

## **4. Diskussion**

### **4.1. Stellungnahme zu den Methoden**

Die stichprobenartigen unabhängigen Auswertungen durch einen anderen Institutsmitarbeiter führten zu identischen Ergebnissen.

Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C. Da die Messung der Proben, insbesondere der Proben aus Thrombozyten sehr zeitaufwendig ist, ließen sich Lagerungen von bis zu 5 Monaten nicht vermeiden. Dr. May (klinische Neurobiologie, Charité) stellte jedoch bei sechs Monate gelagerten Thrombozytenproben keine Aktivitätsminderung der MAO-B fest, so dass davon ausgegangen werden kann, dass unter den gewählten Bedingungen die MAO-B ein sehr stabiles Enzym ist. Die Plasmaproben dieser Studie wurden spätestens nach einem Monat aufgearbeitet.

### **4.2. Stellungnahme zum Studiendesign**

Aufgrund der Zentrifugenauslastung war eine Blutentnahme bei den Probanden unmittelbar vor dem zweiten Mal Rauchen leider nicht möglich. Darüber hinaus hätte dies zu sehr kurz aufeinander folgenden Blutabnahmen und damit zu einer zu starken Belastung der Probanden geführt, die insgesamt 380 ml Vollblut spendeten.

### **4.3. Konzentration von Cotinin im Blutplasma**

Die Bestimmung der Cotininkonzentration im Blutplasma erwies sich als gute Methode zur Kontrolle, ob es sich bei einem Nichtraucher tatsächlich um einen Nichtraucher handelt. Zur Überprüfung des Rauchverhaltens bei den Rauchern erwies sich die Bestimmung als nicht aussagekräftig bezüglich der Absicherung, dass die Abstinenz von 10 Stunden eingehalten wurde. Die gemessene Cotininkonzentration korrelierte weder mit dem (glaubhaft) angegebenen rauchfreien Intervall, noch mit der gemessenen Norharmankonzentration und dem täglichen Zigarettenkonsum.

#### **4.4. Bestimmung der Hemmkonstante $K_i$ von Norharman in vitro und der Einfluss von Norharman auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten ex vivo**

Um festzustellen, ob sich eine Hemmung der Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten durch Norharman überhaupt nachweisen lässt, wurde eine in vitro Untersuchung mit Thrombozyten durchgeführt. Ebenso galt es in vitro herauszufinden, falls es zu einer Hemmung kommt, ab welcher Konzentration an Norharman diese Hemmung auftritt. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte abgeschätzt werden, ob durch Rauchen überhaupt eine entsprechende Konzentration erreicht werden kann. Um später Rückschlüsse auf den Langzeitkonzentrationsverlauf im Gehirn ziehen zu können, war es von Bedeutung zu erfahren, um welche Art der Hemmung es sich handelt.

Die in vitro Untersuchungen ergaben, dass Norharman die MAO-B in Thrombozyten bei einer Hemmkonstante von  $K_i = 1,23 \mu\text{mol/l}$  hemmt. Dieser Wert wurde von Herraiz et al. (2004) mit rekombinanter humaner MAO-B als Enzymquelle ( $K_i = 1,12 \mu\text{mol/l}$ ) bestätigt. In meiner Untersuchung ergab sich aus der Verdrängungskurve eine Hemmung der MAO-B, die etwa ab einer Konzentration von  $100 \text{ nmol/l}$  nachweisbar wird. Der Hemmtyp ist bis zu Konzentrationen von  $3 \mu\text{mol/l}$  rein kompetitiv. Bei noch höheren Konzentrationen tritt eine nicht kompetitive Hemmung ein. Bei den angegebenen benötigten Konzentrationsangaben kann nur der gesamte Thrombozyt betrachtet werden. Unberücksichtigt bleibt die Tatsache, dass die MAO-B sich an der äußeren Mitochondrienmembran befindet, der Ort an dem sich das Norharman aufgrund seiner Lipophilie vermutlich auch am besten anreichern kann. Daraus lässt sich schließen, dass die Konzentration am Wirkort, unter den von mir gewählten Bedingungen, durchaus höher liegen könnte.

#### **4.5. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman**

##### **4.5.1. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman im Blutplasma**

Die ex vivo-Untersuchungen zu dieser Studie erbrachten folgende Ergebnisse: Die Konzentration von Norharman im Blutplasma stieg bei den Rauchern ( $19,2 \text{ pg/ml}$  entsprechend  $0,057 \text{ nM}$ ) durch das Rauchen von nur einer Zigarette auf das sechsfache der Ausgangskonzentration an. Das Rauchen zweier Zigaretten, bewirkte gar einen Anstieg auf das über neunfache der Ausgangskonzentration.

Die Bestimmung der Konzentration an Norharman im Blutplasma wurde bisher erst einmal erfolgreich durchgeführt (Breyer-Pfaff et al., 1996). Deren Befunde, die im Zeitverlauf mit einer sehr kleinen Fallzahl ( $n = 3$ ) von Rauchern, die zum Teil selbst gedrehte Zigaretten rauchten, erhoben wurden, konnten mit der größeren Anzahl Probanden ( $n = 19$ ) in der vorliegenden Studie reproduziert werden. Wie auch in der vorliegenden Studie maßen Breyer-Pfaff et al. bei ihren drei Probanden ähnliche Konzentrationen an Norharman, die jedoch mit einer erheblichen Streuung behaftet waren. So ließ sich beispielsweise bei dem Raucher einer selbst gedrehten Zigarette eine sehr viel höhere Plasmakonzentration nachweisen, als in meiner Studie. Erhebliche interindividuelle Differenzen konnten durch konstantere Ausgangsbedingungen in der vorliegenden Untersuchung reduziert werden. Es gab geringere Unterschiede im täglichen Zigarettenkonsum als bei Breyer-Pfaff, da alle Raucherprobanden mehr als 10 Zigaretten täglich rauchten. Zudem wurde während dieses Experimentes von allen Versuchsteilnehmern dieselbe Zigarettenart geraucht, während bei Breyer-Pfaff et al. drei unterschiedliche Zigarettenarten zum Einsatz kamen. Darüber hinaus wurde in unserer Untersuchung die Zigarettenrauchinhalation supervidiert sowie darum gebeten tief zu inhalieren und während des Rauchens nicht zu sprechen und wir beobachteten die Konzentrationsabnahme nach dem zweiten Mal Rauchen über eine längere Zeitspanne (70 versus 120 min).

