

Aus dem I. Physiologischen Instiut
(Direktor: Prof. Dr. H. Seller)



.....

**Anpassung der lokalen zerebralen Glukosetransporterichten an
Veränderungen der lokalen Glukoseutilisation und ihre
Auswirkungen auf die lokalen Glukosetransportraten im Rattenhirn**

.....

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät Heidelberg
der Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von
Martin Henrik Maurer
aus Karlsruhe

1999

Dekan: Prof. Dr. H.-G. Sonntag
Referent: Prof. Dr. W. Kuschinsky

Inhalt

1 Einleitung	
1.1 Glukosetransport über biologische Membran	1
1.2 Funktion und Gewebeverteilung der GLUT-Isoformen	3
1.3 Strukturmerkmale der GLUT-Familie	7
1.4 Visuelles System	9
1.5 Wasser- und Osmoregulationssysteme des ZNS	11
1.6 Ziele dieser Arbeit	14
2 Material und Methoden	
2.1 Allgemeiner Versuchsablauf	16
2.1.1 Versuchstiere und Versuchsansatz zur Pathologie des Versuchstieres	16
2.1.2 Operation der Versuchstiere	17
2.1.3 Präparation und Aufbewahrung der Gehirne	18
2.2 Messung der lokalen Glukosetransporterichte mittels Immunautoradiographie	19
2.2.1 Methode	19
2.2.2 Bestimmung der Antikörperkonzentrationen	21
2.2.3 Auswerten der Autoradiogramme	21
2.3 Messung der lokalen zerebralen Glukoseutilisation	22
2.4 Messung der lokalen Transportkonstanten für Methylglukose	24
2.5 Nissl-Färbung von Nervenzellen zur Bestimmung der regionalen Nervenzelldichte	26
2.6 Statistische Datenanalyse	27
3 Ergebnisse	
3.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere	28
3.2 Sättigungskurven der Antikörper	31
3.3 Visuelle Deprivation	34
3.3.1 Glukosetransporterichte GLUT1 und GLUT3	34
3.3.2 Lokale zerebrale Glukoseutilisation	37
3.3.3 Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose	39
3.3.4 Nervenzelldichte	42
3.4 Wasserdeprivation	43
3.4.1 Glukosetransporterichte GLUT1 und GLUT3	43
3.4.2 Lokale zerebrale Glukoseutilisation	46
3.4.3 Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose	48
3.4.4 Wassergehalt des Gehirns	51
4 Diskussion	
4.1 Immunautoradiographische Methode	52
4.2 Visuelle Deprivation	54
4.2.1 Lokale zerebrale Glukoseutilisation	54
4.2.2 Quantitative Verteilung der Glukosetransportmoleküle GLUT1 und GLUT3	60
4.2.3 Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose	63
4.3 Wasserdeprivation	65
4.3.1 Lokale zerebrale Glukoseutilisation	65
4.3.2 Quantitative Verteilung der Glukosetransportmoleküle GLUT1 und GLUT3	69
4.3.3 Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose	69
5 Zusammenfassung	72
6 Anhang: Pufferlösungen	74
7 Eigene Veröffentlichungen	75
8 Literaturverzeichnis	76
9 Danksagung	82
10 Lebenslauf	83

1. Einleitung

1.1. Glukosetransport über biologische Membranen

Glukose ist das wichtigste Stoffwechselfmolekül des zentralen Nervensystems. Sie dient den Nervenzellen zur oxidativen und nichtoxidativen ATP-Gewinnung und wird für viele anabole Reaktionen benötigt, deren Produkte zuckerhaltige Makromoleküle sind, darunter Neurotransmitter und Glykoproteine.

Biologische Membranen sind aufgrund ihrer besonderen Struktur als Phospholipiddoppelschicht fast vollständig impermeabel für kleine polare Moleküle wie Glukose. Deshalb vermitteln gewisse integrale Membranproteine den Transport von Glukose und verwandten Substanzen über die Zytoplasmamembran.

In tierischen Zellen werden zwei Arten von Glukosetransportmolekülen gefunden: natrium- und ATP-abhängige Glukosetransporter und Glukosetransporter der erleichterten Diffusion (Gennis 1989).

Die natriumabhängigen Transporter vermitteln den Membrandurchtritt von Glukose in der luminalen Zellmembran transportierender Epithelien (z. B. Dünndarm, proximaler Nierentubulus). Hierbei wird der gleichzeitige passive Eintritt von Na^+ genutzt, um Glukose in der Zelle anzureichern. Der passive Na^+ -Einstrom setzt die normale Funktion der Na^+/K^+ -ATPase in der basolateralen Membran voraus, welche unter Energieverbrauch eine niedrige Na^+ -Konzentration aufrechterhält (Thorens 1993).

Der erste Natrium-Glukose-Kotransporter wurde 1987 kloniert und SGLT1 genannt (Hediger *et al.* 1987). Zwischenzeitlich wurden weitere Mitglieder der SGLT-Familie als SGLT2, SGLT3, SMIT und SNST1 identifiziert (Takata 1996; Takata *et al.* 1997). Sie absorbieren Glukose und Galaktose aus dem Dünndarm und dem Primärharn der Nierentubuli und akkumulieren diese in den Zellen (Bell *et al.* 1993).

In der basolateralen Membran transportierender Epithelien, der Zellmembran von Endothelien und Parenchymzellen vieler Organe wurde ein anderer Typ von Glukosetransportmolekülen in hohen Konzentrationen nachgewiesen. Sie erleichtern die Diffusion von Glukose durch die Zellmembran und werden deshalb Glukosetransportmoleküle der erleichterten Diffusion genannt. Diese Moleküle, welche die GLUT-Familie bilden, transportieren Glukose entlang einem Konzentrationsgradienten über die Plasmamembran. Im Gegensatz zu den Na⁺-Glukose-Kotransportern können sie nicht Glukose anreichern, sondern nur die Diffusion von Glukose beschleunigen, d. h. fazitätieren.

Bis heute wurden sieben Mitglieder der GLUT-Familie aus Säugetierzellen kloniert und in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit GLUT1 bis GLUT7 bezeichnet (Mueckler 1994).

Transportermolekül	Hauptgewebelokalisation
<u>1. Na⁺-abhängiger Kotransport</u>	
SGLT1	Intestinum, Niere (, Gehirn)
SGLT2 (HU 14)	Niere
SGLT3 (SAAT-pSGLT2)	Niere
rkST1	Niere
<u>2. erleichterte Diffusion</u>	
Glut1, 55 kDa-Form	Erythrozyten, Niere, fetales Gewebe, Blut-Gewebe-Schranken (Gehirn, Auge, Plazenta u. a.)
Glut1, 45 kDa-Form	fast alle Zellen, im Gehirn: Glia, Neurone, Ependym, Plexus choroideus
Glut2	Leber, Niere, Pankreas (b-Zellen), Intestinum
Glut3	Gehirn: Neurone, Plazenta, Spermatozoen, Thrombozyten
Glut4	Fettgewebe, Skelet- und Herzmuskel, Gehirn: Zerebellum, hippokampale Neurone
Glut5	Intestinum, Spermatozoen, Makrophagen, Mikroglia
Glut6	(Pseudogen)
Glut7	Lebermikrosomen, Niere

Tab. 1: Glukosetransportmoleküle der Säugetierzelle und ihre hauptsächlichliche Lokalisation (modifiziert nach Takata 1996, Vannucci *et al.* 1997 und H. Koepsell, persönliche Mitteilung).

1.2. Funktion und Gewebeverteilung der GLUT-Isoformen

GLUT1 ist ein ubiquitäres Protein der Säugetierzellen. Seine Expression beginnt schon früh in der Entwicklung und ist verantwortlich für die basale Glukoseaufnahme jeder stoffwechselaktiven Zelle. Nachdem Kasahara und Hinkle diesen Transporter 1977 als Bande-4.5-Protein der Erythrozytenmembran entdeckt hatten, wurde das Gen aus cDNA kloniert, die aus menschlichen HepG2-Hepatomzellen stammte (Mueckler *et al.* 1985), und später GLUT1 genannt (Bell *et al.* 1990). Birnbaum *et al.* (1986) erstellten eine cDNA für GLUT1 aus Hirngewebe.

Ein besonderes Merkmal des GLUT1 ist seine Anreicherung an Blut-Gewebe-Schranken in Endothelien wie den Kapillaren des Gehirns, der Retina, der Iris und dem Innenohr, aber auch Epithelien wie dem Plexus choroideus und dem Ziliarkörper sowie in Synzytiotrophoblastzellen der Plazenta, Basalzellen der Stria vascularis, Pernineuralzellen der Nervenscheiden und Pigmentepithelzellen des Auges (Takata *et al.* 1997).

Im Gehirn findet sich GLUT1 in zwei verschiedenen Isoformen: zum einen in einer 55kDa-Form, die an Gefäßendothelien lokalisiert ist, zum anderen als 45kDa-Form, die auf Astrozytenmembranen gefunden wurde (Maher *et al.* 1993; Vannucci *et al.* 1997). Eine intermediäre Form von GLUT1 mit einem Molekulargewicht von 45-48 kDa wurde im Plexus choroideus beschrieben. Die unterschiedlichen Molekulargewichte führen Kumagai *et al.* (1994) auf eine unterschiedliche N-Glykosylierung der Aminosäureposition Asp45 zurück. Ihre funktionelle Bedeutung ist jedoch unklar. Der K_m -Wert von GLUT1 beträgt 5 mmol/l für D-Glukose (Bell *et al.* 1993).

GLUT2 ist die hauptsächliche Isoform auf Hepatozyten, pankreatischen β -Zellen und resorptiven Zellen der intestinalen Mukosa und der Niere. 1988 haben Thorens *et al.* GLUT2 erstmalig kloniert. Die besondere Eigenschaft dieses Glukosetransportmoleküls ist sein hoher K_m -Wert von 6-12 mmol/l für D-Glukose - dem höchsten aller Transporter der GLUT-Familie. Diese geringe halbmaximale Transportgeschwindigkeit seines Substrates wird erst in der Zusammenarbeit mit dem Hexokinase IV Isoenzym (ATP:D-Glukose-6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2), der Glukokinase, in Leber und Pankreas bedeutsam: durch diese Kopplung können kleinste Änderungen des Blutglukosespiegels durch eine veränderte Glukoseaufnahme in die Zelle erfaßt werden, indem Transport und Phosphorylierung im fast-linearen Bereich der Michaelis¹-Menten²-Kurve stattfinden.

$$\text{Reaktionsgeschw. } V = V_{\max} \cdot C(\text{Substrat}) [\text{mM}] / (C(\text{Substrat}) [\text{mM}] + K_m)$$

Formel 1: Michaelis-Menten-Kinetik: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration und der Michaelis-Konstanten K_m (nach Stryer L (1994) Biochemie. Spektrum, Heidelberg).

Im Gehirn findet sich hauptsächlich **GLUT3** als Glukosetransporter der Neurone. In der Maus ist GLUT3 ausschließlich im Gehirn lokalisiert, im Menschen auch in Plazenta, Leber und Niere (Kayano *et al.* 1988; Bell *et al.* 1990; Gould & Holman 1993). Das Hauptcharakteristikum dieses Transporters ist sein niedriger K_m -Wert von 1-2 mmol/l für D-Glukose (Gould *et al.* 1991), was bedeutet, dass dieser Transporter auch bei niedriger Substratkonzentration effektiv arbeiten kann. Im Hinblick auf die Abhängigkeit des Gehirns von Glukose ist dies von entscheidender Bedeutung für das Überleben des Organs unter Extrembedingungen. Erstmals kloniert wurde GLUT3 1988 von Kayano *et al.* aus menschlichen fetalen Muskelzellen, später auch aus Hirngewebe von Ratte, Maus und Huhn (Nagamatsu *et al.* 1992; Maher *et al.* 1994).

¹Leonor M. Michaelis (1875-1945) Biochemiker in Berlin und New York.

²Maud L. Menten (1879-1961) Ärztin und Biochemikerin in Toronto, Chicago und Pittsburgh.

GLUT3, während weiße Substanz, Adenohypophyse, Epiphyse und zerebrale Blutgefäße nur eine geringe Anzahl oder gar keine GLUT3 exprimieren (Maher *et al.* 1993). Ultrastrukturelle Untersuchungen von Leino *et al.* (1997) zeigen, dass GLUT3 neuronenspezifisch in prä- und postsynaptischen Nervenendigungen sowie nichtmyelinisierten Nervenzellausläufern im Neuropil lokalisiert ist. Aber auch in intrazellulären Vesikeln und Mitochondrien findet sich GLUT3.

Nur im Fettgewebe und Skelet- und Herzmuskel findet sich dagegen **GLUT4**. Diese Gewebe werden insulinabhängig genannt, da sie auf Insulingabe schnell mit einer reversiblen Erhöhung der Glukosetransportrate bis auf den siebenfachen Ausgangswert antworten (Gould & Holman 1993). Dies geschieht durch Verlagerung von Glukosetransportmolekülen aus intrazellulären Kompartimenten an die Oberfläche der Plasmamembran (Cushman & Wardzala 1980).

GLUT5 ist vermutlich ein Fruktosetransporter mit einer gewissen Affinität zu Glukose (Burant *et al.* 1992). Für menschliche Spermatozoen ist GLUT5 wichtigstes Transportmolekül zur Energiebereitstellung. Ausserdem steuert GLUT5 im Dünndarm die Fruktose-Aufnahme.

Molekül	Km [mM]		Anzahl der Aminosäuren	
	D-Glukose	3-O-Methylglukose	Mensch	Ratte
Glut1	5	17	492	492
Glut2	6-12	42	524	522
Glut3	1-2	11	496	493
Glut4	5	4	509	509
Glut5	nicht transportiert	6	501	502
Glut7	nicht bekannt	nicht bekannt	nicht bekannt	528

Tab. 2: K_m -Werte für Glukose und Methylglukose sowie Anzahl der Aminosäuren für die Transportermoleküle der GLUT-Familie (modifiziert nach Takata *et al.* 1997 und Bell *et al.* 1993).

Lediglich als Pseudogen in der DNA konserviert ist **GLUT6**, dem sich kein Transportermolekül zuordnen läßt (Bell *et al.* 1993).

GLUT7 wurde aus intrazellulären, mikrosomalen Membranen der Leberzelle kloniert (Waddell *et al.* 1992). Seine Funktion ist der Transport von Glukose, die von der Glukose-6-phosphatase (EC 3.1.3.9) bereitgestellt wird, aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma (Burchell *et al.* 1994).

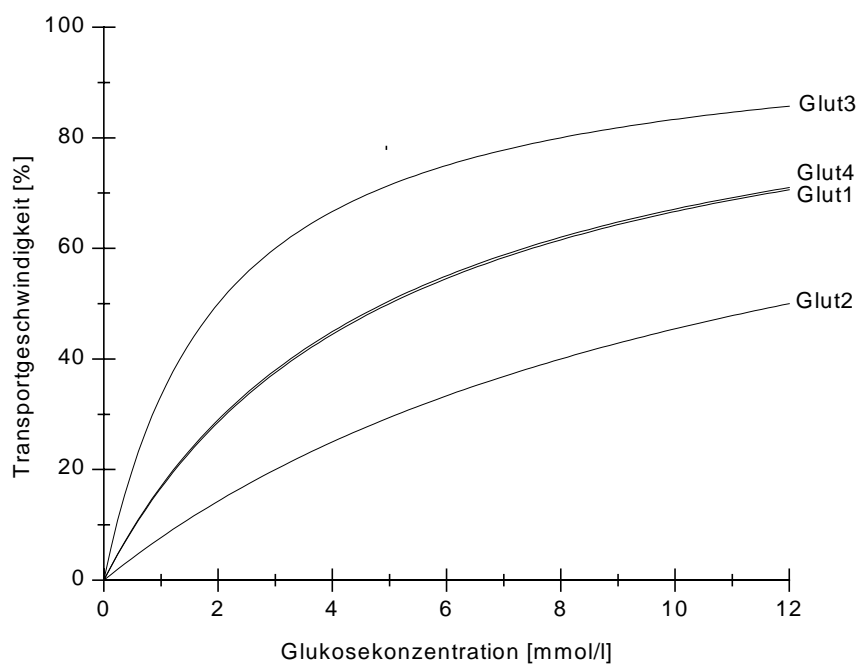


Abb. 1: Transportgeschwindigkeiten für Glukose der verschiedenen Moleküle der GLUT-Familie in Analogie zur Michaelis-Menten-Kinetik (n. Bell *et al.* 1993).

1.3. Strukturmerkmale der GLUT-Familie

Alle GLUT-Isoformen der Säugetierzelle gehören zu einer großen Superfamilie von Genen, deren Proteine viele Hexosen und andere Kohlenstoffverbindungen transportieren (Marger & Saier 1993). Zwölf α -helikale transmembranöse Domänen durchspannen die Plasmamembran und ermöglichen dem Glukosemolekül den Durchtritt. C- und N-terminales Ende liegen auf der zytoplasmatischen Seite und die einzige N-Glykosilierungsstelle befindet sich extrazellulär zwischen den Domänen 1 und 2 an der Position Asp45. Die Länge der Oligosaccharidkette kann zwischen den einzelnen Molekülen einer Isoform differieren (Maher *et al.* 1993).

Zwischen den Domänen 6 und 7 befindet sich eine große zytoplasmatische Schleife von etwa 60 Aminosäuren, deren Funktion nicht vollständig geklärt ist (Mueckler *et al.* 1985). Die Glukosetransportmoleküle der GLUT-Familie in allen untersuchten Vertebratenspezies bestehen aus 490 bis 533 Aminosäuren, von denen 128 invariant sind.

Von diesen liegen die meisten in den transmembranösen Domänen. Die konservierten Aminosäuresequenzen der N-terminalen Domänen 1, 2, 4 und 5 wiederholen sich in den C-terminalen Domänen 7, 8, 10 und 11. Gould und Holman (1993) meinen dazu, dass sich im Laufe der Evolution ein Vorläufergen aus sechs Transmembrandomänen verdoppelte.

Über die dreidimensionale Struktur der Glukosetransportmoleküle ist wenig bekannt. Kristallographische Röntgenstrukturanalysen stehen noch aus, weil alle Kristallisationsversuche aufgrund des lipophilen Charakters der Moleküle scheiterten. Allerdings stellten Mueckler *et al.* (1985) zur Diskussion, dass mindestens fünf transmembranöse Helices einen hydrophilen Tunnel bilden, durch den das zu transportierende Molekül hindurchtreten kann.

Den Mechanismus, mit dem Glukose die Seiten der Plasmamembran wechselt, vergleichen Lienhard *et al.* (1992) mit dem einer Klappe: auf der einen Seite bindet das zu transportierende Molekül, was zu einer Konformationsänderung des Transporters führt. Dadurch wird das Glukosemolekül auf die andere Seite der Membran gebracht und dissoziiert wieder vom Transporter. Auch Gould und Holman (1993) unterstützen diese Ansicht, indem sie durch Bindungsstudien mit dem spezifischen intrazellulären Inhibitor Cytochalasin B und dem D-Glukose Kompetitor Forskolin zwei strukturell verschiedene Bindungsstellen extra- und intrazellulär annehmen.

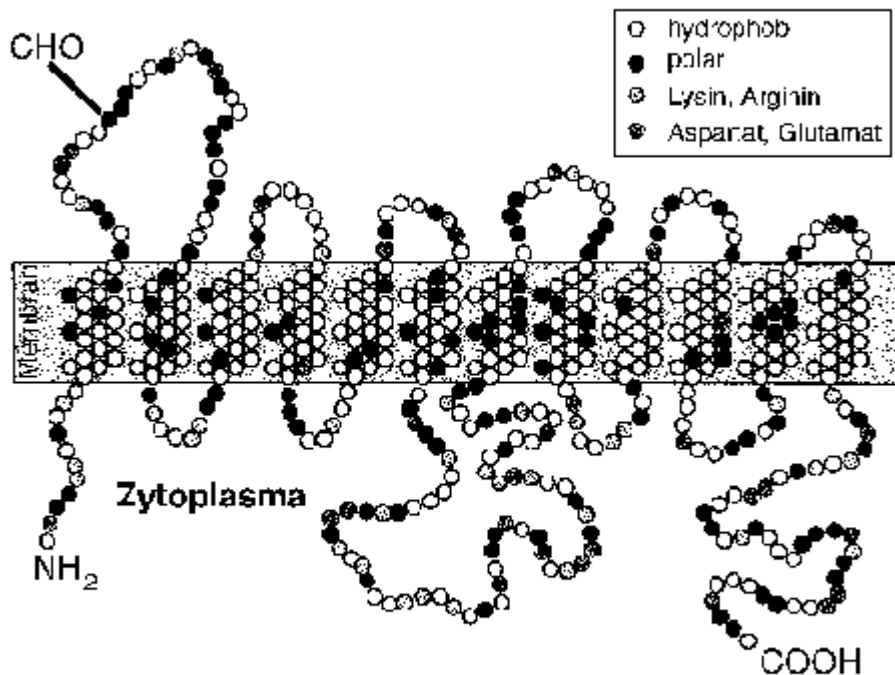


Abb. 2: Vermutliche Struktur der Glukosetransportmoleküle am Beispiel von GLUT1 (nach Mueckler 1994).

1.4. Visuelles System

Das visuelle System der Ratte entspricht in weiten Teilen dem des Menschen. Es setzt sich aus einem retinogenikulokortikalen, retinotektalen, retinoprätektalen, retinohypothalamischen und optisch-akzessorischen System zusammen.

Nach der Signalaufnahme und erster Reizverarbeitung in der Retina leitet der Nervus opticus die optische Information zum **Chiasma opticum**. Beim Menschen kreuzen hier diejenigen Fasern, die den nasalen Retinaanteilen entspringen. Bei der Ratte jedoch kreuzen etwa 90 % (Cooper & Thurlow 1985) bis 97 % (Jeffery 1984) der Fasern zur kontralateralen Seite. Dies ermöglicht einen Seitenvergleich zwischen rechter und linker Hemisphäre nach unilateraler Enukleation (Horsburgh & McCulloch 1991), was auch unserem Versuchsansatz entspricht.

Nach dem Chiasma opticum leitet der Tractus opticus die Sehinformation zur ersten Umschaltstelle auf dem Weg zum visuellen Kortex, dem **Corpus geniculatum laterale**. Dieses besteht aus einem dorsalen Kern, der retinale Afferenzen erhält, sowie einem ventralen Kern mit Afferenzen von dem ipsilateralen visuellen Kortex der Areae 17 und 18, dem Stratum griseum superficiale des ipsilateralen Colliculus superior, ipsilateralen prätektalen Kernen und dem kontralateralen ventralen Kern des Corpus geniculatum laterale (Cosenza & Moore 1984). Der dorsale Kern ist bei Primaten in sechs Schichten angeordnet, die unterschiedliche Anteile des Gesichtsfeldes repräsentieren. Diese Zytoarchitektur fehlt der Ratte, jedoch ist eine Organisation des Gesichtsfeldes im Nucleus dorsalis von rostroventral nach caudodorsal erkennbar (Reese & Jeffery 1983). Projektionen bestehen zum Nucleus reticularis thalami und den Arealen 17, 18 und 18a des visuellen Kortex (Sefton *et al.* 1981).

