.67	C
3	TRPA1 -/-	laterocaudal	N. spinosus	0.011	20	0.013	1.18	C
4	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.003	25	0.012	4.00	A δ
5	TRPA1 -/-	caudoventral	N. tentorius	0.005	26	0.023	5.11	A δ
6	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.008	15	0.016	2.13	A δ
7	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.003	18	0.007	2.80	A δ
8	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.020	30	0.030	1.50	C
9	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.025	23	0.028	1.12	C
10	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.007	20	0.030	4.29	A δ
11	TRPA1 -/-	caudosagittal	N. tentorius	0.015	17	0.030	2.00	C

Tabelle 6: Eigenschaften der abgeleiteten Fasern von TRPA1-Knockout Gruppe

Unit	Genotyp	Rezept. Feld	Nerv	Latenz (s)	El. Schwelle (μ A)	Strecke (m)	V (m/s)	Klasse
1	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.014	25	0.021	1.50	C
2	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.004	3	0.020	5.56	A δ
3	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.008	5	0.020	2.67	A δ
4	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.014	21	0.020	1.43	C
5	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.006	5	0.020	3.64	A δ
6	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.009	15	0.025	2.94	A δ
7	TRPA1/TRPV1 =/=	laterozentral	N. spinosus	0.006	10	0.020	3.33	A δ
8	TRPA1/TRPV1 =/=	laterozentral	N. spinosus	0.020	10	0.020	1.00	C
9	TRPA1/TRPV1 =/=	sagittal	N spinosus	0.007	nicht bestimmt	0.052	7.43	A δ
10	TRPA1/TRPV1 =/=	laterosagittal	N. spinosus	0.016	nicht bestimmt	0.035	2.19	C
11	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.008	nicht bestimmt	0.019	2.53	A δ
12	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.004	nicht bestimmt	0.019	4.75	A δ
13	TRPA1/TRPV1 =/=	caudosagittal	N. tentorius	0.016	nicht bestimmt	0.013	0.81	C

Tabelle 7: Eigenschaften der abgeleiteten Fasern der TRPA1- und TRPV1-Doppelknockout -Gruppe

C57Bl6	Faser 1	Faser 2	Faser 3	Faser 4	Faser 5	Faser 6	Faser 7	Faser 8	Faser 9	Faser 10	Faser 11	Faser 12	Faser 13	Mittelwert
KI an	2.50	2.50	2.00	2.50	2.67	16.67	2.50	2.50	2.50	2.50	2.00	2.50	2.50	3.53
	2.50	2.33	12.17	2.50	2.50	2.67	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	3.24
	2.50	2.50	1.67	2.50	2.50	7.33	2.50	2.50	2.50	2.50	2.00	2.50	2.50	2.77
	2.50	2.50	3.00	2.50	2.50	2.50	3.00	2.50	2.50	2.50	2.17	2.33	2.50	2.54
	2.67	2.50	1.50	2.50	2.50	2.83	17.83	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	3.64
NaOH	4.17	6.17	3.00	2.50	2.50	2.50	4.83	2.50	6.00	2.50	2.17	1.50	2.50	3.29
	2.50	9.00	11.17	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.17	2.33	2.50	3.63
	2.50	2.50	1.83	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.17	2.50	2.50	2.42
	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	4.67	2.50	2.50	2.50	2.50	2.33	2.50	2.50	2.65
	2.50	2.50	2.33	2.50	2.50	3.67	2.67	2.50	5.17	2.50	2.00	2.50	2.50	2.76
waschen	2.50	13.67	3.83	2.50	2.50	6.83	2.50	2.71	2.50	2.50	2.17	2.50	2.50	3.79
	2.50	9.17	1.67	2.50	2.50	3.17	2.50	2.57	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	3.01
	2.50	2.67	1.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.57	2.50	2.50	2.33	2.33	2.50	2.42
	2.50	2.67	2.17	2.50	2.50	2.50	2.50	3.00	2.50	2.50	2.33	2.50	2.50	2.51
	2.50	2.50	2.00	2.50	2.50	2.50	2.67	3.86	2.50	2.50	2.17	2.33	2.50	2.54
AS 300 µM	48.33	7.83	8.17	16.67	14.33	13.33	23.67	13.17	35.33	3.33	1.67	1.50	10.67	15.23
	0.67	15.17	0.00	30.00	12.17	2.00	6.33	1.67	0.00	0.00	3.83	0.00	1.00	5.60
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.33	0.00	0.00	0.23
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.19
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.17	0.00	0.00	0.17
waschen	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.13
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	0.05
	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.09
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.67	0.00	0.00	0.05
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	0.09
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.12
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	0.09
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	0.09
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	0.00	0.00	0.12
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.00	1.17	0.00	0.00	0.13

