

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

Acetonitril, LiChrosolv® Acetonitril, Firma Merck, FRG

Albumin aus Rinderserum (BSA), Firma Sigma Chemie, FRG

Ammoniumacetat, Firma Merck, FRG

Reines Ethanol (96%), Firma Merck, FRG

Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA), Firma Merck, FRG

Essigsäure, Firma Merck, FRG

Harman (1-Methyl- β -Carbolin), Firma Sigma Chemie, FRG

H₂O zur Analyse immer Millipore gefiltertes Wasser

4-Hydroxychinolin (4-HQ), Firma Sigma Chemie, FRG

5-Hydroxytryptamin (5-HT, Serotonin)-Kreatininsulfat, Firma Sigma Chemie, FRG

Kaliumhydroxid (KOH), Firma Merck, FRG

Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), Firma Merck, FRG

Kaliumdihydrogenphosphat-Trihydrat (K₂HPO₄·3 H₂O), Firma Merck, FRG

Kynuramin, Firma Sigma Chemie, FRG

Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄), Firma Merck, FRG

Dinatriumphosphat-Trihydrat (Na₂HPO₄·3H₂O), Firma Merck, FRG

Methanol, LiChrosolv Methanol, Firma Merck, FRG

Natronhydroxid, Firma Merck, FRG

Norharman (β -Carbolin), Firma Sigma Chemie, FRG

Octansulfonsäuredinatriumsalz, Firma ICN, USA

Perchlorsäure, Firma Merck, FRG

Protein-Assay Dye Reagent, (Färbereagenz), Firma Bio Rad, FRG

Salzsäure (HCl)

Trichloressigsäure, Firma Merck, Darmstadt, FRG

Zigaretten, ohne Filter, Camel; (0,9mg Nikotin, 12mg Kondensat), FRG, unter Lizenz von Winston-Salem, USA

2.2. Geräte und Zubehör

2.2.1. Geräte

Thrombozytenzählkammer, Firma Coulter Counter Thrombocounter-C Coulter Electronics LTD.

Harpden, Herts, USA

Photometer, PMQ2, Firma Zeiss, FRG

Homogenisator: RM-22, Firma Janke & Kunkel, FRG

pH-Meter: E 512, Firma Metrohm, CH

Kartuschen zur Thrombozytenpräparation für HPLC: Bakerbondspe*Phenyl (C₆H₅),
dazugehörige Saugpumpe: Baker 10 SpeSystem, USA

Magnetrührer: Firma Janke & Kunkel, FRG

Gefriertrocknungsanlage: Christ LMC-1 (Beta 1-8-K) Firma Christ, FRG

Spektralfluorometer: ZFM 4C, Firma Zeiss, FRG

Waagen: PL 1200, Präzisionswaage: AE 163, beide Firma Mettler, FRG

Sonifier: B-12, Branson, Firma Sonic Power, USA

Vortexer: Heidolph Reax 1 D, Firma Heidolph, FRG

Rotavapor, Firma Büchi, CH, dazugehörige Pumpe: Speedivac ES 35, Firma Edwards
Hochvakuum GmbH, FRG

Aqua ad analysem: Millipore Milli-Q ZFM Q 230 04, Firma Millipore, FRG

Schüttler-Wasserbad: Firma Köttermann, FRG

Zentrifugen und Rotoren

Sorvall RC5C, (Rotor SM 24) und Sorvall, RC 28 S (Rotor SS34), Firma Du Pont, USA

Tischzentrifuge für MAO Test: Biofuge 13, Sepatech, Firma Heraeus, FRG

Gekühlte Zentrifuge im Isotopenlabor für 5-HT und Blutauarbeitung, Varifuge 3.OR, Firma
Heraeus, FRG

Bodenzentrifuge (für Zentrifugiervorgang vor dem Filtern über Kartuschen): ECCO-Superior-
IIIb, FRG

2.2.2. Chromatographie und Säulenmaterial

HPLC (High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie,
Hochdruckflüssigkeitschromatographie):

HPLC Firma Hewlett Packard, HP1090, Chem Station 149/96, Fluoreszenzdetektor 1046 A, USA

Filter (für HPLC): Membranfilter NC 45, 0,45 µm, Firma Schleicher und Schuell, FRG

Säulen

für β-Carboline: 250x4,6mm reversed-phase-Säule (Firma VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH, FRG; Säulenmaterial: Inertsil C8, 5 µm) und eine Vorsäule (1,5 cm, gleiches Material)

für 5-HT: 250 x 4,6 mm Säule (Firma VDS Optilab Chromatographie Technik GmbH, FRG; Säulenmaterial: Firma Inertsil, ODS-2,5 µm)

2.2.3. Zubehör

Pipetten: Firma Eppendorf, FRG dazugehörige Spitzen, 100 µl und 1000 µl, Firma Biozym, FRG

