

3. Ergebnisse

3.1. In vitro Untersuchungen

Raucher sind einem geringeren Risiko M. Parkinson zu entwickeln ausgesetzt als Nichtraucher. Ein Erklärungsansatz dieses neuroprotektiven Effektes liegt in der Hemmung der MAO-B-Aktivität durch Zigarettenrauch. Norharman ist ein Bestandteil des Zigarettenrauches. Die beiden in vitro Experimente dienen der Bestimmung der Hemmkonstante und der Klärung, ab welcher Konzentration an Norharman eine Hemmung der MAO-B-Aktivität auftritt und um welchen Hemmtyp es sich handelt.

3.1.1. Bestimmung der Hemmkonstante K_i von Norharman

Die Hemmkonstante K_i wurde mittels dreier voneinander unabhängigen Experimenten bei $1,23 \mu\text{M}$ (SD = 0,095) bestimmt. Die folgende Graphik stellt eines dieser Experimente exemplarisch mit einer logarithmierten Abszisse dar.

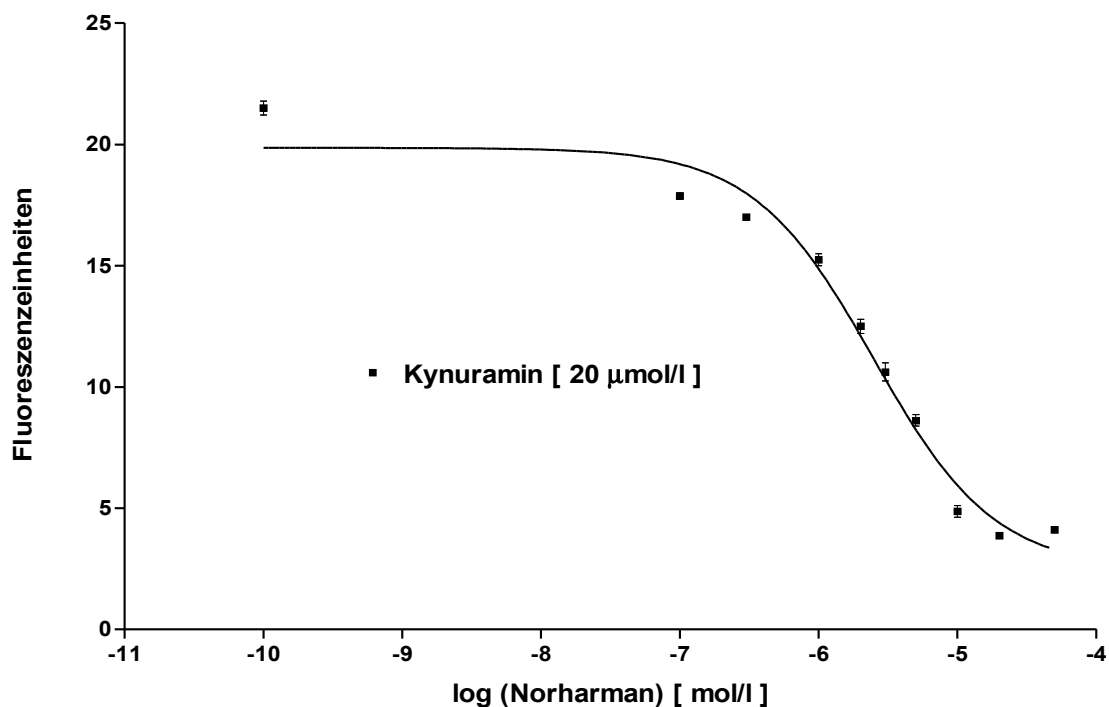


Abbildung 2: Bestimmung der Hemmkonstante K_i von Norharman in vitro mit humanen Thrombozyten als Enzymquelle.

Die Abszisse ist logarithmiert dargestellt. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD bei zwei Duplikaten von drei unabhängigen Experimenten. Als Substrat kommt Kynuramin in $20 \mu\text{mol/l}$ zur Anwendung.

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

Norharman beeinflusst die Aktivität des Enzyms MAO-B. In drei voneinander unabhängigen Experimenten wurde überprüft, von welcher Konzentration an Norharman eine Enzymhemmung bewirkt und was für ein Typ der Hemmung vorliegt. In geringen Konzentrationen von Norharman zeigt sich lediglich ein Einfluss auf den K_m -Wert, V_{max} bleibt quasi unverändert. Bis zu einer Konzentration von 3 $\mu\text{mol/l}$ wirkt Norharman rein kompetitiv, die Affinität zwischen Enzym und Substrat wird herabgesetzt. Bei aufsteigenden Konzentrationen von Norharman zeigt sich eine zunehmende Hemmung des Enzyms mit Einfluss sowohl auf den K_m - als auch den V_{max} -Wert, was die Annahme einer nicht kompetitiven Hemmung nahe legt.

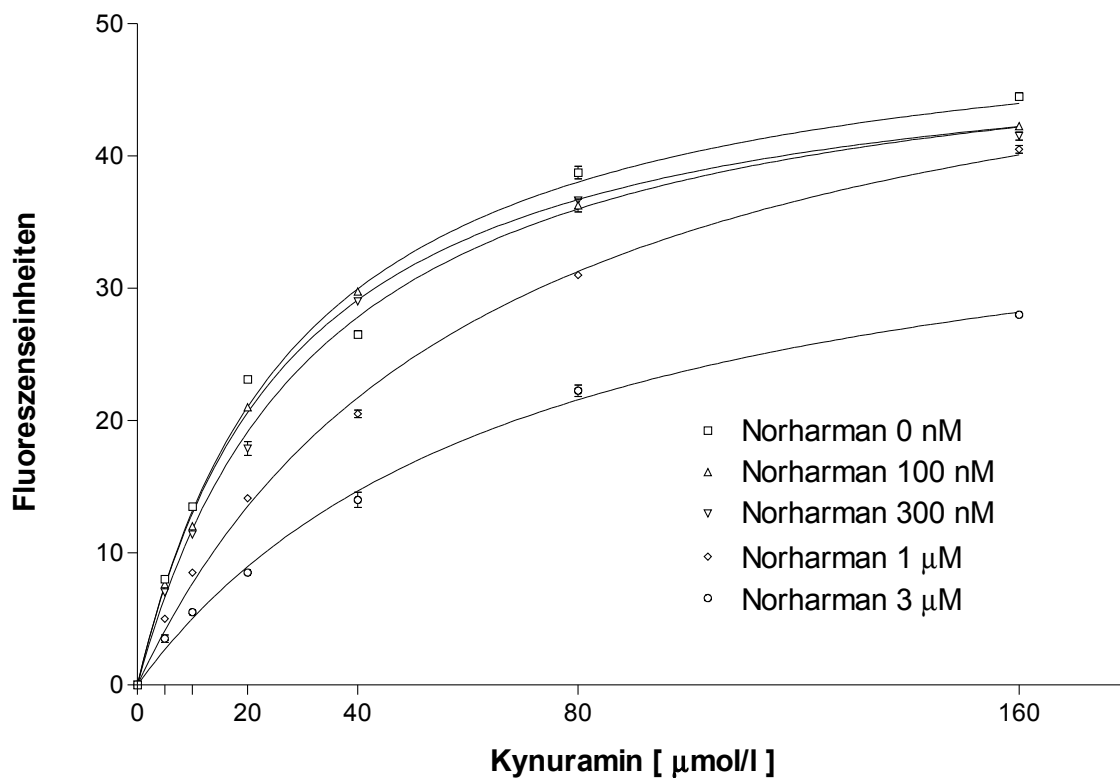


Abbildung 3: **Einfluss von Norharman auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten**
Bei Duplikaten erfolgt die Darstellung als Mittelwert \pm SD Die verschiedenen Symbole repräsentieren die jeweilige Norharmankonzentration wie in der Legende angegeben.