Die aufgeführten Unterschiede der beiden Untersuchungen sind vermutlich Gründe für die unterschiedlichen pharmakokinetischen Parameter. Aus unserer pharmakokinetischen Datenanalyse ergibt sich eine längere Eliminationshalbwertszeit im Plasma (51 min) als bei den Probanden von Fr. Breyer-Pfaff (15–35 min). Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass einzelne Probanden dieser Studie ebenso kurze Eliminationshalbwertszeiten aufweisen.

Bei den Nichtrauchern der vorliegenden Studie lässt sich kein signifikanter Unterschied der Ausgangskonzentration zu den Rauchern nachweisen. Die Nichtraucher hatten Schwierigkeiten den Rauch zu inhalieren. Dies erklärt den lediglich dreifachen Anstieg der Konzentration an Norharman als auch den durchweg niedrigeren Konzentrationszeitverlauf an Norharman im Gegensatz zu den Rauchern. Außerdem blieb ein Dosiseffekt aus.

#### **4.5.2. Zeitverlauf der Konzentration von Norharman in den Thrombozyten**

Bei den Rauchern ist die Ausgangskonzentration von Norharman in den Thrombozyten etwa viermal so hoch wie bei den Nichtrauchern (20,02 nM vs. 4,94 nM). Bei einem durchschnitt-

lichen Volumen der Thrombozyten von 8,8 femtoliter ergibt sich, eine gleichmäßige Verteilung in den Thrombozyten vorausgesetzt, eine Ausgangskonzentration an Norharman von 4,94 nM. Diese liegt fast 100fach höher als im Blutplasma (0,057 nM). Bei einer so starken Anreicherung von Norharman in tiefen Kompartimenten überrascht es daher nicht, dass der Basalwert bei den Rauchern in den Thrombozyten, nicht aber im Blutplasma höher liegt. Ähnliche Ergebnisse können so auch für das Gehirn erwartet werden.

Nach der ersten Zigarette steigt die Konzentration von Norharman in den Thrombozyten deutlich an. Sie lässt sich durch weiteres Rauchen der zwei Zigaretten während der zweiten Sitzung nur noch geringgradig steigern. Zwei Stunden später ist die Konzentration noch leicht erhöht. Nicht auszuschließen ist, dass, bei einer raschen Umverteilung zwischen Thrombozyten und Plasma, der zweite Norharman-Gipfel nicht mehr in voller Höhe nachweisbar ist, da erst etwa 20 Minuten nach dem Rauchen die Konzentration bestimmt wurde. Diese Hypothese scheint jedoch unwahrscheinlich, da die Konzentration auch zwei Stunden später noch erhöht ist und die Eliminationshalbwertszeit, wie die pharmakokinetischen Analysen zeigen, im Vergleich zum Plasma fast viermal so lang (190 min) ist. Vielmehr kann hier von einer Sättigung der Aufnahmekapazität der Thrombozyten ausgegangen werden. Ein weiterer Erklärungsansatz dieser Befunde könnte bei der Rauchtchnik selbst liegen. Viele Raucher berichteten schon nach einer Zigarette über leichte Nausea. Die Aussicht auf das Rauchen von zwei zusätzlichen Zigaretten ließ diese daher vermutlich weniger tief inhalieren, so dass sie nicht die doppelte Menge an Zigarettenrauch aufnahmen. Dieser Erklärungsansatz gewinnt auch beim Betrachten der Norharmankonzentrationen im Blutplasma an Bedeutung. Nach dem zweiten Mal Rauchen war nicht die zwölfwache Konzentration gegenüber dem Basalwert, sondern lediglich eine neunfache gegenüber der sechsfachen Konzentrationszunahme nach dem ersten Mal Rauchen zu beobachten.

Die Bestimmung der Halbwertszeiten weist, insbesondere in den Thrombozyten, eine hohe interindividuelle Variabilität auf. Die Ergebnisse stellen daher eine erste Annäherung an die pharmakokinetische Datenanalyse im Medium Thrombozyten dar. Weitere Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um die Pharmakokinetik der  $\beta$ -Carboline Norharman und Harman profunder zu erforschen. Unter biometrischen Aspekten sollten dann mixed effect Datenanalysen zum Einsatz kommen.

Der Ausgleich zwischen den Kompartimenten ist bisher noch ungesichert. Für einige Substanzen wie beispielsweise Serotonin (siehe unten, S.66), werden aktive Transportmechanismen postuliert. Bei den  $\beta$ -Carbolinen ist dies weitgehend ungeklärt. Aufgrund der Lipophilie können die-

se jedoch auch leicht ohne Transporter diffundieren und sich anreichern. Dies ist am Modell der mit dem Dopamintransporter (DAT) transfizierten HEK 293 Zellen (human embryonic kidney cells) für Norharman und Harman gezeigt worden. Im Vergleich mit dem Wildtyp der HEK 293 Zellen akkumulierten die transfizierten Zellen genauso viel Norharman und Harman (Storch et al., 2004). Die zelluläre Aufnahme der von mir untersuchten Substanzen erfolgt demnach unabhängig vom hochaffinen Dopamintransporter DAT.