Reagenzgefäße verschiedener Größen: Firma Sarstedt, FRG

Reaktionsgefäße für MAO-Analysen, Firma Eppendorf, USA

Abimed Röhrchen, Firma Abimed, FRG

50 ml Röhrchen zur Blutabnahme, Firma Nunc, FRG

Braunülen, Firma Braun, FRG

2.3. Probanden

2.3.1. Teilnahmebedingungen und Probandendaten

Die Probandenauswahl erfolgte gemäß der Helsinki-Deklaration und dem AMG, §§ 40/41. Alle Teilnehmer wurden ausführlich mit einer Probandeninformation über Ablauf und Fragestellung der Untersuchung aufgeklärt und für ihren Aufwand entschädigt. Ihr schriftliches Einverständnis lag vor Beginn der Untersuchung vor. Sie hatten das Recht die Untersuchung jederzeit und ohne Angabe von Gründen abzubrechen. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums „Benjamin Franklin“ hat die Studie als ethisch unbedenklich eingestuft.

Die Rekrutierung erfolgte per Aushang an den Universitäten Berlins.

Ein- und Ausschlusskriterien

Zur Untersuchung zugelassen wurden nur männliche Probanden im Alter zwischen 20 und 38 Jahren, deren Zigarettenkonsum (bei den Rauchern) bei mindestens 12 Stück pro Tag lag. Ausgeschlossen war die Teilnahme für Personen, deren Zigarettenkonsum des vergangenen Monats sich von dem des vergangenen halben Jahres unterschied. Ebenso führten zum Ausschluss von der Studie somatische oder seelische Erkrankungen, die Abhängigkeit von Drogen oder Alkohol sowie der Gebrauch von Drogen innerhalb der letzten zwei Wochen und die Erkrankung an Morbus Parkinson bei Verwandten ersten Grades.

Gefragt wurde außerdem nach der Einnahme von Aufputsch- und Beruhigungsmitteln vor Prüfungssituationen oder aus anderem Anlass, derzeitiger Medikamenteneinnahme, Grunderkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus und längeren Rauchpausen im Laufe des Lebens. Ebenfalls erfragt wurde der Grad der Nikotinabhängigkeit anhand des Fagerström-Test für Nikotinabhängigkeit (Heatherton et al., 1991). Die Erkrankung an psychischen Krankheiten bei Verwandten ersten Grades und das Vorkommen von Alkoholsucherkrankungen bei Verwandten wurden ebenfalls ermittelt.

Die Nichtraucherprobanden mussten seit mindestens einem Jahr Nichtraucher sein und wurden darüber hinaus den gleichen Ein- und Ausschlusskriterien unterworfen, um eine Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten.

2.4. Versuchsablauf und Studiendesign

Am Vortag war es den Probanden nicht gestattet tryptaminreiche Nahrungs- und Genussmittel wie Wein, Bier, Käse oder Heringe zu konsumieren, da Tryptamin als Vorläufersubstanz von Norharman gilt (Susilo & Rommelspacher 1988, Rommelspacher et al., 1991b). Die letzte Zigarette durfte am Vorabend geraucht werden, so dass ein mindestens 10-stündiges rauchfreies Intervall vor der ersten Blutabnahme gewährleistet war. Pro Versuchstag wurden vier Probanden einbestellt. Der Beginn der Untersuchung war um 9:00 Uhr morgens in der Sonderforschungsambulanz für Abhängigkeitserkrankungen des Universitätsklinikums Benjamin Franklin festgelegt und erfolgte mit Aufklärung, Einverständniserklärung der Probanden und anschließendem Legen des peripheren venösen Zugangs (Braunüle). Jeweils zwei Probanden rauchten gleichzeitig gemäß der folgenden Studiendesigns:

Studiendesign A

Norharman und Harman im Blutplasma	+	+	+	-	+	+	+
Norharman und Harman in Thrombozyten	+	+	-	-	+	-	+
MAO-B Aktivität	+	-	+	-	-	+	+
5-HT Konzentration in Thrombozyten	+	-	+	-	-	+	+
Zeitpunkte der Blutabnahme (in Minuten)	- 2	5	15	58	73	90	180
	A	B	C	D	E	F	G
	↑			↑			
	1 Zigarette			2 Zigaretten			
	(t = 0 min)			(t = 60 min)			

Tabelle 1: Studiendesign A

Vor dem Rauchen erfolgte die Blutabnahme zur Bestimmung der Basalwerte aller untersuchten Substanzen, also Norharman und Harman im Blutplasma und den Thrombozyten, die MAO-B in den Thrombozyten und 5-Hydroxytryptamin in den Thrombozyten (Zeitpunkt A, -2 min). Anschließend wurde die erste Zigarette ohne Filter so zügig wie möglich bei maximaler Inhalation innerhalb von höchstens drei Minuten geraucht. 5 Minuten nach Beginn des Rauchens wurde Blut für die Bestimmung von Norharman und Harman im Plasma und Thrombozyten abgenommen. (Zeitpunkt B, 5 min). 10 min darauf erfolgte die Blutabnahme zur Bestimmung von Norharman und Harman im Plasma, der MAO-B und 5-HT. (Zeitpunkt C, 15 min). 60 min nach Beginn des Rauchens rauchten die Probanden erneut. Bei dieser Sitzung wurden 2 Zigaretten (Zeitpunkt D) geraucht, um den Dosiseffekt zu untersuchen. Hierzu benötigten die Probanden 8 Minuten, 5 min später wurde die vierte Blutabnahme (Zeitpunkt E, 13 min nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette, insgesamt 73 min nach Versuchsbeginn) zur Bestimmung von Norharman und Harman im Plasma und Thrombozyten vorgenommen. 15 min später (Zeitpunkt F, insgesamt exakt 90 min nach Versuchsbeginn), wurde Blut zur Bestimmung von Norharman und Harman im Plasma sowie des 5-Hydroxytryptamins und der MAO-B aus den