Anzahl der Versuche (n)	Norharman [μM]	V_{max} nmol 4-HQ/mg Prot./min	SD V_{max}	K_m [μmol 4-HQ/l]	SD K_m
3	0	2,81	0,4	26,8	2,8
2	0,1	2,39	0,1	28,9	0,9
3	0,3	2,60	0,4	32,7	0,9
3	1	2,77	0,4	54,8	7,2
3	3	2,23	0,5	88,6	22,5
2	10	1,77	0,6	153,4	16,4

Tabelle 3: **Einfluss von Norharman auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten**

Anmerkung: 4-HQ = 4-Hydroxylnorharman,

Prot. = Protein,

SD = Standardabweichung der Einzelwerte

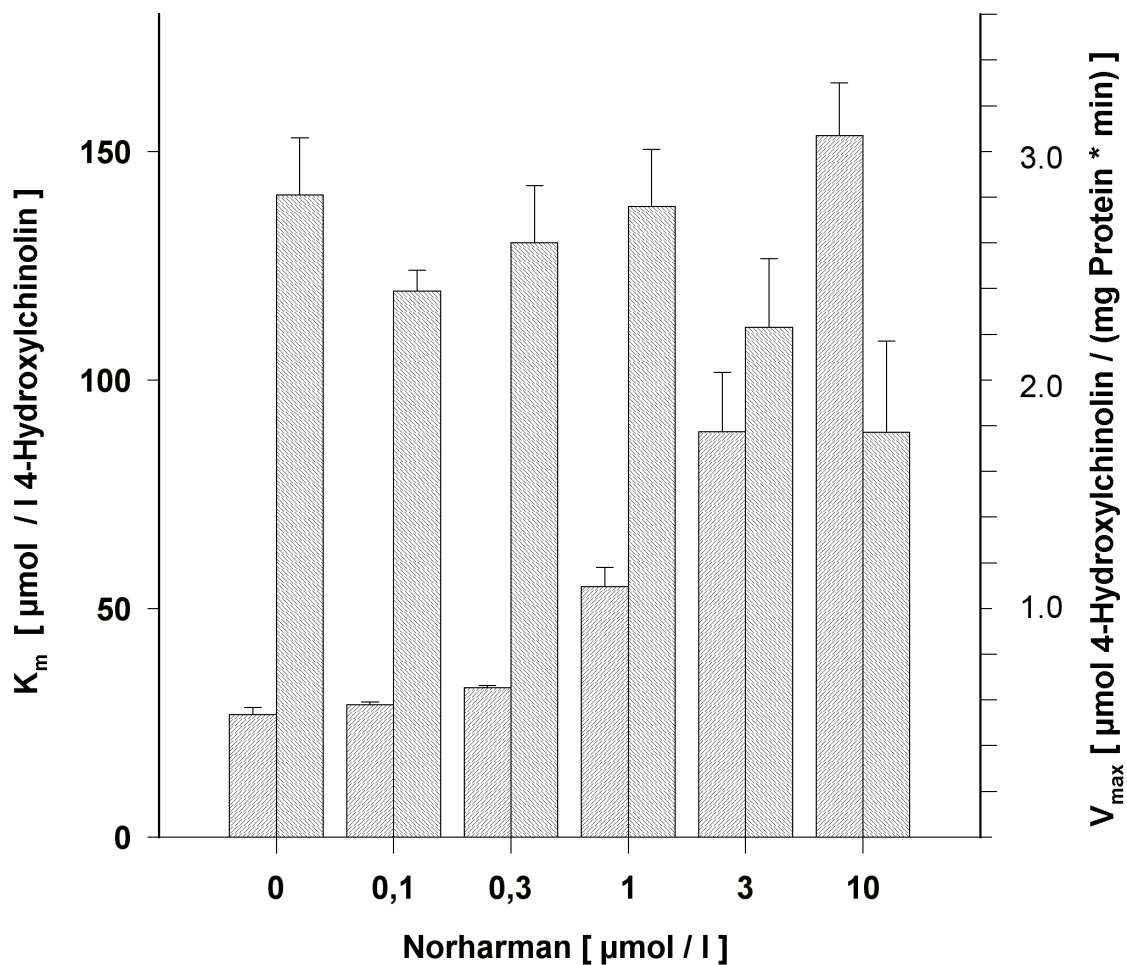


Abbildung 4: **Einfluss von Norharman auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten. Darstellung von V_{max} und K_m im Balkendiagramm.** Auf der Abszisse sind die jeweiligen Norharmankonzentrationen abgetragen. Die Säulen links von der jeweiligen Konzentration stellen den K_m -Wert, wie er durch die linke Ordinate repräsentiert wird, dar. Die Säulen rechts der jeweiligen Norharmankonzentration zeigen die maximale Enzymaktivität der MAO-B (V_{max}), die durch die rechte Ordinate repräsentiert wird. Die Darstellung der Säulen erfolgt als Mittelwerte \pm SEM. Zur Anzahl der jeweiligen Experimente siehe auch oben, Tabelle 3.

3.2. Ex vivo Untersuchungen

3.2.1. Demographische Daten

Alle Probanden waren männlich, zwischen 20 und 37 Jahren wobei der Mittelwert bei 29,2 Jahren ($SD = 8,3$) lag. Die Anzahl der Probanden variierte in Abhängigkeit vom Experiment von $n = 5$ bis $n = 22$. Die Raucher hatten zwischen dem 13-ten und 23-ten Lebensjahr mit dem Rauchen angefangen (MW 17,4 Jahre, $SD = 2,4$). Der BMI (body mass index) betrug zwischen 18,4 und 31,2 kg/m^2 (MW 22,9 kg/m^2 , $SD = 2,9$). Bei fast allen rauchenden Probanden rauchten

Verwandte ersten Grades. Zwischen rauchenden Probanden und den Nichtraucherkontrollen herrschte Übereinstimmung in Bezug auf Alter, und Geschlecht und die Tatsache, dass keine Vorerkrankungen vorlagen.

3.2.2. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman

3.2.2.1. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman im Blutplasma

Im Zigarettenrauch kommt das β -Carbolin Norharman vor, das eine Hemmung der MAO-B Aktivität hervorruft.

Nullhypothese: Im Zeitverlauf treten keine Unterschiede in der Norharmankonzentration im Plasma auf.

Im Friedman Test betrug die Probandenanzahl bei den Rauchern $n = 19$, das Chi-Quadrat $\chi^2 = 73,77$, die Freiheitsgrade $df = 5$ und das Signifikanzniveau $p < 0,0000001$, was bedeutet, dass durch Rauchen eine Veränderung der Konzentration an Norharman bewirkt wird. Bei den rauchenden Nichtrauchern betrug $n = 5$, $\chi^2 = 9,0$, $df = 6$ und $p = 0,17$.

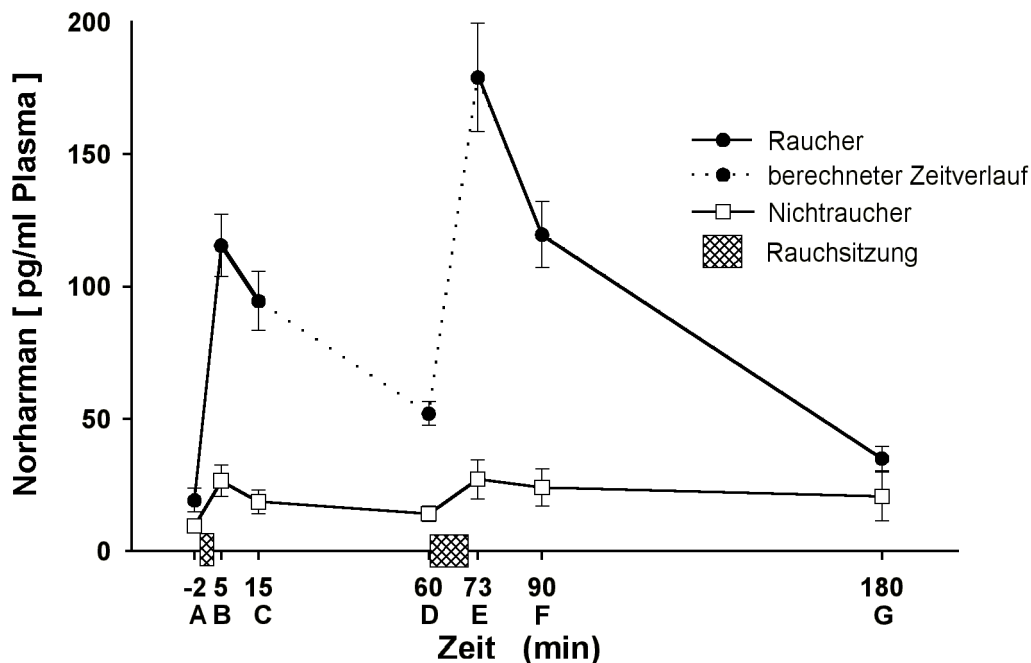


Abbildung 5: **Zeitverlauf der Konzentration von Norharman im Blutplasma** von Rauchern und rauchenden Nichtrauchern nach dem Rauchen einer Zigarette (Zeit 0–3 min) und zweier Zigaretten (Zeit 60–68 min) (Schraffierte Flächen). Bei den Rauchern erfolgte zum Zeitpunkt D keine Konzentrationsbestimmung von Norharman. Dieser Wert wurde aus der pharmakokinetischen Datenanalyse bestimmt und dieser Zeitverlauf daher mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Die Konzentrationen werden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler der Mittelwerte) angegeben, bestimmt von 19 Rauchern und 5 Nichtrauchern. Vor der Untersuchung hielten die Raucher ein mindestens neunstündiges rauchfreies Intervall ein.