Über die Axone der Neurone im Corpus geniculatum laterale, die zusammen die Sehstrahlung, Radiatio optica, bilden, wird der primäre **visuelle Kortex** erreicht, welcher dem Areal 17 nach Brodmann³ entspricht. Die Area 17 ist in sechs Schichten gegliedert, die unterschiedliche Afferenzen aus anderen Regionen des Kortex, einigen Thalamuskerngebieten, dem Corpus geniculatum laterale und einigen Kernen des Hirnstamms erhalten.

³Korbinian Brodmann (1868-1918) Neurologe in Berlin und Tübingen.

Sie projiziert zu sekundären und tertiären Anteilen des visuellen Kortex, den Brodmann Areae 18 und 19. Nach einem neueren Konzept stellen die Verbindungen zwischen den einzelnen Arealen keine Kette neuronaler Schaltstrukturen dar, sondern funktionell spezialisierte Verknüpfungen, die eine parallele Informationsverarbeitung ermöglichen. Nach dieser Nomenklatur wird die Area 17 als V1, die Area 18 als V2 und die verschiedenen Anteile der Area 19 als V3, V3A, VP, V4 und V5 bezeichnet (Zilles & Rehkämper 1993).

Neben diesem retinogenikulokortikalen Hauptweg, der den bewußten Seheindruck vermittelt, werden für unbewußte Augen- und Kopfbewegungen zur Fixierung bewegter Objekte Informationen aus dem retikulotektalen System verarbeitet. Dabei zweigen aus dem Tractus opticus Fasern ab, die im **Colliculus superior** enden. Auffällig ist die Schichtung des Colliculus superior: sechs Laminae durchziehen das Kerngebiet von kranial nach kaudal. Die drei oberen Schichten, das Stratum zonale, das Stratum griseum superficiale und das Stratum opticum, erhalten Afferenzen aus der Retina über den Tractus opticus und geben Efferenzen ab zu den unteren Schichten, während die tieferen Laminae, das Stratum griseum medium, das Stratum medullare medium, das Stratum griseum profundum und das Stratum medullare profundum neben den oben genannten Afferenzen Eingänge erhalten aus dem Rückenmark, dem ipsilateralen visuellen Kortex, bestimmten Hinterstrangkernen und den Nuclei cochleares. Sie projizieren zu den Augenmuskelkernen, der Formatio reticularis, dem Fazialiskerngebiet, pontinen Kernen und dem Rückenmark (Zilles & Rehkämper 1993). Außerdem verlaufen Fasern vom Colliculus superior zu den kortikalen Arealen 17, 18 und 18a (Sefton *et al.* 1981) sowie zum dorsolateralen Nucleus des Corpus geniculatum laterale (Reese 1984).

Das **retinoprätektale System** vermittelt den Pupillen- und Akkommodationsreflex, während das **retinohypothalamische System** die lichtabhängige zirkadiane Rhythmik steuert. Das **akzessorische optische System** ist Teil des visuomotorischen Systems und dient dem optokinetischen Nystagmus.

1.5. Wasser- und Osmoregulationssysteme des ZNS

Durstempfinden und das folgende Verhalten der Wasser- und Natriumaufnahme, sowie die dazugehörigen biochemischen Vorgänge wie hormonale Regulationsmechanismen, die den Flüssigkeitshaushalt des Körpers aufrecht erhalten, unterliegen der Kontrolle eines komplexen, höchst integrierten Kreises neuronaler Strukturen, die den osmotischen Druck der Extrazellulärflüssigkeit auf das Genaueste regulieren (Fitzsimons 1979). Zwei Pfade dieses Neuronenkreises sind bekannt: der eine ist im Frontalhirn lokalisiert und verbindet zirkumventrikuläre Organe mit dem medianen präoptischen Kern, dem Nucleus paraventricularis und dem Nucleus supraopticus. Der andere Pfad sorgt für die Kommunikation des Hypothalamus mit der Medulla oblongata (Lenkei *et al.* 1997).

Stimuli dieser Neuronenkreise umfassen Hyperosmolarität, Barorezeptoren-Afferenzen und das Hormon Angiotensin II, das in Niere und Gehirn gebildet wird (Rolls & Rolls 1982). Die Wirkung dieser Faktoren beruht auf der Stimulation rezeptiver Felder hauptsächlich im Frontalhirn wie dem Nucleus praeopticus medianus (MnPO), septalen Kernen wie dem Nucleus septalis triangularis, spezifischen Kerngebieten des Hypothalamus, speziell dem Nucleus supraopticus, dem Subfornikalorgan (SFO) und dem Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) (Bourque *et al.* 1994). Unbekannt sind jedoch die Funktionen der Mehrzahl dieser Kerngebiete und ihre Verbindungen untereinander.

Hypothalamus und Neurohypophyse bilden eine morphologische und funktionelle Einheit, ihre Verbindung ist das neurosekretorische System. In den Perikarya des **Nucleus supraopticus** und **Nucleus paraventricularis** im Hypothalamus werden die Peptidhormone Antidiuretisches Hormon (ADH), das in der englischsprachigen Literatur als Vasopressin oder Arginin-Vasopressin (AVP) bezeichnet wird, und Oxytocin synthetisiert, durch axonalen Transport gelangen sie in die **Neurohypophyse**, wo beide in neurosekretorischen Granula gespeichert werden, bis eintreffende Aktionspotentiale zu einer Hormonfreisetzung führen (Bargmann 1966).

Der Nucleus supraopticus ist dem Tractus opticus angelagert. In seinen Zellen finden sich u.a. Cholecystokinin und Dynorphin. Der Nucleus paraventricularis liegt an der Wand des dritten Ventrikels und ist nur durch eine dünne Gliafaserschicht vom Ependym getrennt. In seinen peptidergen Neuronen finden sich u.a. Corticoliberin (CRH), Neurotensin und Cholecystokinin.

Beide Kerngebiete sind großzellig und weisen eine Besonderheit in ihrer Gefäßversorgung auf: Die enge Verknüpfung zwischen Endokriniem und Nervensystem äußert sich in einer ungewöhnlich starken Gefäßversorgung einzelner hypothalamischer Kerngebiete. Sowohl der Nucleus supraopticus, als auch der Nucleus paraventricularis weisen eine etwa sechsfach höhere Kapillardichte auf als die übrige graue Substanz. Ihre Nervenzellen haben einen engen Kontakt zu den Kapillaren, die sie zum Teil sogar umschließen. Dies beschreibt der Begriff der endozellulären Kapillaren (Nieuwenhuys 1980).

Vasopressin oder Antidiuretisches Hormon (ADH) ist ein Nonapeptid. Sein Zielort sind die Sammelrohre und distalen Konvolute der Niere, in denen es die Permeabilität von Wasser über die Epithelien erhöht. Unter seiner Einwirkung entsteht ein konzentrierter, hyperosmolarer Urin, dem Körper geht wenig Wasser verloren. Oxytocin ist ein Nonapeptid ähnlicher Struktur wie Vasopressin. Beim Menschen dient es der Uteruskontraktion unter der Geburt und der Milchejektion während der Laktation, bei der Ratte reguliert es jedoch auch den Natrium- und Flüssigkeitshaushalt durch Stimulation der Natriurese, eine Änderung der Plasmaosmolalität bewirkt eine Freisetzung von Oxytocin (Bourque & Oliet 1997).

Das **Subfornikalorgan** zählt zu den zirkumventrikulären Organen, die zwar funktionell verschieden sind, sich in der Struktur ihrer Gefäßbeziehung jedoch ähneln (Kuschinsky 1995). Es liegt am Dach des dritten Ventrikels nahe des Foramen interventriculare Monroi⁴ und enthält neben Gliazellen und vereinzelt Neuronen große, runde Parenchymzellen, deren neuronale Herkunft umstritten ist. Ultrastrukturell lassen sich Ependymkanälchen erkennen, die von der Oberfläche eindringen und mit weiten intrazellulären Spalträumen in Verbindung stehen. Peptiderge Nervenfasern, in denen sich Somatostatin und Luliberin nachweisen lassen, enden an Kapillaren und im Bereich der Ependymkanälchen.

Das Organum subfornicale hat keine Blut-Hirn-Schranke, sondern unterschiedlich stark fenestrierte Kapillaren. Auch sind die Endothelzellen nicht durch Zonulae occludentes (tight junctions) verbunden. Viele Substanzen können auf diese Weise sehr leicht vom Blut in diese Regionen übertreten und ermöglichen so eine neurohumorale Sensorfunktion (Gross 1992). Alle zirkumventrikulären Organe sind stark vaskularisiert und weisen einen ungewöhnlichen haarnadelförmigen Kapillarverlauf auf (Gross 1991).

⁴Alexander Monro (1733-1817) Anatom in Edinburgh.

1.6. Ziele

Diese Arbeit soll Anpassungen der lokalen zerebralen Glukosetransporterichten von GLUT1 und GLUT3 an Veränderungen der lokalen Glukoseutilisation als Mass für den lokalen Hirnstoffwechsel und ihre Auswirkungen auf die lokalen Glukosetransportraten im Rattenhirn untersuchen.

Um die lokalen Veränderungen der Glukosetransporterichten möglichst exakt zu erfassen, sollte als erstes die bisher angewandte immunautoradiographische Methode (Zeller *et al.* 1995; 1997) zur Bestimmung der Dichten von GLUT1 und GLUT3 verbessert werden. Durch veränderte Inkubationsparameter sollten die Mengen an eingesetzten Antikörpern gegenüber der bisher angewandten Methode reduziert und gleichzeitig die örtliche Auflösung verbessert werden, damit auch kleine Hirnstrukturen mit hinreichender Genauigkeit dargestellt werden können.

Diese verbesserte Methodik sollte dann für zwei Versuchsansätze angewendet werden. Im ersten Versuchsansatz sollte der lokale Hirnstoffwechsel in den zu untersuchenden Hirnstrukturen gesenkt, im zweiten Versuchsansatz erhöht werden.

Für den ersten Versuchsansatz (Senkung des lokalen Hirnstoffwechsels) wurde das visuelle System gewählt, da der neuronale Weg der Informationsverarbeitung anatomisch gut definiert ist und dieser leicht und vollständig reproduzierbar ausgeschaltet werden kann. Die Strukturen des visuellen Systems enthalten ausreichende Mengen der zu untersuchenden Proteine. Außerdem projizieren etwa 90 % (Cooper & Thurlow 1985) bis 97 % (Jeffery 1984) der retinalen Ganglienzellen auf die kontralaterale Hemisphäre, so dass nach Ausschaltung der retinalen Zellen der einen Seite eine Auswertung der Gehirne im Seitenvergleich möglich ist.

Bei der Deprivation des visuellen Systems durch verminderten sensorischen Input werden GLUT1- und GLUT3-Dichte, lokaler Glukosestoffwechsel und lokale Glukosetransportrate in Beziehung gesetzt. Es soll untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen den funktionellen Parametern Hirnstoffwechsel und Glukosetransportrate und den morphologischen Parametern GLUT1- und GLUT3-Dichte besteht.

Der zweite Versuchsansatz nimmt die Fragen des Zusammenhangs zwischen Transporterdichte von GLUT1 und GLUT3, Transportrate und Stoffwechselgrösse aus dem ersten Versuchsansatz auf, jedoch für eine Verminderung des lokalen Stoffwechsels einzelner Hirnstrukturen. Im Durstversuch über drei Tage werden wasserdeprivierte Tiere mit einer Kontrollgruppe, die freien Zugang zu Wasser hatte, verglichen.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeiner Versuchsablauf

2.1.1. Versuchstiere und Versuchsansatz zur Pathophysiologie des Versuchstieres

Bei allen Versuchstieren handelte es sich um männliche Wanderratten (*Rattus norvegicus*) vom Stamm Sprague-Dawley, die von der Firma Charles River Wiga (Wilmington, MA, USA) stammten und in der Versuchstieranlage der Universität Heidelberg gehalten wurden. Die Umgebungsparameter waren konstant eingestellt auf eine Raumtemperatur von 23 °C, eine Luftfeuchtigkeit von 50-60 % und einen Hell-Dunkel-Zyklus von 14 zu 10 Stunden. Die Ratten bekamen standardisiertes Futter (Altromin C1000, Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum*. Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere wird unten angegeben.

Nach Genehmigung der Tierversuche durch das Regierungspräsidium Karlsruhe als zuständige Aufsichtsbehörde (AZ der Tierversuchsgenehmigung 37-9185.81/17/97) wurde zur Deprivation des visuellen Systems den Versuchstieren unter Halothan-Lachgas-Narkose der rechte Nervus opticus durchtrennt und der Bulbus enukleiert (Wakabayashi *et al.* 1994). In die Operationswunde wurde ein equines Kollagen (Tachotop Spezial 1, Nycomed, München) eingelegt und die Lider durch Naht versorgt. Gegen den Operationsschmerz wurde die Wunde mit dem Lokalanästhetikum Lidocain (Xylocain, Astra Chemicals, Wedel/Holstein) bestrichen.

Bei chronischem Versuchsansatz wurden die Tiere, nachdem sie aus der Narkose erwacht waren, für eine Woche wieder in die Versuchstieranlage der Universität Heidelberg gebracht und dort unter den obigen Umweltparametern bis zum Versuchstag täglich gewogen und beobachtet.

Im Versuchsansatz der Wasserdeprivation (AZ der Tierversuchsgenehmigung 37-9185.81/18/97 des Regierungspräsidiums Karlsruhe) wurden die Versuchstiere unter den gegebenen Umweltparametern für einen Zeitraum von drei Tagen ohne Wasser gehalten. Die Kontrolle des Durstversuchs beinhaltete ebenfalls tägliches Wiegen und Beobachten der Tiere.

2.1.2. Operation der Versuchstiere

Am Versuchstag erfolgte die Narkose der Versuchstiere durch Inhalationsnarkotika, wobei die Narkosegase zunächst in einen Kunststoffkasten geleitet wurden. Das Gasgemisch setzte sich zusammen aus 1-1.5 % Halothan (Fluothane, ICI Pharma, Plankstadt), 28.5 % O₂ und ca. 70 % N₂O.

Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde durch ein rektales Thermometer kontinuierlich gemessen und durch ein Heizkissen (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard, Edenbridge, KT, USA) konstant auf etwa 37 °C gehalten. Nach einem Hautschnitt in der rechten Leiste wurden Arteria und Vena femoralis präpariert und ein Polyethylenkatheter der Größe PE50 in die Gefäße eingeführt. Die Wunde wurde chirurgisch versorgt und mit Lidocain (Xylocain, Astra Chemicals, Wedel/Holstein) bestrichen.

Durch diese Zugänge konnten die physiologischen Parameter arterielle Blutgase und pH-Wert, Hämatokrit, arterieller Blutdruck und Herzfrequenz sowie die arterielle Plasmaglukosekonzentration während des Versuchs mehrfach gemessen werden.

Nach Implantation der Katheter wurden die Tiere in einen ihrem Körpergewicht entsprechenden Rattentunnel (Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) gesetzt. Dabei wurde das nicht operierte Auge mit einer 60 W Glühbirne (70 cd) aus 30 cm Entfernung beleuchtet, so dass die Beleuchtungsstärke konstant bei 80 lux gehalten wurde.

$\text{Beleuchtungsstärke } E \text{ [lx]} = \text{Intensität } I \text{ [cd]} * \text{COS Einfallswinkel } \alpha / \text{Abstand } r^2$

Formel 2: Zusammenhang zwischen Beleuchtungsstärke und Lichtintensität (nach Kuchling H (1995) Taschenbuch der Physik, Fachbuchverlag Leipzig, Köln).

Arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck wurden über den Katheter in der A. femoralis kontrolliert (Statham Pressure Transducer, Hugo Sachs, March). Außerdem wurden über den arteriellen Katheter Proben zur Analyse des pH-Wertes und der Blutgase (Automatic Blood Gas System AVL 990, AVL, Bad Homburg) entnommen, sowie der Hämatokrit mit einer Tischzentrifuge (Hämatokrit-Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen) bestimmt. Aus dem Plasmaanteil wurde anschließend die Plasmaglukosekonzentration gemessen (Glucose Analyser 2, Beckmann, Frankfurt).

Die Versuchstiere wurden so für mindestens vier Stunden überwacht, um durch die Narkose bedingte Effekte gering zu halten. Erst nach dieser Zeit wurde mit dem Versuch begonnen.

2.1.3. Präparation und Aufbewahrung der Gehirne

Die narkotisierten Tiere wurden nach Versuchsende mit einer Guillotine dekapitiert und die Schädeldecke freigelegt. Diese wurde durch eine kräftige Schere bogenförmig vom Foramen magnum bis zum Gesichtsschädel abgehoben. Danach wurde die Dura mater eröffnet und das Gehirn mit einer feinen Pinzette entnommen, wobei die Hirnnerven durchtrennt wurden.

Das Gehirn wurde sofort in etwa -40 °C kaltem 2-Methylbutan (Merck, Darmstadt) schockgefroren. Durch den hohen Wärmeleitfähigkeitskoeffizienten des 2-Methylbutans lassen sich auch größere Gewebestücke schockgefrieren. Um einem Dehydrieren im Gefrierschrank entgegenzuwirken, wurden die Gehirne in M1 Einbettmedium (Lipshaw, Detroit, MI, USA) aufgenommen. Anschließend wurden sie bei -70 °C bis zum Schneiden aufbewahrt, wobei eine Umhüllung aus Parafilm "M" (American National Can, Greenwich, CT, USA) und eine Plastikdose für weiteren Schutz sorgten.

2.2. Messung der lokalen Glukosetransporterichte mittels Immunautoradiographie

2.2.1. Methode

Die eingebetteten Gehirne wurden in einem Kryomikrotom (Reichert-Jung 2800 Frigocut E, Leica, Bensheim) mit einer Kammertemperatur von $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer Dicke von $10\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten und auf die zimmerwarmen, Poly-L-lysin beschichteten Objektträger aufgenommen. Alle Glasobjektträger wurden mit einer $0.01\text{ }\%$ Poly-L-lysin Lösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) beschichtet, damit die Hirnschnitte besser auf den Objektträgern haften. Sie wurden in einem Metallrondell für 10 min eingetaucht und dann für etwa 1 h im Trockenschrank bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Die Schnitte wurden luftgetrocknet und bis zur Färbung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

Zum Färben wurden die Schnitte 1 min in Aceton fixiert, da eine Fixierung in Paraformaldehyd die darzustellenden Antigene durch Proteinquervernetzung nicht zugänglich macht. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurden die Objektträger mit einem Fettstift umfahren (PAP-Pen, Dako, Glostrup, Dänemark), um ein Verlaufen der aufzutragenden Antikörperlösung zu verhindern. Danach wurden die Membranen in $0.2\text{ }\%$ Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS permeabilisiert und die Objektträger für dreimal jeweils 5 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen.

Ohne dass die Schnitte eintrockneten wurde nun der Primärantikörper aufgetragen. Dabei kam ein im Kaninchen entwickelter polyklonaler Antikörper zum Einsatz, der gegen ein synthetisches Peptid aus 13 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Glukosetransportmoleküls GLUT1 in der Ratte gerichtet ist. Die Herstellung des Antikörpers ist bei Haspel *et al.* (1988) beschrieben. Das GLUT1-Antikörperserum (Diagnostic International, Karlsdorf) wurde $1:125$ verdünnt, dies entspricht 60 pmol/ml . Diese Konzentration wurde durch Sättigungskurven bestimmt.

Im Gegensatz dazu wurde GLUT3 mit Antikörpern dargestellt, die gegen die letzten 12 Aminosäuren des Moleküls gerichtet sind (Diagnostic International, Karlsdorf). Dabei wurde eine Konzentration von $1:750$ eingesetzt, die ebenfalls aus Sättigungskurven bestimmt wurde. Hierbei beträgt die Antikörperkonzentration 80 pmol/ml .

Anschließend wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer und auf einem Schütteltisch inkubiert, damit die Schnitte nicht austrockneten und um eine gleichmäßige Verteilung der Antikörperlösung zu gewährleisten.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst drei Mal mit 0.2 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS für 5 min gewaschen, um nicht gebundene Primärantikörper zu entfernen. Dann wurden die gebundenen Primärantikörper mit [³⁵S]-gekoppelten anti-Kaninchen-IgG aus dem Esel (Amersham, Braunschweig) als Sekundärantikörper für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf dem Schütteltisch inkubiert. Die Konzentrationen der Sekundärantikörper betragen 40 nCi (1480 Bq) je Objektträger bezüglich GLUT1 und 25 nCi (925 Bq) je Objektträger für GLUT3.

Anschließend folgte dreimaliges Waschen der Objektträger mit 0.2 % Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS. Nach einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 50 %, 75 % und 90 % Ethanol zum Dehydrieren wurden die Schnitte luftgetrocknet.

Die trockenen Objektträger wurden mit der Unterseite auf Pappkarton geklebt und in einer Röntgenkassette auf einem feinkörnigen Röntgenfilm (Kodak Min-R, MRDM-1, Rochester, NY, USA) für zwei Wochen exponiert.

Um später quantitative Aussagen über die Verteilung der Glukosetransportmoleküle treffen zu können, wurden Schnitte aus Rattenhirnhomogenat, die wie die Hirnschnitte behandelt wurden, zusammen mit einem kommerziellen [¹⁴C]-Standard (Amersham, Braunschweig) der Filmkassette beigelegt. Dabei repräsentiert das Homogenat die mittlere Dichte der Transportermoleküle im adulten Rattenhirn. Nach einer Expositionszeit von zwei Wochen wurden die Filme entwickelt (Hyperprocessor, Amersham, Braunschweig) und an einer CCD-Bildbearbeitungsanlage ausgewertet.

2.2.2. Bestimmung der Antikörperkonzentrationen

Um diejenige Antikörperkonzentration zu bestimmen, die zur Markierung der im Hirnschnitt vorhandenen Epitope ausreicht, wurden Testreihen mit verschiedenen Konzentrationen des Primärantikörpers und des Sekundärantikörpers durchgeführt. Aus den so gewonnenen Daten wurden Sättigungskurven erstellt. Wegen der unterschiedlich dichten Verteilung von GLUT1 und GLUT3 im Hirngewebe wurden für beide Transportertypen Sättigungskurven erstellt.

2.2.3. Auswerten der Autoradiogramme

Die Autoradiogramme wurden mit Hilfe einer Bildbearbeitungsanlage mit MCID-Software (Microcomputer enhanced image device, Imaging Research Inc., St. Catherines, Ontario, Kanada) ausgewertet. Diese ist mit einer CCD-Kamera ausgestattet, um die Röntgenfilme zu digitalisieren.