In dieser Studie wurde erstmals die Konzentration an Norharman in dem Kompartiment Thrombozyten bestimmt. Die Zuverlässigkeit der Methode konnte durch die Messungen mit drei Elutionsmitteln bei guten Korrelationen belegt werden. Die Vorteile der Messung von Norharman in den Thrombozyten liegen in der Verfügbarkeit des Materials und der Geräte und der minimalen Invasivität. Das bedeutet, dass den Probanden lediglich Blut abgenommen wurde und keine weiteren Belastungen, beispielsweise mit radioaktiven Strahlen bei einer PET Untersuchung in Kauf genommen werden mussten.

Auf die Vergleichbarkeit des peripheren Kompartimentes Thrombozyten mit zentralen Prozessen wurde in der Einleitung hingewiesen. Diskutiert werden diese Bedingungen nochmals unten, S. 61, im Abschnitt Einfluss des Rauchens auf die MAO-B Aktivität in den Thrombozyten während der Beobachtungszeit.

#### **4.5.3. Korrelation der Norharmankonzentration in Thrombozyten und Blutplasma zu den vier gemeinsamen Messzeitpunkten**

Da die Norharmankonzentration in den Thrombozyten nur bei den Rauchern bestimmt wurde, beziehen sich die folgenden Darstellungen nur auf die Raucher.

Die Ausgangskonzentrationen von Norharman im Blutplasma und den Thrombozyten korrelieren nur mäßig. Unmittelbar nach dem ersten Mal Rauchen und am Ende des Experimentes korrelieren diese gar nicht. Zum Zeitpunkt der höchsten Konzentration von Norharman sowohl in den Thrombozyten als auch im Plasma besteht jedoch eine hochsignifikante Korrelation. Dieser Befund deutet auf Austauschvorgänge hin, die schneller als der Messzyklus ablaufen und die zumindest bis zu den gegebenen Konzentrationen nicht sättigbar sind. Dass sich ein ebensolcher Effekt unmittelbar nach dem ersten Rauchen nicht nachweisen lässt, könnte eventuell daran liegen, dass die Aufnahme nicht so schnell erfolgt. Versuchsaufbau- und labortechnisch war es nicht möglich, die Zeitpunkte Plasma B (5 min) mit Thrombozyten C (15 min) zu vergleichen.

## **4.6. Zeitverlauf der Konzentration von Harman**

### **4.6.1. Zeitverlauf der Konzentration von Harman im Blutplasma**

Die basale Konzentration von Harman im Plasma der Raucher beträgt 0,049 nM. Das Rauchen der ersten Zigarette führt bei den Rauchern zu einer Erhöhung der Konzentration von Harman um das dreifache der Ausgangskonzentration. Zwei weitere Zigaretten bewirken nur einen geringen weiteren Anstieg. Die nachweisbare Konzentration von Harman ist wesentlich niedriger als die des Norharman. Auch diese Ergebnisse sind konsistent mit denen von Breyer-Pfaff et al. (1996), die einen dem Norharman ähnlichen Zeitverlauf mit fünffach geringeren Konzentrationen, beschreiben. Auch lassen sich diese Ergebnisse gut mit den Untersuchungen Poindexters (1962) in Einklang bringen, der in vitro eine je nach Tabakart, zwei- bis dreimal niedrigere Konzentration an Harman in Vergleich zu Norharman nachwies.

Die Konzentration von Harman im Plasma von Nichtrauchern beträgt 0,0232 nM. Im Zeitverlauf liegen die Harmankonzentrationen ähnlich wie die Norharmankonzentrationen deutlich unter denen der Raucher. Signifikant ist dieser Unterschied außer beim Basalwert zu allen Zeitpunkten.

### **4.6.2. Zeitverlauf der Konzentration von Harman in den Thrombozyten**

In den Thrombozyten beträgt die Ausgangskonzentration von Harman bei den Rauchern 6,8 nM, nach dem Rauchen zweier Zigaretten 16,2 nM. Aufgrund der großen Streuung und der niedrigen Konzentration an Harman in den Thrombozyten konnten keine Signifikanzen im Konzentrationsverlauf von Harman in den Thrombozyten von Rauchern gefunden werden. Der Nachweis von Harman im Blutplasma war bereits an der Nachweisgrenze. Die Konzentration von Harman ist im Blutplasma deutlich niedriger als in den Thrombozyten. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass sich Harman ebenso wie Norharman, in den Thrombozyten anreichert.

## **4.7. Einfluss des Rauchens auf die MAO-B Aktivität in den Thrombozyten während der Beobachtungszeit**

Aufgrund der Schwierigkeiten MAO-A-haltiges Gewebe vom Menschen zu gewinnen und weil Voruntersuchungen gezeigt haben, dass Norharman die B-Isoform stärker hemmt als die A-Isoform der MAO, untersuchten wir in dieser Studie die MAO-B, die aus Thrombozyten gewonnen werden kann.

Da die meisten bisherigen Studien für ihre Untersuchungen zur Aktivität der MAO-B eine einzige Substratkonzentration nahe der Sättigung nutzten, lag der Vorteil meiner Arbeit in der Applikation von 6 Substratkonzentrationen (1/7 bis dem 4,5fachen des  $K_m$ -Wertes). Das erlaubte es mir, die Effekte des Rauchens sowohl auf die Enzymaktivität ( $V_{max}$ ) als auch auf die Enzymaffinität, wie sie durch den  $K_m$ -Wert bestimmt wird, zu untersuchen.

Aufgrund der eigenen in vitro Voruntersuchungen und der Berichte in der Literatur wurde ein Einfluss des Rauchens auf die Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten erwartet. Wir gingen davon aus, dass bei akutem Rauchen bei Rauchern, eher als bei Nichtrauchern der  $K_m$ -Wert steigt und  $V_{max}$  sinkt. Die Untersuchungsergebnisse zeigen jedoch, dass der  $K_m$ -Wert (als Bezugsgröße für die Affinität) bei den Rauchern im Verlauf des Experimentes weitestgehend unbeeinflusst bleibt. Das weitere Rauchen reicht nicht aus, um eine nachweisbare Reduktion der Enzymaffinität zu bewirken. Wir gehen davon aus, dass die Rekrutierung von starken Rauchern dazu führte, dass, trotz des 10-stündigen rauchfreien Intervalls, die Bindungsstellen des Enzyms durch Bestandteile des Zigarettenrauches bereits durch vorheriges Rauchen blockiert waren. Dies erklärt jedoch nicht, dass sich keine signifikante Änderung in der Aktivität der MAO-B ( $V_{max}$ ) durch das Rauchen der insgesamt drei Zigaretten bei den Rauchern feststellen lässt.