Tabelle 8: Minutenaktivität der Einzelfasern der C57Bl6-Gruppe

TRPA1 - /-	Faser 1	Faser 2	Faser 3	Faser 4	Faser 5	Faser 6	Faser 7	Faser 8	Faser 9	Faser 10	Faser 11	Faser 12	Mittelwert
Kontrolle	2.50	2.50	2.50	2.50	2.50	3.33	2.17	2.50	6.17	3.83	2.17	2.50	2.93
	1.67	2.67	2.50	1.83	2.50	2.50	2.00	2.50	6.67	2.17	1.17	2.50	2.56
	0.83	2.67	2.50	0.00	2.50	2.17	2.33	2.50	5.33	2.17	2.17	2.50	2.31
	1.50	2.50	2.50	2.50	2.50	2.00	2.17	2.50	7.00	2.67	1.67	2.50	2.67
	0.00	2.50	2.50	2.50	2.50	2.67	2.17	2.50	6.83	2.33	2.00	2.50	2.58
NaOH	2.50	2.50	10.00	2.50	6.33	3.33	2.17	7.33	9.33	2.33	2.50	2.83	4.47
	2.50	2.50	3.83	2.50	2.50	4.00	1.67	2.50	7.17	2.50	1.00	2.50	2.93
	2.50	2.50	3.83	2.50	2.50	4.83	1.83	2.50	6.33	2.50	2.50	2.50	3.07
	2.50	2.50	3.33	2.33	2.50	4.50	2.50	2.50	10.50	2.83	2.50	2.50	3.42
	2.50	2.50	2.83	2.50	2.50	5.67	1.67	2.50	6.50	2.33	2.50	2.50	3.04
waschen	2.33	2.50	2.67	2.50	4.83	2.83	1.83	2.50	7.17	2.50	2.50	2.50	3.06
	7.00	2.50	2.50	2.33	3.17	3.33	1.33	2.50	6.17	3.00	2.50	2.50	3.24
	4.33	2.67	2.50	2.50	2.50	3.50	1.33	2.50	6.67	2.50	2.50	2.83	3.03
	2.50	2.67	2.67	2.00	2.50	4.17	1.00	2.50	6.00	2.67	2.50	2.50	2.81
	2.50	2.50	2.50	1.67	2.50	3.33	0.83	2.50	7.50	2.67	2.50	2.50	2.79
AS 300µM	14.00	40.17	6.50	102.17	5.50	35.33	9.50	28.33	86.67	4.67	13.17	51.17	33.10
	4.17	11.50	6.83	0.00	3.67	1.00	0.00	2.50	4.83	1.83	0.00	0.00	3.03
	1.83	0.00	0.00	0.00	5.67	0.00	0.00	2.50	5.00	1.67	0.67	0.00	1.44
	0.00	0.00	0.00	0.00	6.33	0.00	0.00	2.50	3.67	0.50	2.00	0.00	1.25
	0.00	0.00	0.00	0.00	14.83	0.00	0.00	2.50	3.50	0.00	2.50	0.00	1.94
waschen	0.00	0.00	0.00	0.00	12.67	0.00	0.00	2.33	4.17	0.17	2.50	0.17	1.83
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.50	4.17	0.17	2.50	0.00	0.69
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.83	4.50	0.67	2.50	0.00	0.79
	0.00	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	5.17	0.00	2.50	0.17	0.88
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	4.00	0.17	2.50	0.00	0.76
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	3.33	0.17	2.50	0.00	0.71
	0.00	0.17	0.00	0.00	1.50	1.50	0.00	2.50	3.50	0.00	2.17	0.00	0.94
	0.00	0.00	0.00	0.00	1.83	1.83	0.00	2.50	3.17	0.00	2.33	0.00	0.97
	0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	4.00	0.17	2.50	0.00	0.78
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.50	2.83	0.00	2.33	0.17	0.65

