

Glutamat- und GABA-Konzentration in Gehirn und Liquor Cerebrospinalis von Ratten unter Behandlung mit Phosphatidylcholin

D. Claus, J. S. Kim, J. C. Aschoff und H. H. Kornhuber

Abteilung Neurologie, Universität Ulm (Prof. D. H. H. Kornhuber),
Steinhövelstrasse 9, D-7900 Ulm, Bundesrepublik Deutschland

Effect of Chronic Phosphatidylcholine Treatment on Glutamate and GABA Concentrations in Rat Brain and CSF

Summary. Phosphatidylcholine increases CNS concentrations of acetylcholine. In rats we investigated whether or not phosphatidylcholine also influences the neurotransmitters glutamate and GABA.

In 17 rats 1.5 g/kg Lethicon perorally was administered daily for 2 weeks, 15 rats served as controls. In tissue from frontal cortex, striatum, substantia nigra, cerebellar cortex no significant differences between treated and untreated animals were found in glutamate or GABA concentrations.

A central nervous interaction between the cholinergic system and the neurotransmitters glutamate and GABA, therefore, could not be demonstrated after 2 weeks of phosphatidylcholine intake.

Key words: Phosphatidylcholine – Glutamate – GABA – Brain – CSF – Friedreich's ataxia

Zusammenfassung. Um zu untersuchen, ob die Gabe von Phosphatidylcholin, die den zentralnervösen Acetylcholingehalt erhöht, einen Einfluß auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA hat, wurde 17 von 32 Ratten über 14 Tage 1,5 g/kg Lethicon® pro die peroral gegeben.

Die fluorometrische Messung der Konzentrationen von Glutamat und GABA in frontalem Cortex, Striatum, Nigra, Kleinhirnrinde sowie von Glutamat im Liquor cerebrospinalis ließ keine signifikanten Unterschiede gegenüber Kontrolltieren erkennen.

Nach zweiwöchiger Gabe von Phosphatidylcholin konnte keine zentralnervöse Interaktion des cholinergen Systems mit den Neurotransmittern Glutamat und GABA nachgewiesen werden.

Schlüsselwörter: Phosphatidylcholin – Glutamat – GABA – ZNS – Liquor cerebrospinalis – Friedreichsche Ataxie

Einleitung

Bei der Friedreichschen Ataxie wurden verschiedene, vermutlich genetisch determinierte, Stoffwechselabnormitäten entdeckt. So findet sich nicht selten (Barbeau et al. 1976; Shapcott et al. 1976) ein Diabetes mellitus, daneben verminderte Glukosetoleranz und überschießende Insulinantwort auf Glukosebelastung. Das kann mit einem Defekt der Lipoamiddehydrogenase, einem Enzym des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zusammenhängen (Filla et al. 1978; Haubrich et al. 1979).

Infolge eines defekten Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes wird die Synthese von Azetyl-Coenzym A und Azetylcholin im ZNS vermindert (Barbeau 1978; Jenden 1979). Cholin ist das limitierende Substrat der cerebralen Azetylcholin-Synthese (Haubrich et al. 1979). Durch perorale Gabe von Phosphatidylcholin können die Cholinpiegel in Serum und Liquor um mehrere hundert Prozent sowie der Azetylcholingehalt im ZNS gesteigert werden (Eckernäs 1977; Growdon et al. 1977; Growdon 1979; Hirsch et al. 1977; Zeisel 1980). Im Tierversuch wurde bei Ratten eine gute intestinale Resorption (Fox et al. 1979) von Phosphatidylcholin sowie ein Anstieg der ZNS-AzetylcholinKonzentration nach oraler Gabe nachgewiesen (Cohen und Wurtman 1976; Hirsch und Wurtman 1978).

Barbeau (Barbeau 1978) setzte Lecithin folgerichtig zur Behandlung der Friedreichschen Ataxie ein und fand einen positiven Effekt.

Weitere Untersuchungen (Huxtable et al. 1979) zeigten, daß die Konzentrationen von Glutamat, Aspartat und GABA im Kleinhirn von Patienten, die an Friedreichscher Ataxie gestorben waren, vermindert sind.

Eine Kombination hereditärer Defekte des Stoffwechsels dieser Aminosäuren und der assoziierten GABA mit o. g. Abnormitäten des Glukosemetabolismus ist denkbar (Butterworth et al. 1980). Es ist auch vorstellbar, daß eine Steigerung des zentralnervösen Cholinangebotes und Azetylcholingehaltes infolge vermehrter Aktivität cholinergischer Interneurone (Davis et al. 1979) zu einer höheren GABA-Ausschüttung führt.