Thrombozyten abgenommen. Zum Abschluss, drei Stunden nach der ersten und zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette wurden nochmals alle Parameter untersucht: Also Norharman und Harman im Blutplasma und den Thrombozyten; die MAO-B in den Thrombozyten und 5-Hydroxytryptamin in den Thrombozyten (Zeitpunkt G, 180 min).

Studiendesign B

5-HT Konzentration im Blutplasma	+	+	+	-	+	+	+
5-HT Konzentration in Thrombozyten	+	+	+	-	+	+	+
Cotinin Konzentration im Blutplasma	+	-	-	-	-	-	-
Zeitpunkte der Blutabnahme (inMinuten)	-2	5	15	58	73	90	180
	A	B	C	D	E	F	G
				↑	↑		
				1 Zigarette	2 Zigaretten		
				<i>(t = 0 min)</i>	<i>(t = 60 min)</i>		

Tabelle 2: Studiendesign B

In der zweiten Probandengruppe wurde nach dem gleichen Zeitschema geraucht und Blut abgenommen, jedoch erfolgte zu allen Messzeitpunkten die Bestimmung des 5-HT im Plasma und den Thrombozyten. Zusätzlich wurde vor dem ersten Rauchen die Plasma-Cotinin-Konzentration bestimmt, um eine Kontrolle über die Aussage zum Genuss der letzten Zigarette am Vorabend zu haben, da in dieser Gruppe keine β -Carboline gemessen wurden.

2.5. Blutaufarbeitung

Zwei 50 ml Röhrchen wurden jeweils 2,5 ml 1,5%iger EDTA Lösung, als Antikoagulant in 0,7%ige NaCl Lösung zugesetzt. Je nach Messzeitpunkt wurden 60 ml (Zeitpunkte A, G, Studie A), 40 ml (Zeitpunkte B und F, Studie A) respektive 30 ml (Zeitpunkte C und F Studie A, alle Zeitpunkte Studie B) venöses Blut mittels einer Braunüle direkt in diese Röhrchen getropft, sofort auf Eis gestellt und anschließend 15 Minuten lang bei 4 °C mit 200 g ohne Bremse zentrifugiert.

Die Probe bestand aus einem Überstand aus plättchenreichem Plasma (Thrombozyten und Plasma) und einem Rückstand aus Erythrozyten und Plasma.

Vom Überstand (plättchenreiches Plasma) wurden 1 ml für die Bestimmung des 5-HT in den Thrombozyten, 10 ml für die Bestimmung der MAO-B und zwischen 12 ml und 18 ml für die Bestimmung der β -Carboline Harman und Norharman in den Thrombozyten abgehebert. Im Anschluss wurden Überstand und Rückstand nochmals für 10 min mit 2000 g bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert. Das Plasma aus Über- und Rückstand wurde vereinigt. So standen 16–40 ml Volumen zur Verfügung. Dieses Volumen wurde gemessen und zur Bestimmung des 5-HT und der β -Carboline bei -80 °C eingefroren. Die Erythrozyten aus dem Rückstand wurden verworfen, die Thrombozytenpellets zur Bestimmung des 5-HT, der β -Carboline und der MAO-B bei -80 °C eingefroren.

Die Thrombozytenzählung erfolgte durch die Mitarbeiter des Instituts für Klinische Neurobiologie unter Verwendung der Thrombozytenzählkammer Coulter Counter.

2.6. Bestimmung von Harman und Norharman

2.6.1. Bestimmung von Harman und Norharman im Blutplasma

Nach dem Auftauen wurden die Plasmaproben mit 36 400 g und bei +4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Extraktion der β -Carboline erfolgte mittels Baker C 6-Kartuschen mit einem Fassungsvermögen von 3 ml. Ein 4 ml Aliquot (also 2x2 ml) des Überstandes wurde auf eine Kartusche gegeben, die mit 2,5 ml eines 10 mM Natriumphosphat Puffers (pH 7,0) equilibriert worden war. Es folgte ein Waschschriff mit 5 ml destilliertem Methanol, das mit 5 ml des 10 mM Natriumphosphat-Puffers auf einen pH von 7,0 adjustiert worden waren. Nachdem die Probe bei leichtem Unterdruck durch die Kartusche gelaufen war, wurde diese mit 2,5 ml des Natrium-

