

5. Fazit

Es ist beachtenswert, dass sowohl Harman (3,6 µg/g gerauchtem Tabak) als auch Norharman (12,6 µg/g gerauchtem Tabak) im Zigarettenrauch in hohen Konzentrationen vorkommen (Poindexter, 1962). Harman hemmt die MAO-A ($K_i = 220$ nM) und Norharman spezifisch die MAO-B ($K_i = 730$ nM) *in vitro* (May et al. 1991b) und *in vivo* (Rommelspacher et al., 1994). L-Deprenyl verdrängte [³H]Norharman, das an die Mitochondrienmembran in Rattengehirn gebunden war mit einem K_i -Wert von 130 nM. Dies legt eine hochaffine Bindung von Norharman an das aktive Zentrum der MAO-B im Hirngewebe nahe (Pawlik & Rommelspacher, 1988). Zu meiner Annahme, dass Norharman und Harman zu der Hemmung des Enzyms beitragen, passt die Beobachtung, dass die Bestandteile des Zigarettenrauchs klein sind, die beide Isoformen der MAO inhibieren (Yu & Boulton, 1987). Darüber hinaus wird Dopamin, der beim Morbus Parkinson am meisten betroffene Neurotransmitter, im menschlichen Gehirn durch beide Isoformen der MAO metabolisiert.

Das Verteilungsverhältnis der jeweiligen Enzymaktivität schwankt stark in Abhängigkeit von der Gehirnregion. Im zerebralen und zerebellären Kortex beträgt das Verhältnis 1:1. Im pons und der medulla oblongata liegt das Verteilungsverhältnis bei 1:2. Im zerebralen Kortex konnten K_m -Werte von MAO-A und B in Höhe von 240 respektive 230 µM nachgewiesen werden (O'Carroll et al., 1983). Daher, vorausgesetzt, dass die Hemmung der MAO zu dem postulierten neuroprotektiven Effekt des Rauchens beiträgt, sind Harman und Norharman (mit ihrer unterschiedlichen Affinität zu den beiden Isoformen der MAO) zwei attraktive Kandidaten unter den Bestandteilen des Zigarettenrauchs, die diesen Effekt hervorrufen könnten. Wenn man die K_i -Werte für Norharman und Harman (beide sind kein Substrat der MAO) mit den K_m -Werten des Dopamins vergleicht, fällt auf, dass die Affinität für Norharman ungefähr 330-mal und die für Harman etwa 1000-mal so hoch ist wie die für Dopamin.

In Hinblick auf die Beobachtungen der Parkinson Study Group (1998) fällt auf, dass der irreversible MAO-B-Hemmstoff Selegilin (= l-Deprenyl) nicht neuroprotektiv, zumindest nicht bei den mit L-Dopa (l-Dihydroxyphenylalanin) behandelten Patienten wirkt. Es ist daher verlockend zu spekulieren, dass es für die neuroprotektive Wirkung der Hemmung beider Isoformen der MAO bedarf. Das wiederum unterstützt die Plausibilität unserer Hypothese dass die β -Carboline zu dem neuroprotektiven Effekt des Zigarettenrauchs beitragen.

Das Rauchen verursachte in meiner Untersuchung eine dramatische Konzentrationssteigerung von Norharman und eine etwas geringere Konzentrationssteigerung von Harman bei den Rauchern. Bei ihnen lag die Ausgangskonzentration von Norharman in den Thrombozyten bei 20,02 nM und nach dem Rauchen zweier Zigaretten betrug die Konzentration 27,93 nM. Die entsprechenden Konzentrationen an Harman betragen 6,8 nM und nach dem Rauchen zweier Zigaretten 16,3 nM. Aus diesen Werten kann abgeleitet werden, dass das Rauchen zweier Zigaretten einen Konzentrationsanstieg von etwa 10 nM in den Thrombozyten bewirkt. Aufgrund der in dieser Studie beobachteten langsamen Eliminationshalbwertszeit kann ein starker Raucher Konzentrationen von 100 bis 150 nM Norharman durch das Rauchen von 10 Zigaretten innerhalb weniger Stunden erreichen.

