

Einfluß von Aethanol auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA

D. Claus, J. S. Kim, M. E. Kornhuber und Y. S. Ahn

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

Effect of Ethanol on Glutamate and GABA Levels in Rat Brain and CSF

Summary. The effect of chronic ethanol administration, 5 g/kg per day for 2 or 4 weeks, on the neurotransmitters glutamate and GABA was investigated in rats. An increase in GABA was found in the striatum, hippocampus, and substantia nigra, 8 or 12 h after the last ingestion of ethanol, this being masked by injection of barbiturate.

In addition an increase of glutamate has been found in the examined brain areas. This is consistent with the known effect of ethanol on brain Dopa metabolism and release.

Finally, the relevance of the results for the pathogenesis of withdrawal seizures and delirious states is discussed.

Key words: Ethanol – Barbiturate – Cortex – GABA – Glutamate – Hippocampus – Nigra – Striatum

Zusammenfassung. In zwei Versuchsserien wurde der Einfluß von chronischer Aethanolgabe (5 g/kg täglich) über 2 bzw. 4 Wochen auf die Neurotransmitter Glutamat und GABA bei Ratten untersucht. Dabei fand sich ein durch Barbiturat maskierter Anstieg der GABA-Konzentration in Striatum, Hippocampus und Substantia nigra, 8 bzw. 12 Stunden nach der letzten Aethanolgabe.

Für Glutamat konnte ebenfalls ein Anstieg in den untersuchten Hirnregionen gefunden werden, der mit den für Dopamin bekannten Veränderungen unter Aethanol vereinbar ist. Die Bedeutung für die Pathogenese hirnorganischer Anfälle und psychotischer Symptome nach chronischem Alkoholmißbrauch wird diskutiert.

Schlüsselwörter: Aethanol – Barbiturat – Cortex – GABA – Glutamat – Hippocampus – Nigra – Striatum

Einleitung

Über die Veränderungen von Konzentration, Metabolismus, Ausschüttung und Wirkung verschiedener Neurotransmitter wie GABA, Dopamin, Acetylcholin, Substanz P, Serotonin und Noradrenalin unter Aethanolgabe oder im Entzug, liegen verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen vor. Mit den Ergebnissen werden Überlegungen zur Suchtentstehung (Tabakoff et al. 1980; Wood 1980), zur Pathogenese hirnorganischer Anfälle im Entzug (Cooper et al. 1979; Goldman et al. 1981) oder zum Delirium tremens (Anokhina 1979; French et al. 1977) verbunden.

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat wurde in diesem Zusammenhang bisher noch nicht untersucht. Eine Veränderung des Glutamatmetabolismus unter chronischer Alkoholgabe (Veksler und Magomedova 1980) mit möglicher Bedeutung für die Pathogenese von Entzugsanfällen (Freed et al. 1978) wurde früher vermutet. Wir haben darum die Glutamatkonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen chronisch aethanolbehandelter Ratten gemessen.

Material und Methode

Untersucht wurden CHBB-Rattenmännchen von 300–350 g Körpergewicht, bei zufälliger Verteilung 100–120 Tage alt, die nach Bedarf gefüttert und bei regelmäßigen Tag- und Nachtzyklen in einem gleichmäßig temperierten und feuchten Raum gehalten worden waren.

In der ersten Versuchsserie erhielten 14 Tiere 4 Wochen lang täglich per Magensonde 5 g/kg Aethanol in 40-volumenprozentiger Lösung. Die letzte Fütterung erfolgte am Versuchstag, wonach die Tiere zeitlich gestaffelt (7 Tiere 2–6 Stunden nach der letzten Fütterung und 7 Tiere über 6–10 Stunden nach der letzten Fütterung) und abwechselnd mit den 9 Kontrolltieren geopfert wurden (Tabelle 1).

Tabelle 1. Konzentrationen von Glutamat und GABA in Hirnstrukturen von Ratten nach chron. Alkoholgabe über 4 Wochen

(μmol/g) 10 Std		Kontrolltiere	2–6 Std	>6–10 Std
			Nach letzter Alkoholgabe	
Frontaler Cortex	Glutamat	11,09 ± 0,43	11,53 ± 0,38	12,67 ± 0,37 <i>P</i> < 0,02
	GABA	2,42 ± 0,23	2,56 ± 0,21	2,75 ± 0,28
Striatum	Glutamat	9,88 ± 0,22	9,73 ± 0,21	10,56 ± 0,26
	GABA	2,64 ± 0,27	2,97 ± 0,31	2,79 ± 0,51
Hippocampus	Glutamat	10,10 ± 0,15	10,33 ± 0,22	11,07 ± 0,39 <i>P</i> < 0,05
	GABA	2,81 ± 0,14	2,91 ± 0,19	2,65 ± 0,13
	Glutamat	5,03 ± 0,14	4,98 ± 0,58	6,34 ± 0,36 <i>P</i> < 0,002
Nigra	GABA	13,53 ± 0,38	13,46 ± 0,95	14,52 ± 0,76
	Glutamat	12,32 ± 0,46	12,45 ± 0,49	13,20 ± 0,58
Liquor cerebrospinalis (nmol/ml)				