Eine Unterfunktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes bei Friedreichscher Ataxie kann eine verlangsamte Oxydation des Pyruvats und einen relativen Mangel an Azetyl-Coenzym A zur Folge haben. Es ist darum möglich, daß wegen dieses Azetyl-Coenzym A-Defizits der Citrat-Zyklus von seiten des Glutamat- und Aspartat-Pools her aufgefüllt wird (Barbeau 1979). Vermehrtes Cholinangebot kann aber über eine Steigerung der Azetylcholinsynthese das Azetyl-Coenzym A-Defizit verstärken und auch auf diesem Wege den intrazellulären Gehalt von Glutamat, Aspartat und infolgedessen auch GABA vermindern.

Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, untersuchten wir, ob die Gabe von Phosphatidylcholin bei Ratten die Konzentration von Glutamat und GABA im ZNS und Liquor cerebrospinalis (CSF) beeinflußt.

Material und Methode

Es wurden 32 CHBB Rattenmännchen von 300–350 g Körpergewicht in einem gleichmäßig temperierten und feuchten Raum mit regelmäßigen Tag- und Nacht-Zyklen bei Fütterung

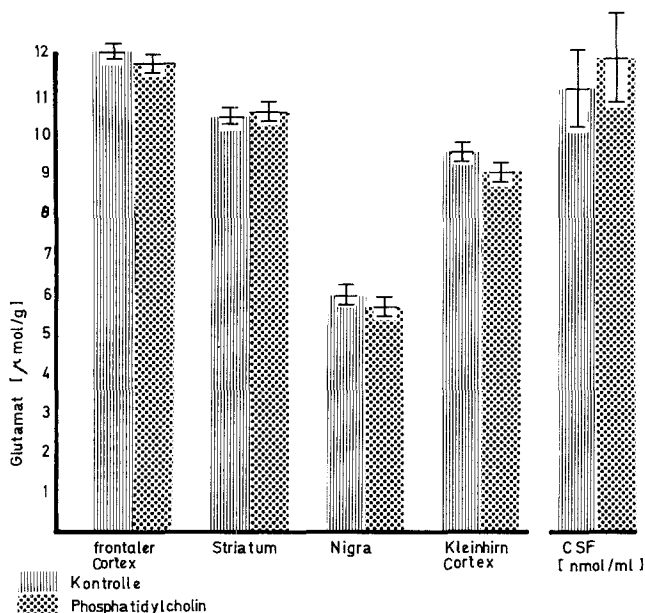


Abb. 1. Glutamatkonzentration in den untersuchten Hirnstrukturen und im Liquor cerebrospinalis bei mit Phosphatidylcholin behandelten und unbehandelten Tieren

nach Bedarf gehalten. Zwei Wochen lang erhielten 17 Tiere täglich 5 ml einer Suspension von Phosphatidylcholin (entsprechend 1,5 g/kg Lethicon® der Firma Nattermann, Köln; gereinigtes Soja-Lecithin-Granulat mit einem Gehalt von 50% Phosphatidylcholin) per Magensonde. Die Fütterung erfolgte täglich zwischen 9 h und 10 h, zuletzt am Versuchstag, an dem abwechselnd die Versuchs- und die Kontrolltiere geopfert wurden.

Den narkotisierten Tieren (0,4 g/kg Hexobarbital-Natrium, Evipan®) wurden nach Präparation der Membrana atlantooccipitalis durch Suboccipitalpunktion 120–180 μl Liquor unblutig entnommen und sofort auf -80°C gefroren.

Anschließend wurde am lebenden Tier das Gehirn entnommen, um (Kim et al. 1981) Gewebeproben des frontalen Cortex, rostralen Striatums, der Substantia nigra und der Kleinhirnrinde zu gewinnen. Die Gewebeproben wurden in 300 μl eisgekühlter 0,5 M Perchlorsäure, die ein mM EDTA enthielt, in Glashomogenisatoren homogenisiert, anschließend mit 4000 Umdrehungen/min für 15 min zentrifugiert. 200 μl des Überstandes wurden bis zur Analyse bei -80°C tiefgefroren.

In den Gewebeproben sowie im Liquor cerebrospinalis (CSF) wurden die Konzentrationen von Glutamat und GABA fluorometrisch mit der Methode nach Graham und Aprison (Graham and Aprison 1966; Kim et al. 1981) gemessen.

Ergebnisse

Wie die Abb. 1 und 2 zeigen, finden sich für die Konzentrationen von Glutamat und GABA keine signifikanten Differenzen zwischen den mit Phosphatidylcholin gefütterten und den unbehandelten Versuchstieren.