Der Basalwert der Norharmankonzentration der Raucher beträgt im Mittel 19,2 pg/ml (SD = 19,4 pg/ml). Schon 5 min nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette steigt der Wert auf 116 pg/ml (SD = 50,8) an. Dieser Anstieg ist hochsignifikant ($p = 0,000004$). Weitere 10 min später fällt dieser Wert auf 94,6 pg/ml (SD = 48,5) ab und unterscheidet sich noch immer signifikant vom Ausgangswert ($p = 0,000004$). 5 Minuten nach der zweiten und dritten Zigarette steigt die Konzentration auf 179 pg/ml an (SD = 89,6). 30 min nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette fällt sie auf 120 pg/ml (SD = 54,1) ab. Die Konzentrationsabnahme im Zeitraum zwischen Messung E und F ist hochsignifikant bei $p = 0,000027$. Deutlicher noch zeigt sich der Abfall zum Zeitpunkt G (F nach G $p = 0,000004$), zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette mit einem Wert von 35 pg/ml (SD = 20,1), der fast wieder das Ausgangsniveau erreicht

hat Die Korrelation für zwei abhängige Proben ergab bei A zu G ein Signifikanzniveau von $p = 0,113$, bei recht guter Korrelation: $r = 0,38$, E zu G: $p = 0,09$, $r = 0,4$, F zu G: $p = 0,14$, $r = 0,35$, E zu F: $p = 0,000001$, $r = 0,89$ und C zu F: $p = 0,016$, $r = 0,54$.

Bei den rauchenden Nichtraucher liegt die Basalkonzentration mit $9,5 \text{ pg/ml}$ ($SD = 5,0$) niedriger als bei den Rauchern ($p = 0,3$). 5 min nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt diese $26,6 \text{ pg/ml}$ ($SD = 13,3$), weitere 10 min später $18,6 \text{ pg/ml}$ ($SD = 10,0$). Unmittelbar vor dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette liegt die Konzentration bei $14,1 \text{ pg/ml}$ ($SD = 6,3$). 5 Minuten nach der zweiten und dritten Zigarette steigt die Konzentration auf $27,1 \text{ pg/ml}$ an ($SD = 16,6$). 30 min nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette beträgt sie noch $24,1 \text{ pg/ml}$ ($SD = 15,9$). Zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette (Zeitpunkt G) beträgt die Konzentration noch $21,6 \text{ pg/ml}$ ($SD = 20,7$). Der Anstieg nach dem zweiten Mal Rauchen im Vergleich zur Ausgangskonzentration als auch im Vergleich zu dem Zeitpunkt unmittelbar vor dem zweiten Mal Rauchen beschreibt einen Trend ($p = 0,063$). Darüber hinaus treten im Zeitverlauf keine Signifikanzen auf. Die Ausgangs- und Endkonzentration unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen der Raucher ($p = 0,297$). Zu allen anderen Zeitpunkten unterscheidet sich die Konzentration signifikant (Zeitpunkt B: $p = 0,003$, C: $p = 0,0002$, E: $p = 0,001$, F: $p = 0,001$, G: $p = 0,14$).

3.2.2.2. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman in den Thrombozyten

Nullhypothese: Im Zeitverlauf treten keine Unterschiede in der Norharmankonzentration in den Thrombozyten auf. Im Friedman Test betrug die Probandenanzahl $N = 15$, Chi-Quadrat $\chi^2 = 12,6$, die Freiheitsgrade $df = 3$ und das Signifikanzniveau $p = 0,004$.

A–B: $p = 0,002$ A–E $p = 0,005$ E–G $p = 0,001$ A–G $p = 0,56$; bei jeweils sehr guten Korrelationen: A–B: $r = 0,74$ $p = 0,002$; A–E: $r = 0,62$ $p = 0,013$; E–G: $r = 0,69$ $p = 0,001$; A–G: $r = 0,5$, $p = 0,058$.

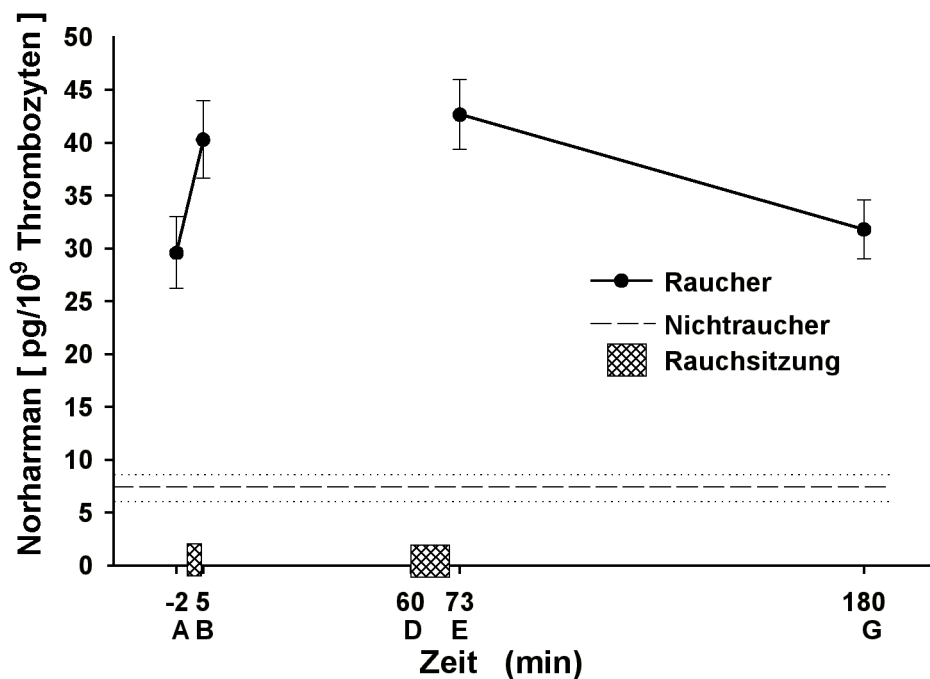


Abbildung 6: **Zeitverlauf der Konzentration von Norharman in den Thrombozyten**

Raucher (n = 16 bis 19). Schraffierte Fläche: Rauchen einer Zigarette (0 min), bzw. zweier Zigaretten (60 min). Die basale Konzentration der Nichtraucherkontrollen (n = 5) ist als horizontal gestrichelte Linie dargestellt. Die Konzentrationen werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Der Basalwert der Raucher der im Mittel $29,6 \text{ pg}/10^9 \text{ Thr.}$ ($SD = 13,1$) beträgt, unterscheidet sich hochsignifikant von dem der Nichtraucherkontrollen mit $7,3 \text{ pg}/10^9 \text{ Thr.}$ ($SD = 4,5$), $p = 0,000001$.

Schon 5 min nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette steigen die Konzentrationen bei den Rauchern auf $39,1 \text{ pg}/10^9 \text{ Thr.}$ ($SD = 50,8$) an. Dieser Anstieg ist hochsignifikant ($p = 0,002$). 30 min nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette steigen die Werte auf $41,3 \text{ pg}/10^9 \text{ Thr.}$ ($SD = 14,4$) an, und unterscheiden sich signifikant vom Basalwert ($p = 0,005$). Zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette hat der Wert mit $31,8 \text{ pg}/10^9 \text{ Thr.}$ ($SD = 12,1$) fast wieder seine Ausgangskonzentration erreicht und unterscheiden sich signifikant von Zeitpunkt E ($p = 0,001$).