Tabelle 2. Glutamat und GABA in Hirnstrukturen von Ratten, chron. Alkohol über 2 Wochen; 4, 8, 12 Std nach letzter Alkoholgabe

($\mu\text{mol/g}$)		Kontroll-tiere	Stunden nach letzter Alkoholgabe		
			4	8	12
Frontaler Cortex	Glutamat	$10,79 \pm 0,17$	$10,77 \pm 0,23$	$11,20 \pm 0,38$	$11,62 \pm 0,31$ $P < 0,05$
	GABA	$3,56 \pm 0,37$	$3,10 \pm 0,32$	$2,70 \pm 0,25$	$3,82 \pm 0,29$
Striatum	Glutamat	$10,45 \pm 0,12$	$10,07 \pm 0,36$	$10,32 \pm 0,25$	$11,00 \pm 0,20$ $P < 0,05$
	GABA	$3,21 \pm 0,22$	$2,93 \pm 0,55$	$4,18 \pm 0,28$	$3,88 \pm 0,20$ $P < 0,05$ $P < 0,10$
Hippocampus	Glutamat	$10,59 \pm 0,20$	$10,55 \pm 0,23$	$11,02 \pm 0,29$	$11,38 \pm 0,20$ $P < 0,02$
	GABA	$2,29 \pm 0,32$	$2,70 \pm 0,51$	$3,25 \pm 0,46$	$4,13 \pm 0,14$ $P < 0,001$
Nigra	Glutamat	$5,62 \pm 0,33$	$5,09 \pm 0,40$	$5,25 \pm 0,20$	$5,38 \pm 0,66$
	GABA	$15,66 \pm 0,48$	$14,65 \pm 0,24$	$17,34 \pm 1,16$	$17,45 \pm 0,67$ $P < 0,05$

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

Anschließend wurden aus dem intra vitam entnommenen Gehirn Gewebsproben von frontalem Cortex, Striatum, rostralem Hippocampus und Substantia nigra gewonnen.

Die Gewebsproben wurden mit 300 μl eisgekühlter 0,5 M Perchlorsäure, die ein nMEDTA enthielt, homogenisiert (Kim et al. 1981). Nach dem anschließenden Zentrifugieren wurden 200 μl des Überstandes bei minus 80°C tiefgefroren.

In Überstand und Liquor cerebro-spinalis wurden die Konzentrationen von Glutamat und GABA mit der Methode nach Graham und Aprison (1966) und Kim et al. (1981) fluorometrisch gemessen.

In einer zweiten Versuchsserie erhielten unter sonst unveränderten Bedingungen 18 Tiere 2 Wochen lang täglich 5 g/kg 40-volumenprozentigen Aethylalkohol per Magensonde. Den 10 Kontrolltieren wurde die gleiche Menge Wasser verabfolgt. Je 6 der Versuchstiere wurden unnarkotisiert genau 4, 8 und 12 Stunden (Tabelle 2) nach der letzten Alkoholgabe dekapitiert.

Aus den Gehirnen wurden wieder Gewebsproben von frontalem Cortex, Striatum, Hippocampus sowie Substantia nigra gewonnen und in der oben beschriebenen Weise untersucht. Für die Ergebnisse wurden die Standardabweichungen (SEM) errechnet und Signifikanz mit Hilfe des *t*-Tests nach Student überprüft.

Ergebnisse

Tabelle 1 zeigt die Transmitterkonzentrationen in den untersuchten Hirnstrukturen und im Liquor cerebro-spinalis nach vierwöchiger Aethanolgabe. Die Versuchstiere werden in zwei Gruppen, Untersuchung 2–6 Stunden und über 6 bis zu 10 Stunden nach der letzten Alkoholgabe aufgeteilt.

Für die GABA-Konzentrationen finden sich keine signifikanten Unterschiede, für Glutamat zeigt sich ein signifikanter Anstieg in frontalem Cortex, Hippocampus und Substantia nigra.