Für die Hemmung der MAO-B durch Norharman beträgt der K_i -Wert 730 nM im Rattenvorderhirn (May et al., 1991), was bei kompetitiver Hemmung eine IC_{50} von etwa 1 μ M ergibt. Bei der Annahme, dass die Konzentration des Inhibitors in einer einfachen Bindung in einer 100fachen Spanne zwischen einem Zehntel des IC_{50} -Wertes bis zum zehnfachen des IC_{50} -Wertes auftritt, dann hemmt ein Zehntel der IC_{50} -Konzentration das Enzym um 10%. In diesem Fall würden die Norharmankonzentrationen starker Raucher ausreichen um 10% der Enzymaktivität zu hemmen. Es ist jedoch auch möglich, dass der Grad der MAO-B-Hemmung in den Thrombozyten durch das Rauchen unterschätzt worden ist. Turkish et al. (1988) bestimmten den Effekt der MAO-B-Hemmung auf das Verhalten und verglichen den Grad der Hemmung eines irreversiblen (l-Deprenyl) und eines reversiblen (MD 240928) Hemmstoffes der MAO-B. Sie gelangten zu der Einsicht, dass aufgrund eines Verdünnungseffektes während der Aufarbeitung der Thrombozyten die Enzymhemmung durch die reversiblen Hemmstoffe der MAO um mindestens 6% und vielleicht sogar um 17% unterschätzt wurde. Ebenfalls zu beachten ist das im Gewebe verbleibende Norharman. Aufgrund seiner Lipophilie könnte Norharman in der Schicht zwischen der Phospholipidmembran der Mitochondrien und dem Protein des Enzyms festsitzen. Das würde zu einer Akkumulation von Norharman im Submilieu der Mitochondrienmembran, wo sich die MAO befindet, führen.

Wenn man die Annahme zu Grunde legt, dass 10% der MAO-B bei starken Rauchern gehemmt werden und man weitere 10% aufgrund von Verdünnungseffekten dazu addiert, kann davon ausgegangen werden, dass Norharman substantiell zu der durch Tabak hervorgerufenen MAO-B Enzymhemmung beiträgt. Die Konzentrationen von Harman steigen während des Zigarettenrauchens aufgrund der geringeren Konzentration im Zigarettenrauch weniger stark an. Das Hemm-

potential von Harman gegenüber der MAO-A liegt jedoch etwa dreimal so hoch wie das des Norharmans gegenüber der MAO-B (K_i 230 versus 730 nM). Daher sollten bei starken Rauchern die Konzentrationen an Harman im Gehirn ausreichen um die MAO-A zu inhibieren.

Dopamin wird im Gehirn durch beide Isoformen der MAO metabolisiert. Die Hemmung des MAO-B alleine durch Selegilin (l-Deprenyl) reicht nicht aus um die dopaminergen Neuronen vor der Neurodegeneration bei Patienten mit M. Parkinson zu bewahren. Andererseits schützt Rauchen bis zu einem gewissen Grad davor an M. Parkinson zu erkranken wie epidemiologische Studien immer wieder zeigen. Es könnte sehr gut sein, dass beide Isoformen des Enzyms gehemmt werden müssen, um die Neuroprotektion zu erreichen, die in diesen Untersuchungen nachgewiesen wird. Die vorliegende Studie bietet den indirekten Beweis, dass die Konzentration der β -Carboline, die durch das Tabakrauchen inhaliert werden, substantiell zur Enzymhemmung beitragen, wie in PET-Untersuchungen bei Rauchern gezeigt werden konnte.