Ebenso überraschend ist, dass sich zwischen den Rauchern und Nichtrauchern keine Unterschiede in der Enzymaktivität der MAO-B ( $V_{max}$ ) finden. Im Gegensatz dazu wird bei Alkoholkranken die nachgewiesene reduzierte Enzymaktivität der MAO-B ( $V_{max}$ ) als nosologisches Merkmal angesehen (Rommelspacher et al., 1994a).

Für die Nichtraucher fallen die Ergebnisse hinsichtlich der Enzymaffinität ( $K_m$ ) anders aus. Bei ihnen bewirkt das Rauchen einer Zigarette eine leichte, obwohl nicht signifikante Abnahme der Affinität (Anstieg des  $K_m$ -Wertes). Diese liegt im gesamten Experiment stets signifikant höher als die Enzymaffinität der Raucher. Damit lassen sich die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen, die eine kompetitive Hemmung der MAO-B durch geringe Mengen an Norharman nahe legen, bestätigen. Bei den Nichtrauchern ist anzunehmen, dass aufgrund der Tatsache, dass sie nicht dazu in der Lage sind, ausreichend tief inhalieren zu können (wie die nachgewiesenen niedrigeren Norharmankonzentrationen nahe legen), im Zeitverlauf keine ausgeprägtere Senkung der Enzymaffinität (Erhöhung des  $K_m$ -Wertes) eintritt.

Bei Rauchern lässt sich eine Hemmung der MAO-B im Gehirn mittels einer PET-Studie von etwa 40% nachweisen (Fowler et al. 1998). In den Basalganglien findet sich sogar eine Hemmung von 49% und bei einzelnen Probanden eine Hemmung von bis zu 77% (Fowler et al.,

2000). Zeitverläufe wurden bei dieser Messung allerdings nicht durchgeführt. Überdies waren die Abstände zwischen letzter Zigarette und Zeitpunkt der PET-Untersuchungen unterschiedlich lang (zwischen 1,7 und 12 Stunden).

Dass die Untersuchungsergebnisse in den Thrombozyten weit weniger eindeutig, wenn nicht sogar widersprüchlich ausfallen, zeigen die folgenden Studien. Norman et al. (1987) fanden eine Steigerung der MAO-B Aktivität bei Rauchern, die mit dem Rauchen aufhörten, was auf eine Reversibilität der Hemmung hindeuten könnte. Bei Raucherinnen stellten sie (1982) eine signifikant niedrigere Aktivität der MAO-B (bestimmt wurde lediglich  $V_{\max}$ ) als bei Nichtraucherinnen ( $n = 14$ ) ( $p < 0,001$ ) fest. Bei Männern ließ sich dieser Unterschied nicht nachweisen. Ebenso konnten Norman et al. (1987) eine inverse Korrelation zwischen der Thiocyanatkonzentration im Plasma (als Index der Rauchexposition) und der MAO-B Aktivität bei Frauen, nicht jedoch bei Männern feststellen. Orelund et al. (1981) fanden bei einer Gruppe, die sich nur aus Raucherinnen zusammensetzte, eine niedrigere Aktivität der MAO-B in den Thrombozyten als bei Ex- und Nichtraucherinnen. Diese beiden Studien zeigen, dass die Hemmung der MAO-B geschlechtsabhängig zu sein scheint. Der Einfluss auf die MAO-B schlug sich bei der Studie von Orelund et al. (1981) nur auf  $V_{\max}$  nicht jedoch auf den  $K_m$ -Wert nieder. Berlin et al. (1995) fanden bei 88 Rauchern, die zu etwa einem Drittel aus Frauen und zwei Dritteln aus Männern bestanden, eine Aktivitätsminderung der MAO-B ( $V_{\max}$ ) von 53%. Bei dieser Untersuchung erfolgte keine Bestimmung des  $K_m$ -Wertes. Auch wurden die Ergebnisse nicht nach Männern und Frauen aufgeschlüsselt. Littlewood et al. (1984) fanden bei Kopfschmerzpatienten keinen Einfluss des Rauchens auf die Aktivität der MAO-B, selbst nicht bei Rauchern die mit dem Rauchen aufhörten und nach drei Monaten Abstinenz wieder damit begannen.

Bei den oben genannten Studien blieben andere Einflüsse auf die Enzymhemmung der MAO-B wie Rauchfrequenz, Lebensalter der Thrombozyten und die Herkunft des Tabaks größtenteils unberücksichtigt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es bisher keine Studie gibt, die zweifelsfrei eine Hemmung der Aktivität der MAO-B durch Rauchen bei Männern in den Thrombozyten nachweisen konnte.

Eindeutiger und übereinstimmender sind hingegen die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen. Yu und Boulton (1987) stellten bei der Bedampfung von Lungengewebe von Ratten mit Rauch, der aus der Verbrennung von Tabak gewonnen wurde, einen gemischten Hemmtyp der MAO (A und B nicht unterschieden) fest, der bei höheren Konzentrationen irreversibel war. Das Fraktionieren der Lösung zeigte, dass nur die Substanzen, die ein niedriges Molekulargewicht auf-



wiesen, beide Isoformen des Enzyms hemmten. Die inhibierenden Substanzen konnten nicht identifiziert werden. Carr und Basham (1991) fanden im Rattenhirn zwischen mit Rauchextrakt versetztem Rattenhirnhomogenat und Kontrollen signifikante Differenzen sowohl im  $K_m$ -Wert als auch bei der Enzymaktivität  $V_{max}$ . Der Rauchextrakt wurde aus Verbrennung und anschließend in Lösung bringen gewonnen (75  $\mu\text{g}$  feste Rauchbestandteile/ml).