Tabelle 9: Minutenaktivität der Einzelfasern der TRPA1-Knockout-Gruppe

TRPA1 -/ TRPV1 -/	Faser 1	Faser 2	Faser 3	Faser 4	Faser 5	Faser 6	Faser 7	Faser 8	Faser 9	Faser 10	Faser 11	Faser 12	Faser 13	Mittelwert
Kontrolle	5.17	12.33	2.67	3.67	2.50	2.50	2.50	20.00	2.50	5.00	7.50	0.00	2.50	5.29
	5.33	4.50	2.50	3.83	3.17	2.50	2.50	7.67	2.50	5.00	7.33	0.00	2.50	3.79
	8.83	3.50	2.33	5.33	3.17	2.50	2.50	8.17	2.33	4.33	7.50	0.00	2.50	4.08
	6.33	3.83	2.50	3.83	2.83	2.50	2.50	5.83	2.17	4.00	7.50	0.00	2.67	3.58
	8.83	3.67	2.50	4.67	3.33	2.50	2.33	6.83	2.17	4.33	7.17	0.00	2.50	3.91
NaOH	8.00	11.83	3.33	3.33	2.83	2.50	2.33	8.50	30.33	10.17	6.83	0.00	2.50	7.12
	8.33	9.83	2.50	2.83	3.50	2.50	2.50	6.83	1.50	4.33	6.83	0.00	2.50	4.15
	6.67	6.50	2.33	2.83	3.83	2.50	2.33	7.50	2.33	4.00	7.67	0.00	2.50	3.92
	12.50	3.00	2.50	5.33	3.83	2.50	2.33	6.17	2.50	4.17	7.33	0.00	2.50	4.21
	7.33	3.33	2.67	5.67	4.67	2.50	2.33	5.33	2.50	4.50	7.33	0.00	2.50	3.90
waschen	5.17	2.83	2.33	4.83	6.17	2.67	2.33	4.17	2.50	4.33	7.50	0.00	2.50	3.64
	6.50	2.67	2.50	5.83	7.00	2.50	2.50	16.33	2.50	3.83	7.50	0.00	2.50	4.78
	7.17	2.83	2.50	4.67	12.50	3.17	2.17	9.33	2.50	4.83	7.50	0.00	2.50	4.74
	6.33	2.50	2.17	5.17	18.33	2.50	2.50	6.17	2.50	4.67	7.67	0.00	2.50	4.85
	8.33	2.50	2.33	4.17	8.00	2.50	2.50	6.67	2.50	4.67	7.50	0.00	2.50	4.17
AS 300µM	14.67	100.83	3.33	56.00	156.00	2.33	2.50	27.33	19.83	15.67	106.83	135.83	4.33	49.65
	3.50	0.00	1.83	1.83	0.00	11.50	2.17	7.33	0.00	2.50	0.00	0.00	6.50	2.86
	5.67	0.00	2.17	3.00	0.00	23.00	0.00	10.00	0.00	2.50	0.00	0.00	1.00	3.64
	5.17	0.00	1.33	3.33	0.00	0.50	0.67	2.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	1.19
	3.83	0.00	1.17	3.67	0.00	0.00	1.33	2.33	0.00	2.50	0.00	0.00	1.00	1.22
waschen	5.00	0.00	1.33	3.33	0.00	0.00	0.33	2.17	0.00	2.50	0.00	0.00	0.33	1.15
	4.33	0.00	1.33	5.33	0.00	0.00	0.00	2.17	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	1.24
	4.67	0.00	2.00	4.83	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	3.67	0.00	0.00	0.33	1.50
	2.83	0.00	2.33	3.33	0.00	0.00	0.17	2.67	0.00	3.33	0.00	0.00	1.67	1.26
	3.33	0.00	2.50	3.50	0.00	0.00	0.00	2.67	0.00	3.67	0.00	0.00	0.17	1.22
	2.50	0.00	2.00	5.17	0.00	0.00	0.00	2.67	0.00	3.67	0.00	0.00	0.00	1.23
	5.17	0.00	2.33	3.83	0.00	0.00	0.33	2.67	0.00	3.00	0.00	0.00	0.00	1.33
	4.83	0.00	3.33	5.33	0.00	0.00	1.00	4.00	0.00	2.50	0.00	0.00	0.00	1.62
	4.50	0.17	6.33	4.17	0.00	0.00	1.00	2.67	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00	1.71
	3.17	0.17	3.67	4.33	0.00	0.00	2.00	2.33	0.00	3.33	0.00	0.00	0.00	1.46

Tabelle 10: Minutenaktivität der Einzelfasern der TRPA1- und TRPV1-Doppelknockout -Gruppe