Zunächst wurden gerätebedingte Unregelmäßigkeiten der Ausleuchtung des Bildausschnitts korrigiert, dann die optischen Dichten der mitexponierten [^{14}C]-Standards ausgemessen und in einer Eichkurve durch ein Polynom zweiten Grades extrapoliert. Anschließend wurden die optischen Dichten der zu untersuchenden Strukturen auf den jeweiligen Autoradiogrammen gemessen und in die Aktivität pro Gramm Hirngewebe umgerechnet. Zur Anpassung der [^{35}S]-Gewebskonzentration an die [^{14}C]-Standards diente die zuvor erstellte Eichkurve. Von jeder untersuchten Struktur wurden die Dichten in sechs konsekutiven Schnitten gemessen und die Werte analysiert.

2.3. Messung des lokalen zerebralen Glukoseutilisation

Die autoradiographische Methode von Sokoloff *et al.* (1977) zur Messung des lokalen Hirnstoffwechsels beruht auf den besonderen biochemischen Eigenschaften von 2-Desoxy-D-[1-¹⁴C]glukose (Desoxyglukose).

Desoxyglukose wird von den gleichen Transportern über die Bluthirnschranke transportiert wie D-Glukose. Dann wird sie durch Hexokinase (ATP:D-hexose6-phosphotransferase, EC 2.7.1.1) phosphoryliert, jedoch nicht weiter metabolisiert. Das Produkt Desoxyglukose-6-phosphat kann die Zelle nicht mehr verlassen und akkumuliert im Hirngewebe. Dieser erste Schritt der Glykolyse kann als Maß für den Glukoseverbrauch in einzelnen Hirnregionen durch Bestimmung der Konzentration an Desoxyglukose-6-phosphat verwendet werden, wenn Desoxyglukose in Tracermengen eingesetzt wird.

Den Versuchstieren wurde am Versuchstag 125 μ Ci (4.625 MBq) Desoxyglukose (DuPont, Dreieich) je Kilogramm Körpergewicht in 1 ml 0.9%iger NaCl-Lösung im Versuchsansatz der visuellen Deprivation und in 0.5 ml 0.9%iger NaCl-Lösung bei Wasserdeprivation über einen Zeitraum von 20 s intravenös appliziert. Arterielle Blutproben von etwa 100 μ l wurden zu den festgelegten Zeitpunkten 0.25 min, 0.5 min, 0.75 min, 1 min, 2 min, 3 min, 5 min, 7.5 min, 10 min, 15 min, 25 min, 35 min und 45 min entnommen, sofort für 3 min zentrifugiert und danach auf Eis gelagert. Aus diesen Proben wurde die Plasmakonzentration von Glukose und Desoxyglukose bestimmt. Unmittelbar nach Entnahme der letzten Probe wurden die Tiere durch eine Überdosis des Barbiturates Methohexital (Brevimytal, Lilly, Gießen) getötet, sofort dekapitiert und die Gehirne wie oben beschrieben entnommen und eingebettet. Die Radioaktivität der Plasmaproben wurde durch Flüssigszintillationsspektroskopie ermittelt (TriCarb 2200 CA, Packard Instruments, Downes Grove, IL, USA).

In einem Kryomikrotom wurden die Gehirne in einer Dicke von 20 μm geschnitten, auf Deckgläschen aufgenommen und auf einer Heizplatte bei etwa 60 °C getrocknet. Zusammen mit kalibrierten [^{14}C]-Standards wurden die Hirnschnitte in Röntgenfilmkassetten für zwei Wochen auf einem Röntgenfilm exponiert (Kodak MIN-R, MRDR, Rochester, NY, USA).

Dann wurde die lokale Gewebskonzentration an Desoxyglukose durch Densitometrie mit Hilfe der MCID-Software bestimmt und der lokale zerebrale Glukoseverbrauch aus den Plasmaglukose- und Plasmadesoxyglukosespiegeln nach der Formel von Sokoloff *et al.* (1977) berechnet.

2.4. Messung der lokalen Transportkonstanten für Methylglukose

Die autoradiographische Methode von Namba *et al.* (1987) zur Messung der lokalen Glukosetransportrate beruht auf den besonderen biochemischen Eigenschaften von 3-O-¹⁴C]methyl-D-glukose (Methylglukose). Methylglukose wird zwar von Glukosetransportern kompetitiv zu D-Glukose über die Bluthirnschranke transportiert, jedoch nicht verstoffwechselt. Dadurch wird sie in Hirngewebe und Blutplasma gemäß ihrer Konzentration verteilt. Für den Gleichgewichtszustand kann nun die die lokale Glukosetransportrate beschreibende einwärts gerichtete Konstante K_1 und die auswärts gerichtete Konstante k_2 berechnet werden:

$$dC_i / dt = K_1 \text{ [ml/g/min]} * C_p - k_2 \text{ [1/min]} * C_i$$

Formel 3: Differentialgleichung für den Gleichgewichtszustand zwischen der Gewebeglukosekonzentration C_i und der Plasmaglukosekonzentration C_p in Abhängigkeit von den Transportkonstanten K_1 und k_2 (n. Namba *et al.* 1987).

Den Versuchstieren wurde am Versuchstag 125 μ Ci (4.625 MBq) Methylglukose (DuPont, Dreieich) je Kilogramm Körpergewicht in 1 ml 0.9%iger NaCl-Lösung im Versuchsansatz der visuellen Deprivation und in 0.5 ml 0.9%iger NaCl-Lösung bei Wasserdeprivation gleichmäßig während der gesamten Versuchszeit über einen Perfusor (Harvard Apparatus No. 22, FMI, Egelsbach) intravenös appliziert, um eine konstante Konzentration von [¹⁴C] über den Expositionszeitraum zu erhalten (Dienel *et al.* 1991). Arterielle Blutproben von etwa 100 μ l wurden zu festgelegten Zeitpunkten entsprechend der Versuchsdauer entnommen, sofort für 3 min zentrifugiert und danach auf Eis gelagert. Aus diesen Proben wurde die Plasmakonzentration von Glukose und Methylglukose bestimmt. Unmittelbar nach Entnahme der letzten Probe wurden die Tiere dekapitiert und die Gehirne wie oben beschrieben entnommen und eingebettet. Die Radioaktivität der Plasmaproben wurde durch Flüssigszintillationsspektroskopie ermittelt (TriCarb 2200 CA, Packard Instruments, Downes Grove, IL, USA).

In einem Kryomikrotom wurden die Gehirne in einer Dicke von 20 μm geschnitten, auf Deckgläschen aufgenommen und auf einer Heizplatte bei etwa 60°C getrocknet. Zusammen mit kalibrierten [^{14}C]-Standards wurden die Hirnschnitte in Röntgenfilmkassetten für zwei Wochen auf einem Röntgenfilm exponiert (Kodak MIN-R, MRDR, Rochester, USA).

Dann wurde die lokale Gewebskonzentration von Methylglukose durch Densitometrie mit Hilfe der MCID-Software bestimmt und die lokale zerebrale Glukosetransportrate aus den Plasmaglukose- und Plasmamethylglukosespiegeln durch Integration aus Formel (3) berechnet:

$$C_i(T) = K_1 e^{-k_2 T} \int_0^T C_p(t) e^{k_2 t} dt$$

Formel 4: Zusammenhang zwischen Gewebeglukosekonzentration C_i und Plasmaglukosekonzentration C_p . T : Gesamtversuchdauer, K_1 , k_2 : Transportkonstanten für 3-O-[^{14}C]methylglukose (n. Namba *et al.* 1987).

Die Transportkonstanten K_1 für den Einwärts- und k_2 für den Auswärtstransport wurden über eine nicht-lineare Regressionsanalyse nach der Methode der kleinsten Quadrate nach Levenberg und Marquardt bestimmt (Press *et al.* 1986).

2.5. Nissl⁵-Färbung von Nervenzellen zur Bestimmung der regionalen Nervenzellichte

Um zu untersuchen, ob in den Strukturen des visuellen Systems eine Woche nach unilateraler Enukleation auch ein Nervenzellverlust eingetreten ist, wurden 10 µm dicke Kryoschnitte in 96 % Ethanol für 5 min fixiert und in 70 % Ethanol überführt. Dann wurden sie in einer 1 %igen wässrigen Lösung von Toluidinblau (Chroma-Gesellschaft Schmid & Co., Stuttgart-Untertürkheim) gefärbt. Diese Lösung wurde zwei Mal bis zur Dampfbildung erhitzt. Nachdem die Objektträger wieder erkaltet waren, wurden sie vorsichtig zwei bis drei Mal mit destilliertem Wasser und danach mit 70 % Ethanol gespült. Es folgte ein Differenzierungsschritt in 96 % Ethanol. Danach wurden die Schnitte durch absoluten Alkohol und Xylol entwässert und mit einem schnell polymerisierenden Kunstharz überzogen (Eukitt, O. Kindler GmbH & Co., Freiburg i. Br.).

Auf den so hergestellten Objektträgern wurden bei 25facher Vergrößerung im Lichtmikroskop die Strukturen des visuellen Systems fotografiert und die Dichte der Nervenzellen pro Flächeneinheit ausgezählt.

⁵Franz Nissl (1860-1919) Psychiater in Heidelberg.

2.6. Magnetresonanztomographische Messungen

Die Untersuchungen wurden an einem Magnetresonanztomographen für Versuchstiere der Abteilung Klinische Neuroradiologie der Universität Heidelberg durchgeführt. Dieser besteht aus einem BIOSPEC 24/40 System (Bruker, Karlsruhe), das mit einer Frequenz von 100.3 MHz für Protonen arbeitet. Das System ist ausgestattet mit einer aktiv abgeschirmten Gradientenspule. Anregung und Signaldetektion erfolgte durch eine selbstgebaute käfigförmigen Spule mit einem Durchmesser von 30 mm.

Jeweils 6 Versuchs- und Kontrollratten wurden wie oben beschrieben anästhesiert. Der Kopf der Versuchstiere wurde in die Spule gebracht und die Körpertemperatur durch ein spezielles Belüftungssystem bei 37 °C konstant gehalten. In 8 aufeinanderfolgende Spin-Echo diffusionsgewichteten echo-planaren Bildfolgen (DWI) (LeBihan *et al.* 1990; Mansfield 1977) wurden 8 ansteigende Werte der Diffusionsgradientenstärke gemessen, um den Apparent Diffusion Coefficient zu kartieren (Reith *et al.* 1995). Der ADC wird bestimmt durch das Verhältnis der Signalintensität (SI) zweier MR-Bilder mit unterschiedlicher Diffusionswichtung, angegeben als $\ln(SI_1/SI_2)$ und eine Konstante, die aus Stärke, Dauer und Zeitverlauf des Diffusionsgradienten berechnet und b-Wert genannt wird. Die gesamte Messdauer für die MR-Bilder, um die Diffusionskarten zu berechnen, betrug etwa eine Minute pro Versuchstier.

2.7. Statistische Datenanalyse

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Tabellenkalkulation Excel 5.0 (Microsoft Corp., Redmond, UT, USA), Origin 5.0 (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, USA) sowie Programmen zur Varianzanalyse und multiplen t-Tests mit Bonferroni-Korrektur nach Wallenstein *et al.* (1980). Die Transportkonstanten für den Transport von Methylglukose wurden durch das von der Arbeitsgruppe von Louis Sokoloff, Bethesda, MD, USA, im Jahre 1985 erstellte Programm KFIT3KA errechnet, das von mir modifiziert wurde.

In der Gruppe der Versuchstiere der visuellen Deprivation wurden Differenzen zwischen einzelnen Versuchsgruppen durch den t-Test für verbundene Stichproben nach Gosset⁶ getestet, da die Gehirne im Seitenvergleich ausgewertet wurden. Die wasserdeprivierten Tiere wurden mit einer Kontrollgruppe verglichen. Deshalb wurden hier die Ergebnisse für die einzelnen Strukturen durch Varianzanalyse (ANOVA) und t-Test nach Student⁷ für ungepaarte Stichproben ermittelt (Press *et al.* 1986). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt, das Signifikanzniveau ist jeweils angegeben.

⁶William Sealey Gosset (1876-1937) Mathematiker in Dublin.

⁷Pseudonym für William S. Gosset.

3. Ergebnisse

3.1. Physiologische Parameter der Versuchstiere

Die Versuchsgruppen Wasserdeprivation und E nukleation unterschieden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht in Herzfrequenz, arteriellem systolischen und diastolischen Blutdruck, den Werten der arteriellen Blutgasanalyse wie pH-Wert, pCO₂, pO₂ und BE. Auch die arterielle Plasmaglukosekonzentration unterschied sich nicht zwischen den Versuchsgruppen (Tab. 3).

Jedoch führte eine dreitägige Wasserdeprivation zu einem Gewichtsverlust der Tiere von durchschnittlich 25 % durch eine Verminderung des Gesamtkörperwassers. Als Zeichen des Flüssigkeitsverlustes stieg der Hämatokrit während der drei Dursttage um etwa 20 % an. Die Tiere konnten das verringerte Flüssigkeitsvolumen allerdings gut kompensieren, sie zeigten keine Auffälligkeiten im Verhalten, die Nahrungsaufnahme war ungestört, die Urinosmolalität stieg jedoch von 811 ± 264 mmol/kg in der Kontrollgruppe auf 3548 ± 575 mmol/kg in der Gruppe der wasserdeprivierten Tiere (Abb. 3).

Die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach unilateraler E nukleation ist in Abb. 4 und unter Wasserdeprivation in Abb. 5 dargestellt.

	Enukleation	Wasser- deprivation	Kontrolle
Anzahl	28	23	20
Gewicht [g]	315 ± 22	242 ± 18	* 322 ± 15
Hämatokrit [%]	46.1 ± 3.3	52.6 ± 3.5	* 42.6 ± 5.2
Art. Blutdruck, systol. [mmHg]	159 ± 21	160 ± 24	166 ± 16
Art. Blutdruck, diastol. [mmHg]	102 ± 14	102 ± 16	111 ± 10
Herzfrequenz [min ⁻¹]	407 ± 57	412 ± 54	421 ± 51
Art. pH	7.415 ± 0.041	7.399 ± 0.034	7.404 ± 0.029
Art. pCO ₂ [mmHg]	38.9 ± 3.1	39.8 ± 4.4	40.6 ± 1.7
Art. pO ₂ [mmHg]	90.1 ± 9.9	102.2 ± 21.3	100.8 ± 26.5
B.E. [mmol/l]	0.5 ± 2.6	-0.2 ± 1.8	0.9 ± 1.1
Art. Plasmaglukose [mg/dl]	166 ± 40	136 ± 29	164 ± 44

Mittelwerte ± Standardabweichungen. * p < 0.05

Tab. 3: Physiologische Parameter der Versuchstiere in den Gruppen Wasserdeprivation und Enukleation im Vergleich zur Kontrollgruppe.

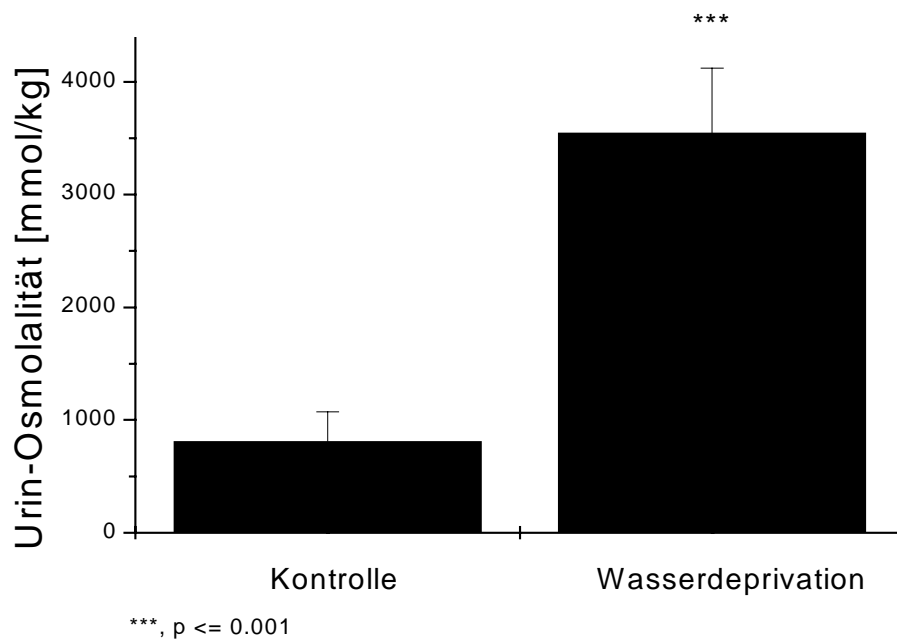


Abb. 3: Urinosmolalität der wasserdeprivierten Tiere gegenüber der Kontrollgruppe.

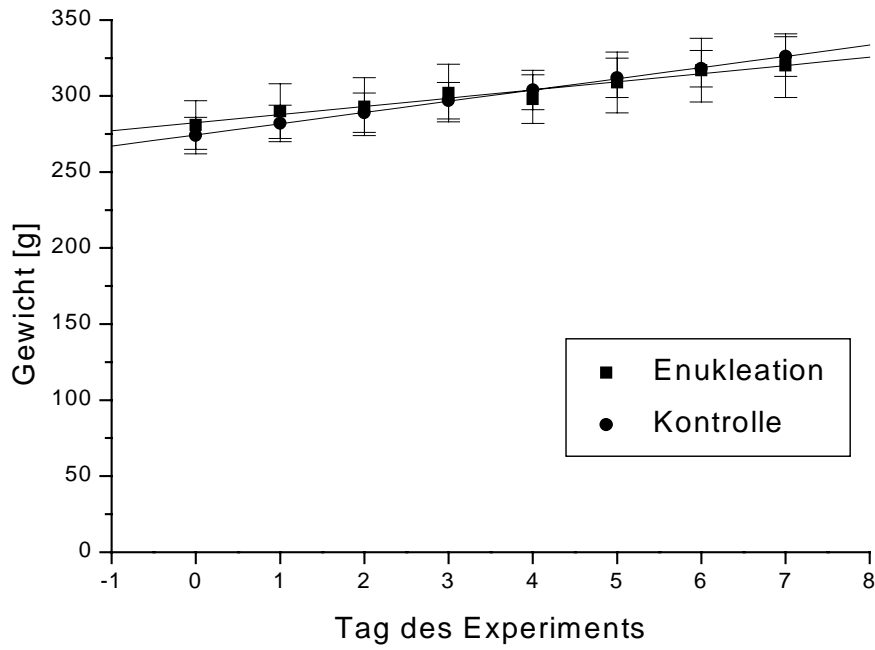


Abb. 4: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach unilateraler Enukleation.

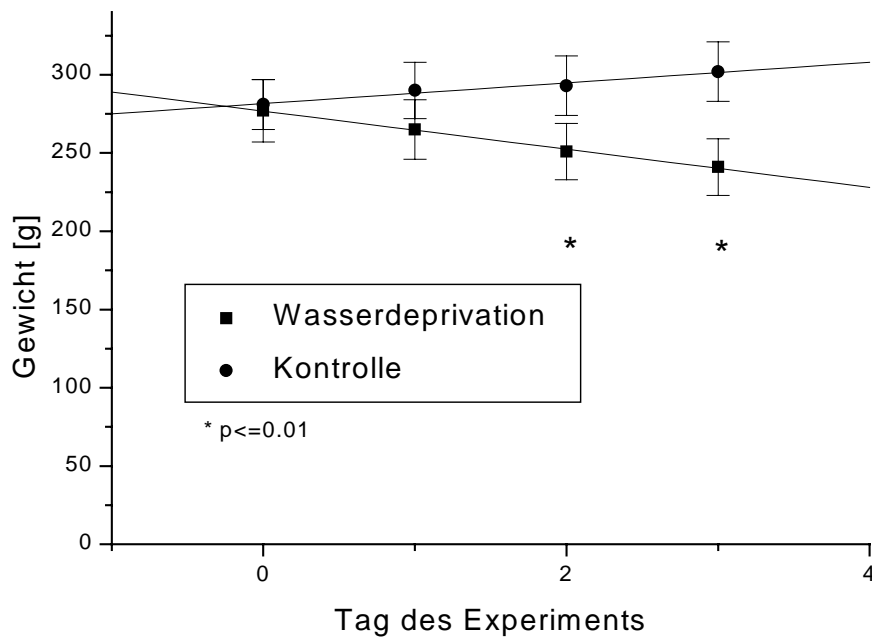


Abb. 5: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere unter Wasserdeprivation.

3.2. Sättigungskurven der Antikörper

Die von Zeller *et al.* (1995; 1997) entwickelte Methode zur quantitativen Bestimmung der Dichte der Glukosetransportmoleküle GLUT1 und GLUT3 in verschiedenen Hirnstrukturen wurde modifiziert, um möglichst alle Epitope mit geringen Mengen an Antikörper abzusättigen. Zunächst wurde in einer Verdünnungsreihe die Konzentration des Primärantikörpers gegen GLUT1 bzw. GLUT3 bestimmt, wobei der Sekundärantikörper im Überschuss zugegeben wurde. Anschließend wurde die Konzentration des Sekundärantikörpers durch entsprechende Verdünnungsreihen variiert. Es zeigt sich, dass durch die verlängerte Inkubationszeit über Nacht weniger Primärantikörper eingesetzt werden muß, um alle Epitope zu besetzen.

Die Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper wurden im Versuch so gewählt, dass sie sich im Sättigungsbereich befinden. Dies sollen die Pfeile in Abb. 6-9 verdeutlichen. Bei Einsatz des Sekundärantikörpers von GLUT3 ergab sich eine Filmschwärzung in der Autoradiographie ausserhalb des linearen Bereichs, so dass wir diesen Antikörper nicht im Sättigungsbereich einsetzen konnten. Trotzdem wird durch die geeigneten Inkubationsparameter und den Versuchsaufbau eine korrekte Darstellung der Transporterverteilung erreicht.

In Bezug auf GLUT1 ergab sich eine Konzentration des Primärantikörpers von 60 pmol/ml. Dazu wurde das Kaninchenserum 1:125 verdünnt. Der Sekundärantikörper bezüglich GLUT1 wurde in einer Konzentration von 40 nCi (1480 Bq) je Objektträger eingesetzt.

Der GLUT3-Primärantikörper wurde 1:750 aus der Originalpackung verdünnt, was einer Konzentration von 80 pmol/ml entspricht. Die Konzentration des Sekundärantikörpers ergab sich zu 25 nCi (925 Bq) je Objektträger.

Die frühere Mischung aus radioaktiv markiertem und unmarkiertem Kaninchen-IgG (Zeller *et al.* 1995; 1997), um ein zu starkes Signal zu vermeiden, wurde nicht mehr eingesetzt, weil durch die höhere Verdünnung des Sekundärantikörpers eine nicht mehr übermäßige Schwärzung des Röntgenfilms erreicht wurde.