3.2.2.3. Pharmakokinetik von Norharman in Plasma und Thrombozyten

Der terminale Teil der Konzentrations-Zeitverläufe nach dem zweiten Rauchen von jedem der 39 Profile wurde untersucht, um die Datenpunkte auszuwählen, die für die Bestimmung von λ_z geeignet waren. Für die Bestimmung von λ_z in Plasma standen drei geeignete Datenpunkte zur Verfügung. Für die Bestimmung von λ_z in Thrombozyten standen nur zwei Datenpunkte zur Verfügung. Insgesamt waren vier Konzentrations-Zeitverläufe nicht auswertbar, da eine Konzentrationszunahme bis zur 90. Minute erfolgt, so dass keine Eliminationsphase beobachtbar war.

Die pharmakokinetischen Parameter und ihre deskriptive Statistik sind unten in Tabelle 4 zusammengefasst. Konzentrationen sind als geometrisches Mittel angegeben. Insgesamt waren die Variationskoeffizienten sehr groß. Daher ist für alle drei pharmakokinetischen Zeit- bzw. Geschwindigkeitsparameter der Median und die Spannweite angegeben. Bei allen Probanden und in beiden Matrices wurde die mittlere maximale Konzentration nach dem zweiten Rauchen erreicht (Median: 75 min) Der Konzentrationsanstieg vom Ausgangswert zum Maximalwert war im Plasma etwa achtmal höher als in den Thrombozyten. Die terminale Eliminationsgeschwindigkeitskonstante lag im Median bei $0,0136 \text{ min}^{-1}$ im Plasma bzw. $0,0037 \text{ min}^{-1}$ in den Thrombozyten. Die Streuung der Werte in den Thrombozyten war etwa zehnmal höher als im Plasma. Insgesamt wurde die terminale Eliminationshalbwertszeit aus 19 Plasmakonzentrations-Zeitprofilen und 16 Thrombozytenkonzentrations-Zeitprofilen bestimmt. Hierbei wurde ein großer Variationskoeffizient (82% in Plasma und 188% in Thrombozyten) festgestellt. Die mediane $t_{1/2,z}$ in Plasma betrug 51 Minuten mit einer Spannweite von 26,8 und 259,1 min. Die apparente terminale Eliminationshalbwertszeit in den Thrombozyten war länger als drei Stunden (Median: 190,1 min, Spannweite: 78–7358 min) und damit viel länger als diejenige im Plasma. Dabei wiesen 4 Probanden sogar eine Eliminationshalbwertszeit von über 1000 Minuten auf, die auf eine nur sehr langsame Elimination hindeutet.

	Probanden- anzahl	Median	Minimum	Maximum
Plasma				
C_{\max} [pg/ml]	20	159,0 ^a	28,8	390,3
t_{\max} [min]	20	15	-	-
λ_z [min^{-1}]	19	0,0136	0,0027	0,0258
$t_{1/2,z}$ [min]	19	51,0	26,8	232,3
Thrombozyten				
C_{\max} [pg/10 ⁹ Thrombozyten]	19	41,1 ^a	29,6	82,3
t_{\max} [min]	19	15	-	-
λ_z [min^{-1}]	16	0,0037	0,00009	0,0088
$t_{1/2,z}$ [min]	16	190,1	78,4	7368,0

Tabelle 4: **Pharmakokinetik von Norharman in Plasma und Thrombozyten**

^a geometrischer Mittelwert

3.2.2.4. Korrelation der Norharmankonzentration in Thrombozyten und Blutplasma zu den vier gemeinsamen Messzeitpunkten

Die höchste Korrelation von Norharman im Blutplasma und in den Thrombozyten wird bei den Rauchern bei der höchsten Konzentration an Norharman, 5 min nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette erreicht. Die schwächste Korrelation wird knapp zwei Stunden nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette erreicht. Bei den Nichtrauchern wurde nur der Basalwert der Norharmankonzentration in den Thrombozyten bestimmt.

Norharman in Plasma und Thrombozyten	Korrelationskoeffizient (r)	Signifikanz (p)
Messzeitpunkt A -2 min	0,44	0,1
Messzeitpunkt B 5 min	0,17	0,54
Messzeitpunkt E 73 min	0,63	0,004
Messzeitpunkt G 180 min	-0,07	0,78

Tabelle 5: **Korrelation der Norharmankonzentration in Thrombozyten und Blutplasma zu den vier gemeinsamen Messzeitpunkten**

3.2.3. Zeitverlauf der Konzentration von Harman

3.2.3.1. Zeitverlauf der Konzentration von Harman im Blutplasma

Nullhypothese: Im Zeitverlauf treten keine Unterschiede in der Konzentration von Harman auf.

Im Friedman Test beträgt die Probandenanzahl bei den Rauchern $n = 19$, $\chi^2 = 34,04$, $df = 5$ und $p = 0,000002$. Bei den rauchenden Nichtrauchern beträgt $n = 5$, $\chi^2 = 13,8$, $df = 6$ und $p = 0,02$.

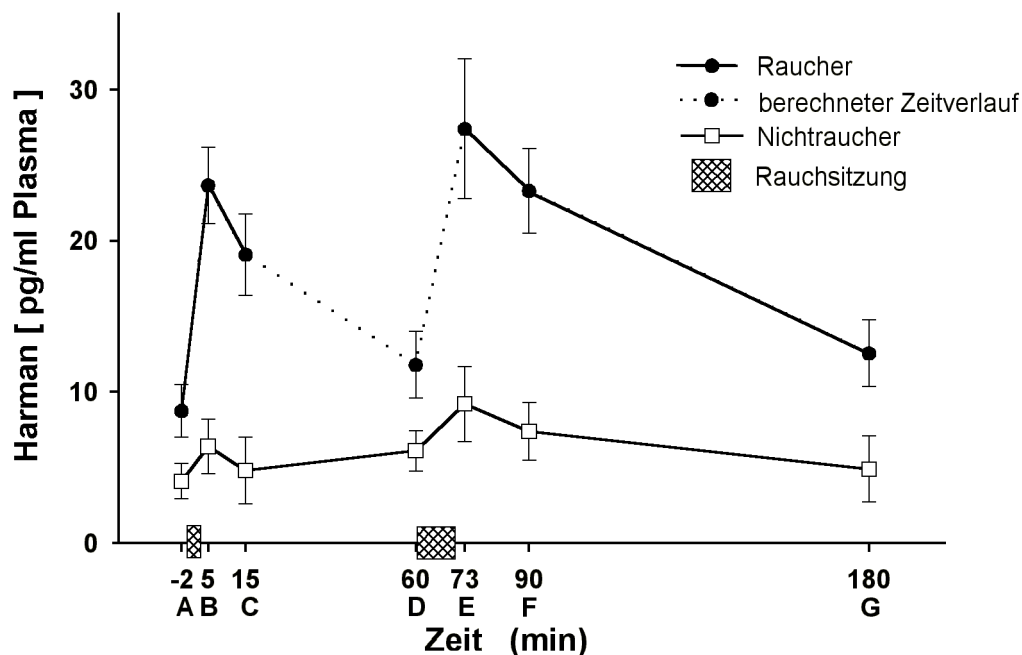


Abbildung 7: **Zeitverlauf der Konzentrationen von Harman im Blutplasma** von Rauchern und rauchenden Nichtrauchern nach dem Rauchen einer Zigarette (Zeit 0–3 min) und zweier Zigaretten (Zeit 60–68) Minuten (Schraffierte Fläche). Bei den Rauchern erfolgte zum Zeitpunkt D keine Konzentrationsbestimmung von Harman. Dieser Wert wurde aus der pharmakokinetischen Datenanalyse bestimmt und dieser Zeitverlauf daher mit einer gestrichelten Linie dargestellt. Die Konzentrationen werden als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler der Mittelwerte) angegeben, bestimmt von 19 Rauchern und 5 Nichtrauchern. Vor der Untersuchung hielten die Raucher ein mindestens neunstündiges rauchfreies Intervall ein.