In Tabelle 2 werden die nach zweiwöchiger Aethanolgabe aus den untersuchten Hirnstrukturen unnarkotisierter Tiere mit definiertem Zeitabstand zur letzten Aethanoldosis (4, 8 und 12 Stunden) gemessenen Daten aufgeführt. Auch hier findet sich mit Ausnahme der Substantia nigra in allen untersuchten Regionen ein signifikanter Anstieg der Glutamatkonzentration. Im Nigragewebe steigt der Glutamatgehalt nach anfänglichem Abfall (4 Stunden nach der letzten Alkoholdosis) später trendmäßig an.

Für die Gamma-Aminobuttersäure finden sich unterschiedliche zeitliche Verläufe, wobei in Striatum, Hippocampus und Nigra signifikante Konzentrationszunahmen auffallen. Während sich also die Werte für Glutamat in beiden Versuchsserien identisch verhalten, es findet sich ein Konzentrationsanstieg mit zunehmendem Zeitintervall zur letzten Alkoholgabe, ist für GABA nur bei nicht narkotisierten Tieren eine deutliche Konzentrationszunahme erkennbar.

Diskussion

Für die Konzentration der Gamma-Aminobuttersäure im Zentralnervensystem nach chronischer Aethanolgabe werden tierexperimentell unterschiedliche Ergebnisse mit Zunahme (Abbondanza und Cessi 1978; Abbondanza 1980; Häkkinen und Kulonen 1967; Rawat 1974; Chopde et al. 1977) und Verminderung (Gordon 1967; Patel und Lal 1973) beschrieben. Das liegt an individueller Variabilität, am zeitlichen Verlauf der Änderungen sowie an unterschiedlichen Versuchsansätzen.

Wir haben die Tiere nicht nach der Methode von Majchrowicz (Majchrowicz 1975) abhängig gemacht, sondern über 2 bzw. 4 Wochen einmal täglich Aethylalkohol per Magensonde gegeben.

Darüber hinaus unterscheiden sich die Konzentrationsverläufe in den verschiedenen Hirnregionen. So konnten Volicer et al. (1977) nach Alkoholentzug nur in Pons-Medulla und Cerebellum einen deutlichen GABA-Abfall nachweisen, während sich dieser im Cortex erst nach 24stündigem Entzug einstellte und im Subcortex die GABA-Konzentration nach anfänglichem Abfall später anstieg. Auch Cooper et al. (1979) fanden im Alkoholentzug bei Ratten keine signifikanten GABA-Konzentrationsunterschiede für das gesamte Gehirn, mit Ausnahme eines Konzentrationsabfalles nach 18stündigem Entzug im Hirnstamm.

Der Einfluß des Aethanols auf den GABA-Metabolismus, dem Bedeutung für die Pathogenese hirnorganischer Anfälle im Entzug zukommt (Cooper et al. 1979; Goldman et al. 1981; Volicer et al. 1977), wird unterschiedlich erklärt (Liljequist und Engel 1979). So nahm Liljequist eine verminderte Sensibilität zentralnervöser GABA-Rezeptoren an, während Hunt et al. (1979) eine Interaktion von Aethanol mit den Neurotransmittern Dopamin und Acetylcholin, aber nicht mit GABA selbst, vermutete.

In unserer Untersuchung fanden wir einen signifikanten Anstieg der Konzentrationen von GABA (Abb. 1) in Striatum, Hippocampus und Substantia nigra jeweils 8 bzw. 12 Stunden nach der letzten Alkoholgabe, wodurch die Ergebnisse von Abbondanza (1980) in speziellen Hirnregionen bestätigt werden.

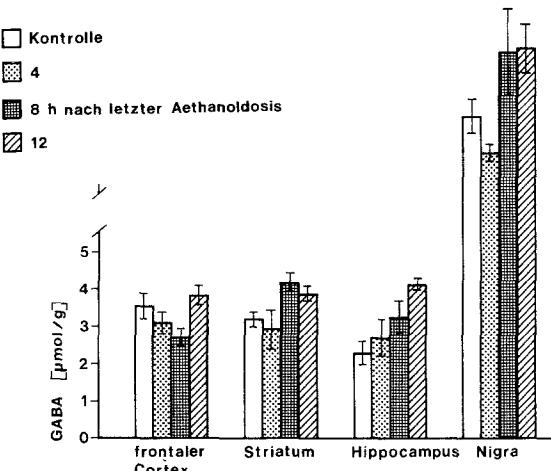


Abb. 1. GABA-Konzentrationen in den untersuchten Hirngewebsproben bei Kontrolltieren und 4, 8 bzw. 12 Stunden nach zweiwöchiger Alkoholgabe

Das Ergebnis wird, wie die erste Versuchsserie (hierzu Tabelle 1) zeigt, durch Narkotisierung mit einem GABA-ergen Barbiturat maskiert. Infolge der hierdurch vermehrten GABA-Ausschüttung liegen bei den Kontrolltieren die Konzentrationen des Neurotransmitters im Gewebe von frontalem Cortex, Striatum und Substantia nigra unter denen der nicht narkotisierten Kontrolltiere (hierzu Tabelle 2). Außerdem ändern sich die GABA-Konzentrationen bei barbituratvorbehandelten Tieren nach Aethanolgabe nicht signifikant.