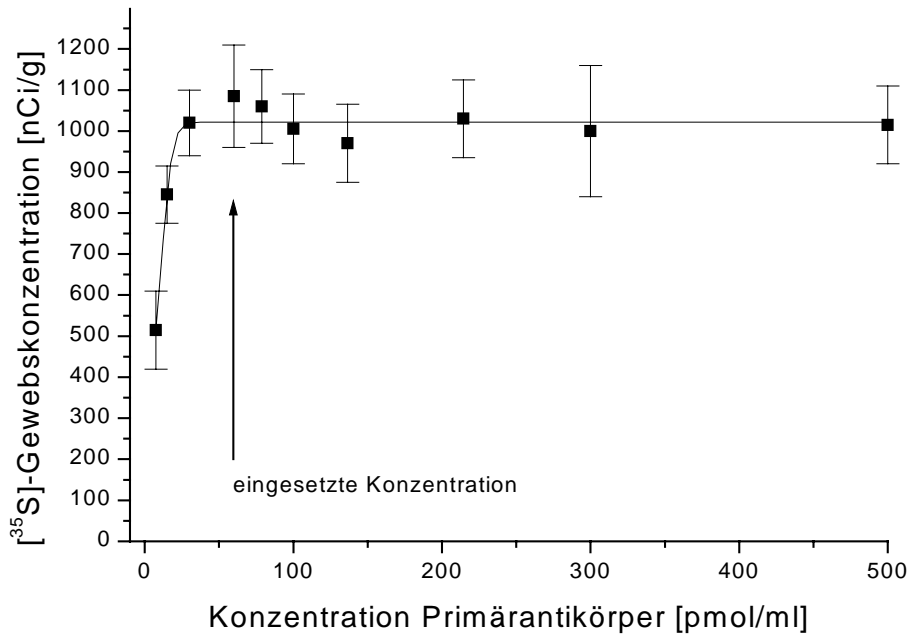


Abb. 6: Sättigungskurve des Primärantikörpers für GLUT1

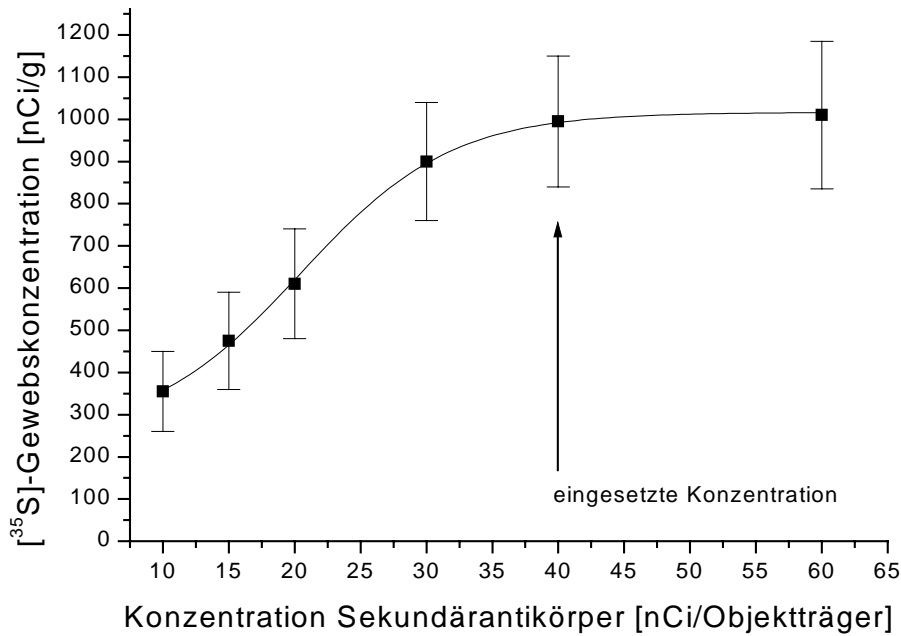


Abb. 7: Sättigungskurve des Sekundärantikörpers für GLUT1

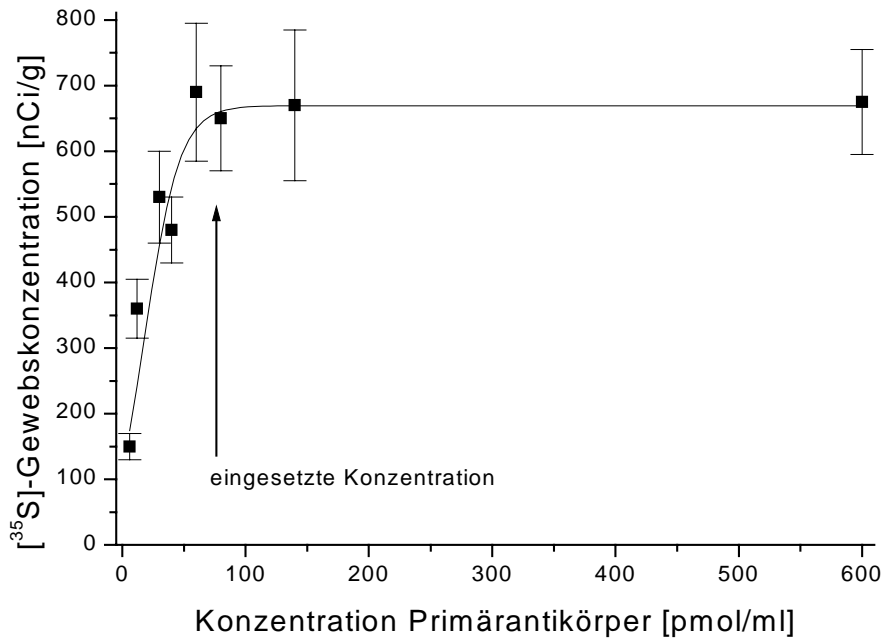


Abb. 8: Sättigungskurve des Primärantikörpers für GLUT3

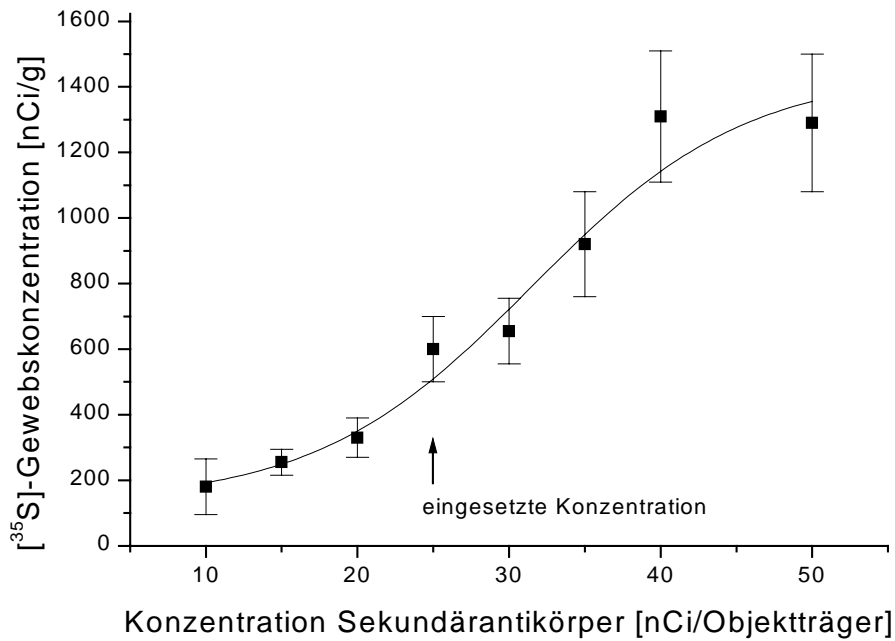


Abb. 9: Sättigungskurve des Sekundärantikörpers für GLUT3

3.3. Visuelle Deprivation

3.3.1. Glukosetransporterichte GLUT1 und GLUT3

Mit der für GLUT1 bzw. GLUT3 entwickelten immunautoradiographischen Methode wurden die Dichten der Glukosetransporter in konsekutiven Gefrierschnitten des Gehirns rechtsseitig enukleierter Ratten bestimmt. In 34 Strukturen wurden die GLUT1- bzw. GLUT3-Dichte gemessen und mit den entsprechenden Dichten der kontralateralen Seite mit dem t-Test für unverbundene Stichproben nach Gosset verglichen. Beide Werte wurden auf Hirnhomogenat unbehandelter Ratten bezogen. Da etwa 90 % (Cooper & Thurlow 1985) bis 97 % (Jeffery 1984) der retinalen Fasern im Chiasma opticum kreuzen, ist es möglich, die ipsilaterale unveränderte Seite als Kontrolle für den Vergleich mit der kontralateralen Hemisphäre zu nehmen (Horsburgh & McCulloch 1991).

In Tab. 4 sind die einzelnen Daten für rechte und linke Hirnseite bezüglich GLUT1 und in Tab. 5 bezüglich GLUT3 für die ermittelten Strukturen angegeben.

Für GLUT1 zeigt sich, dass im dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale eine um etwa 20 % erniedrigte Dichte auf der linken Seite zu finden ist, auf die die Fasern des rechten, enukleierten Auges projizieren. Auch im frontoparietelen Kortex und in der Area 17 des visuellen Kortex sind die GLUT1-Proteindichten um etwa 13 % bzw. 5 % erniedrigt, während in der Area 18 des visuellen Kortex die GLUT1-Dichte um etwa 14 % erhöht ist.

Dagegen zeigt sich die Dichte von GLUT3 im dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale um etwa 11 %, im magno- und parvozellulären Anteil des ventralen Kernes des Corpus geniculatum laterale um etwa 11 % bzw. 8 %, sowie in den Schichten I-III des Colliculus superior um etwa 23 % erniedrigt, während in der Area 17 des visuellen Kortex die GLUT3-Dichte um etwa 5 % erhöht ist.

Struktur	n=8 GLUT1-Dichte rechts	n=8 GLUT1-Dichte links
Gyrus cinguli	97 ± 11	95 ± 11
Frontoparietaler Cortex	105 ± 12	91 ± 15 *
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Kern	105 ± 7	84 ± 10 **
", ventraler Kern, parvozellulare Schicht	93 ± 12	94 ± 8
", ventraler Kern, magnozellular Schicht	84 ± 11	88 ± 12
Corpus callosum	39 ± 2	40 ± 3
Corpus mamillare	118 ± 27	119 ± 26
Corpus geniculatum mediale	101 ± 10	106 ± 9
Retrosplenialer Cortex	98 ± 20	98 ± 20
Entorhinaler Cortex	79 ± 12	99 ± 18
Okzipitaler Cortex	106 ± 11	103 ± 11
Forceps major corporis callosi	38 ± 5	38 ± 4
Colliculus superior, Schichten 1-3	111 ± 16	111 ± 19
Colliculus superior, Schichten 4-6	88 ± 13	91 ± 14
Region des zentralen Höhlengrau	94 ± 17	96 ± 19
Nucleus mesencephalicus	59 ± 12	65 ± 16
Substantia nigra, Pars compacta	82 ± 10	82 ± 9
Substantia nigra, Pars reticularis	100 ± 19	112 ± 20
Hippocampus, CA1, Stratum radiatum	80 ± 7	75 ± 13
Hippocampus, CA1, Pyramidenzellschicht	120 ± 8	115 ± 15
Hippocampus, CA 2	89 ± 9	94 ± 11
Hippocampus, CA 3	86 ± 17	100 ± 18
Hippocampus, CA 4	96 ± 11	101 ± 16
Gyrus dentatus, Stratum moleculare	74 ± 10	73 ± 13
Gyrus dentatus, Körnerzellschicht	95 ± 14	98 ± 15
Visueller Cortex, Area 17	131 ± 24	125 ± 22
Visueller Cortex, Area 18a	121 ± 20	138 ± 20
Colliculus inferior	145 ± 23	148 ± 20
Hirnhomogenat	100 ± 7	100 ± 7

Tab. 4: Vergleich der GLUT1-Dichte in rechter und linker Hirnhälfte nach rechtsseitiger Enukleation. Die Meßwerte beziehen sich auf Hirnhomogenat unbehandelter Ratten.

* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01

Struktur	n=8 GLUT3-Dichte rechts	n=8 GLUT3-Dichte links
Gyrus cinguli	110 ± 7	108 ± 10
Frontoparietaler Cortex	113 ± 13	122 ± 12
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Kern	138 ± 12	123 ± 11 *
", ventraler Kern, parvozellulare Schicht	132 ± 13	121 ± 14
", ventraler Kern, magnozellular Schicht	131 ± 14	116 ± 15 *
Corpus callosum	38 ± 6	38 ± 6
Corpus mamillare	120 ± 33	119 ± 32
Corpus geniculatum mediale	122 ± 11	126 ± 7
Retrosplenialer Cortex	106 ± 8	107 ± 10
Entorhinaler Cortex	112 ± 19	111 ± 13
Okzipitaler Cortex	109 ± 10	110 ± 11
Forceps major corporis callosi	38 ± 6	36 ± 10
Colliculus superior, Schichten 1-3	87 ± 18	67 ± 13 *
Colliculus superior, Schichten 4-6	83 ± 17	83 ± 17
Region des zentralen Höhlengrau	96 ± 7	95 ± 10
Nucleus mesencephalicus	65 ± 11	59 ± 10
Substantia nigra, Pars compacta	51 ± 7	53 ± 9
Substantia nigra, Pars reticularis	102 ± 22	101 ± 23
Hippocampus, CA1, Stratum radiatum	114 ± 16	115 ± 19
Hippocampus, CA1, Pyramidenzellschicht	118 ± 14	118 ± 16
Hippocampus, CA 2	98 ± 15	96 ± 18
Hippocampus, CA 3	109 ± 18	111 ± 15
Hippocampus, CA 4	103 ± 15	101 ± 14
Gyrus dentatus, Stratum moleculare	37 ± 12	41 ± 9
Gyrus dentatus, Körnerzellschicht	107 ± 15	101 ± 14
Visueller Cortex, Area 17	151 ± 25	159 ± 24
Visueller Cortex, Area 18a	163 ± 45	164 ± 36
Colliculus inferior	119 ± 25	119 ± 24
Hirnhomogenat	100 ± 12	100 ± 12

Tab. 5: Vergleich der GLUT3-Dichte in rechter und linker Hirnhälfte nach rechtsseitiger Enukleation. Die Meßwerte beziehen sich auf Hirnhomogenat unbehandelter Ratten.

* p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01

3.3.2. Lokale zerebrale Glukoseutilisation

Die lokale zerebrale Glukoseutilisation (LCGU) als Maß für den lokalen Hirnstoffwechsel war im dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale um etwa 17 %, im magno- und parvozellulären Teil des ventralen Kerns des Corpus geniculatum laterale um etwa 21 % bzw. 10 %, in den Schichten I-III des Colliculus superior um etwa 20 %, im okzipitalen Kortex um etwa 29 % und der Area 17 des visuellen Kortex um etwa 31 % erniedrigt. In der Area 18 des visuellen Kortex ist die LCGU um etwa 6 % erhöht.

Andere Strukturen des visuellen Systems wie der Tractus opticus oder sekundäre und tertiäre Areale des visuellen Kortex wiesen im Seitenvergleich keine Unterschiede auf. Auch fanden sich keine Unterschiede in einer der anderen untersuchten Strukturen zwischen rechter und linker Hemisphäre (Tab. 6).

Struktur	n=5 LCGU rechts [$\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$]	n=5 LCGU links [$\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$]
Frontaler Cortex	69 \pm 3	69 \pm 2
Nucleus accumbens	51 \pm 8	52 \pm 9
Genu corporis callosi	23 \pm 7	23 \pm 7
Nuclei septales laterales	42 \pm 6	42 \pm 6
Nucleus caudatus	69 \pm 10	67 \pm 8
Parietaler Cortex	69 \pm 8	68 \pm 6
Sensomotorischer Cortex	67 \pm 7	65 \pm 5
Globus pallidus	35 \pm 5	36 \pm 6
Hypothalamus	33 \pm 3	34 \pm 4
Corpus amyaloideum	46 \pm 6	48 \pm 6
Thalamus dorsalis, lateraler Kern	70 \pm 9	72 \pm 10
Thalamus dorsalis, ventraler Kern	66 \pm 8	66 \pm 8
Capsula interna	22 \pm 2	22 \pm 3
Tractus opticus	16 \pm 4	17 \pm 2
Gyrus cinguli	66 \pm 2	66 \pm 3
Frontoparietaler Cortex	69 \pm 12	61 \pm 5
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Kern	65 \pm 10	55 \pm 6 *
" , ventraler Kern, parvozellulare Schicht	51 \pm 13	42 \pm 7
" , ventraler Kern, magnozellular Schicht	59 \pm 18	53 \pm 18
Corpus callosum	22 \pm 5	22 \pm 4
Corpus mamillare	67 \pm 13	69 \pm 14
Corpus geniculatum mediale	112 \pm 26	112 \pm 26
Retrosplenialer Cortex	63 \pm 3	64 \pm 3
Entorhinaler Cortex	39 \pm 5	39 \pm 4
Okzipitaler Cortex	73 \pm 8	57 \pm 9 **
Forceps major corporis callosi	19 \pm 3	18 \pm 4
Colliculus superior, Schichten 1-3	57 \pm 7	48 \pm 8 *
Colliculus superior, Schichten 4-6	57 \pm 11	56 \pm 11
Region des zentralen Höhlengrau	46 \pm 7	46 \pm 8
Nucleus mesencephalicus	52 \pm 10	52 \pm 9
Substantia nigra, Pars compacta	45 \pm 11	44 \pm 11
Substantia nigra, Pars reticularis	54 \pm 9	53 \pm 7
Pedunculus cerebri	20 \pm 3	21 \pm 5
Hippocampus, CA1, Stratum radiatum	39 \pm 8	39 \pm 7
Hippocampus, CA1, Pyramidenzellschicht	59 \pm 11	58 \pm 9
Hippocampus, CA 2	38 \pm 7	37 \pm 4
Hippocampus, CA 3	47 \pm 7	48 \pm 7
Hippocampus, CA 4	43 \pm 8	42 \pm 7
Gyrus dentatus, Stratum moleculare	31 \pm 2	31 \pm 4
Gyrus dentatus, Körnerzellschicht	61 \pm 11	59 \pm 9
Visueller Cortex, Area 17	75 \pm 11	57 \pm 11 *
Visueller Cortex, Area 18a	43 \pm 4	45 \pm 4
Colliculus inferior	166 \pm 33	165 \pm 27
Lemniscus lateralis	76 \pm 12	79 \pm 12
Region des pontinen Graus	40 \pm 7	40 \pm 6
Medulla cerebelli	24 \pm 6	24 \pm 6
Cortex cerebelli	42 \pm 7	44 \pm 8
Nucleus olivaris superior	105 \pm 23	107 \pm 28
Nucleus dentatus	63 \pm 16	65 \pm 17
Nucleus vestibularis	90 \pm 20	87 \pm 19

Tab. 6: Vergleich der LCGU in rechter und linker Hirnhälfte nach rechtsseitiger Euklektion.

* p <= 0.05, ** p <= 0.01

3.3.3. Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose

Die Konstanten K_1 und k_2 für den Transport von 3-O-[^{14}C]Methylglukose waren im dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale um jeweils etwa 10 % erniedrigt. Nur die Transportkonstante K_1 war im parvozellulären Anteil des ventralen Kernes des Corpus geniculatum laterale um etwa 6 % kleiner als in der Kontrollgruppe. Tab. 7 und Tab. 8 zeigen eine Übersicht über die einzelnen Meßwerte. In keiner der anderen untersuchten Strukturen waren die Transportkonstanten K_1 und k_2 zwischen rechter und linker Hemisphäre verschieden.

Struktur	n=12 K ₁ rechts [ml/g/min]	n=12 K ₁ links [ml/g/min]
Frontaler Cortex	0.178 ± 0.022	0.175 ± 0.020
Nucleus accumbens	0.147 ± 0.016	0.140 ± 0.016
Genu corporis callosi	0.060 ± 0.006	0.062 ± 0.007
Nuclei septales laterales	0.103 ± 0.006	0.101 ± 0.007
Nucleus caudatus	0.139 ± 0.012	0.136 ± 0.011
Parietaler Cortex	0.165 ± 0.019	0.165 ± 0.017
Sensomotorischer Cortex	0.184 ± 0.022	0.184 ± 0.021
Globus pallidus	0.097 ± 0.008	0.091 ± 0.007
Hypothalamus	0.096 ± 0.008	0.098 ± 0.009
Corpus amygdaloideum	0.095 ± 0.008	0.095 ± 0.008
Thalamus dorsalis, lateraler Kern	0.135 ± 0.013	0.143 ± 0.012
Thalamus dorsalis, ventraler Kern	0.158 ± 0.017	0.155 ± 0.017
Capsula interna	0.040 ± 0.004	0.038 ± 0.004
Gyrus cinguli	0.177 ± 0.016	0.173 ± 0.016
Frontoparietaler Cortex	0.177 ± 0.017	0.174 ± 0.019
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Kern	0.138 ± 0.013	0.125 ± 0.011 **
", ventraler Kern, parvozellulare Schicht	0.139 ± 0.012	0.131 ± 0.009 *
", ventraler Kern, magnozellige Schicht	0.123 ± 0.016	0.122 ± 0.015
Corpus callosum	0.065 ± 0.005	0.066 ± 0.005
Corpus mamillare	0.140 ± 0.023	0.143 ± 0.026
Corpus geniculatum mediale	0.160 ± 0.018	0.157 ± 0.020
Retrosplenialer Cortex	0.180 ± 0.016	0.175 ± 0.015
Entorhinaler Cortex	0.094 ± 0.008	0.094 ± 0.008
Okzipitaler Cortex	0.182 ± 0.019	0.179 ± 0.020
Forceps major corporis callosi	0.069 ± 0.004	0.070 ± 0.004
Colliculus superior, Schichten 1-3	0.176 ± 0.031	0.169 ± 0.026
Colliculus superior, Schichten 4-6	0.166 ± 0.026	0.174 ± 0.026
Region des zentralen Höhlengrau	0.132 ± 0.011	0.133 ± 0.010
Nucleus mesencephalicus	0.139 ± 0.010	0.134 ± 0.011
Substantia nigra, Pars compacta	0.099 ± 0.011	0.102 ± 0.011
Substantia nigra, Pars reticularis	0.124 ± 0.013	0.129 ± 0.012
Hippocampus, CA1, Stratum radiatum	0.106 ± 0.008	0.109 ± 0.010
Hippocampus, CA1, Pyramidenzellschicht	0.124 ± 0.010	0.127 ± 0.012
Hippocampus, CA 2	0.105 ± 0.009	0.106 ± 0.009
Hippocampus, CA 3	0.109 ± 0.010	0.113 ± 0.010
Hippocampus, CA 4	0.108 ± 0.009	0.110 ± 0.010
Gyrus dentatus, Stratum moleculare	0.119 ± 0.013	0.118 ± 0.015
Gyrus dentatus, Körnerzellschicht	0.143 ± 0.014	0.138 ± 0.013
Visueller Cortex, Area 17	0.164 ± 0.018	0.161 ± 0.016
Visueller Cortex, Area 18a	0.132 ± 0.012	0.131 ± 0.012
Colliculus inferior	0.215 ± 0.042	0.214 ± 0.039
Lemniscus lateralis	0.145 ± 0.019	0.147 ± 0.019
Region des pontinen Graus	0.120 ± 0.012	0.123 ± 0.011
Medulla cerebelli	0.062 ± 0.004	0.065 ± 0.004
Cortex cerebelli	0.145 ± 0.012	0.160 ± 0.017
Nucleus olivaris superior	0.191 ± 0.025	0.183 ± 0.019
Nucleus dentatus	0.163 ± 0.021	0.160 ± 0.019
Nucleus vestibularis	0.196 ± 0.051	0.191 ± 0.048

Tab. 7: Vergleich der Gleichgewichtskonstanten K₁ in rechter und linker Hirnhälfte nach rechtsseitiger Enukleation.