Der Basalwert von Harman im Blutplasma liegt für die Raucher bei 8,7 pg/ml (SD = 7,5). 5 min nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette steigt die Konzentration im Blutplasma auf 23,7 pg/ml (SD = 11,0), an, $p = 0,00007$. Weitere 10 min später fällt dieser Wert auf 19,1 pg/ml (SD = 11,7) ab, $p = 0,00021$. Fünf Minuten nach der zweiten und dritten Zigarette steigt die Konzentration auf 27,4 pg/ml (SD = 20,2) an. 15 min später ist sie auf 23,3 pg/ml (SD = 12,2)

abgefallen: D zu F $p = 0,00027$. Zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette hat sie mit 12,6 pg/ml (SD = 9,6) beinahe wieder das Ausgangsniveau erreicht: A zu G $p = 0,096$, bei guten Korrelationen: B–C: $r = 0,56$, $p = 0,012$, B–F: $r = 0,5$, $p = 0,025$, B–G: $r = 0,62$, $p = 0,005$, C–F: $r = 0,67$, $p = 0,002$, C–G: $r = 0,77$, $p < 0,0001$.

Bei den rauchenden Nichtraucher liegt die Basalkonzentration mit 4,1 pg/ml (SD = 2,6) niedriger als bei den Rauchern. 5 min nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt diese 6,4 pg/ml (SD = 4,0), weitere 10 min später 4,8 pg/ml (SD = 4,9). Unmittelbar vor dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt die Konzentration 6,1 pg/ml (SD = 3,0). Fünf Minuten nach der zweiten und dritten Zigarette steigt die Konzentration auf 9,2 pg/ml an (SD = 5,6) und unterscheidet sich mit $p = 0,6$ nicht von der Ausgangskonzentration. 30 min nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette beträgt die Konzentration noch 7,4 pg/ml (SD = 4,3). Zwei Stunden nach der zweiten und dritten Zigarette (Zeitpunkt G) hat die Konzentration mit 4,9 pg/ml (SD = 3,6) fast wieder den Ausgangswert erreicht. Die Konzentration im Zeitverlauf liegt, abgesehen von dem Basalwert, signifikant unter derjenigen der Raucher (A: $p = 0,36$, B: $p = 0,001$, C: $p = 0,012$, E: $p = 0,05$, F: $p = 0,004$, G: $p = 0,044$).

3.2.3.2. Zeitverlauf der Konzentration von Harman in den Thrombozyten

Die Basalkonzentration von Harman in den Thrombozyten bei den Rauchern unterscheidet sich signifikant ($p = 0,001$) von der der Nichtraucher. Erstere liegt etwa viermal so hoch: 11,0 pg/ 10^9 Thr. (SD = 19,7) für $n = 15$ Raucher, 2,7 pg/ 10^9 Thr. (SD = 1,5) für $n = 11$ Nichtraucher. Das Experiment wurde im Zeitverlauf nur bei den Rauchern durchgeführt. Im Zeitverlauf ändert sich an den Konzentrationen von Harman in den Thrombozyten nicht sehr viel. Im Friedman Test beträgt die Probandenanzahl $n = 15$, $\chi^2 = 3,0$, $df = 3$ und $p = 0,4$, bei jeweils sehr guten Korrelationen. Fünf Minuten nach Beginn des ersten Rauchens verändert sich die Harmankonzentration fast nicht (9,8 pg/ 10^9 Thrombozyten, SD = 20,3, $n = 16$). Dreizehn Minuten nach dem zweiten Mal Rauchen verdoppelt sich die Konzentration (25,9 pg/ 10^9 Thrombozyten, SD = 59,1 $n = 19$) mit geringen Veränderungen zum Zeitpunkt G (20,2 pg/ 10^9 Thrombozyten, SD = 51,8, $n = 19$).

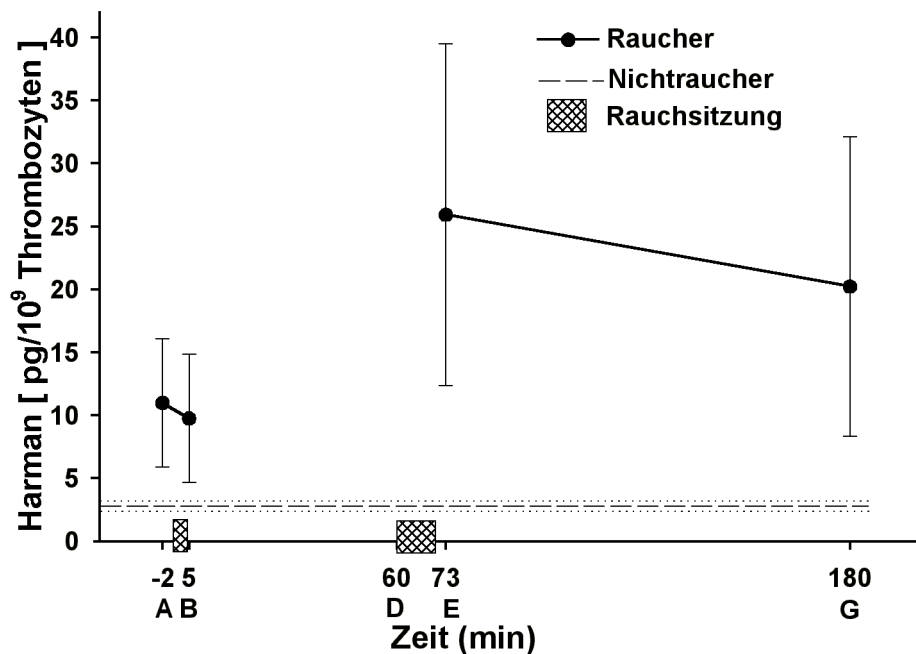


Abbildung 8: **Zeitverlauf der Konzentration von Harman in den Thrombozyten** von Rauchern (n = 16 bis 19). Schraffierte Fläche: Rauchen einer Zigarette (0 min), bzw. zweier Zigaretten (60 min). Die basale Konzentration der Nichtraucherkontrollen (n = 5) ist als horizontal gestrichelte Linie dargestellt. Die Konzentrationen werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

3.2.3.3. Pharmakokinetik von Harman in Plasma und Thrombozyten

Für die Bestimmung der apparenten terminalen Eliminationsgeschwindigkeitskonstanten von Harman wurde ebenfalls der letzte Teil der Konzentrations-Zeitverläufe nach dem zweiten Rauchen von jedem der 39 Profile (Plasma 20, Thrombozyten 19) untersucht, um die Datenpunkte auszuwählen, die für die Bestimmung von λ_z geeignet waren. Für die Bestimmung von λ_z in Plasma lagen drei geeignete Datenpunkte vor, außer bei 8 Probanden, bei denen nur zwei Datenpunkte zur Verfügung standen. Für die Bestimmung von λ_z in Thrombozyten standen nur zwei Datenpunkte zur Verfügung, außer bei 6 Probanden, die nicht ausgewertet werden konnten. Zusätzlich waren zwei Plasma- und vier Thrombozytenkonzentrations-Zeitverläufe nicht auswertbar, da im Beobachtungszeitraum eine Konzentrationszunahme erfolgte.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Parameter sind gemeinsam mit der deskriptiven Statistik unten in Tabelle 6 zusammengefasst. Für Konzentrationen wird der geometrische

Mittelwert angegeben. Insgesamt waren die Variationskoeffizienten sehr groß. Daher ist für alle drei pharmakokinetischen Zeit- bzw. Geschwindigkeitsparameter der Median und die Spannweite angegeben. Bei allen auswertbaren Probanden und in beiden Matrices wurden die durchschnittlichen maximalen Konzentrationen (21,1 pg/ml Plasma und 12,2 pg/10⁹ Thrombozyten) nach dem zweiten Rauchen erreicht (Median: 15 min) In den Thrombozyten resultierte der Wert aus lediglich neun Probanden, wohingegen bei 6 Probanden noch immer eine Konzentrationszunahme zu beobachten war. Diese Werte können daher als „Mindest“-Werte angesehen werden. Dies trifft auch für die apparente terminale Eliminationshalbwertszeit zu (n = 18 im Plasma, aber nur n = 9 in den Thrombozyten). Zusätzlich ergab sich ein großer Variationskoeffizient (78% im Plasma und 112% in den Thrombozyten). Die mediane t_{1/2,z} in Plasma betrug 68,3 Minuten (Spannweite: 26,3–302,5 min). Die apparente Eliminationshalbwertszeit in Thrombozyten betrug „mindestens“ ca. 2,5 Stunden (im Median, Spannweite: 28,8–738 min) und damit wesentlich länger als im Plasma.