phosphat-Puffers gespült. Die Elution der β -Carboline aus der Kartusche erfolgte mit 5 ml destil- liertem Methanol. Spätestens nach 5 Durchgängen wurden die Kartuschen verworfen. Das Eluat wurde in einem silanisierten Spitzkölbchen, das nur zur Bestimmung der β -Carboline genutzt wird, am Rotavapor zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 400 μ l einer 50%igen Me- thanollösung aufgenommen und bei -20 °C maximal eine Woche lang bis zur weiteren Analyse am HPLC (Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie) aufbewahrt. Die Auftrennung von Norhar- man und Harman erfolgte mittels HPLC. Nach Auftauen und Zentrifugation wurde ein Aliquot der Proben konsekutiv nach drei verschiedenen Methoden eluiert (mobile Phase):

Methode A: Flussrate 1,5 ml/Minute. Der Eluent bestand aus 38,9% Acetonitril (90%ig), und 61,1% wässriger Phase, bestehend aus: 50 mM Ammoniumacetat (pH 9,0) und 2,5 mM 1-Octan- sulfonsäuredinatriumsalz.

Methode B: Flussrate 1,4 ml/Minute. Der Eluent bestand aus 55% reinem Methanol und 45% wässriger Phase bestehend aus: 20 mM Ammoniumacetat und 2,5 mM 1-Octansulfonsäure- dinatriumsalz.

Methode C: Flussrate 1,4 ml/Minute. Der Eluent bestand aus 50% reinem Methanol und 50% wässriger Phase bestehend aus: 50 mM Ammoniumacetat (pH 9,0) und 2,5 mM 1-Octansulfon- säuredinatriumsalz.

Die Retentionszeiten für Norharman und Harman waren (A): 6,8 bzw. 7,7 min, (B): 7,7 bzw. 8,9 min (C): 12,8 bzw. 15,3 min. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 5 pg/Stichprobe (5 pg/4 ml). Jeder Durchlauf enthielt mehrere Stichproben mit internem Standard, um die Wiederfindung, die bei 90–95% lag, zu bestimmen. Mehrere Leerwerte pro Durchlauf dienten zur Gewährleistungs- kontrolle der Reinheit der Reagenzien. Die Fluoreszenzdetektion fand bei einer Anregung von 231 nm und einer Emission von 454 nm statt. Diese Methoden zur Bestimmung von Harman und Norharman wurden bereits mehrfach angewandt (Rommelspacher et al., 1991a, Spies et al., 1995, 1996).

Auswertung der HPLC-Chromatogramme der Plasmaproben

Alle Proben der einzelnen Zeitpunkte jedes Probanden wurden in Triplikaten (nach den drei Elu- tionsbedingungen, siehe oben, Methoden) analysiert. Zunächst wurden aus den Chromato- grammen die Norharman und Harman Signale (peaks) aufgesucht, die sich anhand der Reten-

tionszeiten der authentischen Standards der jeweiligen Sequenz ausmachen ließen. Eventuelle Verunreinigungen konnten auch anhand der Standards und der Leerwerte erkannt werden. Bei den Standards kam es in diesem Fall zur Vergrößerung der Fläche unter der Kurve ohne Veränderung der Retentionszeiten. Doppelgipfligkeit und/oder eine Abflachung bei An- bzw. Abstieg des Gipfels deutete auf zusätzliche Substanzen hin, die eine ähnliche Retentionszeit besitzen. Im Zweifelsfall wurde die Plasmaprobe erneut aufgearbeitet und die Messung wiederholt. Anschließend wurde der Mittelwert aus dem Integral der Fläche der Norharman und Harman-Gipfel der drei Elutionsbedingungen gebildet und in Menge pro Injektion umgerechnet.

2.6.2. Bestimmung von Harman und Norharman in den Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden in 0,1 mmol/l EDTA in einer Lösung bestehend aus 44,44 ml 90%iger CH₃CN, 31,56 ml H₂O, 3 ml destillierter 6 M HCl und 1 ml 8 mM EDTA aufgenommen und homogenisiert (CH₃CN/H₂O/6 M HCl/EDTA = 40/36/3/1). 4 * 4 ml Homogenat entsprechen 4 * 400 mg Pellet. Daraus wurden zwei Proben, je eine mit 0,2 und 0,5 ng Norharman- und Harmanzusatz, 10 Minuten lang bei 27 460 g bei 4 °C (mit dem Rotor Sorvall SM 24) zentrifugiert. Die Überstände wurden in Kunststoffröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 40 ml abgegossen und der Rückstand erneut in dem Puffer aufgenommen, homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt, mit 300 µl 5 mol/l KOH versetzt und für eine Stunde bei -80 °C tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Gefriertrocknung über ca. 40 Stunden. Der trockene Rückstand wurde erneut bei -80 °C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurde der Rückstand in 4ml Natriumphosphatpuffer aufgenommen, gevortext und im Kühlschrank gekühlt. Die Extraktion der β-Carboline erfolgte mittels Baker-C-6-Kartuschen mit einem Fassungsvermögen von 3 ml. Ein 4 ml Aliquot (2x2 ml) des Überstandes wurde auf eine Kartusche gegeben, die mit 2,5 ml eines 10 mmol/l Natriumphosphat-Puffers (pH 7,0) equilibriert worden war. Es folgten 5 ml destilliertes Methanol, das auf einen pH von 7,0 mit 5 ml des 10 mM Natriumphosphat Puffers adjustiert worden war. Nachdem die Probe bei leichtem Unterdruck durch die Kartusche gelaufen war, wurde diese mit 2,5 ml des Natriumphosphat Puffers gespült. Die Elution der β-Carboline aus der Kartusche erfolgte mit 5 ml destilliertem Methanol. Bei dieser Untersuchung wurden die Kartuschen spätestens nach drei Durchgängen verworfen. Das Eluat wurde in einem silanisierten Spitzkölbchen (das nur zur Bestimmung der β-Carboline genutzt wird) am Rotavapor zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 400 µl einer 50%igen