Die Unterschiede zwischen den bisher veröffentlichten Studien, Tierexperimenten und meiner Arbeit lassen sich eventuell zusätzlich durch unvermeidbare Schwierigkeiten in der Methodik und der Probandenrekrutierung erklären: Die zweimalige Waschung der Thrombozyten führt möglicherweise zum geringen Auswaschen der reversibel gebundenen Inhibitoren. Dies könnte beispielsweise Norharman betreffen, das zum einen reversibel, zum anderen mit relativ geringer Affinität ( $K_i = 800 \text{ nM}$ ) an MAO-B bindet und deshalb eventuell abdissoziieren könnte. Wenn die Thrombozyten jedoch nicht so intensiv gewaschen werden, kommt es zu falschen Ergebnissen durch Kontamination mit Plasmabestandteilen.

Berlin et al. (1995) rekrutierten starke Raucher die einen hohen Score im Fagerström-Test hatten. Die Probanden meiner Studie waren im Schnitt zwar ebenso starke Raucher (durchschnittlich etwa 20 Zigaretten pro Tag), jedoch wiesen sie einen wesentlich niedrigeren Fagerström Score auf, was auf eine geringere Abhängigkeit hinweist.

Die Hemmung der MAO-Aktivität wirkt mit der dopaminerge Effektormechanismen steigenden Wirkung der Dopaminagonisten synergistisch, indem es Dopamin davor bewahrt, verstoffwechselt zu werden. Bei Patienten mit M. Parkinson würde eine Hemmung der MAO-B auch das von den verbliebenen Dopaminzellen produzierte Dopamin davor bewahren verstoffwechselt zu werden (von Knorrning & Orelund 1985). Diese Hypothese wird von einer PET-Studie von Salokangas et al. (2000) unterstützt, die die präsynaptische Dopaminaktivität bei männlichen Rauchern (durchschnittlich 19,8 Zigaretten pro Tag) und Nichtrauchern untersuchten. Es konnte eine signifikant höhere Aufnahme der Dopamin-Vorstufe [ $^{18}\text{F}$ ]DOPA in den Basalganglien bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern festgestellt werden. Dies wurde in den Zusammenhang mit früheren Beobachtungen gestellt, dass Raucher eine niedrigere MAO-A und MAO-B Aktivität im Gehirn aufweisen (Fowler et al., 1996, 1996a) und dass deshalb der Abbau von Dopamin vermindert ist, durch Tabakbestandteile die Freisetzung von Dopamin jedoch erhöht wird.

Matsubara et al. (1993) hatten als physiologische Konzentration von Norharman in der humanen substantia nigra 16 nmol/kg Gewebe nachgewiesen. Dies entspricht einer 27,6fachen Anreiche-

rung im Vergleich zum parietalen Kortex (0,58 nmol/kg). Im Rattengehirn fanden Fekkes und Bode (1993) sogar eine Konzentration von 60 nmol/kg.

Im Gehirn konnten Greiner et al. (1983) tierexperimentell nach intraperitonealer Injektion von [<sup>14</sup>C]Tetrahydronorharman eine 13fache Anreicherung im Vergleich zum Plasma feststellen. [<sup>14</sup>C]Tetrahydronorharman hat sehr ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften wie Norharman, so dass erwartet werden kann, dass auch Norharman leicht die Blut-Hirnschranke passieren kann und sich ebenfalls im Gehirn anreichert. Dort, ebenso wie in den Thrombozyten lässt sich die Anreicherung von Norharman und Harman zumindest teilweise durch die chemische Struktur erklären. Diese beiden  $\beta$ -Carboline besitzen keine hydrophilen Substituenten. Sie unterscheiden sich lediglich durch die Methylgruppe in Position 1 des Harman-Moleküls. Somit haben beide Substanzen einen stark lipophilen Charakter, der die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke stark begünstigt und so zu einer Anreicherung im Gehirn führen kann. Überdies reichern sich Norharman und Harman in den pigmentierten Regionen des ZNS an und sind dort noch nach 30 Tagen in erhöhter Konzentration nachweisbar, wie Östergren et al. (2004) tierexperimentell nachweisen konnten. Sie zeigten autoradiographisch, dass Norharman und Harman spezifisch in den neuromelaninhaltigen Neuronen binden. Höchstwahrscheinlich können Harman und Norharman auch ohne Transporter in die dopaminergen Neuronen aufgenommen werden und dort akkumulieren (Storch et al., 2004).

Wenn zusätzlich zu den physiologischen Konzentrationen von Norharman die Zufuhr aus dem Tabakrauch mit einer Anreicherung im Hirngewebe, und hierbei speziell in den melanin-haltigen Neuronen der substantia nigra, der Hirnregion, die beim M. Parkinson besonders betroffen ist, hinzukommt, ist unter diesen Bedingungen eine Hemmung der MAO-B Aktivität durchaus denkbar. Eine endgültige Klärung der Frage könnten PET-Studien mit markiertem Norharman herbeiführen.

#### **4.8. Einfluss des Rauchens auf 5-Hydroxytryptamin**

5-HT kann aus dem kardiovaskulären System über Endothelzellen und sympathische Nervenendigungen entfernt werden (Verbeuren 1989). Zwei Prozesse limitieren den Anstieg von 5-HT im Plasma und konsekutiv wahrscheinlich auch in den Thrombozyten:

- 1.) der enzymatische Abbau durch MAO besonders in der Leber und
- 2.) die rasche Entfernung von 5-HT durch das Endothel in der Lunge (Gillis 1985). Das freie 5-HT, das der Desaminierung in der Leber entkommt, wird zu der Lunge transportiert, wo es rasch aus dem Kreislauf durch Aufnahme in das Endothel und die glatte Muskulatur entfernt wird. Im Anschluss erfolgt die oxidative Desaminierung, katalysiert durch die MAO-A (Verbeuren 1989).