	Probanden- anzahl	Median	Minimum	Maximum
Plasma				
C _{max} [pg/ml]	20	27,08 ^a	6,69	63,85
t _{max} [min]	20	15	-	-
λ _z [min ⁻¹]	18	0,0101	0,0023	0,0264
t _{1/2,z} [min]	18	68,3	26,3	302,5
Thrombozyten				
C _{max} [pg/10 ⁹ Thrombozyten]	13	12,21 ^a	2,04	252,52
t _{max} [min]	13	15	-	-
λ _z [min ⁻¹]	9	0,0047 ^b	0,0009 ^b	0,0240 ^b
t _{1/2,z} [min]	16	146,2 ^b	28,8 ^b	738,6 ^b

Tabelle 6: **Pharmakokinetik von Harman in Plasma und Thrombozyten**

^a Geometrischer Mittelwert

^b Die Zahlen sind Minimumwerte, da fünf Probanden immer noch eine Konzentrationszunahme von Harman während des Beobachtungszeitraumes aufwiesen.

3.2.4. Zeitverlauf der MAO-B Aktivität in den Thrombozyten

Im Zigarettenrauch ist Norharman enthalten. Wie die in vitro Experimente gezeigt haben, ist Norharman in niedrigen Konzentrationen ein kompetitiver, in hohen Konzentrationen auch ein nicht-kompetitiver Inhibitor des Enzyms MAO-B. Nach dem Rauchen einer Zigarette werden eine Erhöhung des K_m -Wertes und eine Reduktion von V_{max} erwartet.

3.2.4.1. Einfluss des Rauchens auf die maximale Umsatzgeschwindigkeit der MAO-B (V_{max})

Bei den Rauchern ($n = 7$) betragen im Friedman Test $\chi^2 = 0,94$, die Freiheitsgrade $df = 3$ und das Signifikanzniveau $p = 0,85$. Es kam also zu keinen signifikanten Veränderungen von V_{max} . Anders sah es jedoch bei den Nichtrauchern aus: $n = 5$, $\chi^2 = 13,0$, Freiheitsgrade $df = 6$, Signifikanzniveau $p = 0,03$.

Der Ausgangswert von V_{max} liegt bei den Rauchern bei $5,9 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 2,4$). 15 Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt V_{max} $5,2 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$ ($SD = 2,7$). 30 min nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt V_{max} $5,6 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$ ($SD = 3,0$). Zwei Stunden nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette liegt V_{max} bei $5,5 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$ ($SD = 2,5$).

Bei den Nichtrauchern ist der Basalwert von V_{max} $5,3 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 0,8$). 5 Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt V_{max} noch $4,8 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 1,1$), 10 Minuten später sinkt V_{max} auf $3,4 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$ ($SD = 1,5$) ab (A zu C: $p = 0,06$). Unmittelbar vor dem zweiten Mal Rauchen beträgt V_{max} $4,7 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 1,2$). Fünf Minuten nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt V_{max} $4,1 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 1,3$). 30 Minuten nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette ist V_{max} $5,1 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 0,5$). Zwei Stunden nach dem zweiten Mal Rauchen beträgt V_{max} $5,6 \mu\text{mol 4-HQ}/(\text{min} * \text{mg Protein})$, ($SD = 0,5$).

Es liegen keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen Rauchern und rauchenden Nichtrauchern vor.

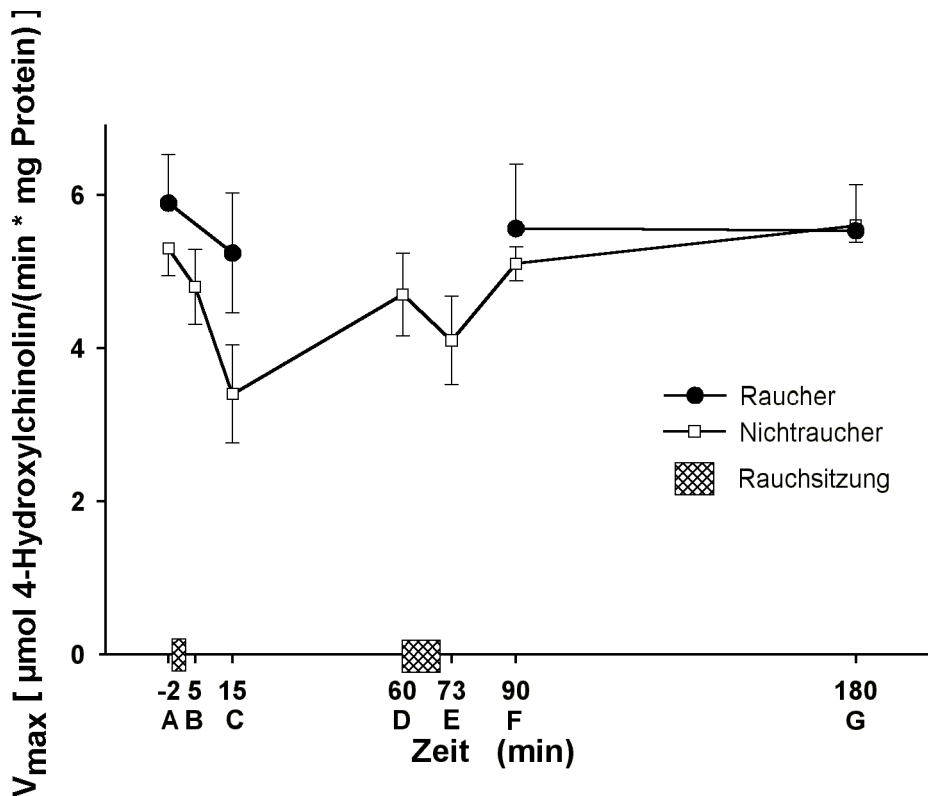


Abbildung 9: **Ex vivo Sättigungskinetikexperimente: V_{max} der Monoaminoxidase** aus Thrombozyten von Rauchern und Nichtrauchern wurde zu verschiedenen Messzeitpunkten bestimmt. Das Studiendesign ist oben in Tabelle 1: Studiendesign A, S.21 beschrieben. Die Darstellung erfolgt als Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler der Mittelwerte), bestimmt von 15–19 Rauchern je nach Messzeitpunkt und 5 Nichtrauchern. 4-Hydroxylichinolin wurde als Substrat verwendet.

3.2.4.2. Einfluss des Rauchens auf die Michaeliskonstante K_m

Bei den Rauchern führt der Friedman-Test für die K_m -Werte zu folgenden Ergebnissen ohne statistische Signifikanz: $n = 15$, $\chi^2 = 5,8$, $df = 3$ und $p = 0,13$. Bei den rauchenden Nichtrauchern beträgt $n = 5$, $\chi^2 = 12,3$, $df = 6$ und $p = 0,04$.

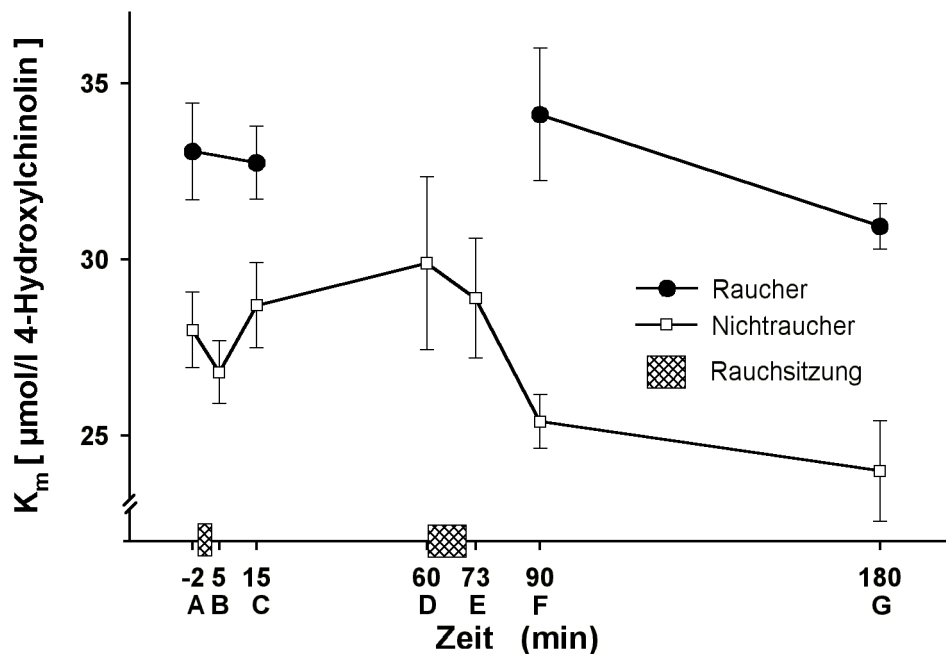


Abbildung 10: Ex vivo Sättigungskinetikexperimente.