* p <= 0.05, ** p <= 0.01

Struktur	n=12 k ₂ rechts [min ⁻¹]	n=12 k ₂ links [min ⁻¹]
Frontaler Cortex	0.356 ± 0.056	0.349 ± 0.051
Nucleus accumbens	0.309 ± 0.044	0.289 ± 0.044
Genu corporis callosi	0.124 ± 0.024	0.132 ± 0.026
Nuclei septales laterales	0.217 ± 0.017	0.210 ± 0.020
Nucleus caudatus	0.306 ± 0.034	0.293 ± 0.032
Parietaler Cortex	0.332 ± 0.050	0.332 ± 0.045
Sensomotorischer Cortex	0.370 ± 0.056	0.365 ± 0.052
Globus pallidus	0.212 ± 0.025	0.192 ± 0.023
Hypothalamus	0.200 ± 0.025	0.206 ± 0.027
Corpus amygdaloideum	0.197 ± 0.025	0.196 ± 0.024
Thalamus dorsalis, lateraler Kern	0.254 ± 0.034	0.271 ± 0.030
Thalamus dorsalis, ventraler Kern	0.309 ± 0.042	0.298 ± 0.044
Capsula interna	0.085 ± 0.022	0.078 ± 0.021
Gyrus cinguli	0.337 ± 0.038	0.330 ± 0.039
Frontoparietaler Cortex	0.343 ± 0.043	0.331 ± 0.045
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Kern	0.266 ± 0.034	0.240 ± 0.030 *
" , ventraler Kern, parvozellulare Schicht	0.278 ± 0.032	0.262 ± 0.026
" , ventraler Kern, magnozellige Schicht	0.275 ± 0.049	0.270 ± 0.045
Corpus callosum	0.141 ± 0.018	0.140 ± 0.017
Corpus mamillare	0.255 ± 0.057	0.264 ± 0.066
Corpus geniculatum mediale	0.319 ± 0.046	0.304 ± 0.050
Retrosplenialer Cortex	0.342 ± 0.039	0.328 ± 0.037
Entorhinaler Cortex	0.188 ± 0.026	0.184 ± 0.025
Okzipitaler Cortex	0.346 ± 0.046	0.330 ± 0.048
Forceps major corporis callosi	0.152 ± 0.013	0.155 ± 0.014
Colliculus superior, Schichten 1-3	0.375 ± 0.084	0.351 ± 0.067
Colliculus superior, Schichten 4-6	0.365 ± 0.072	0.390 ± 0.071
Region des zentralen Höhlengrau	0.262 ± 0.030	0.260 ± 0.027
Nucleus mesencephalicus	0.305 ± 0.030	0.285 ± 0.032
Substantia nigra, Pars compacta	0.232 ± 0.038	0.233 ± 0.034
Substantia nigra, Pars reticularis	0.248 ± 0.036	0.254 ± 0.033
Hippocampus, CA1, Stratum radiatum	0.214 ± 0.025	0.221 ± 0.030
Hippocampus, CA1, Pyramidenzellschicht	0.228 ± 0.028	0.239 ± 0.032
Hippocampus, CA 2	0.217 ± 0.026	0.218 ± 0.027
Hippocampus, CA 3	0.210 ± 0.030	0.217 ± 0.028
Hippocampus, CA 4	0.205 ± 0.025	0.213 ± 0.028
Gyrus dentatus, Stratum moleculare	0.254 ± 0.039	0.260 ± 0.045
Gyrus dentatus, Körnerzellschicht	0.254 ± 0.034	0.246 ± 0.032
Visueller Cortex, Area 17	0.313 ± 0.045	0.302 ± 0.040
Visueller Cortex, Area 18a	0.258 ± 0.031	0.253 ± 0.033
Colliculus inferior	0.425 ± 0.100	0.421 ± 0.093
Lemniscus lateralis	0.288 ± 0.049	0.290 ± 0.050
Region des pontinen Graus	0.246 ± 0.034	0.252 ± 0.031
Medulla cerebelli	0.157 ± 0.015	0.167 ± 0.016
Cortex cerebelli	0.250 ± 0.029	0.281 ± 0.040
Nucleus olivaris superior	0.405 ± 0.066	0.372 ± 0.047
Nucleus dentatus	0.333 ± 0.055	0.322 ± 0.049
Nucleus vestibularis	0.289 ± 0.101	0.280 ± 0.096

Tab. 8: Vergleich der Gleichgewichtskonstanten k₂ in rechter und linker Hirnhälfte nach rechtsseitiger Enukleation.

* p <= 0.05, ** p <= 0.01

3.3.4. Nervenzelldichte

Eine Woche nach unilateraler ENUKLEATION zeigt sich die Zahl der Nervenzellen in den Strukturen des visuellen Systems im Seitenvergleich nicht vermindert.

Struktur	Rechts	Links
Colliculus superior, Schichten I-III	82 ± 8	79 ± 7
Corpus geniculatum laterale, dorsaler Nucleus	61 ± 7	59 ± 2
Corpus geniculatum laterale, ventraler Nucleus	21 ± 4	19 ± 5

Tab. 9: Nervenzelldichte. Angegeben ist die Anzahl der Neurone pro ausgezählter Hirnstruktur des photographischen Bildes (n=6).

3.4. Wasserdeprivation

3.4.1. Glukosetransporterichte GLUT1 und GLUT3

In Analogie zum pathophysiologischen Modell der visuellen Deprivation wurden die GLUT1- und GLUT3-Dichten von aufeinanderfolgenden Gefrierschnitten des Gehirns drei Tage wasserdeprivierter Ratten gemessen. Hierbei wurden die ermittelten Dichten aus 18 Strukturen mit denen nicht wasserdeprivierter Kontrollratten verglichen.

In bezug auf GLUT1 ergaben sich erhöhte Proteindichten im Nucleus paraventricularis um etwa 15 %, im Subfornikalorgan um etwa 32 % und in der Neuro- und Adenohypophyse um jeweils etwa 62 %. Die einzelnen Werte sind in Tab. 10 wiedergegeben.

Dagegen zeigt sich die GLUT3-Dichte in der Capsula interna um etwa 19 % vermindert und in der Neurohypophyse um etwa 160 % erhöht. Tab. 11 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Strukturen.

Struktur	n=5 GLUT1-Dichte Kontrolle	n=5 GLUT1-Dichte Wasserdeprivation
Nucleus caudatus	108 ± 11	111 ± 3
Nucleus septalis triangularis	110 ± 12	120 ± 11
Parietaler Kortex	105 ± 6	111 ± 8
Sensomotorischer Kortex	126 ± 12	128 ± 9
Subfornikalorgan	90 ± 13	119 ± 20 *
Nucleus suprachiasmaticus	98 ± 14	104 ± 10
Nucleus supraopticus	117 ± 14	129 ± 16
Nucleus periventricularis	90 ± 13	98 ± 9
Thalamus, Nucleus ventrolateralis	111 ± 10	115 ± 12
Nucleus paraventricularis	112 ± 12	129 ± 9 *
Hypothalamus	99 ± 10	100 ± 10
Corpus amygdaloideum	111 ± 9	117 ± 9
Thalamus, Nucleus anterior	116 ± 14	113 ± 16
Capsula interna	44 ± 9	44 ± 8
Corpus callosum	52 ± 10	51 ± 6
Gyrus cinguli	105 ± 8	106 ± 9
Neurohypophyse	143 ± 9	231 ± 31 **
Adenohypophyse	108 ± 15	175 ± 25 **
Gesamthirn	100 ± 9	100 ± 7

Tab. 10: Vergleich der GLUT1-Dichte nach drei Tagen Wasserdeprivation gegen eine Kontrollgruppe unbehandelte Ratten. Die Meßwerte beziehen sich die mittlere GLUT1-Dichte im Gesamthirn. * p <= 0.05, ** p <= 0.01

Struktur	n=5 GLUT3-Dichte Kontrolle	n=5 GLUT3-Dichte Wasserdeprivation
Nucleus caudatus	114 ± 12	119 ± 10
Nucleus septalis triangularis	152 ± 11	143 ± 9
Parietaler Kortex	100 ± 9	105 ± 17
Sensomotorischer Kortex	116 ± 11	132 ± 21
Subfornikalorgan	91 ± 19	111 ± 23
Nucleus suprachiasmaticus	94 ± 13	88 ± 18
Nucleus supraopticus	119 ± 22	122 ± 31
Nucleus periventricularis	83 ± 7	86 ± 23
Thalamus, Nucleus ventrolateralis	159 ± 18	146 ± 16
Nucleus paraventricularis	129 ± 15	151 ± 28
Hypothalamus	101 ± 9	95 ± 6
Corpus amygdaloideum	129 ± 7	137 ± 16
Thalamus, Nucleus anterior	135 ± 8	125 ± 15
Capsula interna	21 ± 3	17 ± 2 *
Corpus callosum	47 ± 15	39 ± 4
Gyrus cinguli	111 ± 12	100 ± 9
Neurohypophyse	108 ± 15	281 ± 2 **
Adenohypophyse	18 ± 7	25 ± 13
Gesamthirn	100 ± 6	100 ± 5

Tab. 11: Vergleich der GLUT3-Dichte nach drei Tagen Wasserdeprivation gegen eine Kontrollgruppe unbehandelter Ratten. Die Meßwerte beziehen sich auf die mittlere GLUT3-Dichte im Gesamthirn. * p <= 0.05, ** p <= 0.01

3.4.2. Lokale zerebrale Glukoseutilisation (LCGU)

Nach 3 Tagen Wasserdeprivation konnten wir eine erhöhte LCGU im Nucleus septalis triangularis um etwa 207 %, im Subfornikalorgan um etwa 84 %, im Nucleus supraopticus um etwa 28 %, im Nucleus paraventricularis um etwa 44 % und in der Neurohypophyse um etwa 60 % messen, während im Genu corporis callosi und im zerebellären Weiß eine Verminderung der LCGU um etwa 19 % bzw. 30 % auftrat. Im folgenden sind die einzelnen Messwerte dargestellt (Tab. 12):

Struktur	n=5 LCGU Kontr. [$\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$]	n=5 LCGU WD [$\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$]
Frontaler Kortex	91 \pm 6	90 \pm 6
Nucleus accumbens	61 \pm 9	66 \pm 10
Genu corporis callosi	32 \pm 4	26 \pm 2 **
Nuclei septales laterales	51 \pm 5	50 \pm 5
Nucleus caudatus	94 \pm 6	96 \pm 5
Nucleus septalis triangularis	27 \pm 8	83 \pm 10 **
Parietaler Kortex	92 \pm 9	91 \pm 8
Sensomotorischer Kortex	90 \pm 13	97 \pm 9
Auditorischer Kortex	112 \pm 26	107 \pm 11
Globus pallidus	49 \pm 7	50 \pm 6
Subfornikalorgan	49 \pm 6	90 \pm 14 **
Nucleus suprachiasmaticus	45 \pm 7	44 \pm 10
Nucleus supraopticus	65 \pm 8	83 \pm 12 **
Nucleus periventricularis	46 \pm 11	43 \pm 6
Thalamus, Nucleus ventrolateralis	84 \pm 5	88 \pm 13
Nucleus paraventricularis	59 \pm 7	85 \pm 10 **
Hypothalamus	44 \pm 7	47 \pm 2
Corpus amygdaloideum	62 \pm 11	68 \pm 12
Thalamus, Nucleus anterior	102 \pm 11	105 \pm 8
Laterale Habenula	110 \pm 2	110 \pm 11
Capsula interna	28 \pm 6	29 \pm 5
Gyrus cinguli	90 \pm 13	99 \pm 6
Frontoparietaler Kortex	98 \pm 9	101 \pm 7
Corpus geniculatum laterale, Nucleus dorsalis	86 \pm 8	94 \pm 8
Thalamus, Nucleus parafascicularis	90 \pm 4	88 \pm 11
Corpus mamillare	89 \pm 5	93 \pm 11
Entorhinaler Kortex	50 \pm 2	49 \pm 1
Corpus geniculatum mediale	105 \pm 13	116 \pm 12
Retrosplenialer Kortex	78 \pm 10	85 \pm 6
Okzipitaler Kortex	98 \pm 11	101 \pm 7
Forceps major corporis callosi	27 \pm 3	28 \pm 8
Colliculus superior	76 \pm 9	80 \pm 6
Region des zentralen Höhlengrau	57 \pm 4	60 \pm 5
Tiefer mesencephaler Kern	65 \pm 6	66 \pm 4
Substantia nigra, Zona reticularis	67 \pm 11	70 \pm 8
Substantia nigra, Zona compacta	63 \pm 4	60 \pm 7
Hippocampus, CA1, Zona radialis	54 \pm 4	52 \pm 4
" , CA1, Zona pyramidalis	70 \pm 7	75 \pm 3
" , CA2	49 \pm 4	48 \pm 3
" , CA3	55 \pm 9	57 \pm 4
" , CA4	50 \pm 8	52 \pm 4
" , Stratum moleculare	46 \pm 6	51 \pm 4
" , Gyrus dentatus	74 \pm 8	81 \pm 8
Visueller Kortex, Area 17	84 \pm 16	96 \pm 12
Colliculus inferior	169 \pm 11	181 \pm 16
Lemniscus lateralis	90 \pm 12	101 \pm 8
Region des pontinen Grau	53 \pm 5	53 \pm 3
Medulla cerebelli	37 \pm 3	26 \pm 3 **
Cortex cerebelli	58 \pm 11	62 \pm 7
Nucleus olivaris superior	142 \pm 21	140 \pm 26
Nucleus dentatus	90 \pm 9	91 \pm 8
Nucleus vestibularis	107 \pm 13	120 \pm 7
Nucleus cuneatus	62 \pm 8	59 \pm 4
Nucleus ambiguus	56 \pm 4	54 \pm 10
Formatio reticularis	55 \pm 5	60 \pm 4
Neurohypophyse	48 \pm 10	77 \pm 5 **
Adenohypophyse	17 \pm 12	9 \pm 3

Tab. 12: Lokale zerebrale Glukoseutilisation nach 3 Tagen Wasserdeprivation gegenüber unbehandelten Kontrolltieren. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$)

3.4.3. Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose

In 57 Strukturen wurde nach 3 Tagen Wasserdeprivation die vom Blut ins Gehirn gerichtete Transportkonstante K_1 gemessen. In 18 Strukturen war sie erniedrigt, in 18 Strukturen erhöht und in 21 Strukturen unverändert. Tab. 13 zeigt die Ergebnisse im einzelnen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die vom Gehirn ins Blut gerichtete Transportkonstante k_2 in 3 Strukturen erhöht, in 43 Strukturen erniedrigt und in 11 Strukturen unverändert. Tab. 14 zeigt die Ergebnisse im einzelnen.

Struktur	n=12 K ₁ Kontrolle [ml/g/min]	n=12 K ₁ Wasserdeprivation [ml/g/min]
Frontaler Kortex	0.220 ± 0.017	0.194 ± 0.027 **
Nucleus accumbens	0.188 ± 0.016	0.148 ± 0.016 **
Genu corporis callosi	0.070 ± 0.005	0.091 ± 0.009 **
Nuclei septales laterales	0.116 ± 0.008	0.137 ± 0.015 **
Nucleus caudatus	0.158 ± 0.012	0.167 ± 0.021
Nucleus septalis triangularis	0.100 ± 0.011	0.077 ± 0.008 **
Parietaler Kortex	0.207 ± 0.023	0.200 ± 0.026
Sensomotorischer Kortex	0.227 ± 0.029	0.216 ± 0.034
Auditorischer Kortex	0.155 ± 0.024	0.237 ± 0.037 **
Globus pallidus	0.138 ± 0.049	0.102 ± 0.014 **
Subfornikalorgan	0.174 ± 0.064	0.166 ± 0.050
Nucleus suprachiasmaticus	0.122 ± 0.012	0.149 ± 0.015 **
Nucleus supraopticus	0.150 ± 0.011	0.185 ± 0.021 **
Nucleus periventricularis	0.138 ± 0.024	0.147 ± 0.014
Thalamus, Nucleus ventrolateralis	0.139 ± 0.025	0.243 ± 0.042 **
Nucleus paraventricularis	0.142 ± 0.017	0.196 ± 0.032 **
Hypothalamus	0.120 ± 0.012	0.151 ± 0.016 **
Corpus amygdaloideum	0.154 ± 0.026	0.154 ± 0.022
Thalamus, Nucleus anterior	0.186 ± 0.028	0.231 ± 0.039 **
Laterale Habenula	0.078 ± 0.017	0.202 ± 0.038 **
Capsula interna	0.084 ± 0.027	0.081 ± 0.011
Gyrus cinguli	0.233 ± 0.032	0.220 ± 0.036
Frontoparietaler Kortex	0.188 ± 0.019	0.225 ± 0.036 **
Corpus geniculatum laterale, Nucleus dorsalis	0.175 ± 0.017	0.207 ± 0.032 **
Thalamus, Nucleus parafascicularis	0.165 ± 0.021	0.186 ± 0.034 *
Corpus mamillare	0.137 ± 0.014	0.163 ± 0.041 *
Entorhinaler Kortex	0.162 ± 0.028	0.112 ± 0.009 **
Corpus geniculatum mediale	0.200 ± 0.025	0.200 ± 0.028
Retrosplenialer Kortex	0.238 ± 0.030	0.184 ± 0.020 **
Okzipitaler Kortex	0.236 ± 0.021	0.196 ± 0.024 **
Forceps major corporis callosi	0.079 ± 0.005	0.086 ± 0.007 **
Colliculus superior	0.197 ± 0.015	0.179 ± 0.022 *
Region des zentralen Höhlengrau	0.159 ± 0.011	0.165 ± 0.022
Tiefer mesencephaler Kern	0.172 ± 0.019	0.155 ± 0.020 *
Substantia nigra, Zona reticularis	0.172 ± 0.020	0.153 ± 0.025 *
Substantia nigra, Zona compacta	0.168 ± 0.009	0.150 ± 0.019 **
Hippocampus, CA1, Zona radialis	0.144 ± 0.010	0.127 ± 0.013 **
" , CA1, Zona pyramidalis	0.134 ± 0.010	0.144 ± 0.016 *
" , CA2	0.122 ± 0.007	0.116 ± 0.011
" , CA3	0.133 ± 0.007	0.127 ± 0.013
" , CA4	0.131 ± 0.010	0.126 ± 0.012
" , Stratum moleculare	0.157 ± 0.015	0.132 ± 0.012 **
" , Gyrus dentatus	0.171 ± 0.015	0.152 ± 0.014 **
Visueller Kortex, Area 17	0.230 ± 0.027	0.162 ± 0.022 **
Colliculus inferior	0.388 ± 0.102	0.232 ± 0.048 **
Lemniscus lateralis	0.214 ± 0.032	0.199 ± 0.026
Region des pontinen Grau	0.164 ± 0.025	0.156 ± 0.019
Medulla cerebelli	0.068 ± 0.007	0.074 ± 0.008 *
Cortex cerebelli	0.204 ± 0.021	0.197 ± 0.025
Nucleus olivaris superior	0.278 ± 0.061	0.211 ± 0.034 **
Nucleus dentatus	0.256 ± 0.039	0.204 ± 0.035 **
Nucleus vestibularis	0.365 ± 0.150	0.309 ± 0.109
Nucleus cuneatus	0.179 ± 0.018	0.180 ± 0.026
Nucleus ambiguus	0.172 ± 0.038	0.178 ± 0.024
Formatio reticularis	0.164 ± 0.017	0.176 ± 0.025
Neurohypophyse	0.667 ± 0.589	0.386 ± 0.071
Adenohypophyse	0.069 ± 0.021	0.108 ± 0.023 **

Tab. 13: Transportkonstante K₁ nach 3 Tagen Wasserdeprivation gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.