6. Zusammenfassung

Rauchen ist einerseits der größte vermeidbare Auslöser von Morbidität und Mortalität, andererseits zeigen epidemiologische Studien, dass die Prävalenz von Rauchern unter Patienten mit Morbus Parkinson niedriger ist als in der Allgemeinbevölkerung. Der Grund für diese geringere Prävalenz ist unbekannt. Als Ursache wird eine geringere Produktion von Sauerstoffradikalen bei Rauchern angenommen. Studien zur Pathogenese der Degeneration dopaminerger und anderer Neurone bei der Parkinson'schen Krankheit legen nämlich nahe, dass Sauerstoffradikale maßgeblich zur Zerstörung der Neurone beitragen. Diese entstehen physiologischerweise als Produkte der oxidativen Transaminierung beim Abbau von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin durch die Monoaminoxidase. Dieses Enzym liegt in zwei Isoformen vor, als Subtyp A und B. Dopaminerge Neurone enthalten den Subtyp A, serotonerge und Gliazellen den Subtyp B. Diese Erkenntnisse führten zu umfangreichen Studien mit Selegilin, einem irreversiblen Hemmstoff der MAO-B. Es wurde erwartet, dass weniger Sauerstoffradikale entstehen und so die Degeneration der Nervenzellen gestoppt werden kann. Unter diesen Bedingungen wären die physiologischen Abwehrmechanismen in der Lage, die geringere Menge an Sauerstoffradikalen zu inaktivieren. Nach der ersten Euphorie wurde bald klar, dass Selegilin den degenerativen Prozess, wenn überhaupt, nur um wenige Jahre verlangsamt. Dies wurde u.a. darauf zurückgeführt, dass Dopamin unter diesen Bedingungen verstärkt durch die MAO-A abgebaut wird, die in den dopaminergen Neuronen exprimiert wird. Positron emissionstomographische Untersuchungen haben dann gezeigt, dass in der Folge des Rauchens sowohl die MAO-B als auch die MAO-A im Gehirn gehemmt ist. Diese überraschenden Befunde und die relativ geringe Prävalenzrate von Rauchern unter den Patienten mit Morbus Parkinson haben uns zu der vorliegenden Studie veranlasst. Es sollten die Hypothesen geprüft werden, dass im Tabakrauch Hemmstoffe sowohl der MAO-A als auch der MAO-B vorkommen. Deren Konzentrationen reichen aus, um die Aktivität beider Isoenzyme zu vermindern und so die Produktion von Sauerstoffradikalen einzuschränken. Diese Hypothese impliziert eine zweite, dass nämlich beide Isoformen der MAO gehemmt werden müssen, um eine deutliche Protektion zu erzielen, wie dies scheinbar mit dem Rauchen erreicht wird. Die dritte Hypothese lautet, dass Norharman, ein Pyrolyseprodukt von Tryptophan, das in hohen Konzentrationen im Tabakrauch vorhanden ist und die MAO-B hemmt und Harman, das die MAO-A hemmt, wesentlich die epidemiologischen Beobachtungen erklären können.

PET Untersuchungen haben bei Rauchern eine verminderte Aktivität der MAO-B in den Basalganglien von im Mittel 49% bei einzelnen Rauchern sogar von 77% ergeben. Ich habe eine Abnahme der Affinität der MAO-B in den Thrombozyten von Rauchern nachgewiesen. Dieser Befund stimmt mit den PET-Beobachtungen im Gehirn überein. Außerdem habe ich in in vitro Experimenten eine Hemmkonstante K_i von 1,23 μM Norharman für die MAO-B aus Thrombozyten gemessen. Ab einer Konzentration von 100 nM hemmt Norharman die MAO-B deutlich. Die ex vivo Untersuchungen ergaben, eine gleichmäßige Verteilung vorausgesetzt, in Thrombozyten eine Konzentration von 4,94 nM Norharman als Ausgangskonzentration bei Rauchern. Das Rauchen einer Zigarette führte zur Erhöhung der Konzentration um etwa ein Drittel auf 6,6 nM. Es ergibt sich nun die Frage, ob die Konzentrationen von Norharman und Harman ausreichen, um die jeweiligen MAO-Isoenzyme zu hemmen. Um dies zu beurteilen müssen ausgehend von den gemessenen Konzentrationen weitere Faktoren berücksichtigt werden.

- 1.) Die gemessenen Werte sind wahrscheinlich niedriger als die in vivo vorhandenen, weil aus methodischen Gründen die Thrombozyten vor den Messungen sorgfältig gewaschen wurden. Der entsprechende Verlust wurde in Kauf genommen. Im Blutplasma erhöhte sich die Konzentration von Norharman nach einer Zigarette auf das sechsfache, nach zwei Zigaretten auf das neunfache.
- 2.) Bei einer von mir gemessenen Eliminationshalbwertszeit von 190 Minuten und einer Rauchkarenz von 10 Stunden zu Beginn des Experiments, muss davon ausgegangen werden, dass die Ausgangskonzentration für einen Raucher, der durchschnittlich 20 Zigaretten pro Tag raucht, zu Beginn der Messungen gering war im Vergleich zu den Werten im Tagesverlauf.
- 3.) Norharman reichert sich als lipophile Substanz in Membranen an, also auch in der äußeren Mitochondrienmembran, der Lokalisation der MAO.
- 4.) Es sind verschiedene Moleküle beschrieben, an die Norharman bindet wie z.B. Neumelanin und Cytochrome. Deshalb ist die Konzentration von Norharman in der Substantia nigra, wo die Zellkörper der dopaminergen Neurone lokalisiert sind, die beim Morbus Parkinson vor allem degenerieren, von allen bisher untersuchten Hirnregionen am höchsten. Beispielsweise ist sie 27,6fach höher als im parietalen Kortex.
- 5.) Da die Affinität zur MAO-B etwa 300-mal höher ist als die von Dopamin und Norharman ans aktive Zentrum des Isoenzyms bindet, könnte eine zusätzliche Wirkung von Norharman dadurch zustande kommen, dass die Bindung von Dopamin an das Enzym