Weder in der frontalen Rinde noch in Substantia nigra oder im Striatum zeigen sich signifikante Unterschiede (Tabelle 1). Die größten Konzentrations-

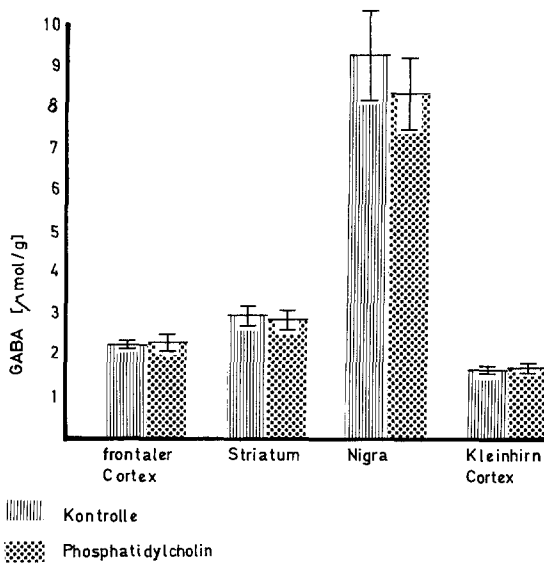


Abb. 2. GABA-Konzentration in den untersuchten Hirnstrukturen bei mit Phosphatidylcholin behandelten und Kontrolltieren

Tabelle 1. Konzentrationen von Glutamat und GABA in Rattenhirn und Liquor unter chronischer Behandlung mit Phosphatidylcholin. Durchschnittswerte \pm SEM, Anzahl der Versuchstiere in Klammern

	Glutamat ($\mu\text{mol/g}$)		GABA ($\mu\text{mol/g}$)	
	Kontrollen	Phosphatidylcholin	Kontrollen	Phosphatidylcholin
Frontaler Cortex	12,07 \pm 0,19 (17)	11,77 \pm 0,22' (15)	2,23 \pm 0,10 (12)	2,30 \pm 0,21 (10)
Striatum	10,42 \pm 0,19 (17)	10,53 \pm 0,23 (15)	2,97 \pm 0,23 (10)	2,85 \pm 0,23 (12)
Nigra	5,92 \pm 0,23 (17)	5,63 \pm 0,23 (15)	9,27 \pm 1,06 (10)	8,34 \pm 0,85' (12)
Kleinhirn-Cortex	9,52 \pm 0,23 (17)	9,01 \pm 0,23'' (15)	1,67 \pm 0,09 (11)	1,71 \pm 0,11 (11)
CSF	(nmol/ml)			
	11,11 \pm 0,98 (16)	11,88 \pm 1,10 (10)		

' $P > 0,25$; '' $P > 0,10$

differenzen finden sich bei Glutamat in der Kleinhirnrinde, der Unterschied ist nicht signifikant ($P > 0,1$) und ihm steht eine minimal ansteigende Konzentration von GABA in der gleichen Hirnstruktur entgegen.

Im Liquor konnte wegen der geringen abpunktierten Menge nur das Glutamat gemessen werden, wo die Werte mit 11,11 und 11,88 nmol/ml weitgehend identisch sind.

Diskussion

Anhand früherer Untersuchungen (Cohen und Wurtman 1976; Hirsch und Wurtman 1978) war nachgewiesen worden, daß die perorale Gabe von Phosphatidylcholin bei Ratten zu einem Anstieg des zentralnervösen Cholingehaltes führt. Dieser Anstieg und die Zunahme der Azetylcholinkonzentration kann aufgrund der täglich gegebenen Menge von durchschnittlich 1,5 g/kg Lethicon® (50% Phosphatidylcholin) bei den Versuchstieren vorausgesetzt werden.

Über die oben beschriebenen Mechanismen (Barbeau 1979; Davis et al. 1979) konnte demnach eine Verminderung des intrazellulären Glutamat- und GABA-Pools sowie eine vermehrte GABA-Ausschüttung erwartet werden.

Beide Annahmen haben sich anhand der Ergebnisse nicht bestätigt. Die Steigerung des zentralnervösen cholinergen Einflusses hat den Gehalt von Glutamat und GABA weder in den untersuchten Hirnstrukturen (frontaler Cortex, Striatum, Substantia nigra, Kleinhirnrinde) noch die Glutamatkonzentration im Liquor cerebrospinalis signifikant verändert. Somit fand sich kein Anhalt für die Entleerung intrazellulärer Speicher oder vermehrte nigrostriatale GABA-Ausschüttung.

Auch in der Kleinhirnrinde, wo bei Heredoataxien ein Mangel an Glutamat, Aspartat und GABA nachgewiesen worden war (Huxtable et al. 1979), konnten keine signifikanten Konzentrationsdifferenzen für GABA und Glutamat gemessen werden. Während der Glutamatgehalt hier gering absank (von 9,52 auf 9,01 $\mu\text{mol/g}$, $P > 0,1$), ließ die Konzentration von GABA diese Tendenz nicht erkennen.