(* p<=0.05, ** p<=0.01)

Struktur	n=12 k ₂ Kontrolle [min ⁻¹]	n=12 k ₂ Wasserdeprivation [min ⁻¹]
Frontaler Kortex	0.461 ± 0.044	0.292 ± 0.055 **
Nucleus accumbens	0.409 ± 0.043	0.237 ± 0.037 **
Genu corporis callosi	0.158 ± 0.019	0.168 ± 0.026
Nuclei septales laterales	0.237 ± 0.024	0.219 ± 0.036
Nucleus caudatus	0.342 ± 0.034	0.266 ± 0.047 **
Nucleus septalis triangularis	0.212 ± 0.034	0.126 ± 0.023 **
Parietaler Kortex	0.416 ± 0.056	0.285 ± 0.051 **
Sensomotorischer Kortex	0.451 ± 0.069	0.318 ± 0.066 **
Auditorischer Kortex	0.324 ± 0.064	0.330 ± 0.067
Globus pallidus	0.259 ± 0.127	0.172 ± 0.038 *
Subfornikalorgan	0.368 ± 0.171	0.281 ± 0.116
Nucleus suprachiasmaticus	0.271 ± 0.037	0.242 ± 0.035 *
Nucleus supraopticus	0.332 ± 0.033	0.299 ± 0.046 *
Nucleus periventricularis	0.264 ± 0.062	0.227 ± 0.031 *
Thalamus, Nucleus ventrolateralis	0.278 ± 0.067	0.362 ± 0.080 **
Nucleus paraventricularis	0.291 ± 0.045	0.311 ± 0.067
Hypothalamus	0.241 ± 0.035	0.260 ± 0.039
Corpus amygdaloideum	0.301 ± 0.068	0.263 ± 0.052
Thalamus, Nucleus anterior	0.389 ± 0.072	0.338 ± 0.074
Laterale Habenula	0.176 ± 0.061	0.281 ± 0.073 **
Capsula interna	0.171 ± 0.087	0.175 ± 0.038
Gyrus cinguli	0.432 ± 0.071	0.303 ± 0.066 **
Frontoparietaler Kortex	0.359 ± 0.045	0.319 ± 0.067 *
Corpus geniculatum laterale, Nucleus dorsalis	0.361 ± 0.044	0.302 ± 0.063 **
Thalamus, Nucleus parafascicularis	0.344 ± 0.057	0.284 ± 0.070 *
Corpus mamillare	0.283 ± 0.04	0.216 ± 0.083 **
Entorhinaler Kortex	0.344 ± 0.075	0.179 ± 0.024 **
Corpus geniculatum mediale	0.386 ± 0.06	0.296 ± 0.056 **
Retrosplenialer Kortex	0.479 ± 0.071	0.245 ± 0.039 **
Okzipitaler Kortex	0.452 ± 0.048	0.267 ± 0.046 **
Forceps major corporis callosi	0.172 ± 0.019	0.142 ± 0.022 **
Colliculus superior	0.402 ± 0.039	0.253 ± 0.044 **
Region des zentralen Höhlengrau	0.321 ± 0.029	0.247 ± 0.046 **
Tiefer mesencephaler Kern	0.374 ± 0.051	0.242 ± 0.045 **
Substantia nigra, Zona reticularis	0.379 ± 0.055	0.260 ± 0.059 **
Substantia nigra, Zona compacta	0.35 ± 0.024	0.232 ± 0.043 **
Hippocampus, CA1, Zona radialis	0.295 ± 0.029	0.190 ± 0.030 **
" , CA1, Zona pyramidalis	0.265 ± 0.028	0.199 ± 0.034 **
" , CA2	0.249 ± 0.019	0.182 ± 0.028 **
" , CA3	0.274 ± 0.02	0.190 ± 0.031 **
" , CA4	0.265 ± 0.028	0.190 ± 0.029 **
" , Stratum moleculare	0.313 ± 0.039	0.185 ± 0.028 **
" , Gyrus dentatus	0.342 ± 0.039	0.193 ± 0.029 **
Visueller Kortex, Area 17	0.464 ± 0.064	0.235 ± 0.047 **
Colliculus inferior	0.82 ± 0.237	0.334 ± 0.090 **
Lemniscus lateralis	0.453 ± 0.081	0.295 ± 0.053 **
Region des pontinen Grau	0.371 ± 0.07	0.243 ± 0.042 **
Medulla cerebelli	0.188 ± 0.03	0.140 ± 0.027 **
Cortex cerebelli	0.391 ± 0.049	0.267 ± 0.047 **
Nucleus olivaris superior	0.627 ± 0.157	0.316 ± 0.068 **
Nucleus dentatus	0.539 ± 0.096	0.307 ± 0.070 **
Nucleus vestibularis	0.749 ± 0.342	0.367 ± 0.166 **
Nucleus cuneatus	0.366 ± 0.048	0.251 ± 0.052 **
Nucleus ambiguus	0.433 ± 0.116	0.263 ± 0.050 **
Formatio reticularis	0.355 ± 0.046	0.267 ± 0.052 **
Neurohypophyse	0.786 ± 0.77	0.275 ± 0.070 *
Adenohypophyse	0.215 ± 0.097	0.247 ± 0.076

Tab. 14: Transportkonstante k₂ nach 3 Tagen Wasserdeprivation gegenüber unbehandelten Kontrolltieren.

(* p<=0.05, ** p<=0.01)

3.4.4. Wassergehalt des Gehirns

Durch magnetresonanztomographische Untersuchungen wurde der Apparent diffusion coefficient (ADC) bestimmt, der den Wassergehalt eines Organs beschreibt (Duelli *et al.* 1999).

Zwischen jeweils sechs Tieren in Versuchs- und Kontrollgruppe ergaben sich nach drei Tagen Wasserdeprivation keine Unterschiede (Tab. 15).

Region	ADC in der Kontrollgruppe (n=6) [10 ⁻³ mm ² s ⁻¹]	ADC nach 3 Tagen Wasserdeprivation (n=6) [10 ⁻³ mm ² s ⁻¹]
Marklager	0.615 ± 0.016	0.593 ± 0.017
Kortex	0.661 ± 0.025	0.649 ± 0.038

Tab. 15: Apparent diffusion coefficient (ADC) der Magnetresonanztomographie (MRT) nach 3 Tagen Wasserdeprivation gegenüber der Kontrollgruppe.

Auch durch die herkömmliche Methode (Schröck & Kuschinsky 1989), die auf einer Gewichtsbestimmung beruht, wurde der Wassergehalt in verschiedenen Organen in jeweils sechs Versuchs- und Kontrolltieren bestimmt. Dabei zeigt eine dreitägige Wasserdeprivation keine Unterschiede im Wassergehalt des Gehirns, jedoch eine Verminderung des Wassergehalts in Niere und Skelettmuskel (Tab. 16).

Organ	Wassergehalt der Kontrollgruppe [%] (n=6)	Wassergehalt nach 3 Tagen Wasserdeprivation [%] (n=6)
Gehirn	76.76 ± 0.54	76.24 ± 0.76
Herz	76.17 ± 0.30	75.65 ± 0.24 **
Leber	66.88 ± 0.46	66.61 ± 0.26
Milz	76.70 ± 0.38	76.57 ± 0.20
Niere rechts	75.78 ± 0.96	74.76 ± 0.78 *
Niere links	76.11 ± 1.12	74.59 ± 0.89 *
Skelettmuskel	75.96 ± 0.19	73.08 ± 3.26 *

Tab. 16: Wassergehalt in verschiedenen Organen nach 3 Tagen Wasserdeprivation (* p<= 0.05, ** p<=0.01).

4. Diskussion

4.1. Immunautoradiographische Methode

Um die Glukosetransporterichten mit der lokalen zerebralen Glukoseutilisation als Maß für den lokalen Hirnstoffwechsel vergleichen zu können, müssen annähernd gleiche Auflösungen der einzelnen Hirnstrukturen auf dem Röntgenfilm anzutreffen sein. Die Markierung der Desoxyglukose mit [^{14}C] und des Sekundärantikörpers mit [^{35}S] werden durch den β -Zerfall mit einer Maximalenergie von etwa 0.2 MeV ($3.024 \cdot 10^{-14}$ J) vergleichbar, die eine ähnliche Eindringtiefe in den Röntgenfilm gewährleistet.

Die hohe örtliche Auflösung der hier vorgestellten immunautoradiographischen Methode macht ein Präparieren einzelner Hirnstrukturen mit kleinem Volumen oder einer unregelmäßigen Geometrie obsolet, wie es für ein quantitatives Western blotting notwendig wäre. Vannucci *et al.* (1994) untersuchten deshalb nur ausgewählte Strukturen wie z.B. die Hypophyse, die gut zu präparieren war. Auch Brant *et al.* (1993) verwendeten quantitatives Western Blotting mit geringerer örtlicher Auflösung, wobei auch sie die einzelnen Hirnstrukturen aus dem Gewebe präparierten.

Damit keine unspezifischen Bindungen auftreten, müssen möglichst alle Epitope mit Antikörpern abgesättigt sein. Aus diesem Grund wurden Sättigungskurven für die jeweils beste Konzentration von Primär- und Sekundärantikörper angefertigt. Durch veränderte Versuchsbedingungen wie eine verlängerte Inkubationszeit konnte die Originalmethode von Zeller *et al.* (1995; 1997) wesentlich verbessert werden. Sowohl für GLUT1 als auch für GLUT3 erfordern die Versuche jetzt weniger Primär- und Sekundärantikörper, wobei die Bildqualität sogar noch ansteigt.

Die Konzentrationen der Antikörper wurden so gewählt, dass sie gerade den Sättigungsbereich erreichten (Abb. 6 bis Abb. 9). Dadurch werden möglichst viele Epitope erfasst und es treten wenig unspezifische Bindungen auf. Die gemessenen Proteindichten wurden zur mittleren Verteilung des jeweiligen Glukosetransportmoleküls im Gesamthirn in Beziehung gesetzt. In Bezug auf den Sekundärantikörper von Glut3 ergab sich ein Sonderfall: Hier konnten wir den Antikörper nicht im Sättigungsbereich einsetzen, da sich ansonsten die Filmschwärzung der Autoradiographie nicht mehr im linearen Bereich der Eichkurve befunden hätte. Trotzdem kann durch die geeignete Wahl der Inkubationsparameter eine korrekte Darstellung der Verteilung der GLUT3-Transportproteine erreicht werden (Duelli *et al.* 1998a). In der von Zeller *et al.* (1995; 1997) beschriebenen Methode wurde der radioaktiv markierte Sekundärantikörper mit unmarkiertem Antikörper gleicher Spezifität verdünnt. Auf dieses Verfahren wurde verzichtet, weil die höhere Verdünnung des Sekundärantikörpers trotzdem eine ausreichende Anzahl Epitope abdeckt.

Die lange Halbwertszeit des [^{14}C] von 5730 Jahren ermöglichte den Vergleich der [^{14}C]-Standards mit unterschiedlichen Gewebekonzentrationen im Gehirnschnitt. Um einen Bezug zu [^{35}S] herzustellen, wurde eine Eichgerade erstellt.

4.2. Visuelle Deprivation

4.2.1. Lokale zerebrale Glukoseutilisation (LCGU)

Das visuelle System ist für den hier gewählten Versuchsansatz gut geeignet. Der operative Zugang ist einfach und für das Versuchstier wenig belastend (Wakabayashi *et al.* 1994). Die extrakranielle Durchtrennung des Nervus opticus verursacht wegen der sich anschließenden fehlenden elektrisch-synaptischen Stimulation Veränderungen in den einzelnen Anteilen des visuellen Systems im Gehirn.

Voraussetzung für die Aufnahme des wichtigsten Substrats des Hirnstoffwechsels, der Glukose, in Neurone und Gliazellen ist der Transport aus dem Endovasalraum über das Interstitium in das Zellinnere. Eine Veränderung des lokalen Hirnstoffwechsels in den Strukturen des visuellen Systems könnte im Prinzip neben anderen möglichen Ursachen in einer veränderten Anzahl der Glukosetransportermoleküle begründet liegen oder aber deren Funktion könnte verändert sein, was sich in den kinetischen Konstanten des Glukosetransports zeigen würde.

Aufgrund der guten Kenntnis der anatomischen Struktur des visuellen Systems lässt sich bei rechtsseitiger Enukleation die linke Hemisphäre mit der kontralateralen Seite vergleichen, da etwa 90 % (Cooper & Thurlow 1985) bis 97 % (Jeffery 1984) der retinalen Ganglienzellen über das Chiasma opticum auf die Gegenseite projizieren. Zilles *et al.* (1989) lehnen den kontralateralen Vergleich ab, da sie erniedrigte Glukosestoffwechselraten im gesamten Gehirn maßen. Sie enukleierten Ratten im Alter von 353 bis 490 Tagen doppelseitig und setzten die Werte der lokalen zerebralen Glukoseutilisation in Bezug zu unbehandelten Tieren. Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse könnte das im Vergleich zur vorliegenden Studie hohe Alter der Versuchstiere sein, durch das die gesamte Glukoseaufnahme vermindert ist (Vannucci *et al.* 1994). Ein direkter Vergleich der Ergebnisse einer doppelseitigen Enukleation mit denen einer einseitigen Enukleation dürfte gar nicht möglich sein.

Wir konnten keine Unterschiede in den Stoffwechselraten für Glukose zwischen Strukturen des visuellen Systems der ipsilateralen Hemisphäre der enukleierten Tiere im Vergleich mit unbehandelten Kontrolltieren feststellen, während sich die Strukturen der kontralateralen Hemisphären sehr wohl unterschieden. Um die Ergebnisse mit denen anderer Gruppen vergleichen zu können, behielten wir den Bezug zur kontralateralen Hemisphäre im selben Versuchstier bei (Wakabayashi *et al.* 1994; Chalmers & McCulloch 1991a; Chalmers & McCulloch 1991b; Horsburgh & McCulloch 1991; Toga 1987; Thurlow & Cooper 1985).

Cooper und Thurlow (1985) beschreiben die charakteristische Antwort des visuellen Systems auf Durchtrennung des Nervus opticus als Diaschisis, einer vorübergehenden Verminderung der neuronalen Aktivität nach Denervierung. Sie untersuchten unilateral enukleierte Ratten mit Hilfe der 2-Desoxyglukose-Methode auf Veränderungen im lokalen Hirnstoffwechsel in den Strukturen des visuellen Systems. Die Überlebenszeit ihrer Ratten zwischen Läsion und Versuch liegt zwischen 1 h und 91 d. In den Strukturen der deprivierten Hemisphäre, nämlich dem Colliculus superior, dem Corpus geniculatum laterale und dem visuellen Cortex, erhielten sie ebenfalls eine Verminderung der LCGU, die der Größe unserer Messungen entspricht. Sie versuchten, einen Lichteinfall auf das nicht enukleierte Auge durch Vernähen des Lides zu verhindern. Dennoch erhielten sie die gleichen Ergebnisse wie wir. Dies legt nahe, dass trotz der Lidnaht die retinalen Ganglienzellen des gesunden Auges durch einfallende Lichtquanten während des Tag-Nacht-Rhythmus hinreichend gereizt werden.

Die histologischen Untersuchungen in der Arbeit von Cooper und Thurlow (1985) zeigen, dass erst nach sieben bis acht Tagen ein Nervenzellverlust im Colliculus superior beginnt, der sein Maximum nach etwa 1½ Monaten erreicht. Nach etwa 3 Monaten regenerieren die Neurone wieder, die Nervenzelldichte nimmt wieder zu. Die Neurone des Colliculus superior wurden mit Toluidinblau nach Nissl (1894) gefärbt. Wir konnten nach einer Woche keine Unterschiede in der Anzahl der Nervenzellen zwischen linker und rechter Hemisphäre in den Strukturen des visuellen Systems feststellen.

Smith und Bedi (1997) untersuchten den Nervenzellverlust nach unilateraler Eukleation im kontralateralen Colliculus superior. An 90 Tage alten Ratten entnahmen sie den rechten Bulbus und präparierten nach einer Überlebenszeit von 60 bzw. 300 Tagen unter Umgebungslichtintensitäten den Colliculus superior aus dem Hirngewebe. Daraus fertigten sie 2 µm dicke Kryoschnitte, in denen sie Neurone mit Toluidinblau nach Nissl (1894) färbten. Durch stereologische Verfahren bestimmten sie das Volumen des Stratum superficiale griseum (Schicht II des Colliculus superior) durch Lichtmikroskopie, sowie numerische Dichte und absolute Anzahl von Neuronen in dieser Schicht. Sie fanden, dass das Volumen des Stratum griseum superficiale in beiden Versuchsgruppen im Seitenvergleich um etwa 40 % reduziert war. Die numerische Dichte der Neurone war jedoch nicht beeinflusst, so dass die Anzahl der Neurone in dieser Zellschicht erheblich reduziert war.

Im Gegensatz zu dieser Arbeit, die die Zellzahl in den genannten Arealen nach 60 und 300 Tagen durch eine Nissl-Färbung bestimmte, konnten wir keinen Unterschied zwischen rechter und linker Hemisphäre bezüglich der Zellzahl eine Woche nach monokularer Eukleation in den Strukturen des visuellen Systems feststellen. Dies legt nahe, dass nach sieben Tagen noch kein Nervenzellverlust eingetreten ist und der erniedrigte Glukosestoffwechsel in den genannten Strukturen auf eine verminderte neuronale Aktivität, nicht jedoch auf eine verminderte Anzahl von Nervenzellen zurückzuführen ist.

Chalmers und McCulloch (1991a) untersuchten den zeitlichen Verlauf der LCGU-Änderung nach einseitiger Eukleation im Colliculus superior. Sie fanden, dass der maximale Abfall der Glukoseutilisation am ersten Tag nach der Eukleation mit etwa 45 % unter der Norm am größten ist. Nach 5 d betrug die Verminderung der LCGU noch 30 %. Sie verglichen dabei die Menge an metabolisierter 2-Desoxyglukose in rechter und linker Hemisphäre nach einseitiger Eukleation bei Überlebenszeiten der Versuchstiere von 1 d bis 20 d. Dabei war der Grad der metabolischen Depression in den primären visuellen Feldern, wie z.B. dem Colliculus superior oder dem Corpus geniculatum laterale, stärker als in den sekundären, die keine direkten Eingänge aus der Retina erhalten, wie z.B. der visuelle Kortex. In unserer Untersuchung lag die Verminderung der LCGU bei etwa 20 % für den Colliculus superior.

Außerdem fanden sie, dass der Verlust an Nervenfasern erst nach dem 5. postoperativen Tag in den Projektionsfasern und erst nach dem 10. postoperativen Tag in den optischen Kerngebieten einsetzt. Dabei war nur die neuronale Aktivität, nicht jedoch die gliale Aktivität reduziert. Dies zeigt auch unsere Studie: nach einer Woche sind im Seitenvergleich noch keine Nervenzellverluste eingetreten.

Viele Untersucher verwenden pigmentierte Ratten, um den lokalen Hirnstoffwechsel unter Lichtstimulation zu untersuchen, da bereits Umgebungslichtintensitäten von 300 bis 850 lux bei Albinoratten zu retinalem Zelltod führen können und die Albinoretina einen optischen Stimulus nur mit verminderter Effizienz in neuronale Antworten umzusetzen vermag. Batipps *et al.* (1981) untersuchten weiße und pigmentierte Ratten unter Normalbedingungen mit der 2-Desoxyglukose-Methode. Alle Versuchstiere wurden unter Umgebungslichtintensitäten in den Tierversuchsanlagen aufgezogen, die denen normaler Arbeitsplatzbedingungen entsprechen. Im Vergleich mit pigmentierten Ratten weisen die Albinos im visuellen Kortex, in den ersten drei Schichten des Colliculus superior und im Corpus geniculatum laterale um durchschnittlich 20 % erniedrigte Stoffwechselraten auf. Wir haben wegen der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien Albinoratten eingesetzt, da wir die Daten der lokalen zerebralen Glukoseutilisation im Seitenvergleich auswerten und folglich diese Ergebnisse keine Rolle spielen.

Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten einen engen Zusammenhang zwischen der Glukoseutilisation und der Frequenz der elektrischen Stimulation durch Nadelelektroden (Yarowsky *et al.* 1979). Unserem Versuchsansatz liegt trotz einer anderen Methodik ohne Nadelelektroden dasselbe pathophysiologische Modell zugrunde: Einer Durchtrennung des Nervus opticus folgt eine verminderte natürliche elektrisch-synaptische Reizung nachgeschalteter Strukturen, in unserem Falle derjenigen des visuellen Systems. In diesen sinkt ebenso die Stoffwechselaktivität, so dass wir unsere Ergebnisse auf eine chronische Deprivation des Sinnesreizes zurückführen.

Toga (1987) untersuchte, ob eine akute ENUKLEATION bei Ratten, die im Dunkeln oder im Hellen aufgewachsen sind, eine Veränderung im Hirnstoffwechsel herbeiführt. Die 90 d bis 120 d im Dunkeln aufgezogenen Ratten wurden mit normalen Kontrolltieren verglichen, wobei das 2-Desoxyglukose-Experiment in beiden Gruppen unter Umgebungslicht durchgeführt wurde. Die im Dunkeln aufgewachsenen Tiere wiesen eine etwa doppelt so große Stoffwechselrate im Colliculus superior und Corpus geniculatum laterale auf wie die Kontrolltiere. Er erklärt dies mit einer höheren Sensibilisierung der visuellen Areale.

Bei unserem Versuchsansatz verbleiben die Tiere dagegen nicht mit intakter Retina für einen sehr langen Zeitraum im Dunkeln, sondern es wird das Sinnessystem für eine Woche nach einer chirurgischen Läsion des Nervus opticus einem verminderten Input ausgesetzt.

Den erniedrigten Stoffwechsel in den Organen des visuellen Systems nach Enukleation erklären Horsburgh und McCulloch (1991) mit einer verminderten Zahl an Bindungsstellen für Neurotransmitter. Sie konnten eine plastische Modifikation von Second-messenger-Systemen wie z.B. der Adenylatzyklase (EC 4.6.1.1) oder der Proteinkinase C (EC 2.7.1.37) nicht nachweisen. In der *in vitro* Bindungsstudie untersuchten sie das Bindungsverhalten von Forskolin an der G_s-Adenylatzyklase und von Phorbol-12,13-dibutyrat an der Proteinkinase C im Vergleich zum Stoffwechsel von 2-Desoxyglukose. Zu verschiedenen Zeiten nach unilateraler Enukleation, die zwischen 1 d und 20 d lagen, konnten sie eine Abnahme der LCGU in den Strukturen des visuellen Systems feststellen, während das Bindungsverhalten von Forskolin nach 5 Tagen um etwa 15 % und von Phorbol-12,13-dibutyrat um etwa 5 % abnahm. Sie erklärten dies durch die verminderte visuelle Funktion nach Läsion von retinofugalen Fasern, molekulare Regulationsmechanismen der Proteinsynthese trügen ihrer Ansicht nach nicht dazu bei.

4.2.2. Quantitative Verteilung der Glukosetransportmoleküle GLUT1 und GLUT3

Brant *et al.* (1993) untersuchten zwölf Hirnstrukturen durch semiquantitatives Western Blotting auf das Vorkommen der Transportproteine GLUT1 bis GLUT4. Dabei präparierten sie die jeweiligen Hirnstrukturen aus dem Gehirn der Versuchstiere und extrahierten ein Membranhomogenat. Die Membranproteine trennten sie durch Gelelektrophorese und stellten sie durch spezifische Antikörper dar. Die Dichten der Transportermoleküle bezogen sie auf die Dichte im Frontalhirn. Während sie nur geringe Mengen an GLUT2 und GLUT4 fanden, ergab sich für GLUT1 und GLUT3 eine heterogene Verteilung. Besonders geringe Werte für GLUT1 fanden sich im Nucleus caudatus, besonders hohe im Cerebellum, Hypothalamus und Bulbus olfactorius. Für GLUT3 fanden sich besonders niedrige Werte im Chiasma opticum, der Hypophyse und dem Cerebellum und auffallend hohe im frontalen und parietalen Kortex.

Bei unserem Versuchsansatz wurden GLUT1 und GLUT3 immunoautoradiographisch im Hirnschnitt nachgewiesen. Eine Präparation der Hirnstrukturen entfiel. Die Strukturen des optischen Systems konnten einzeln analysiert werden. Strukturen der weißen Substanz wiesen eine Proteindichte von etwa 30 - 40 % der Strukturen der grauen Substanz, wie z. B. Kortexareale auf.

Dies deutet darauf hin, dass durch das Homogenisieren des Gewebes wie bei Brant *et al.* (1993) intrazelluläre GLUT-Moleküle freigesetzt werden könnten. Die autoradiographische Methode kann diese intrazellulären GLUTmoleküle nicht erfassen. Cornford *et al.* (1993) und Leino *et al.* (1997) wiesen darauf hin, dass die GLUT1-Moleküle der Blut-Hirn-Schranke - ähnlich dem GLUT4 des Fett- und Muskelgewebes - in einem intrazellulären Kompartiment gespeichert sein könnte, das bei Bedarf an die Zelloberfläche gebracht würde und so die vorhandenen GLUT1-Moleküle in die Plasmamembran integriert.