#### **Neuronaler und nicht neuronaler Transport von 5-HT**

Serotonin kann ebenso wie die anderen zentral ausgeschütteten monoaminergen Botenstoffe wie Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin durch zwei verschiedene Gruppen von Transportsystemen inaktiviert werden. Zum einen erfolgt die Inaktivierung durch den neuronalen Uptake 1 Transport, zum anderen durch den extraneuronalen Transport. Dieser wurde früher als Uptake 2 bezeichnet. Der neuronale Uptake 1 (auch Kokain-sensitive Aufnahme genannt) ist von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  abhängig und zeigt eine hohe Affinität für Monoamine. Zum Uptake 1 gehören der Serotonintransporter (5-HTT), der Dopamintransporter (DAT) und der Noradrenalintransporter (NET) (Nelson, 1998). Der extraneuronale Uptake 2 (auch steroid-sensitiver Uptake genannt) ist  $\text{Na}^+$  unabhängig und wird als Hochkapazitätstransporter bei niedriger Affinität bezeichnet. Zu dieser Gruppe gehören der OCT1 (organic cation transporter), der OCT2 und der EMT (extraneuronal monoamine transporter) (ursprünglich OCT3 genannt) (Gründemann et al., 1998, Kekuda et al., 1998). OCT1 und EMT finden sich in der Lunge, OCT1 darüber hinaus in Niere, Leber und Darm. OCT2 wird hauptsächlich in der Niere und im Gehirn exprimiert. EMT weist eine geringe Organspezifität auf und findet sich in sehr vielen Geweben, besonders stark wird er jedoch in der Plazenta, der Lunge und dem Herzen exprimiert (Haag, 2004). Im Gehirn ist die mRNA für sämtliche neuronalen und nicht neuronalen Transporter nachweisbar (Horvath et al., 2003).

### **Selektivität und Spezifität**

Die Selektivität der Transporter NET, DAT und 5-HTT ist begrenzt. So kann beispielsweise NET besser Dopamin als Noradrenalin aber 5-HT nur mit geringer Potenz transportieren. Dennoch hat der NET für 5-HT eine wesentlich höhere Kapazität (Effizienz) als für Noradrenalin. DAT kann kein Noradrenalin transportieren, ist aber dazu in der Lage, 5-HT ins Striatum aufzunehmen. Der 5-HTT kann sowohl 5-HT als auch mit geringer Affinität Dopamin und Noradrenalin transportieren (Frazer et al. 1999).

### **Abbau und Transport von 5-HT in der Lunge**

In der Lunge ist die Aufnahme durch den Uptake 2 fünfmal größer als durch den Uptake 1 (Eisenhofer 2001). Diese fünfmal so hohe Aufnahme konnte zumindest für Noradrenalin nachgewiesen werden (Russel & Kircher, 1985). 5-HT kann bei hohen Konzentrationen auch durch den Uptake 2 transportiert werden (Paczkowski et al., 1996). Dieser spielt also neben dem 5-HTT in der Lunge eine wichtige Rolle für die 5-HT-Inaktivierung. Aus der Lunge eines anästhesierten Hundes kann intravenös infundiertes 5-HT bis zu 90% entfernt werden. Die Entfernung von 5-HT erfolgt unabhängig von der neuronalen Aufnahme, was durch eine sympathische Denervation mittels 6-Hydroxydopamin nachgewiesen werden konnte (Iwasawa & Gillis, 1974).

Yu und Boulton (1987) wiesen nach, dass das Bedampfen von Lungengewebe von Ratten mit Zigarettenrauch zu einer erheblichen Reduktion der Desaminierung von Serotonin und somit zu erhöhten Spiegeln von Serotonin in der Lunge führt. Weiterhin stellte schon Essman (1977) eine Erhöhung des Serotonins als Folge von Zigarettenrauchexposition in der Haut von Mäusen fest. Da er ebenfalls eine Reduktion der Aktivität der MAO nachweisen konnte, vermutete er, diesen Effekt durch erhöhte 5-HT Aufnahme einerseits und verminderten Abbau von 5-HT andererseits erklären zu können. Karhi et al. (1982) fanden in einem in vitro Experiment bei dem Rattenlungengewebe mit 5-HT perfundiert und mit Rauch bedampft wurde, dass Zigarettenrauch die Metabolisierung von 5-HT reduziert aber zu keiner Hemmung der Aufnahme von 5-HT in das Lungenendothel führt.

### **5-HT in den Thrombozyten**

LG Schmidt et al. (1997) konnten bei Rauchern und Nichtrauchern keine Unterschiede in den 5-HT Ausgangskonzentrationen feststellen. Offenbar handelte es sich bei den Probanden um nicht so starke Raucher wie in der hier vorgestellten Studie. Hier lag die Ausgangskonzentration der Raucher signifikant höher als bei den Nichtrauchern. Bei den Nichtrauchern veränderte sich im Zeitverlauf nur wenig. Das Rauchen einer Zigarette bewirkte einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der 5-HT-Konzentration, der sehr schnell wieder rückläufig war.

In der vorliegenden Studie bewirkt das Rauchen einer Zigarette bei den Rauchern einen starken Abfall der 5-HT-Konzentration in den Thrombozyten. Dieser Abfall wird durch das Rauchen von zwei weiteren Zigaretten quasi aufgehoben. Bereits unmittelbar nach dem zweiten Mal Rauchen stiegen die 5-HT-Konzentrationen an, um dann nach zwei Stunden wieder das Ausgangsniveau zu erreichen. Neu ist der überraschende Verlauf nach dem zweiten Mal Rauchen. Danach ist der 5-HT-Abfall nicht mehr nachweisbar. Der Befund steht in Widerspruch zu der eingangs formulierten Hypothese, dass aufgrund der Hemmung der MAO-B Enzymaktivität durch die Inhaltstoffe des Rauchens, 5-HT als Substrat der MAO-B (bei hohen Konzentrationen) in den Thrombozyten nicht mehr metabolisiert werden kann. Somit rechneten wir mit einem Anstieg der 5-HT-Konzentration in den Thrombozyten und konsekutiv auch im Blutplasma. Offensichtlich spielen noch eine Reihe weiterer Mechanismen für die Metabolisierung und Ausschüttung von 5-HT eine Rolle.