verhindert wird. Die indirekten Messungen legen nahe, dass weitere Inhaltsstoffe des Tabakrauchs an dieser Wirkung beteiligt sind, jedoch ist es wahrscheinlich, dass Norharman wesentlich zur Verminderung des Abbaus von Dopamin beiträgt.

Die Harmankonzentrationen entsprachen bei den Rauchern etwa einem Drittel der Norharmankonzentrationen. Da die Affinität von Harman zur MAO-A etwa dreimal so hoch ist wie die von Norharman zur MAO-B (220 nM vs. 730 nM) und 1000-mal höher als die von Dopamin zur MAO-A, ist eine wesentliche Beteiligung von Harman an der beobachteten Hemmung der MAO-A in den Basalganglien denkbar.

Als Indikator für eine Hemmung der MAO-B unter in vivo Bedingungen wurde die 5-HT Konzentration im Blutplasma und den Thrombozyten gemessen. Es wurde festgestellt, dass die Konzentrationen in den beiden Kompartimenten bei den Rauchern signifikant höher waren als bei den Nichtrauchern. Der Verlauf nach der ersten Zigarette war gegensätzlich, nach der zweiten Rauchersitzung gleichförmig in den beiden Gruppen. Die Unterschiede wurden auf eine wesentlich höhere Elininationskapazität des Lungenepithels der Raucher zurückgeführt. Dafür könnte Histamin eine Rolle spielen, da es die Kapazität der extraneuronalen Transporter vervierfacht. Tierexperimentelle Befunde haben gezeigt, dass die Abbaukapazität von Histamin in der Lunge nach 29-tägigem Rauchen halbiert ist.

Zusammengefasst belegen die Untersuchungen, dass die Tabakinhaltsstoffe Norharman und Harman einen wesentlichen Beitrag zur Hemmung der in PET-Untersuchungen beobachteten Hemmung der MAO-A und MAO-B beitragen. Dafür sind im Wesentlichen zwei Mechanismen verantwortlich nämlich die direkte Hemmung des Enzyms und die Verhinderung der Bindung von Dopamin an das aktive Zentrum wegen der wesentlich höheren Affinität als der von Dopamin.

7. Methodikanhang

Herstellung des Waschpuffers für die Bestimmung der MAO-B in den Thrombozyten

$K_2HPO_4 = 2,28 \text{ g} + 465 \text{ mg EDTA}$ in 200 ml H_2O

$KH_2PO_4 = 0,34 \text{ g} + 116 \text{ mg EDTA}$ in 50 ml H_2O . Das K_2HPO_4 wurde vorgelegt und der pH von 7,4 mittels des KH_2PO_4 am pH-Meter eingestellt.

Herstellung des Inkubationspuffers für die Bestimmung der MAO-B in den Thrombozyten

$K_2HPO_4 = 9,13\text{g}+465 \text{ mg EDTA}$ in 200 ml H_2O

$KH_2PO_4 = 1,36 \text{ g}+116 \text{ mg EDTA}$ in 50 ml H_2O . In gleicher Weise wie beim Waschpuffer legte man das K_2HPO_4 vor und stellte den pH von 7,4 mittels des KH_2PO_4 am pH-Meter ein. Beide Puffer waren gekühlt maximal eine Woche lang haltbar.

| $\mu\text{g}/400 \mu\text{l}$ | Inkubationspuffer ml | 1:8-Verdünnung ml | H_2O ml |
|-------------------------------|----------------------|-------------------|-----------|
| 2,5 | 1 | 0,25 | 3,75 |
| 5 | 1 | 0,5 | 3,5 |
| 7,5 | 1 | 0,75 | 3,25 |
| 10 | 1 | 1,0 | 3,0 |
| 12,5 | 1 | 1,25 | 2,75 |
| 15 | 1 | 1,5 | 2,5 |

Tabelle 9: Verdünnungsschema des Standards