

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin  
der Deutschen Sporthochschule Köln  
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin  
Abteilungsleiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

# **Vergleich der Kapillarisation und MCT1 Expression an der Bluthirnschranke von Cerebellum und Hippocampus der Maus nach und vor einem mehrwöchigen Ausdauertraining**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der ärztlichen Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Benedikt Dillkofer  
aus Freising, Deutschland

promoviert am 23.02.2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2022

Dekan:           Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter:   Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch  
2. Gutachter:   Universitätsprofessor Dr. med. J. Rittweger

## Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung von Herrn Marc Schuhmann durchgeführt und die Bilddatensätze des Cerebellums von mir ausgewertet worden. Die Datensätze der Hippocampusformation wurden von Herrn Marc Schuhmann erhoben.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 13.07.2022

Unterschrift:



<sup>1</sup> Bei kumulativen Promotionen stellt nur die eigenständig verfasste Einleitung und Diskussion die Dissertationsschrift im Sinne der Erklärung gemäß dieser Erklärung dar.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich inständigst bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Bloch sowie Prof. Dr. Dr. Philipp Zimmer, welche mir stets die Tür für den Abschluss der Promotionsschrift offen hielten und mich anspornten das Thema zu beenden. Weiter bedanke ich mich bei meiner Familie, insbesondere meiner Frau Judith, welche mir den Rücken stärkte und zeitlichen Rahmen für die Niederschrift schuf. Zuletzt natürlich bedanke ich mich bei meinen Kindern, Clara Elisa und Laurin Konrad für die Entbehrung meiner Person sowie meinen Schwestern Katrin und Stefanie und meinem Vater Konrad für die ständige Ermutigung. Zudem möchte ich meinem guten Freund Jannis Langer danken, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter ohne die nichts von dem was ich im Leben erreichen durfte möglich gewesen wäre. Leider kannst du, die Abgabe dieser Arbeit nicht miterleben. Du trägst einen großen Teil daran.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Laktat und Monocarboxylattransporter .....</b>	<b>10</b>
2.1.1. Laktat .....	10
2.1.2. Die Familie der Monocarboxylattransporter .....	14
2.1.2.1. MCT1,2 und 4 .....	14
2.1.2.2. MCT3 .....	17
2.1.2.3. MCT 5 .....	17
2.1.2.4. MCT6 .....	17
2.1.2.5. MCT7 .....	17
2.1.2.6. MCT8 und 10 .....	18
2.1.2.7. MCT12 .....	18
<b>2.2. Der zentralnervöse Metabolismus .....</b>	<b>19</b>
2.2.1. Die Bluthirnschranke .....	19
2.2.2. Zentralnervöse Energieträger .....	20
2.2.3. Zentralnervöser Substratumsatz .....	21
2.2.4. Das Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle .....	23
<b>2.3. Der Aufbau des Mäusehirns .....</b>	<b>24</b>
2.3.1. Die Entwicklung des Mäusehirns .....	24
2.3.2. Der Hippocampus .....	25
2.3.3. Die Erregungsausbreitung im Hippocampus – intrinsischer Schaltkreis .....	26
2.3.4. Das Cerebellum der Maus .....	27
2.3.4.1. Anatomische Grundlagen .....	27
2.3.4.2. Zelltypen und histologische Gliederung .....	28
2.3.4.3. Afferenzen und Efferenzen des Cerebellums .....	29
2.3.4.4. Kleinhirnerne .....	30
2.3.4.5. Afferenzen und Efferenzen der cerebellären Kerne .....	32