Die elektronenmikroskopische Studie von Cornford *et al.* (1993) zeigte eine asymmetrische Verteilung der GLUT1-Moleküle in Endothelzellen des Gehirns. In perfusionsfixierten Kaninchenhirnschnitten wurde durch einen gegen den C-Terminus gerichteten Primärantikörper die GLUT1-Moleküle gebunden und diese durch einen goldmarkierten Sekundärantikörper detektiert. Dann bestimmten die Untersucher in den Hirnschnitten die Immunogoldreaktivität quantitativ. Cornford *et al.* (1993) fanden, dass etwa 15 % aller GLUT1-Moleküle an der luminalen Membran lokalisiert sind, während etwa 45 % abluminal gelegen sind. Weitere 40 % fanden sich in intrazellulären Kompartimenten. Durch die asymmetrische Verteilung des GLUT1 auf der Endothelzelle verbunden mit der Möglichkeit, diese Verteilung in kurzer Zeit zu ändern, indem die intrazellulären GLUT1-Moleküle an die Oberfläche der Endothelzellen gebracht werden, wäre die Möglichkeit gegeben, den Glukosefluss über die Blut-Hirn-Schranke sehr schnell den Erfordernissen des Stoffwechsels anzupassen, ohne dass die Notwendigkeit besteht, neue Proteine zu synthetisieren. Inwieweit diese Möglichkeit funktionell an Hirngefäßen genutzt wird, ist nicht bekannt.

Obwohl alle strukturellen Elemente der Nervenzelle zu deren Glukosemetabolismus beitragen, spiegeln Änderungen der Glukoseutilisation die Aktivität in den Neuronenendigungen wider (Mata *et al.* 1980). Wir messen nach Läsion der synaptischen Verbindungen des Nervus opticus erniedrigte GLUT3-Dichten in den abhängigen Strukturen. In diesen ist auch die LCGU vermindert. Hieraus kann gefolgert werden, dass die verminderte synaptische Aktivität den regionalen Glukosestoffwechsel senkt. Dieses wiederum führt zu einer Verminderung der funktionsfähigen Glukosetransportmoleküle. Eine Erklärung für die verminderte GLUT3-Dichte könnten Degenerationsmechanismen sein, die das Projektionsgebiet der retinofugalen Fasern betreffen. Dadurch gehen bei mangelnder funktioneller Beanspruchung die abhängigen Areale zugrunde. Schon nach einer Woche könnten diese Effekte zu sehen sein. Einen Zusammenhang zwischen GLUT3-Proteindichte und LCGU unter Kontrollbedingungen und unter funktioneller Beanspruchung wie z. B. Hyper- und Hypoglykämie und Nikotingabe bestätigen auch andere Arbeiten unserer Gruppe (Duelli *et al.* 1998b; Duelli *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Die Dichten des Glukosetransportmoleküls GLUT3 in den Regionen mit direkten retinalen Eingängen, dem dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale und den Schichten I bis III des Colliculus superior, fallen ab, während sie im Projektionszentrum, der Area 17, ansteigt. Dies könnte an zellulären Degenerationsprozessen liegen, die sich in den Strukturen mit direktem Eingang abspielen, während in den Projektionsfeldern schon frühzeitig Kompensations- und Reparationsmechanismen vorherrschen.

Die erniedrigte Dichte der Glukosetransportproteine GLUT3 in unserer Untersuchung könnte auch durch eine erniedrigte Anzahl von Neuronen in den Strukturen des visuellen Systems zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, haben wir Messungen der Neuronendichte in diesen Strukturen vorgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Neuronendichte im Seitenvergleich nach einer Woche nicht abnimmt. Diese stehen im Einklang zu den Ergebnissen von Cooper und Thurlow (1985), die durch Nissl-Färbung eine Woche nach unilateraler Eukleation noch keine Unterschiede im Seitenvergleich feststellen konnten. Erst danach, etwa in der zweiten Woche beginnend, nahm das Volumen des untersuchten Areals sowie die Nervenzellzahl ab.

Auch andere Proteine, die im Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel der Zelle zu sehen sind, sind nach unilateraler Eukleation in einer Hemisphäre in ihrer Dichte vermindert. Zhang *et al.* (1996) untersuchten die Expression von NO-Synthase (EC 1.14.13.39), NADPH-Diaphorase (EC 1.6.99.1) und der Cytochromoxidase (EC 1.9.3.1) eine, zwei oder drei Wochen nach rechtsseitiger Eukleation. Sie fanden im Colliculus superior und im Corpus geniculatum laterale erniedrigte Proteindichten der genannten Enzyme. Der Effekt war nach drei Wochen am stärksten, aber auch schon nach einer Woche sichtbar. Allerdings untersuchten sie im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht, ob die Nervenzellzahl oder -dichte abgenommen hatte.

4.3. Wasserdeprivation

4.3.1. Lokale zerebrale Glukoseutilisation

In den meisten Versuchsansätzen zur Wasserdeprivation werden Zeiträume zwischen zwei und fünf Tagen gewählt. In unserem Modell beträgt die Versuchszeit drei Tage, damit sollen extreme Belastungen der Versuchstiere ausgeschlossen werden.

Prinzipiell kann Dehydratation entweder durch Wasserdeprivation oder durch Salzingestion hervorgerufen werden. Jedoch hat nur die Wasserdeprivation einen Einfluss auf die LCGU (Gross *et al.* 1985). Deshalb wählten auch wir die Wasserdeprivation, um osmoregulatorische Zentren des Rattenhirns zu stimulieren.

Duncan *et al.* (1989) setzten die [1-¹⁴C]Glukosemethode zur Messung des Hirnstoffwechsels ein. Sie fanden nach einem Wasserentzug von 2 Tagen im Gehirn von Sprague-Dawley-Ratten andere Ergebnisse als Gross *et al.* (1985) und Duelli *et al.* (1999): Die Glukoseutilisation stieg im magnozellularen Anteil des Nucleus paraventricularis und im Nucleus supraopticus um etwa 75 bis 100 % und in der Neurohypophyse, im lateralen und anterioren hypothalamischen Gebiet sowie dem somatosensorischen Kortex und Gyrus cinguli um 30 bis 40 %. Keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren fanden sich im parvozellulären Anteil des Nucleus paraventricularis, im periventrikulären Kern des Hypothalamus, im Corpus callosum, im Organum vasculosum laminae terminalis und im Subfornikalorgan.

Die [1-¹⁴C]Glukosemethode hat einige Nachteile gegenüber der 2-Desoxyglukosemethode (Collins *et al.* 1987). Im Gegensatz zur 2-Desoxyglukosemethode ist keine Quantifizierung der Glukoseutilisation in Absolutzahlen möglich. Es wird ein Glukoseutilisationsindex berechnet werden, der sich aus der Silberkorndichte pro 1000 μm^2 des Hirnschnitts geteilt durch die spezifische Aktivität der Plasmaglukose zusammensetzt. Da keine Quantifizierung möglich ist, entfällt das wiederholte Entnehmen von Plasmaproben, das bei großem Volumen einen Einfluss auf den Flüssigkeitshaushalt haben könnte, andererseits betrug das durchschnittlich von uns entnommene Volumen nur etwa 1.5 ml pro Ratte ($14 \cdot 70\text{-}100 \mu\text{l}$), verteilt auf einen Zeitraum von 45 Minuten. Die Flüssigkeitsverluste durch die Katheter ersetzen wir nicht, mit Ausnahme von 0.5 ml isotoner Kochsalzlösung, in der der radioaktive Tracer gelöst wurde. Duncan *et al.* (1989) entnahmen aber vor Versuchsbeginn 1.1 ml Blut zur Bestimmung physiologischer Parameter und kurz vor Versuchsende eine Blutprobe aus dem linken Ventrikel von 2 bis 3 ml. Allerdings ersetzen sie die entnommene Flüssigkeitsmenge durch isotope Kochsalzlösung. Wie groß der Einfluss dieser kurzfristigen Veränderungen der Flüssigkeitsmenge des Körpers auf den regionalen Hirnstoffwechsel ist, kann nicht abgeschätzt werden. Einen weiteren Unterschied der Untersuchung von Duncan *et al.* (1989) ist die kürzere Zeit der Wasserdeprivation von 2 Tagen im Vergleich zu 3 Tagen in unserem Versuchsansatz.

Gross *et al.* (1985) untersuchten die Auswirkungen der Wasserdeprivation während einer fünftägigen Versuchsdauer. Dabei entzogen sie Sprague-Dawley-Ratten für den gesamten Versuchszeitraum jegliche Flüssigkeit, außer der durch das Trockenfutter aufgenommenen. Mittels der 2-Desoxyglukosemethode fanden sie in fünf Strukturen eine deutliche Erhöhung der LCGU: Im Subfornikalorgan, dem Nucleus septalis triangularis und den hypothalamischen Nuclei paraventricularis und supraopticus war der Stoffwechsel um 30 bis 70 % erhöht, in der Neurohypophyse sogar um 370 %. In fast allen anderen untersuchten 45 Strukturen war die LCGU zwischen 20 und 30 % erniedrigt.

Alle Strukturen mit erhöhtem Hirnstoffwechsel sind im Frontalhirn gelegen und haben anatomische Verbindungen untereinander und zu anderen Strukturen, die den Flüssigkeitshaushalt des Körpers regulieren. Auch in der vorliegenden Arbeit haben wir eine Steigerung der lokalen zerebralen Glukoseutilisation in den Strukturen des osmoregulativen Systems gemessen, allerdings in geringerem Ausmasse. Dies könnte auf die kürzere Versuchsdauer in unserer Untersuchung zurückzuführen sein. Eine deutliche Abnahme der LCGU in allen anderen Strukturen konnten wir jedoch nicht feststellen.

Ein Grund dafür, dass nach 5 Tagen Wasserdeprivation der gesamte Hirnstoffwechsel reduziert ist, könnte in der Belastung für das Versuchstier liegen, die die Verminderung des Flüssigkeitsgehalts des Körpers mit sich bringt. Auch könnte der Wassergehalt des Gehirns vermindert sein und dadurch ein verminderter Stoffwechsel vorgetäuscht werden.

In dieser Arbeit haben wir den Wassergehalt nach 3 Tagen in verschiedenen Organen des Versuchstieres bestimmt. Während in einigen peripheren Organen wie Niere und Skelet- und Herzmuskel der Wassergehalt erniedrigt war, zeigte sich noch keine Änderung im Gehirn. Diese Ergebnisse könnten die Unterschiede zu Gross *et al.* (1985) erklären.

Unter akuter Dehydratation von 16-18 Stunden untersuchten Kadekaro *et al.* (1986), wie sich die LCGU in Long-Evans- und Brattleboro-Ratten unterscheidet. Brattleboro-Ratten weisen einen homozygoten Gendefekt auf. Sie können kein ADH synthetisieren und zeigen einen Diabetes insipidus neurohormonalis. Brattleboro-Ratten trinken wesentlich mehr als Vergleichstiere, sie haben eine höhere Plasmaosmolarität und ein deutlich erniedrigtes Körpergewicht. Die Brattleboro-Ratten weisen unter Normalbedingungen einen erhöhten Stoffwechsel im 2-Desoxyglukoseversuch im Subfornikalorgan, in der lateralen Habenula, im Nucleus septalis triangularis und in der Neurohypophyse auf. Wasserentzug steigert die ohnehin schon erhöhte LCGU in diesen Strukturen und aktiviert andere, die mit dem Subfornikalorgan verbunden sind. Die Effekte sind in den Brattleboro-Ratten stärker als in den Long-Evans-Kontrollen mit normalen ADH-Plasmaspiegeln. Im Gegensatz zu einer Wasserdeprivation von 5 Tagen (Gross *et al.* 1985) ist keine generelle Deprivation des Hirnstoffwechsels zu erkennen, vielmehr sind in zahlreichen Strukturen die einzelnen Werte erhöht.

Kadekaro *et al.* (1986) fanden einen generell erhöhten Hirnstoffwechsel nach 16 bis 18 Stunden Wasserdeprivation, Gross *et al.* (1985) einen generell erniedrigten nach 5 Tagen Wasserdeprivation. Mit 3 Tagen Wasserdeprivation könnten die Ergebnisse dieser Untersuchung genau in die Phase der Normalisierung und Kompensation des Stoffwechsels fallen, so dass nur in den Strukturen des osmoregulativen Systems eine LCGU-Erhöhung sichtbar ist, wie in allen drei Studien gezeigt. Die von uns eingesetzten Sprague-Dawley-Ratten haben etwa gleich große Stoffwechselraten unter Normalbedingungen wie die Long-Evans-Ratten, so dass unsere Ergebnisse vergleichbar sind. Es könnte das Argument vorgebracht werden, dass Wasserdeprivation eine Stressreaktion auslöst, die unspezifische Effekte auf den Hirnstoffwechsel hat. Dem widerspricht, dass wir nach 3 Tagen Wasserdeprivation eine Erhöhung der LCGU nur in den Strukturen des flüssigkeitsregulierenden Systems fanden, während in allen anderen keine Änderung zu beobachten war.

Eine andere Methode, die Auswirkung von Wassermangel auf den Stoffwechsel des Gehirns zu untersuchen, ist die der Salzingestion. Hierbei wird durch Trinken oder Infusion einer hyperosmolaren Salzlösung die Plasmaosmolarität erhöht.

Sprague-Dawley Ratten mit freiem Zugang zu 2 %iger Salzlösung zeigten nach vier Tagen keine Erhöhung des Hirnstoffwechsels in den von Kadekaro und Gross (1985) untersuchten Hirnstrukturen mit Ausnahme der Neurohypophyse, in der die LCGU erhöht war. Dagegen war in Ratten nach vier Tagen absolutem Flüssigkeitsentzug der Hirnstoffwechsel im Subfornikalorgan, dem Nucleus septalis triangularis, dem Nucleus paraventricularis, dem Nucleus supraopticus und der Neurohypophyse erhöht und in einigen Kernen der präoptischen Region (AV3V) erniedrigt. Dies zeigt, dass die Salzingestion als Modell für die Wasserdeprivation unzureichend ist. Sie kann nicht die komplexen Regulationsvorgänge zwischen Plasmaosmolarität, Angiotensin II und Barorezeptordisinhibition unter Flüssigkeitsentzug simulieren. Die chronische Salzingestion ist jedoch ein gutes Modell für eine intrazelluläre Dehydratation. Durch chronische Wasserdeprivation wurde eine intra- und extrazelluläre Dehydratation erreicht.

4.3.2. Quantitative Verteilung der Glukosetransportmoleküle GLUT1 und GLUT3

In den meisten vorausgehenden Untersuchungen wurde die Gewebeverteilung der GLUT-Moleküle durch immunhistochemische Methoden untersucht (Vannucci *et al.* 1997). Obwohl die Verteilungsmuster von sowohl GLUT1 als auch GLUT3 heterogen erschienen, konnte das Ausmass der Veränderungen nicht genauer bestimmt werden. In der vorliegenden Untersuchung können unterschiedliche Transporterdichten in unterschiedlichen Hirnstrukturen bestimmt werden. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten einen Anstieg der Glukosetransporterichte von GLUT1 und GLUT3 nach chronischer Nikotininfusion (Duelli *et al.* 1998b) und eine Abnahme der Transporterdichten nach visueller Deprivation (Duelli *et al.* 1998a). Diese Daten zeigten eine lokale dynamische Anpassung der Glukosetransportmoleküle an veränderte metabolische Voraussetzungen.

In dieser Arbeit konnten wir einen Anstieg der GLUT1-Dichte und einen erheblich grösseren Anstieg der GLUT3-Dichte in der Neurohypophyse messen. In der Adenohypophyse war bei uns nur die GLUT1-Dichte erhöht, während die GLUT3-Dichte unverändert blieb.

Vannucci *et al.* (1994) untersuchten Rattenhypophysen durch quantitatives Western Blotting auf GLUT1 und GLUT3. Sie verglichen eine Kontrollgruppe mit wasserdeprivierten Ratten nach 1, 2 und 3 Tagen. Sie homogenisierten die Neurohypophyse und bestimmten die Transportproteine mit spezifischen Antikörpern. Durch Phosphorimageanalyse massen sie die Dichte des GLUT1 und GLUT3 im Vergleich zu einem Proteinstandard.

Sie fanden erhöhte GLUT1-Werte für die 45 kDa-Isoform nach zwei und dreitägiger Wasserdeprivation von 20 bzw. 50 %. Wesentlich stärker war bei ihrer Untersuchung GLUT3 angestiegen. Nach 2 Tagen war GLUT3 um 45 %, nach 3 Tagen um 55 % angestiegen. Keine Änderung konnten sie nach einem Tag feststellen. Unsere Daten stimmen darin überein, nur dass wir auch andere Strukturen des osmoregulativen Systems untersuchen konnten.

Es könnte vermutet werden, ob die Effekte der Wasserdeprivation auf die Transporterdichten und auf die LCGU, wie sie in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, nicht auch auf einen veränderten Wassergehalt im Gehirn der Versuchstiere nach 3 Tagen Wasserdeprivation zurückzuführen sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde der Apparent Diffusion Coefficient (ADC) magnetresonanztomographisch gemessen. Diese Methode eignet sich mit hoher Sensitivität für Messungen des extrazellulären Wassergehalts des Gehirns (Barzo *et al.* 1997) als auch für Verschiebungen des Wassergehalts zwischen dem intra- und extrazellulären Kompartiment (Benveniste *et al.* 1992). Um die ADC-Messungen zu kontrollieren, wurden die konventionelle Methode von Schröck und Kuschinsky (1989) eingesetzt, die auf Bestimmung von Trocken- und Feuchtgewicht beruht.

Es konnte keine Veränderung des Wassergehalts des Gehirns zwischen den wasserdeprivierten Ratten und der Kontrollgruppe durch beide Methoden festgestellt werden. Deshalb kann eine Volumenminderung des Gehirns unter Wasserdeprivation ausgeschlossen werden. Dies bedeutet, dass die Werte für die Transporterdichten und die lokale Glukoseutilisation keiner Korrektur durch veränderten Wassergehalt bedürfen. Ausserdem wird der Wert der magnetresonanztomographischen ADC-Messung bestätigt.

4.4. Lokale zerebrale Transportkonstanten für Methylglukose

Die Transporterbestimmung kann über die Dichte der Glukosetransportmoleküle Auskunft geben. Der Zusammenhang zwischen Transporterdichte und Transport ist dadurch aber noch nicht erfasst. Die Aussage über den Glukosetransport wird mit der 3-O-Methylglukose-Methode möglich.

Bisher beschrieb keine Arbeit die Transportkonstanten für Methylglukose unter visueller Deprivation wie in unserem Modell, jedoch sind Daten für andere pathophysiologische Zustände verfügbar. Unter einer leichten Verminderung des Stoffwechsels mittels einer insulininduzierten Hypoglykämie kommt es zu einer Verminderung der auswärts gerichteten Konstanten k_2 auf etwa 80 % des Ausgangswertes, während die einwärts gerichtete Konstante K_1 unverändert bleibt (Duelli *et al.*, unveröffentlichte Daten). Bei einem verminderten Angebot akkumuliert Glukose verstärkt in den Zellen. Es stellte sich die Frage, ob auch bei verminderter LCGU wie bei der visuellen Deprivation sich die Transportkonstanten in denselben Strukturen gleichsinnig veränderten wie die GLUT1- und Glut3-Dichten. Dies scheint im Corpus geniculatum laterale für K_1 und k_2 der Fall zu sein. Die Kontrollwerte unserer Arbeit liegen in der gleichen Größenordnung wie die Werte von Namba *et al.* (1987). Unsere Kontrollwerte für K_1 stimmen auch mit den von Gjedde und Rasmussen (1980) für eine unidirektionale Transferkonstante in unbehandelten wachen Ratten berichteten Werten überein.

Duelli *et al.* (1998b) applizierten Nikotin über eine osmotische Minipumpe für eine Woche. Dabei waren sowohl K_1 als auch k_2 in der Mehrzahl der Strukturen durchschnittlich um 40 % erniedrigt, obwohl die lokale zerebrale Glukoseutilisation (LCGU) nicht generell vermindert war oder sogar anstieg. Wie sich die Stimulation eines ZNS-Systems auf die Transportkonstanten auswirkt, ist bislang unbekannt. Eine dreitägige Wasserdeprivation erhöhte die LCGU in den Strukturen des osmoregulativen Systems. Die von uns erhobenen Daten für K_1 und k_2 zeigen jedoch keine klare systematische Veränderung, vielmehr waren die Transportkonstanten in einigen Strukturen erhöht, in einigen Strukturen erniedrigt und in einigen Strukturen unverändert. Dabei standen die Hirnstrukturen in keinem Zusammenhang zur osmoregulativen System.

Eine vereinfachte Methode um K_1 zu bestimmen wandten Chen *et al.* (1995) an. Sie setzten eine andere 3-O-Methylglukose-Technik ein, als die von Namba *et al.* (1987) beschriebene. Die Vorteile der Methylglukose bleiben bestehen: ihre Gewebekonzentration kann über quantitative autoradiographische Methoden mit hoher örtlicher Auflösung bestimmt werden, und der Einwärtstransport ist auch bei kürzerer Versuchsdauern vergleichsweise groß. Das Hauptproblem dieser Methode besteht jedoch darin, dass kein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Damit bleibt unklar, ob wirklich K_1 gemessen wird. Der Transport der Methylglukose ist jedoch ein komplexes System, das sich aus dem regionalen kapillären Blutfluss, der Oberfläche der Kapillarendothelien, der Anzahl der funktionsfähigen Glukosetransportmoleküle auf der Oberfläche der Endothelzellen pro mm^2 der Plasmamembran und der arteriellen Plasmaglukosekonzentration zusammensetzt.

Wir wählten deshalb das Modell von Namba *et al.* (1987), mit dem sowohl K_1 als auch k_2 im Gleichgewichtszustand bestimmt werden können. Dieses Modell beruht auf einer nicht-linearen Regressionsanalyse durch die Methode der kleinsten Quadrate nach Levenberg und Marquardt (Press *et al.* 1986). Wenn der Plasmaglukosespiegel wie in unserem Versuchsansatz konstant gehalten wird und sich die Gewebeglukosekonzentration im Gehirn entsprechend den metabolischen Anforderungen ändert, so ändert sich auch der Verteilungsraum für Methylglukose und deren Gewebekonzentration gleichsinnig nach:

$$\text{Verteilungsraum } \lambda \text{ [ml/g]} = K_1 \text{ [ml/g/min]} / k_2 \text{ [1/min]} = C_i / C_p$$

Formel 5: Verteilungsraum λ für Methylglukose im Gleichgewichtszustand. K_1 , k_2 : Transportkonstanten für den Einwärts- bzw. Auswärtstransport. C_i , C_p : Gewebe- bzw. Plasmamethylglukosekonzentration (n. Namba *et al.* 1987).