Methanol Lösung aufgenommen und bei -20 °C maximal eine Woche lang bis zur weiteren Analyse am HPLC aufbewahrt.

Die Bestimmung von Norharman und Harman in den Thrombozyten erfolgte analog der Bestimmung im Plasma mittels HPLC.

2.7. Bestimmung der Monoaminoxidase B in den Thrombozyten

Die MAO-Enzymaktivität wurde fluorometrisch am Spektralfluorometer bestimmt, entsprechend der Methode von Kraml (1965), in der von Dr. R. Susilo und Dr. M. Pawlik leicht abgewandelten Form nach persönlicher Mitteilung durch Dr. T. May mit Thrombozyten-Mitochondrien als Enzymquelle in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (K_2HPO_4/KH_2PO_4) (pH 7,4).

Waschung der Thrombozyten

Nach dem Auftauen des bei -80 °C eingefrorenen Pellets, gewonnen aus etwa 25 ml Blut, wurde dieses mit 10 ml eines 50 mM Waschpuffers in einem Glas/Teflon Homogenisator homogenisiert. Der Waschpuffer setzte sich aus 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 5 mM EDTA zusammen (Herstellung siehe Anhang, unten, S. 79). Direkt danach wurden die Proben mit 40 000 g bei 4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals, wie oben beschrieben, homogenisiert und zentrifugiert. Das so zweimal gewaschene Endpellet wurde in 4 ml eines Inkubationspuffers aufgenommen und homogenisiert. Der Inkubationspuffer setzte sich aus 0,2 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 5 mM EDTA zusammen.

Für den Test benötigte man lediglich 2 ml des Homogenats. Die restlichen 2 ml wurden für eine eventuelle Testwiederholung bei -80 °C tiefgefroren. Bis zur weiteren Untersuchung wurde das Homogenat auf Eis gestellt. Sowohl vor als auch nach dem Versuch wurde die Proteinkonzentration des Homogenates bestimmt.

Inkubationsansatz

Die Ausrüstung umfasste 1,5 ml Eppendorf Gefäße, die während der Inkubation offen gelassen wurden. Im Inkubationsansatz waren 300 µl 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) + 5 mM EDTA, 200 µl H₂O und 50 µl Homogenat in Phosphatpuffer/EDTA. Die Proben wurden um je 20 Se-

kunden zeitlich versetzt ins Schüttelwasserbad gegeben. Die Vorinkubation betrug 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Um das Homogenat möglichst homogen zu belassen, wurde es unter Rühren mit einem Magnetrührer auf Eis belassen.

Die Hauptinkubation wurde mit 50 µl Kynuramin begonnen. Dieses hat als künstliches Substrat der MAO-B den Vorteil, dass das Produkt 4-Hydroxychinolin (4-HQ) stabil ist. Die Kynuramin-konzentrationen betragen für jede Probe (Duplikate) 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM und 160 µM. Dazu wurde Kynuramin gegeben, das Reaktionsgefäß geschlossen, die Probe gevortext, geöffnet und anschließend wieder ins Wasserbad gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubationszeit wurde die Reaktion durch die Zugabe von Trichloressigsäure (10%ig) gestoppt. Der Standard, aus dem zu jedem Probenmesstag eine Eichgerade erstellt wurde, bestand aus 4-Hydroxychinolin in den folgenden Konzentrationen: 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 80 µM. (1 mg/ml, dann 80 µl/10 ml. 0,48 mg/10 ml 1:6 verdünnt).