<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
3.1.	Material .....	33
3.1.1.	Versuchstiere und Untersuchungsdesign.....	33
3.1.2.	Software und Geräte.....	33
3.2.	Methoden .....	34
3.2.1.	Histologische Bearbeitung .....	34
3.2.2.	Mikroskopische Auswertung.....	37
3.2.3.	Statistische Auswertung .....	37
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Anzahl der Kapillaren .....	39
4.2.	Maximale Graustufenstärke .....	41
4.3.	Mittlere Graustufenstärke .....	42
4.4.	Integrated Density.....	44
4.5.	Kapillarfläche .....	45
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
5.1.	Methodendiskussion .....	47
5.2.	Ergebnisdiskussion.....	48
5.2.1.	Kapillarisierung.....	48
5.2.2.	Expression der MCT1 .....	50
5.3.	Beurteilung .....	53
5.3.1.	Hippocampus .....	53
5.3.2.	Cerebellum .....	54
5.4.	Forschungsausblick .....	55
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>56</b>

<b>7.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>69</b>
<b>7.1.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>69</b>
<b>7.2.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>69</b>



## Abkürzungsverzeichnis

ADP.....	Adenosindiphosphat
ATP.....	Adenosintrihsophat
BDNF .....	Brain-derived neutrophic Factor
BHS.....	Blut-Hirn Schranke
CA .....	Carbonanhydrase
HC .....	Hippocampus
HIF-1 .....	Hypoxia induced factor 1
Int A.....	medial anteriorer Anteil des IntP
IntP.....	interposed nucleus
IntPPC.....	parvizellulärer Anteil des posterioren Int P
KG .....	Kontrollgruppe
Lat .....	lateraler nucleus
LDH1 .....	Laktatdehydrogenase
MCT .....	Monocarboxylattransporter
MedCM.....	caudomedialer nucleus
MedDL.....	dorsolaterale Tuberanz
MedM .....	rostromedialer nucleus
NAD .....	Nicotinamidadenindinukleotid
NBC.....	Natrium/Bicarbonat Cotransporter
NGF.....	Neutrophic growth factor
NHE.....	Natrium/Protonen-Antiport
P .....	Phosphat
ROS .....	Reaktive Sauerstoff Spezies
SCLS.....	solute carriers
TG .....	Trainingsgruppe
VCB.....	vestibulcellulärer nucleus
Y .....	<i>Nucleus Y</i>
ZNS.....	Zentrales Nervensystem

## 1. Zusammenfassung

Physische Belastung induziert eine Vaskulogenese sowie eine Erhöhung der Expression des Laktattransporters MCT1 (Monocarboxylat Transporter 1) im Muskelgewebe. Diese Arbeit untersucht den Einfluss einer vierwöchigen Laufbandtrainingsintervention auf die kortikalen Strukturen des Hippocampus und Cerebellum im Cerebrum der Maus. Hierfür wurden 8 Mäuse kontrolliert randomisiert in zwei Gruppen unterteilt. Eine Untersuchungsgruppe erhielt eine vierwöchige Laufbandtrainingsintervention. Die Kontrollgruppe erhielt keine Trainingsintervention. Nach Mortalisierung wurden immunohistochemische Schnitte der Mäusehirne angefertigt und das Protein MCT1 der Kapillaren der Blut-Hirn-Schranke angefärbt. Diese wurden mittels des Programms „ImageJ“ auf die Expression des MCT1 sowie die Anzahl der Kapillaren untersucht. Hierbei wurde die Expression des MCT1 mittels der Färbungsdichte in densitometrischen Einheiten gemessen (dE). Eine höhere Expression des MCT1 war hierbei durch einen niedrigeren Wert gekennzeichnet. Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Vaskulogenese im Hippocampus im Vergleich der Trainingsinterventionsgruppe mit der Kontrollgruppe (Kapillaranzahl/Maus TG: 309,5 KG: 49,5;  $p < 0,05$ ). Eine relevante Vaskulogenese kann im Cerebellum nicht gezeigt werden (Kapillaranzahl/Maus TG: 47,33, KG: 69; keine Signifikanz). Weiter besteht eine deutlich erhöhte Expression des MCT1 bezogen auf die Kapillarfläche, bezeichnet „Integrated density“, im Hippocampus der Mäuse der Trainingsinterventionsgruppe (Integrated density in  $\mu\text{m}^2 \times \text{dE}$ , TG: 229,88, KG: 440,67 ;  $p < 0,05$ ) Im Cerebellum kann keine höhere Expression des MCT1 im Flächenprodukt gezeigt werden (Integrated density  $\mu\text{m}^2 \times \text{dE}$ , TG: 289,4 , KG: 189,7; keine Signifikanz). Die Abberanz der Ergebnisse ist sowohl durch Einschränkungen im Versuchsdesign als auch durch Unterschiede im Ansprechen auf physische Intervention der beiden Gehirnareale erklärbar. Im Ausblick rechtfertigen die Ergebnisse den Ausbau physischer Trainingsintervention auf die Therapie neurologischer Erkrankungen mit Affektion der Kognition wie z. B: Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson.