Eine verminderte GABA-Ausschüttung bei erhöhter Gewebskonzentration ließe (Kim 1978) gesteigerte dopaminerige Aktivität erwarten, wenn nicht Aethanol selbst (Hunt et al. 1979) wiederum Einfluß auf den nigrostriatalen Transmitter Dopamin ausübt.

Nach chronischer Gabe von Aethanol (Hunt et al. 1979; Pohorecky und Newman 1977) und bei Intoxikation wird bei Ratten ein herabgesetzter Dopamin-Metabolismus und verminderte Freisetzung des Transmitters beobachtet, die nach etwa 7 Tagen zum Normalwert zurückkehrt. Es ist aber auch eine gegenläufige Wirkung (Fadda et al. 1980; Liljequist und Engel 1979), vermehrte Dopamin-Freisetzung bei gesteigerter Synthese, beschrieben, was Hunt et al. (1979) mit einem biphasischen Effekt des Aethanols erklären. Hohe Aethanolkonzentrationen hemmen, niedrigere steigern die nigrostriatale Dopamin-Freisetzung.

Dieser biphasische Effekt läßt sich auch im Zeitverlauf der Glutamat-Konzentrationen (Abb. 2) ablesen. Auf Abb. 2 liegen die Werte 4 Stunden nach der letzten Aethanolgabe in Striatum und Substantia nigra unter den Kontrollwerten, während sie später allmählich ansteigen. Die zunächst hohe Glutamat-Freisetzung wird also mit sinkendem Aethanolspiegel durch Zunahme des dopaminerigen Einflusses gemindert, wodurch (Veksler und Magomedova 1980) bei unvermindertem Glutamat-Metabolismus die Gewebskonzentrationen ansteigen. In diesem Zusammenhang kann die nicht signifikant veränderte Glutamat-Liquorkonzentration auch auf einen absolut gesteigerten Glutamat-Metabolismus deuten.

Der Effekt wird nicht, wie bei Gamma-Aminobuttersäure, durch Barbiturat-Narkose maskiert.

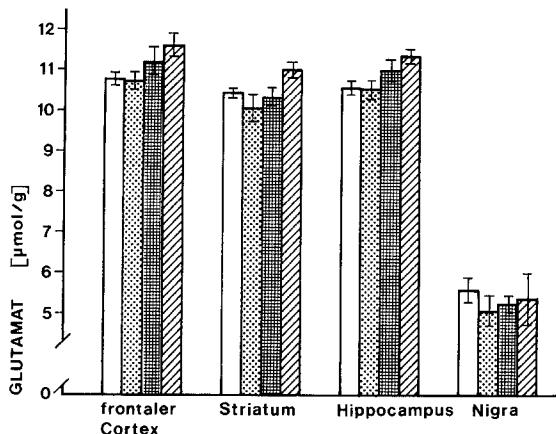


Abb. 2. Konzentrationen von Glutamat in den untersuchten Hirnstrukturen von Kontrolltieren und 4, 8 oder 12 Stunden nach der letzten Aethanolgabe

Die Auffüllung der Glutamat-Speicher kann bei Erregung glutamaterger Neurone eine massive Ausschüttung des exzitatorischen Transmitters ermöglichen und läßt deshalb eine Bedeutung (Freed und Michaelis 1978) für die Entstehung von hirnorganischen Anfällen im Alkoholentzug vermuten.

Tierexperimentell waren unter Amphetamine erhöhte Gewebskonzentrationen von Glutamat in frontalem Cortex, Striatum und Hippocampus gefunden worden (Kim et al. 1981).

Bei Menschen werden nach Amphetaminabusus, ebenso wie während der Halluzinosen im Alkoholentzug und dem Alkoholentzugsdelir, Bilder des akuten exogenen Reaktionstypus beobachtet.

Die weitgehend identischen Veränderungen der zentralnervösen Glutamatkonzentrationen in beiden Tierexperimenten (nach Aethanol und Amphetamine) lassen darum die hypothetische Annahme zu, daß Glutamat auch Bedeutung für Pathogenese von Halluzinationen und delirante Symptome im Alkoholentzug zukommt.