Der K_m -Wert der Monoaminoxidase aus den Thrombozyten wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bei Rauchern ($n = 15-19$) und Nichtrauchern ($n = 5$) bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM.

Der Ausgangswert von K_m liegt bei den Rauchern bei $33,1 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 5,4$). 15 Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette liegt dieser unverändert bei $33,1 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 4,2$). 30 min nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt der K_m -Wert $34,1 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 8,2$). Zwei Stunden nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette liegt er bei $30,9 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 2,8$).

Bei den rauchenden Nichtrauchern liegt der Ausgangswert mit $28 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 2,4$) unter dem der Raucher ($p = 0,001$). Fünf Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt der K_m -Wert $26,8 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 2,0$). Zehn Minuten später $28,7 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 2,7$). Unmittelbar vor dem zweiten Mal Rauchen beträgt der K_m -Wert $29,9 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 5,5$). Fünf Minuten nach dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt der K_m -Wert $28,9 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 3,8$), 30 Minuten nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette $25,4 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 1,7$). Zwei Stunden nach dem zweiten Mal Rauchen beträgt der K_m -Wert $24 \mu\text{mol/l}$ ($SD = 3,2$).

Bei den Nichtrauchern finden sich ebenfalls keine Signifikanzen im Zeitverlauf. Der K_m -Wert liegt jedoch zu allen Zeitpunkten signifikant unter dem der Raucher: A: $p = 0,001$, C: $p = 0,04$, F: $p = 0,00005$, G: $p = 0,00005$, so dass die Enzymaffinität bei den Nichtrauchern zu allen Zeitpunkten signifikant höher als bei den Rauchern ist.

3.2.5. Zeitverlauf der Konzentration von 5-Hydroxytryptamin

3.2.5.1. Zeitverlauf der Konzentration von 5-Hydroxytryptamin im Blutplasma

Dieses Experiment wurde mit den Rauchern der Gruppe A ($n = 8$) und den rauchenden Nichtrauchern ($n = 4$) durchgeführt. Für die Raucher beträgt im Friedman Test $\chi^2 = 10,2$. Die Freiheitsgrade betragen $df = 5$ und das Signifikanzniveau $p = 0,067$. Bei den rauchenden Nichtrauchern beträgt $\chi^2 = 7,2$, die Freiheitsgrade betragen $df = 6$ und das Signifikanzniveau $p = 0,3$.

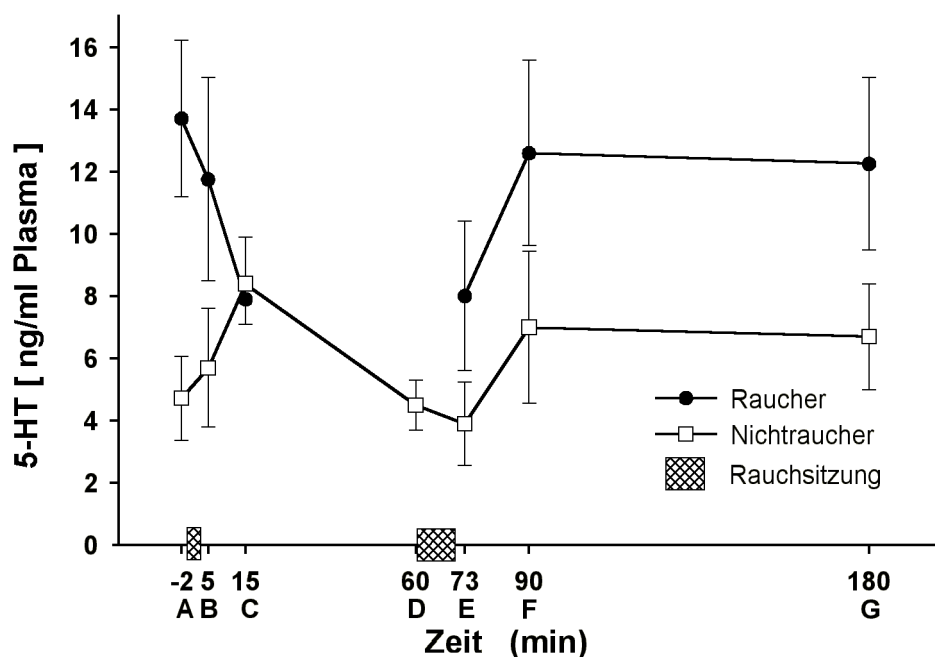


Abbildung 11: **Zeitverlauf der Konzentration von 5-HT im Blutplasma** von Rauchern ($n = 8$) und Nichtrauchern ($n = 4$). Schraffierte Fläche: Rauchen einer Zigarette (0–3 min), bzw. zweier Zigaretten (60–68 min) Darstellung der Konzentrationen als Mittelwerte \pm SEM.

Der Basalwert der Raucher beträgt $13,7 \text{ ng/ml}$ ($SD = 7,1$). 5 Minuten nach dem Beginn des Rauchens der ersten Zigarette sinkt die Konzentration auf $11,8 \text{ ng/ml}$ ($SD = 9,2$). Dieser Abfall

erreicht zum Zeitpunkt C, 10 Minuten später mit 7,9 ng/ml (SD = 5,7) ein signifikantes Niveau ($p = 0,016$). Zum Zeitpunkt E, 13 Minuten nach dem Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette, steigt die 5-HT Konzentration auf 8,0 ng/ml (SD = 6,8) und weitere 15 Minuten später auf 12,6 ng/ml (SD = 8,4) an. Zwei Stunden nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette (Zeitpunkt G) beträgt die Konzentration 12,3 (SD = 7,8) und unterscheiden sich signifikant von Zeitpunkt E ($p = 0,023$) bei einer guten Korrelation mit dem Ausgangswert ($r = 0,68$ und $p = 0,06$).

Die Nichtraucher haben mit 4,72 ng 5-HT/ml (SD = 2,7) eine signifikant ($p = 0,02$) niedrigere Ausgangskonzentration als die Raucher. Sie steigt unmittelbar nach dem Rauchen auf 5,7 ng 5-HT/ml (SD = 3,8) und 15 Minuten nach Beginn des Rauchens auf 8,4 ng 5-HT/ml (SD = 2,6) (A–C: $p = 0,06$) an. Unmittelbar vor dem zweiten Mal Rauchen und knapp eine Stunde nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette beträgt die Konzentration 4,5 ng 5-HT/ml (SD = 1,6). 13 Minuten nach dem Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette sinkt der Wert auf 3,9 ng 5-HT/ml (SD = 2,7) ab. 30 Minuten nach Beginn des zweiten Mal Rauchens steigt die Konzentration auf 7,0 ng 5-HT/ml (SD = 4,9). Zwei Stunden nach Beginn des zweiten Mal Rauchens beträgt die Konzentration noch 6,7 ng 5-HT/ml (SD = 3,4).

3.2.5.2. Zeitverlauf der Konzentration von 5-Hydroxytryptamin in den Thrombozyten

Im Sinne der Hypothese müsste es durch das im Zigarettenrauch enthaltene Norharman zu einer Aktivitätsminderung der MAO-B kommen. Aufgrund dieser angenommenen Aktivitätsminderung würde Serotonin als Substrat der MAO-B (zumindest was hohe Konzentrationen angeht) nicht mehr verstoffwechselt werden. 5-HT stiege dadurch in den Thrombozyten und konsekutiv im Plasma an.

Nullhypothese: Im Zeitverlauf treten keine Unterschiede in der 5-HT Konzentration in den Thrombozyten auf.

Bei Anwendung des Friedman-Tests ist das Signifikanzniveau für die Raucher-Gruppen A und B gemeinsam $p < 0,0009$, $n = 22$, die Freiheitsgrade $df = 3$ und $\chi^2 = 17,1$.

Bei den rauchenden Nichtrauchern beträgt $n = 4$, $df = 6$, $\chi^2 = 2,5$ und $p = 0,9$.