In unserer Untersuchung wurden statische Werte gemessen, deren Konstanz nicht ohne weiteres Veränderungen in den Fließgleichgewichten ausschließt, aus denen sie hervorgehen. Gegenregulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung intrazellulärer Glutamat- oder GABA-Spiegel sind möglich. Allerdings machen die unveränderten Liquorkonzentrationen eine Verstärkung der neuronalen Sekretion von Glutamat unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte bei den untersuchten Tieren nach zweiwöchiger Gabe von Phosphatidylcholin keine zentralnervöse Interaktion des cholinergen Systems mit den Neurotransmittern Glutamat und GABA nachgewiesen werden. Es ist dennoch nicht ausgeschlossen, daß eine Langzeitbehandlung mit Phosphatidylcholin über Monate und Jahre die Konzentration von Glutamat und GABA im Zentralnervensystem verändert.

Literatur

- Barbeau A (1978) Emerging treatments: Replacement therapy with choline or lecithin in neurological diseases. *J Can Sci Neurol* 5: 157-160
- Barbeau A (1979) Friedreich's ataxia 1979: An overview. *J Can Sci Neurol* 6: 311-319
- Barbeau A, Butterworth RF, Ngo T, Breton G, Melancon S, Shapcott D, Geoffroy G, Lemieux B (1976) Pyruvate metabolism in Friedreich's ataxia. *J Can Sci Neurol* 3: 379-388
- Butterworth RF, Landreville F, Hamel E, Merkel A, Giguere F, Barbeau A (1980) Effects of asparagine, glutamine and insulin on cerebral amino acid neurotransmitters. *J Can Sci Neurol* 7: 447-450

- Cohen EL, Wurtman RJ (1976) Brain acetylcholine: Control by dietary choline. *Science* 191 : 561-562
- Davis KL, Berger PA, Hollister LE (1979) Clinical and preclinical experience with choline chloride in Huntington's disease and tardive dyskinesia: Unanswered questions. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ (eds) *Nutrition and the brain*, vol. 5. Choline and lecithin in brain disorders. Raven Press, New York, pp 305-315
- Eckernäss SA (1977) Plasma choline and cholinergic mechanisms in the brain. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 449 : 9-62
- Filla A, Butterworth RF, Geoffroy G, Lemieux B, Barbeau A (1978) Serum and platelet lipamide dehydrogenase in Friedreich's ataxia. *J Can Sci Neurol* 5 : 111-114
- Fox JM, Betzing H, Lekim D (1979) Pharmacokinetics of orally ingested phosphatidylcholine. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ (eds) *Nutrition and the brain*, vol. 5. Choline and lecithin in brain disorders. Raven Press, New York, pp 95-108
- Graham LT, Aprison MH (1966) Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and gamma-aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal Biochem* 15 : 487-497
- Growdon JH, Cohen EL, Wurtman RJ (1977) Effects of oral choline administration on serum and CSF choline levels in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 28 : 229-231
- Growdon JH (1979) Choline, lecithin, and tardive dyskinesia. In: Piorier LJ, Sourkes TL, Bédard PJ (eds) *Advances in neurology*, vol. 24. Raven Press, New York, pp 387-394
- Haubrich DR, Gerber NH, Pflueger AB (1979) Choline availability and the synthesis of acetylcholine. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ (eds) *Nutrition and the brain*, vol. 5. Choline and lecithin in brain disorders. Raven Press, New York, pp 57-71
- Hirsch MJ, Wurtman RJ (1978) Lecithin consumption increases acetylcholine concentration in rat brain and adrenal gland. *Science* 202 : 223-225
- Hirsch MJ, Growdon J, Wurtman RJ (1977) Increase in hippocampal acetyl choline after choline administration. *Brain Res* 125 : 383-385
- Huxtable R, Azari J, Reisine T, Johnson P, Yamamura H, Barbeau A (1979) Regional distribution of amino acids in Friedreich's ataxia brains. *Can J Sci Neurol* 6 : 255-258
- Jenden DJ (1979) An overview of choline and acetylcholine metabolisms in relation to the therapeutic uses of choline. In: Barbeau A, Growdon JH, Wurtman RJ (eds) *Nutrition and the brain*, vol. 5. Choline and lecithin in brain disorders. Raven Press, New York, pp 13-24
- Kim JS, Kornhuber HH, Brand U, Menge HG (1981) Effects of chronic amphetamine treatment on the glutamate concentration in cerebrospinal fluid and brain: implications for a theory of schizophrenia. *Neurosci Lett* 24 : 93-96
- Shapcott D, Melancon S, Butterworth RF, Khoury K, Collu R, Breton G, Geoffroy G, Lemieux B, Barbeau A (1976) Glucose and insulin metabolism in Friedreich's ataxia. *J Can Sci Neurol* 3 : 361-364
- Zeisel SH (1980) Normal plasma choline responses to ingested lecithin. *Neurology* 30 : 1226-1229

Eingegangen am 16. März 1982