Literatur

Abbondanza A (1980) Effect of lithium chloride on cerebral GABA levels in rats after single or repeated doses of ethanol. *J Stud Alcohol* 41: 347-351

Abbondanza A, Cessi C (1978) Effect of n-dypropylacetate and l-glutamine on gamma-aminobutyric acid levels in brains of rats intoxicated with ethanol. *Arch Sci Biol* 62: 77-82

Anokhina IP (1979) Neurochemical aspects in pathogenesis of alcohol and drug dependence. *Drug Alcohol Depend* 4: 265-273

Chopde CT, Brahmankar DM, Shripad VN (1977) Neurochemical aspects of ethanol dependence and withdrawal reactions in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 200: 314-319

Cooper BR, Viik K, Ferris RM, White HL (1979) Antagonism of the ethanol susceptibility to audiogenic seizures during alcohol withdrawal in the rat by gamma-aminobutyric acid (GABA) and "GABA-mimetic" agents. *J Pharmacol Exp Ther* 209: 396-403

Fadda F, Argiolas A, Melis MR, Serra G, Gessa GL (1980) Differential effect of acute and chronic ethanol on dopamine metabolism in frontal cortex, caudate nucleus and substantia nigra. *Life Sci* 27: 979-986

Freed WJ, Michaelis EK (1978) Glutamic acid and ethanol dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 8: 509-514

French SW, Palmer DS, Wiggers KD (1977) Changes in receptor sensitivity of the cerebral cortex and liver during chronic ethanol ingestion and withdrawal. *Adv Exp Med Biol* 85 : 515-538

Goldman GD, Volicer L, Gold BI, Roth RH (1981) Cerebrospinal fluid GABA and cyclic nucleotides in alcoholics with and without seizures. *Alcoholism* 5 : 431-434

Gordon ER (1967) The effect of ethanol on the concentration of gamma-aminobutyric acid in the rat brain. *Can J Physiol Pharmacol* 45 : 915-918

Graham LT, Aprison MH (1966) Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and gamma-aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal Biochem* 15 : 487-497

Häkkinen HM, Kulonen E (1967) Amino acid metabolism in various fractions of rat brain homogenates with special reference to the effect of ethanol. *Biochem J* 105 : 261-269

Hunt WA, Majchowicz E, Dalton ThK, Swartzwelder HS, Wixon H (1979) Alterations in neurotransmitter activity after acute and chronic ethanol treatment: studies of transmitter interactions. *Alcoholism* 3 : 359-363

Kim JS (1978) Transmitters for the afferent and efferent systems of the neostriatum and their possible interactions. *Adv Biochem Pharmacol* 19 : 217-233

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

Liljequist S, Engel J (1979) Attenuation of the gamma-butyrolactone-induced increase in DOPA accumulation by chronic ethanol administration. *J Neurol Transm* 46 : 195-204

Majchrowicz E (1975) Induction of physical dependence upon ethanol and the associated behavioral changes in rats. *Psychopharmacologia* 43 : 245-254

Patel GJ, Lal H (1973) Reduction in brain gamma-aminobutyric acid and in barbital narcosis during ethanol withdrawal. *J Pharmacol Exp Ther* 186 : 625-629

Pohorecky LA, Newman B (1977) Effect of ethanol on dopamine synthesis in rat striatal synaptosomes. *Drug Alcohol Depend* 2 : 329-334

Rawat AK (1974) Brain levels and turnover rates of presumptive neurotransmitters as influenced by administration and withdrawal of ethanol in mice. *J Neurochem* 22 : 915-922

Tabakoff B, Melchior C, Urwyler S, Hoffman PL (1980) Alterations in neurotransmitter function during the development of ethanol tolerance and dependence. *Acta Psychiatr Scand (Suppl)* 286 : 153-160

Veksler II, Magomedova KM (1980) Aspartate aminotransferase activity in the brain and spinal cord in acute and chronic alcohol intoxication (in Russian). *Vopr Med Khim (USSR)* 26 : 438-442

Volicer L, Hurter BP, Williams R, Puri SK, Volicer BJ (1977) Relationship between brain levels of cyclic nucleotides and gamma-aminobutyric acid during ethanol withdrawal in rats. *Drug Alcohol Depend* 2 : 317-327

Wood JM (1980) Effect of depletion of brain 5-hydroxytryptamine by 5,7-dihydroxytryptamine on ethanol tolerance and dependence in the rat. *Psychopharmacology* 67 : 67-72