Nach Zentrifugation bei 10 000 g für 6 Minuten wurden 800 µl des Überstandes mit 2 ml einer 1-M-Natronlauge in einem 13-ml-Röhrchen durchmischt. Gemessen wurde die Fluoreszenz des 4-Hydroxychinolin. Dieses entsteht durch die spontane Zyklisierung der Intermediäraldehyde, die sich bei der oxidativen Desaminierung des Kynuramins bei der durch die Monoaminoxidase katalysierten Reaktion bilden. Die Fluoreszenz der Proben wurde mindestens zweimal gemessen. Um von der Fluoreszenzabnahme im Gerät unbeeinflusste Messergebnisse zu erhalten, wurde ein strikt wiederholter zeitlicher Messablauf durchgeführt. Dabei war darauf zu achten, dass die Fluoreszenz unverzüglich beim ersten Lichtstrahl abgelesen wurde. Gemessen wurde bei einer Anregung (Excitation) von 315 nm. Das Fluoreszenzmaximum lag bei 380 nm (Emission). Als Eichgröße diente ein Standard aus 1-M-Natronlauge. Die Spaltbreite betrug 0,9 mm auf beiden Seiten, die Verstärkung 7 und 9. Gemessen wurde in Mikroküvetten aus Quarz.

Die Berechnung von V_{\max} und K_m erfolgte mittels des GraphPad Prism Programms mit nichtlinearer Regression, die ursprünglich für Bindungstests entwickelt wurde. Der von der Konzentration unabhängige K_m -Wert ist definiert als die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit und hat die Dimension µmol/l (Forth, 1996). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} wird bei vollständiger Substratsättigung erreicht. Eine konstante Enzymmenge (MAO-B) erhält man bei hoher Substratkonzentration (Kynuramin) (Forth, 1996). Die Steigung der Eichgeraden wurde mit Hilfe des Excel-Programms berechnet.

V_{\max} in Beziehung zur Proteinkonzentration und der Eichgeraden der jeweiligen Charge gesetzt, berechnet sich nach folgender Formel:

$$V_{\max} = (V_{\max} \text{ in FEE} * 1,148) * (S_x * \mu\text{g Protein})^{-1} = (\text{nmol 4-OH-Chinolin}) * (\text{min} * \text{mg Protein})^{-1}$$

FEE = Fluoreszenzeinheiten,
 S_x = Steigung der Eichgeraden,
 1,148 = Molmasse des 4-Hydroxylchinolins

2.8. Bestimmung der Hemmkonstante K_i von Norharman

Die Aufarbeitung der Thrombozyten, die aus einem Pool von gesunden Nichtraucherkontrollen stammten, erfolgte in der gleichen Weise, wie oben, S.26 für die Messung der MAO-B Aktivität der Probanden beschrieben. Vorinkubation und Inkubation erfolgten ebenfalls in gleicher Weise, wie bei der Messung der MAO-B-Aktivität. Folgende Norharmankonzentrationen wurden eingesetzt: 0 nM, 100 nM, 300 nM, 500 nM, 750 nM, 1 μM , 2 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM und 30 μM .

Der „apparente“ K_i -Wert wurde entsprechend der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) für kompetitive Inhibition, ungeachtet des wahren Hemmtyps, berechnet:

$$K_i = (IC_{50}) * (1 + [Kyn/K_m])^{-1}$$

Als konstante Substratkonzentration wurde 20 μM Kynuramin eingesetzt. Der IC_{50} -Wert bezeichnet die Inhibitorkonzentration bei 50%iger Enzyminhibition (Craig, 1993), deren Berechnung mittels des GraphPad Prism Programms erfolgte.

2.9. Der Einfluss von Norharman auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten

Die Aufarbeitung, Vorinkubation und Inkubation der Analysate erfolgten in gleicher Weise wie oben, S.26 bei der Messung der MAO-B-Aktivität beschrieben. Ebenso wurden bei diesem Experiment die gleichen Kynuraminkonzentrationen eingesetzt. Es kamen die gleichen Norharmankonzentrationen zum Einsatz, jedoch nur bis 10 μM .

2.10. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford (1976) mit Albumin aus Rinderserum als Standard durchgeführt (1 mg Rinderserumalbumin je ml in H₂O als Stammlösung, die anschließend 1:8 verdünnt wird). Die Proteinbestimmung der Membransuspensionen wurde vor und nach den Versuchstagen durchgeführt und in der Zwischenzeit bei -20 °C gelagert. Vor der Bestimmung wurden die Proben aufgetaut zunächst gevortext, anschließend mit Ultraschall homogenisiert (Sonifier) und in einem Glasröhrchen 1:5 verdünnt [(200 + 800 = 1000) µl].

Verdünnungsschema des Standards: (siehe unten, Methodikanhang, S. 79)

Ansatz

50, 100, 200 µl verdünnte Proben wurden auf 400 µl mit 1:5 verdünntem Inkubationspuffer aufgefüllt und dazu jeweils 400 µl H₂O gegeben, so dass der Ansatz aus 800 µl bestand. Die Standards wurden aus 400 µl der entsprechenden Lösung und 400 µl H₂O gemischt. Die Leerwerte bestanden aus 400 µl 1:5 verdünntem Inkubationspuffer und 400 µl H₂O.

Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl Biorad-Reagenz hinzugegeben, gut durchmischt (Vortex) und die Extinktion bei 596 nm am Photometer gegen den Leerwert, bei Filter 0, einer Spaltbreite von MT4 mit einer Photozelle gemessen. Die Bestimmung erfolgte in Triplikaten.

2.11. Bestimmung von 5-Hydroxytryptamin

2.11.1. Bestimmung von 5-Hydroxytryptamin im Blutplasma

Die Bestimmung des Serotonins erfolgte mittels HPLC, einer Chem-Station, und einer 250 * 4,6 mm Säule (VDS Optilab. Säulenmaterial: Inertsil, ODS-2,5 µm). Wichtige Voraussetzung war, dass das Plasma nicht hämolytisch sein durfte, da die Wiederfindung bei hämolytischen Proben deutlich geringer ist.

Im Ansatz befanden sich 300 µl Blutplasma, 850 µl Wasser, 50 µl Wasser beziehungsweise interner Standard (10 ng), 300 µl 8,06%ige Perchlorsäure. Nach dem Auftauen, Vortexen und Sonifizieren (mindestens 30 Sekunden), wurden die Proben 10 Minuten bei 10 000 g (in der Mini-Ecco Zentrifuge im Kühlraum bzw. in einer kühlbaren Zentrifuge) zentrifugiert. Die Proben mussten bis unmittelbar vor der Injektion auf Eis gestellt werden, lichtgeschützt aufbewahrt, und spätestens innerhalb von 5 Stunden gemessen werden. Das Injektionsvolumen betrug 150 µl je

Probe. Als Eluens diente 2,5%iges Methanol in 50 mmol/l Kaliumphosphat-Puffer (pH 5,0) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1,5 ml/min bei 40 °C und isokratischer Elution. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregung von 230 nm und einer Emission von 338 nm, PMT-Gain 18. Die Retentionszeit für Serotonin betrug 8,6 Minuten.

Der Standard bestand aus 11,5 mg Serotonin-Kreatininsulfat (MW = 405,43) in 10 ml HCl (0,01 mM). Das entspricht 500 µg Serotonin (MW = 176,21) pro ml. Der Standard ist bei -20 °C mehrere Monate haltbar. Die Verdünnung auf 2 µg/ml ist bei 4 °C etwa eine Woche lang haltbar. Der Injektionsstandard bestand aus 3 ng/50 µl.

2.11.2. Bestimmung von 5-Hydroxytryptamin in den Thrombozyten

Als Homogenisationsmedien dienten zwei Lösungen:

Lösung A: 13,44 ml 60%ige HClO₄ in 100 ml H₂O (8%v/v)

Lösung B: 0,1 g EDTA und 0,2 g Na₂S₂O₅ in 100 ml H₂O (Millipore)

Das Thrombozytenpellet wurde mit jeweils 0,5 ml der Lösungen A und B 30 Sekunden lang mit Ultraschall homogenisiert (Sonifier) und direkt im Anschluss daran, mit 2.000 g bei 4 °C ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,45 µm- Filter in ein Abimed-Röhrchen dekantiert, mit 2 000 g bei 4 °C zentrifugiert (mit Bremse), dessen Überstand in ein 2,2 ml- Eppendorf- Gefäß dekantiert und bei -20 °C eingefroren.

HPLC

Das Injektionsvolumen betrug 100 µl. Als Eluent diente Methanol (12%ig) in einem 50 mM K-PO₄-Puffer (pH 5). Die Flussrate betrug 1,0 ml pro Minute. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei einer Anregung von 230 nm und einer Emission von 338 nm (slit 10/10, fix scale 2, resp. 4000 ms), der pmt-gain 13. Die Wiederfindung betrug etwa 90%.

2.12. Bestimmung von Cotinin im Blutplasma

Die Cotininkonzentrationen wurden mittels Gaschromatographie, die Stickstoffphosphat zur Detektion nutzte, aus einer Probe mit 100 µl Plasma berechnet. (Feyerabend und Russel, 1990).

2.13. Graphiken

Die Graphiken wurden mit Hilfe folgender Programme erstellt:

Excel-Tabellenkalkulation (7.0) für Windows, Firma Microsoft (Steigung der Eichgeraden)

GraphPad Prism, Firma GraphPad (MAO-B Enzymaktivität)

Sigma-Plot, Firma Sigma-Plot (4.0) (β -Carboline, 5-HT und MAO-B im Zeitverlauf)

PowerPoint (5.0) Firma Microsoft (Überarbeitung zum Export der Graphiken in das Textverarbeitungsprogramm).

2.14. Pharmakokinetische Datenanalyse

Für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter von Norharman und Harman in Plasma und Thrombozyten der Raucher wurden folgende Dimensionen eingesetzt: Zeit (min), Plasmakonzentration (pg/ml), Thrombozytenkonzentration ($\text{ng}/10^9$ Thrombozyten) und Dosis (arbiträr). Die zwei aufeinander folgenden Rauchphasen (= Behandlungen) mit einer Applikationsdauer von 3 respektive 8 Minuten an jeden Probanden waren eine Zigarette zum Zeitpunkt 0 Minuten und zwei Zigaretten zum Zeitpunkt 60 Minuten nach der ersten Gabe. Bioanalytische Ergebnisse, die unter der Bestimmungsgrenze lagen, wurden vor t_{max} auf Null und nach t_{max} auf „missing“ gesetzt.