Der Abfall von 5-HT nach dem ersten Mal Rauchen, ist ebenso wie der Anstieg bei den Nichtrauchern in der Literatur bereits beschrieben worden:

Marasini et al. (1986) fanden bei Rauchern nicht signifikant erhöhte 5-HT Konzentrationen für den Basalwert. Unmittelbar nach dem Rauchen sanken die Konzentrationen bei den Rauchern etwas ab, um dann 90 min später beinahe wieder Ausgangswerte zu erreichen. Bei den unerfahrenen Rauchern (Nichtrauchern) bewirkte das Rauchen zunächst einen Anstieg der Konzentration von 5-HT in den Thrombozyten. 90 min später wurde auch hier ein Konzentrationsabfall bis leicht unterhalb des Ausgangswertes gemessen. Marasini et al. (1986) vermuteten, dass der 5-HT-Abfall durch eine verminderte Thromboxan A<sub>2</sub> Synthese bedingt ist. Sie spekulierten, dass der unterschiedliche Effekt bei den Nichtrauchern an einer veränderten Plättchensensitivität liegen könnte, da chronische Raucher auch eine veränderte Sensitivität gegenüber den adrenergen Effekten des Nikotins hätten.

Racké et al. (1992) fanden bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern fast doppelt so hohe Serotoninkonzentrationen in den Thrombozyten. Bei den Rauchern bewirkte das Rauchen einer Zigarette bei mindestens einstündiger Abstinenz keine Veränderung der 5-HT-Konzentration in den Thrombozyten. Bei den Nichtrauchern kam es jedoch nach dem Rauchen einer Zigarette zu einem zwei bis zehnfachen Anstieg der 5-HT-Konzentration. Da dieser Effekt, allerdings weniger stark ausgeprägt, auch bei Anwendung eines Nikotinkaugummis auftrat, liegt die Vermutung nahe, dass Nikotin die Nikotinrezeptoren in den enterochromaffinen Zellen des Intestinaltraktes, die für die Ausschüttung von 5-HT verantwortlich sind, stimuliert. Bei den Rauchern wäre dieser Effekt durch die bereits stattgehabte Desensibilisierung nicht mehr nachweisbar.

In der hier vorgestellten Untersuchung differieren die Befunde zwischen den Nichtrauchern und Rauchern. Es ist anzunehmen, dass für die Abnahme von 5-HT nach dem ersten Mal Rauchen (sowohl im Blutplasma als auch in den Thrombozyten) Zigarettenbestandteile verantwortlich sind, die Absorptionsmechanismen stimulieren. Für den Effekt nach dem zweiten Mal Rauchen (nahezu keine Veränderung der Konzentrationen) spielt wahrscheinlich Nikotin, das sich dann mittlerweile in vielen Kompartimenten angereichert hat, eine entscheidende Rolle.

#### **4.8.1. Einfluss des Rauchens auf die Konzentration von 5-Hydroxytryptamin im Blutplasma und den Thrombozyten**

Für unsere Studie war die zeitgleiche Messung von 5-HT im Plasma und in den Thrombozyten von Interesse, da die Aufnahme von Serotonin in die Thrombozyten aus anderen Geweben über das Kompartiment Plasma erfolgt. Der extrazelluläre Pool von 5-HT im Blutplasma hängt unter physiologischen Bedingungen wiederum maßgeblich vom hochaffinen 5-HT Transport in die Thrombozyten ab (Ortiz & Artigas, 1992)

Bei den Nichtrauchern führt das Rauchen beide Male zu einem Anstieg der 5-HT Konzentration, die allmählich wieder abfällt, ohne dass sich die Änderungen statistisch signifikant unterscheiden. Dies entspricht den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, dass die 5-HT Konzentration in den Thrombozyten durch Rauchen ansteigt und ohne gehemmte MAO-B abgebaut würde.

Bei den Rauchern bewirkt das Rauchen einer Zigarette einen deutlichen Abfall der 5-HT Konzentration im Blutplasma. Dieser Befund legt nahe, dass eliminierende Prozesse in der Leber (MAO-A) und der Lunge (MAO-A) aktiv sind. Andererseits greifen Prozesse der Freisetzung

aus den enterochromaffinen Zellen (Nikotin) zum Zeitpunkt der Blutabnahmen noch nicht. Nach dem zweiten Mal Rauchen kam es jedoch zu einem allmählichen erneuten Anstieg der Konzentration, so dass zwei Stunden nach dem zweiten Rauchen die Konzentrationen wieder im Bereich des Ausgangswertes lagen.