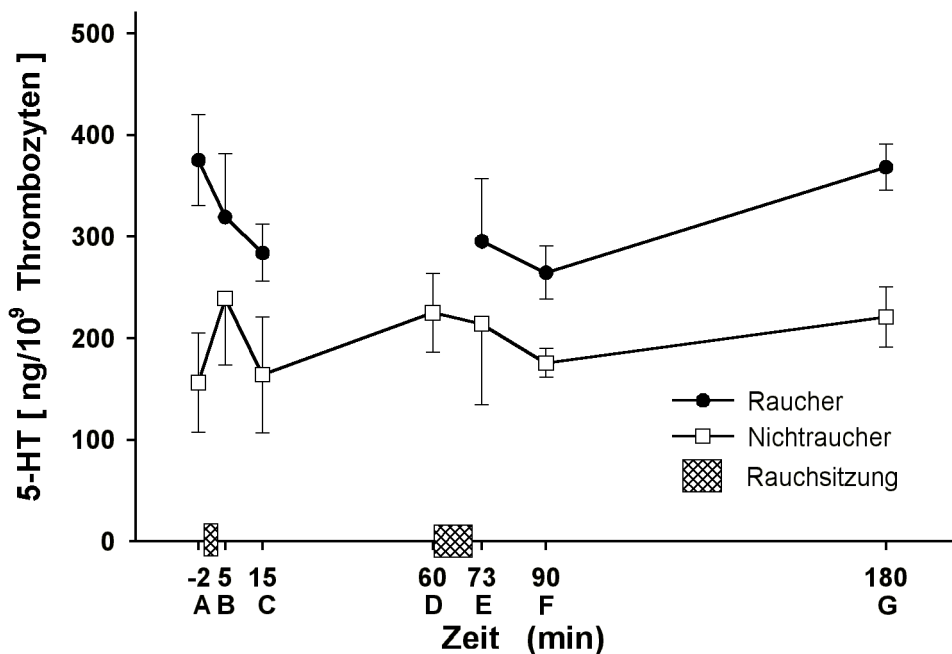


Abbildung 12: **Zeitverlauf der Konzentration von 5-HT in den Thrombozyten.**

Zu Anschauungszwecken erfolgt die Darstellung der beiden Untergruppen der Raucher gemeinsam als Mittelwert \pm SEM. Dementsprechend unterscheiden sich die n-Zahlen der Raucher: n = 22 zu den Zeitpunkten A, C, F und G, n = 8 zu den Zeitpunkten B und D. Die Anzahl der Nichtraucher beträgt n = 4 zu allen Zeitpunkten. Die Zeitintervalle des Rauchens sind als schraffierte Fläche gekennzeichnet. Die Konzentrationen werden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

In beiden Raucheruntergruppen verändert sich die Konzentration von 5-HT im Verlauf des Experimentes.

Gruppe A

(n = 8, df = 5, $\chi^2 = 13,4$ p = 0,013). Der Basalwert der Raucher aus Gruppe A beträgt 391,8 ng/10⁹ Thr. (SD = 213,8). Fünf Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette sinkt die 5-HT-Konzentration auf 319,5 ng/10⁹ Thr. (SD = 175,2), zehn Minuten später, ihr Minimum erreichend, auf 255,2 ng/10⁹ Thr. (SD = 137,7). 13 Minuten nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette (Zeitpunkt E) erreicht die Konzentration ein Niveau von 295,6 ng/10⁹ Thr. (SD = 173,3). 30 Minuten nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette (Zeitpunkt F) beträgt die Konzentration 334,5 ng/10⁹ Thr. (SD = 134,0). Schließlich erreicht die Konzentration zum Zeitpunkt G mit 382,0 ng/10⁹ Thr. (SD = 118,0) wieder nahezu

ihren Ausgangswert, der sich signifikant von Zeitpunkt E ($p = 0,02$) und F ($p = 0,008$) unterscheidet.

Gruppe B

Die Raucher der Gruppe B reagieren dementsprechend: Die 5-HT-Konzentration verändert sich ebenfalls im Zeitverlauf ($n = 14$, $df = 3$, $\chi^2 = 10,7$, $p = 0,01$). Der Ausgangswert der Raucher beträgt $344,4 \text{ ng}/10^9$ Thrombozyten ($SD = 150,1$). 15 Minuten nach dem Beginn des Rauchens der ersten Zigarette sinkt die 5-HT-Konzentration auf $274,1 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 181,5$) ab (Zeitpunkt C). Der Abfall erreicht zum Zeitpunkt F $216,1 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 164,5$) Signifikanz $p = 0,01$. 90 Minuten später erreicht die Konzentration nahezu wieder Ausgangswerte $327,4 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 157,1$), bei einer signifikanten Korrelation mit den Ausgangswerten ($r = 0,72$, $p = 0,004$). In der dritten Gruppe, bei den rauchenden Nichtrauchern beträgt die Ausgangskonzentration $156,2 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 97,5$). Fünf Minuten nach Beginn des Rauchens der ersten Zigarette steigt die Konzentration auf $239,1 \text{ ng } 5\text{-HT}/10^9$ Thr. ($SD = 131,5$) an. 10 Minuten später fällt sie wieder auf $163,9 \text{ ng } 5\text{-HT}/10^9$ Thr. ($SD = 114,2$) ab. Unmittelbar vor dem Rauchen der zweiten und dritten Zigarette beträgt die 5-HT-Konzentration $224,9 \text{ ng } 5\text{-HT}/10^9$ Thr. ($SD = 77,3$). 13 Minuten nach Beginn des Rauchens der zweiten und dritten Zigarette $214,2 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 159,0$) und wiederum 30 Minuten nach Beginn des zweiten Mals Rauchen beträgt die Konzentration $175,7 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 28,7$). Zwei Stunden nach dem zweiten Mal Rauchen beträgt der Wert schließlich $220,75 \text{ ng}/10^9$ Thr. ($SD = 58,8$). Der Basalwert und die Endkonzentration liegen signifikant unter denen der Raucher (A: $p = 0,002$, G: $p = 0,04$).

3.2.5.3. Korrelation der 5-Hydroxytryptaminkonzentration in Thrombozyten und Blutplasma zu den gemeinsamen Messzeitpunkten

Erst nach dem Rauchen von zwei Zigaretten korrelieren die Konzentrationen hoch (Zeitpunkt E). Vor dem ersten Rauchen korrelieren die Konzentrationen negativ (Zeitpunkt A), ohne signifikant zu sein. Bei den rauchenden Nichtrauchern liegen keine signifikanten Korrelationen vor.

5-HT in Plasma und Thrombozyten	Korrelations- koeffizient (r)	Signifikanz Raucher	Korrelations-	Signifikanz
			koeffizient (r)	Nichtraucher
	Raucher	Nichtraucher		
Messzeitpunkt A -2 min	-0,62	0,1	0,8	0,1
Messzeitpunkt B 5 min	0,55	0,16	-0,3	0,6
Messzeitpunkt C 15 min	0,07	0,87	-0,2	0,7
Messzeitpunkt D 58 min			0,5	0,7
Messzeitpunkt E 73 min	0,67	0,07	-0,4	0,5
Messzeitpunkt F 90 min	0,05	0,9	-0,1	0,9
Messzeitpunkt G 180 min	0,21	0,6	0,4	0,6

Tabelle 7: **Korrelation der 5-Hydroxytryptaminkonzentrationen** in Thrombozyten und Blutplasma zu den gemeinsamen Messzeitpunkten

3.2.6. Konzentration von Cotinin im Blutplasma

Bei allen Nichtraucherkontrollen liegt die Konzentration von Cotinin unter der Nachweisgrenze von 5 ng/ml Blutplasma.

Die Konzentration von Cotinin bei den 8 Rauchern der Studie B beträgt 185 ng/ml (SD = 73,1) im Blutplasma.

Die basale Konzentration von Cotinin im Blutplasma war sowohl von der Dauer des rauchfreien Intervalls (mindestens 10 Stunden) als auch von der basalen Konzentration an Norharman und 5-HT im Blutplasma und dem täglichen Zigarettenkonsum unabhängig.

	Korrelationskoeffizient (r)
Letzte Zigarette vor x Stunden und [Cotinin] A '-2 min	-0,010
Anzahl der Zigaretten pro Tag und [Cotinin] A '-2 min	-0,288
5-HT in den Thrombozyten A -2 min und [Cotinin] A '-2 min	0,011
5-HT im Blutplasma A -2 min und [Cotinin] A '-2 min	0,467

Tabelle 8: **Cotinin**korrelationen (Probandenzahl = 8)