Die nichtkompartimentelle Analyse (Gabrielsson & Weiner 2000) wurde mittels Software WinNonlin[®], Version 3.1 oder 3.2 (Pharsight Mountain View, Ca, USA) durchgeführt. Für die Evaluation wurde das Modell 202 (konstante Gabe) genutzt. Die Ergebnisse der bioanalytischen Bestimmung wurden mit einem Gewichtungsfaktor von y^{-1} eingesetzt, um der unterschiedlichen Größenordnung der gemessenen Konzentrationen Rechnung zu tragen. Dieses Gewichtungsschema weist geringeren Konzentrationen ein relativ höheres Gewicht zu.

Die relevanten pharmakokinetischen Parameter wurden wie folgt bestimmt. C_{max} als höchste gemessene Konzentration der β -Carboline in Blutplasma bzw. Thrombozyten zum Zeitpunkt t_{max} . t_{max} war hierbei die Blutentnahmezeit der maximal gemessenen Konzentration von β -Carboline, wobei das gesamte Zeitprofil berücksichtigt wurde und λ_z als Eliminationsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung, die über die Steigung der Regressionsgeraden des apparenten terminalen (log-linearen) Teils der Konzentrations-Zeitkurve nach dem zweiten Rauchen bestimmt wurde.

Die apparente terminale Halbwertszeit $t_{1/2,z}$ wurde durch die Gleichung $t_{1/2,z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$ berechnet.

Aufgrund des experimentellen Charakters der Studie und der geringen n-Zahl pro Probenmatrix und Analysat wurden alle pharmakokinetischen Parameter rein deskriptiv verglichen.

Vor dem zweiten Rauchen (Zeitpunkt D) wurde den Rauchern kein Blut entnommen. Um diese Konzentration zu ermitteln, wurde eine Extrapolation der letzten Konzentration nach dem ersten Rauchen bis zum Zeitpunkt D mit Hilfe der individuellen apparenten terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten durchgeführt. Um diese Herangehensweise zu erläutern, wurde bei den jeweiligen Graphiken (Abbildung 5, S.39 und Abbildung 7, S. 44) eine gestrichelte Linie genutzt, um den Zeitverlauf zu erläutern.

2.15. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Sciences), advanced Statistics 9.0 Programm für Windows. Um zu testen, ob es signifikante Konzentrationsunterschiede im Zeitverlauf gab, wurde der non-parametrische Friedman-Test angewandt. Er stellt das nichtparametrische Äquivalent eines Designs mit Messwiederholungen bei einer Stichprobe bzw. eine Zweifach-Varianzanalyse mit einer Beobachtung pro Zelle dar. Der Friedman-Test wurde zur Überprüfung der Nullhypothese angewandt, wonach die k verbundenen Variablen aus derselben Grundgesamtheit stammen. Für jeden Fall wurden den k Variablen Rangzahlen von 1 bis k zugewiesen. Die Teststatistik wurde auf Grundlage dieser Ränge durchgeführt. Wenn Signifikanzen gefunden wurden, kam der post-hoc Wilcoxon-Test zur Anwendung. Um Unterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu prüfen wurde der Mann-Whitney Test für zwei unabhängige Stichproben genutzt. Er ist äquivalent zum Wilcoxon-Rangsummentest für zwei Gruppen. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde überprüft, ob zwei beprobte Grundgesamtheiten die gleiche Lage besitzen. Die Beobachtungen aus beiden Gruppen wurden kombiniert und in eine gemeinsame Reihenfolge gebracht, wobei im Falle von Rangbindungen der durchschnittliche Rang vergeben wurde. Es wurde berechnet, wie oft ein Wert aus Gruppe 1 einem Wert aus Gruppe 2 und wie oft ein Wert aus Gruppe 2 einem Wert aus Gruppe 1 vorangeht. Die Mann-Whitney-U-Statistik ist die kleinere dieser beiden Zahlen. Die ebenfalls angezeigte Wilcoxon-Rangsummen-W-Statistik ist die Rangsumme der kleineren Stichprobe.

Der Spearman-Korrelationskoeffizient mit seinem jeweiligen Signifikanzniveau wurde angewandt, um die Beziehungen zwischen Variablen oder deren Rängen zu messen. Signifikanzen wurden exakt und 2-seitig ermittelt. Ein Ergebnis mit $p < 0,05$ wurde als signifikant, eines mit $p < 0,1$ als Trend betrachtet. Alle Ergebnisse im Text sind mit Standardabweichung (SD) angegeben. Die Darstellung der Daten in den Graphiken erfolgt als Mittelwert mit Standardabweichung der Mittelwerte (SEM).