Wir erwarteten, dass die 5-HT Konzentration im Plasma nach dem zweiten Mal Rauchen bei den Rauchern noch weiter abnimmt. Dies trat jedoch nicht ein. 30 Minuten nach der zweiten und dritten Zigarette sind die 5-HT Konzentrationen signifikant höher als unmittelbar nach dem zweiten Mal Rauchen. Wie oben beschrieben bewirkt Nikotin die Freisetzung von 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen, der Hauptressource des Plasma-5-HT. Der Grund, warum ein Anstieg nicht nach dem ersten Mal Rauchen zu beobachten ist, könnte an dem von uns gewählten Zeitfenster gelegen haben. Beim ersten Mal Rauchen lagen nur 15 Minuten zwischen dem Rauchen und der Blutentnahme. Dieser Zeitraum könnte zu kurz sein, um die erforderliche Schwellenkonzentration von Nikotin zu erreichen, um die Ausschüttung von 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen zu bewirken. Die Eliminationshalbwertszeit von Nikotin im venösen Blutplasma beträgt 2,5 Stunden (Benowitz et al., 1990). 5-HT würde aus den enterochromaffinen Zellen im Duodenum über den portalen Kreislauf und die Leber in den großen Kreislauf gelangen. Nach der zweiten Sitzung, bei der zwei Zigaretten geraucht wurden, wird die Schwellenkonzentration von Nikotin überschritten und 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen ausgeschüttet. Dies gleicht die Elimination von 5-HT aus dem Blutplasma durch die Aufnahme und den Abbau von 5-HT in der Lunge aus.

Von den Plasma-Konzentrationsveränderungen waren interessanterweise die 5-HT-Konzentrationen in den Thrombozyten nach dem zweiten Mal Rauchen nur wenig betroffen. Möglicherweise liegt dies daran, dass die Aufnahme über den 5-HT-Transporter mit einer gewissen Verzögerung erfolgt.

Es ist anzunehmen, dass nach dem ersten Mal Rauchen bestimmte Bestandteile des Zigarettenrauches an der Membraninnenseite der glatten Muskulatur der Lungenkapillaren akkumulieren. Diese dienen als Aktivatoren, um die von uns vermutete Stimulation des Einstroms von 5-HT in die Zelle mit der Konsequenz der Abnahme von 5-HT im Plasma zu bewerkstelligen. Die Pharmakologie von EMT ist bisher noch nicht ausreichend erforscht, um die in Frage kommenden Substanzen die als Aktivator dienen können, zu benennen. Die Ko-Inkubation mit OCT-2 transfizierten HEK-293 Zellen mit Histamin führt zu einer etwa 3,2fach höheren Transportkapazität für MPP<sup>+</sup> (Gründemann et al., 1999). Es könnte also sein, dass beispielsweise durch das beim

Rauchen freigesetzte Histamin (Lewis et al., 1972) der Transport von 5-HT aus dem Plasma gefördert wird. Dies würde zumindest die Abnahme von 5-HT im Plasma und den Thrombozyten erklären.

Die Gründe für den entgegengesetzten Verlauf der Konzentrationen bei Nichtrauchern und Rauchern nach der ersten Zigarette sind unbekannt. Wenn man davon ausgeht, dass Nikotin an den entereochromaffinen Zellen des Duodenums zum Zeitpunkt der Blutabnahme noch nicht ausreichend wirken kann, können nur unterschiedliche Kapazitäten der Elimination bei gleichzeitiger Ausschüttung von 5-HT aus den Thrombozyten die Veränderungen erklären. Es muss demnach postuliert werden, dass die Eliminationskapazität bei den Rauchern in der Lunge höher ist als bei den Nichtrauchern. Da Histamin die Transportkapazität in der Lunge stark erhöht (vervielfacht), sind Beobachtungen an Meerschweinchen in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Lewis und Nicholls (1972) haben beobachtet, dass nach Tabakrauchexposition für 29 Tage die Abbaukapazität der Lunge für Histamin auf die Hälfte verringert ist. Allerdings ist die Histaminkonzentration leicht erniedrigt. Es ist bekannt, dass Rauchen Histamin aus den Mastzellen freisetzt, was wesentlich zum Bronchospasmus beiträgt. Bei den Rauchern, die mehr Bestandteile des Tabakrauchs aufnehmen, wie diese Studie wieder bestätigt hat, könnte also mehr Histamin freigesetzt werden und dadurch mehr 5-HT aus dem Blut in das Lungenendothel transportiert werden als bei den Nichtrauchern. Bei den Nichtrauchern würde sich die möglicherweise durch Nikotin ausgelöste Freisetzung von 5-HT aus den Thrombozyten, zu denen Nikotin ohne wesentliche Verzögerung gelangt, zu einer Verdopplung der Plasmakonzentration führen. Allerdings bleibt bei dieser Interpretation offen, warum die 5-HT Konzentration in den Thrombozyten bei den Nichtrauchern leicht ansteigt. Interessanterweise verhalten sich die Konzentrationsverläufe nach der zweiten Rauchersitzung in beiden Gruppen gleichsinnig. Dies spricht dafür, dass unter diesen Bedingungen Nikotin eine größere Rolle für die Verläufe spielt.

#### **4.8.2. Korrelation der 5-Hydroxytryptaminkonzentrationen in Plasma und Thrombozyten**

Die Korrelation von 5-HT im Plasma und in den Thrombozyten suggerieren interindividuelle Unterschiede in der Regulation der peripheren 5-HT Konzentrationen. Die hohe inverse Korrelation bei der ersten Blutentnahme vor dem Rauchen bei den Rauchern ist bemerkenswert und noch nicht zuvor beschrieben worden.



Rauchen verursacht einen starken Transport von 5-HT aus den beiden Kompartimenten worauf die positive Korrelation der 5-HT-Konzentrationen schließen lässt. Überdies zeigt sich nach dem zweiten Mal Rauchen, dass Nikotin die Ausschüttung von 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen stimuliert und so die 5-HT-Plasmakonzentration steigert und schließlich erneut zu einer positiven Korrelation führt. Der quantitative Anteil des zeitgleich stattfindenden 5-HT-Transports in das Endothel und die glatte Muskulatur der Lunge konnte jedoch mittels dieser Studie nicht direkt nachgewiesen werden.

Interindividuelle Unterschiede in der Regulation peripherer Plasma-5-HT-Konzentrationen konnten auch in einer anderen Studie nachgewiesen werden, bei der Alkoholranke mit dissozialer Persönlichkeitsstörung etwa dreimal höhere 5-HT-Konzentrationen in den Thrombozyten aufwiesen, als Alkoholranke ohne diese Komorbidität.