Der Verteilungsraum für Methylglukose betrug in der Gruppe der wasserdeprivierten Tiere 0.671 ± 0.121 ml/g und in der Kontrollgruppe 0.485 ± 0.061 ml/g. Die Bedeutung dieser Zunahme des Verteilungsraumes unter Wasserdeprivation ist nicht geklärt.

Nakanishi *et al.* (1996) untersuchten den Einfluss von Glukoseangebot und -nachfrage auf den Glukosegehalt im Gehirn mit Methylglukose. Um den regionalen Stoffwechsel zu verändern, applizierten sie lokal stoffwechselaktive Medikamente. Sie fanden, dass Veränderungen des Glukosegehalts des Gehirns, die durch einen veränderten regionalen Glukosestoffwechsel hervorgerufen wurden, zum Glukosegehalt des Gehirns sowie zum Methylglukoseverteilungsraum in direktem Verhältnis stehen. Im Gegensatz dazu besteht eine inverse Beziehung zwischen Plasma-Gewebe-Verteilungsraum für Methylglukose im Gleichgewichtszustand und der Glukosekonzentration im Gewebe, wenn die Veränderung des Glukosegehalts auf erhöhte oder erniedrigte Glukoseplasmaspiegel zurückzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit ist der Plasmaglukosespiegel der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nicht verändert, so dass die beobachteten Effekte des Methylglukosetransports ebenfalls in einem direkten Verhältnis zur lokalen zerebralen Glukoseutilisation stehen.

Aufgrund der heutigen Kenntnisse der verschiedenen Glukosetransportermoleküle ist es interessant, zu welchem Anteil die einzelnen Isoformen den Gesamttransport beeinflussen. Maher *et al.* (1996) zeigten in Experimenten mit Primärkulturen von zerebellären Körnerzellen, in denen sie die Aktivität des katalytischen Zentrums (CCA, catalytic centre activity) bestimmten, dass GLUT3 Glukose etwa siebenmal schneller transportieren kann als GLUT1. Dies legt nahe, dass Neurone mit einer bestimmten Anzahl GLUT3-Proteine bei einer physiologischen interstitiellen Glukosekonzentration eine größere Transportkapazität haben als Gliazellen der gleichen Anzahl GLUT1-Proteine.

5. Zusammenfassung

Der Glukosetransport über biologische Membranen wird von einer Gruppe transmembranöser Proteine, der GLUT-Familie, vermittelt. Bisher wurden durch Techniken des molekularen Klonierens sieben Mitglieder dieser Genfamilie gefunden und GLUT1 bis GLUT7 benannt. Im Gehirn wurde hauptsächlich das Glukosetransportmolekül GLUT1 in Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und perivaskulären Astrozyten gefunden, während GLUT3 auf Neuronen lokalisiert ist.

Ob lokale Veränderungen der Dichten der Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3 unter längerdauernden lokalen Stoffwechseländerungen im Gehirn auftreten und ob dadurch die Kinetik des Glukoseaustauschs über die Blut-Hirn-Schranke beeinflusst werden, ist bisher kaum untersucht worden. Deshalb wurde in einem Versuchsansatz der lokale Hirnstoffwechsel einzelner Hirnstrukturen durch unilaterale ENUktion in bestimmten Kerngebieten des Rattenhirns gesenkt, in einem zweiten Versuchsansatz durch Wasserdeprivation in bestimmten Kerngebieten erhöht.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Versuchsprotokolle durchgeführt: (1) immunhistochemische Analyse der regionalen Proteindichten von GLUT1 beziehungsweise GLUT3, (2) Bestimmung der lokalen zerebralen Glukoseutilisation (LCGU) mittels der 2- $[^{14}\text{C}]$ Desoxyglukose-Methode und (3) Messung der regionalen Transportkonstanten K_1 and k_2 durch die 3- O - $[^{14}\text{C}]$ Methylglukose-Methode.

Unter chronischer visueller Deprivation nahm die LCGU im dorsalen Kern des Corpus geniculatum laterale, in den Schichten I-III des Colliculus superior, in der Area 17 des visuellen Kortex und im okzipitalen Kortex ab. Die GLUT1-Dichte war im Corpus geniculatum laterale vermindert, während die GLUT3-Dichte im Corpus geniculatum laterale und den Schichten I-III des Colliculus superior verringert war. Die Konstanten für den 3- O - $[^{14}\text{C}]$ Methylglukosetransport K_1 and k_2 waren in Corpus geniculatum laterale vermindert.

Nach drei Tagen Wasserdeprivation war die LCGU in osmoregulativen Zentren des Gehirns wie dem Nucleus septalis triangularis, dem Subfornikalorgan, dem Nucleus supraopticus und Nucleus paraventricularis sowie der Neurohypophyse erhöht. Die GLUT1-Dichte war im Subfornikalorgan, dem Nucleus paraventricularis, der Neurohypophyse und der Adenohypophyse erhöht, die GLUT3-Dichte in der Neurohypophyse. Die Transportkonstanten K_1 und k_2 zeigten keine klaren systematischen Veränderungen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Transporterdichten für GLUT1 und GLUT3 lokal einer dynamischen Anpassung an die lokalen metabolischen Anforderungen im Rattenhirn unterliegen. Dies gilt sowohl für eine Erhöhung, als auch eine Verminderung des lokalen Hirnstoffwechsels. Inwieweit die Änderungen der Transporterdichten zu entsprechenden Veränderungen der Transportkonstanten führen, lässt sich wegen der geringen Zahl von betroffenen Hirnstrukturen nicht sicher klären.

6. Anhang: Pufferlösungen

Dulbeccos Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (10x)

140 mM NaCl
3 mM KCl
1.5 mM KH_2PO_4
8 mM Na_2HPO_4

nach Dulbecco R, Vogt M (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med* 99:167-182.

7. Literaturverzeichnis

Bargmann W (1966) Neurosecretion. *Int Rev Cytol* 19:183-201.

Barzo P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F (1997) Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg* 87:900-907.

Batipps M, Miyaoka M, Shinohara M, Sokoloff L, Kennedy C (1981) Comparative rates of local cerebral glucose utilization in the visual system of conscious albino and pigmented rats. *Neurology (NY)* 31:58-62.

Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW (1993) Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem* 268:19161-19164.

Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S (1990) Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13:198-208.

Benveniste H, Hedlund LW, Johnson GA (1992) Mechanism of detection of acute cerebral ischemia in rats by diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Stroke* 23:746-754.

Birnbaum MJ, Haspel HC, Rosen OM (1986) Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 83:5784-5788.

Bourque CW, Oliet SHR (1997) Osmoreceptors in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 59:601-619.

Bourque CW, Oliet SH, Richard D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15:231-274.

Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW (1993) Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 192:1297-1302.

Burant CF, Takeda J, Brot-Laroche E, Bell GI, Davidson NO (1992) Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is GLUT5. *J Biol Chem* 267:14523-14526.

Burchell A, Allan BB, Hume R (1994) Glucose-6-phosphatase proteins of the endoplasmic reticulum. *Mol Membrane Biol* 11:217-227.

Chalmers DT, McCulloch J (1991a) Alterations in neurotransmitter receptors and glucose use after unilateral orbital enucleation. *Brain Res* 540:243-254.

Chalmers DT, McCulloch J (1991b) Selective alterations in glutamate receptor subtypes after unilateral orbital enucleation. *Brain Res* 540:255-265.

- Chen JL, Wei L, Bereczki D, Hans FJ, Otsuka T, Acuff V, Ghersi-Egea JF, Patlak C, Fenstermacher JD (1995) Nicotine raises the influx of permeable solutes across the rat blood-brain barrier with little or no capillary recruitment. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:687-698.
- Collins RC, McCandless DW, Wagman IL (1987) Cerebral glucose utilization: comparison of [^{14}C]deoxyglucose and [6- ^{14}C]glucose quantitative autoradiography. *J Neurochem* 49:1564-1570.
- Cooper RM, Thurlow GA (1985) Depression and recovery of metabolic activity in rat visual system after eye removal. *Exp Neurol* 87:322-336.
- Cornford EM, Hyman S, Pardridge WM (1993) An electron microscopic immunogold analysis of developmental up-regulation of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:841-854.
- Cosenza RM, Moore RY (1984) Afferent connections of the ventral lateral geniculate nucleus in the rat: an HRP study. *Brain Res* 310:367-370.
- Cushman SW, Wardzala LJ (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J Biol Chem* 255:4758-4762.
- Dienel GA, Cruz NF, Mori K, Holden JE, Sokoloff L (1991) Direct measurement of the lambda of the lumped constant of the deoxyglucose method in rat brain: determination of lambda and lumped constant from tissue glucose concentration or equilibrium brain/plasma distribution ratio for methylglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:25-34.
- Duelli R, Maurer MH, Heiland S, Elste V, Kuschinsky W (1999a) Brain water content, glucose transporter densities and glucose utilization after 3 days of water deprivation in the rat. *Neurosci Lett* 270:1-4.
- Duelli R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998a) Decreased glucose transporter densities, rate constants and glucose utilization in visual structures of rat brain during chronic visual deprivation. *Neurosci Lett* 250:49-52.
- Duelli R, Staudt R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998b) Local transport kinetics of glucose during acute and chronic nicotine infusion in rat brains. *J Neural Transmission* 105:1017-1028.
- Duncan GE, Oglesby SA, Greenwood RS, Meeker RB, Hayward JN, Stumpf WE (1989) Metabolic mapping of functional activity in rat brain and pituitary after water deprivation. *Neuroendocrinology* 49:489-495.
- Fitzsimons JT (1979) The physiology of thirst and sodium appetite. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gennis RB (1989) Biomembranes. Springer, New York.
- Gjedde A, Rasmussen M (1980) Pentobarbital anaesthesia reduces blood-brain glucose transfer in the rat. *J Neurochem* 35:1382-1387.

- Gould GW, Holman GD (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* 295:329-341.
- Gould GW, Thomas HM, Jess TJ, Bell GI (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver and brain isoforms. *Biochemistry* 30:5139-5145.
- Gross PM (1991) Morphology and physiology of capillary systems in subregions of the subfornical organ and area postrema. *Can J Physiol Pharmacol* 69:1010-1025.
- Gross PM (1992) Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res* 91:219-233.
- Gross PM, Kadekaro M, Sokoloff L, Holcomb HH, Saavedra JM (1985) Alterations of local cerebral glucose utilization during chronic dehydrations in rats. *Brain Res* 330:329-336.
- Haspel HC, Rosenfeld MG, Rosen OM (1988) Characterization of antisera to a synthetic carboxyl-terminal peptide of the glucose transporter protein. *J Biol Chem* 263:398-403.
- Hediger MA, Coady MJ, Ikeda TS, Wright EM (1987) Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter. *Nature* 330:379-381.
- Horsburgh K, McCulloch J (1991) Alterations of functional glucose use and ligand binding to second messenger systems following unilateral orbital enucleation. *Brain Res* 549:317-321.
- Jeffery G (1984) Retinal ganglion cell death and terminal field retraction in the developing rodent visual system. *Develop Brain Res* 13:81-96.
- Kadekaro M, Gross PM (1985) Elevated glucose utilization in the subfornical organ during dehydration. *Brain Res Bull* 15:99-104.
- Kadekaro M, Gross P, Sokoloff L (1986) Local cerebral glucose utilization in Long-Evans and Birtleboro rats during acute dehydration. *Neuroendocrinology* 42:203-210.
- Kayano T, Fukumoto H, Eddy RL, Fan Yao S, Byers MG, Shows TB, Bell GI (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. *J Biol Chem* 263:15245-15248.
- Khayat ZA, McCall AL, Klip A (1998) Unique mechanism of GLUT3 glucose transporter regulation by prolonged energy demand: increased half-life. *Biochem J* 333:713-718.
- Kumagai AK, Dwyer KJ, Pardridge WM (1994) Differential glycosylation of the GLUT1 glucose transporter in brain capillaries and plexus choroideus. *Biochim Biophys* 1193:24-30.
- Kuschinsky W (1995) Blood-brain barrier and the production of cerebrospinal fluid. In: Comprehensive human physiology. Greger R, Windhorst U (Hrsg.), Springer, Berlin. pp. 545-560.
- LeBihan D, Turner R, Pekar J, Moonen CTW (1990) Diffusion and perfusion imaging by gradient sensitization: design, strategy, and significance. *F Magn Reson Imaging* 1:7-28.

- Leino RL, Gerhart DZ, van Bueren AM, McCall AL, Drewes LR (1997) Ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurosci Res* 49:617-626.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortes C (1997) Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol* 18:383-439.
- Lienhard GE, Slot JW, James DE, Mueckler MM (1992) Glukose-Transportproteine. *Spektrum der Wissenschaft* März:48-54.
- Maher F, Davies-Hill TM, Simpson IA (1996) Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule cells. *Biochem J* 315:827-831.
- Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA (1994) Glucose transporter proteins in brain. *FASEB J* 8:1003-1011.
- Mansfield P (1977) Multiplanar image formation using NMR spin echoes. *J Phys C Sol State Phys* 10:L55-L58.
- Marger MD, Saier MH (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18:13-20.
- Mata M, Fink DJ, Gainer H, Smith CB, Davidsen L, Savaki H, Schwartz WJ, Sokoloff L (1980) Activity dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflects sodium-pump activity. *J Neurochem* 34:213-215.
- Mueckler MM (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem* 219:713-725.
- Mueckler MM, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229:941-945.
- Nagamatsu S, Kornhauser JM, Burant CF, Seino S, Mayo KE, Bell GI (1992) Glucose transporter expression in brain. cDNA sequence of mouse GLUT3 the brain facilitative glucose transporter isoform and identification of sites of expression by in situ hybridization. *J Biol Chem* 267:467-472.
- Nakanishi H, Cruz NF, Adachi K, Sokoloff L, Dienel GA (1996) Influence of glucose supply and demand on determination of brain glucose content with labeled methylglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:439-449.
- Namba H, Lucignani G, Nehlig A, Patlak C, Pettigrew K, Kennedy C, Sokoloff L (1987) Effects of insulin on hexose transport across blood-brain barrier in normoglycaemia. *Am J Physiol* 252 (Endocrinol Metab 15):E299-E303.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C (1980) Das Zentralnervensystem des Menschen. Springer, Heidelberg.

- Nissl F (1894) Über die sogenannten Granula der Nervenzellen. *Neurol Zbl* 19:20-21.
- Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR (1990) Brain-type glucose transporter (GLUT1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *J Biol Chem* 265:18035-18040.
- Press WH, Flannery BP, Teukolsky SA, Vetterling WT (1986) Numerical recipes. The art of scientific computing. Cambridge University Press, New York. pp. 521-528, 554-560.
- Reese BE (1984) The projection from the superior colliculus to the dorsal lateral geniculate nucleus in the rat. *Brain Res* 305:162-168.
- Reese BE, Jeffery G (1983) Crossed and uncrossed visual topography in dorsal lateral geniculate nucleus of the pigmented rat. *J Neurophys* 49:877-885.
- Reith W, Hasegawa Y, Latour LL, Dardzinski BJ, Sotak CH, Fisher M (1995) Multislice diffusion mapping for 3D evolution of cerebral ischemia in a rat stroke model. *Neurology* 45:172-177.
- Rolls BJ, Rolls ET (1982) Thirst. Cambridge University Press, Cambridge.
- Schröck H, Kuschinsky W (1989) Consequences of chronic K⁺ depletion for the ionic composition of brain, heart, skeletal muscle and cerebrospinal fluid. *Minor Electrolyte Metab.* 15(3):171-177.
- Sefton AJ, Mackay-Sim A, Baur LA, Cottee LJ (1981) Cortical projections to visual centres in the rat: an HRP study. *Brain Res* 215:1-13.
- Smith SA, Bedi KS (1997) Unilateral eye enucleation in adult rats causes neuronal loss in the contralateral superior colliculus. *J Anat* 190:481-490.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897-916.
- Takata K (1995) Glucose transporters in the transepithelial transport of glucose. *J Electron Microsc* 45:275-284.
- Takata K, Hirano H, Kasahara M (1997) Transport of glucose across the blood tissue barriers. *Int Rev Cytol* 172:1-53.
- Thorens B (1993) Facilitated glucose transporters in epithelial cells. *Ann Rev Physiol* 55:591-608.
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF (1988) Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β-pancreatic islet cells. *Cell* 55:281-290.

Thurlow GA, Cooper RM (1985) Increased dependence of superior colliculus metabolic activity on visual cortex after eye enucleation. *Exp Neurol* 87:594-600.

Toga AW (1987) The metabolic consequence of visual deprivation in the rat. *Develop Brain Res* 37:209-217.

Vannucci SJ, Maher F, Koehler E, Simpson IA (1994) Altered expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in neurohypophysis of water-deprived or diabetic rats. *Am J Physiol* 267:E605-E611.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter molecules in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 21:2-21.

Vannucci SJ, Reinhart R, Maher F, Bondy CA, Lee WH, Vannucci RC, Simpson IA (1998) Alterations of Glut1 and Glut3 glucose transporter gene expression following unilateral hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 107:255-264.

Waddell ID, Zomerschoe AG, Voice MW, Burchell A (1992) Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transporter protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT2. *Biochem J* 286:173-177.

Wakabayashi S, Freed LM, Bell JM, Rapoport SI (1994) In vivo incorporation of radiolabelled fatty acids after acute unilateral orbital enucleation in adult hooded Long- Evans rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:312-323.

Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res* 47:1-9.

Yarowsky P, Jehle J, Ingvar DH, Sokoloff L (1979) Relationship between functional activity and glucose utilization in the rat superior cervical ganglion in vivo. *Neurosci Abs* 5:421.

Zeller K, Duelli R, Vogel J, Schröck H, Kuschinsky W (1995) Autoradiographic analysis of the regional distribution of GLUT3 glucose transporters in the rat brain. *Brain Res* 698:175-179.

Zeller K, Rahner-Welsch S, Kuschinsky W (1997) Distribution of GLUT1 glucose transporters in different brain structures compared to glucose utilization and capillary density of adult rat brains. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:204-209.

Zhang C, Granstrom L, Wong-Riley MTT (1996) Deafferentation leads to a down-regulation of nitric oxide synthase in the rat visual system. *Neurosci Lett* 211:61-64.

Zilles K, Rehkämper G (1993) Funktionelle Neuroanatomie. Springer, Heidelberg.

Zilles K, Wree A, Petrovic-Minic B, Schleicher A, Beck T (1989) Different metabolic changes in the lateral geniculate nucleus and the superior colliculus of adult rats after simultaneous or delayed double enucleation. *Brain Res* 488:14-21.

8. Eigene Veröffentlichungen

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

8.1. Originalarbeiten

Duelli R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998a) Decreased glucose transporter densities, rate constants and glucose utilization in visual structures of rat brain during chronic visual deprivation. *Neurosci Lett* 250:49-52.

Duelli R, Staudt R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998b) Local transport kinetics of glucose during acute and chronic nicotine infusion in rat brains. *J Neural Transmission* 105:1017-1028.

Duelli R, Maurer MH, Heiland S, Elste V, Kuschinsky W (1999) Brain water content, glucose transporter densities and glucose utilization after 3 days of water deprivation in the rat. *Neurosci Lett* 270:1-4.

Duelli R, Maurer MH, Staudt R, Heiland S, Duembgen L, Kuschinsky W (2000) Increased cerebral glucose utilization and decreased glucose transporter Glut1 during chronic hyperglycemia in rat brain. *Brain Res* 858(2):338-347.

8.2. Kongressbeiträge

Maurer MH, Duelli R, Elste V, Heiland S, Kuschinsky W (1999) Water deprivation increases glucose transporter densities in the brain. *Pflügers Arch* 437 (5) [Suppl]R98.

Duelli R, Maurer MH, Elste V, Heiland S, Kuschinsky W (1999) Increase of glucose transporter densities during water deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* 19 [Suppl 1] S243.

Duelli R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998) Decreases in glucose transporter densities, rate constants and glucose utilization in visual structures of rat brain during chronic visual deprivation. *Pflügers Arch* 435 (6) [Suppl] R195.

Duelli R, Staudt R, Maurer MH, Kuschinsky W (1998) Glucose utilization, glucose transporter densities and rate constants for glucose transfer during chronic hypoglycemia in the rat brain. *Pflügers Arch* 435 (6) [Suppl] R76.

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Kuschinsky danke ich herzlich für die Themenstellung und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen, sowie seinen persönlichen Einsatz und seine Hilfe in vielen Bereichen, die das Erscheinen dieser Arbeit ermöglichten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. R. Duelli für die intensive und hervorragende Betreuung bei der Einarbeitung in das Thema, der Ausführung der Versuche und der Vollendung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. H. Schröck, Herrn Dr. J. Vogel, Herrn Dr. C. Lenz und Herrn Dr. T. Frietsch für die gute Zusammenarbeit, sowie Frau M. Harlacher, Frau M. Lorenz, Frau T. Fuchs und Herrn P. J. Strauss für wertvolle Hinweise und tatkräftige Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. W. Huttner und dem Graduiertenkolleg Molekulare und Zelluläre Neurobiologie der Universität Heidelberg für ein studienbegleitendes Stipendium, meine Teilnahme an Seminarprogramm, Vorträgen und Methodenkursen.

Herrn Dr. V. Elste, Frau Dr. S. Heiland und Frau S. Schöppenthau, Abt. Klinische Neuroradiologie, danke ich für die magnetresonanztomographischen Messungen.

Diese Arbeit wurde gefördert durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Normalverfahren und über das Graduiertenkolleg Molekulare und Zelluläre Neurobiologie der Universität Heidelberg sowie des Forschungsförderungsprogramms der Universität Heidelberg.

10. Lebenslauf

- 1971 16. Dezember: Geburt in Karlsruhe
als Sohn des Dipl.-Phys. Dr. W. Maurer und der Schulrätin Ursula Maurer, geb. Bauer.
- 1978-82 Besuch der Grundschule.
1982-91 Besuch des Thomas-Mann-Gymnasiums in Stutensee,
Abschluß mit dem Abitur.
- 1980 Auslandsaufenthalt in Madison, Wisconsin/USA.
- 1991-92 Zivildienst in der Chirurgischen Klinik des Städtischen Klinikums
Karlsruhe (Direktor Prof. Dr. R. Bähr).
- 1992-99 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Abschluß mit dem
Staatsexamen.
- 1994 Ärztliche Vorprüfung (Physikum).
1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen).
1998 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen).
1999 Auslandsstudium an der McGill University in Montréal, Québec, Canada.
1999 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen).
- 1997-98 Stipendiat des Graduiertenkollegs Molekulare und Zelluläre Neurobiologie der Universität
Heidelberg.
Gestaltung der Internet-Seite des Graduiertenkollegs
<http://www.nbio.uni-heidelberg.de/Groups/GradKoll/Homepage.htm>