## 2. Einleitung

Schon seit längerem ist bekannt, dass physische Belastung bzw. Sport positive Auswirkungen auf unsere Gesundheit hat (1-3). Hierbei spielen physische, psychische und soziale Aspekte eine Rolle (4). Ein weiterer Faktor ist die Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit (5,6). So kann durch Sport auch bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson und Multipler Sklerose, eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und somit den Krankheitsverlauf positiv beeinflussende Effekte nachgewiesen werden (7, 16). Ebenso kann durch Sport eine Verbesserung der motorischen und koordinativen Fähigkeiten erreicht werden. Dies impliziert auch Halte-, Stütz-, Ziel- und Extrapiramidal-motorik. Diese motorischen Fähigkeiten sind bei der Multiplen Sklerose sowie dem Morbus Parkinson aufgrund unterschiedlicher pathophysiologischer Effekte geschädigt. Auch hier kann durch Training eine Verbesserung der Funktion erreicht werden (16,18). Sowohl Kognition als auch Motorik haben Ihren Ausgangspunkt im zentralen Nervensystem in dem durch Training adaptive Prozesse eingeleitet werden. Als Grundlage dieser Anpassung spielen verschiedene Mechanismen eine Rolle. Hierbei vermitteln die Zytokine Neutrophic growth factor (NGF) und Brain-derived neutrophic factor (BDNF) synaptogenetische Prozesse (8,9). Weiter bestehen auch adaptive Prozesse induziert durch die veränderte Stoffwechselsituation unter Belastung und dem damit einhergehenden Substratwechsel von Glukose zu Laktat. Dieses gewinnt mit zunehmender Belastung Bedeutung als Energiequelle des ZNS (10). Hier wirkt es zusätzlich als Induktor der Angiogenese (138). Das sogenannte Laktatshutteling erfolgt über MCT (Monocarboxylattransporter), welche Laktat aus den metabolisch aktiven Kompartimenten (z. B: der Muskulatur) ausschleusen und über den Blutstrom zu verteilen, wo sie es mittels selbiger dem ZNS als Substrat zur Verfügung stellen (55). Betrachtet man die Kognition, ist die Hippocampusformation eine zentrale Verteilerstelle zwischen den Assoziationsarealen und ist somit entscheidend für die Qualität der Denkprozesse. Somit wird die Hippocampusformation häufig als Surrogatparameter für die Untersuchung von Einflussfaktoren auf die Kognition und deren Veränderung in Morphologie und Mikroskopie des ZNS verwendet (12). Im Hippocampus besteht ein Zuwachs des Laktatmetabolismus unter Belastung (10). Eine interstrukturell vermehrte Expression der Laktattransporter konnte dort bei physischer Aktivität bereits gezeigt werden (121). Dies korreliert mit einer Verbesserung der Kognition im Mensch und Mausversuch (6). Im Endothel der BHS sowie im Erythrozyten befindet sich ausschließlich der MCT Subtyp MCT1 (15), welcher Gegenstand der in dieser Arbeit abgehandelten Untersuchungen ist. Das Cerebellum ist ein Areal welches in der Kognition eher eine untergeordnete Rolle spielt und führend der Regulation von Halte-Stütz und Zielmotorik sowie extrapyramidal-motorischer Prozesse dient. Kapillarisation und MCT Expression sind hier wenig untersucht.

Es ergibt sich hier jedoch ein Anstieg an MCT2 unter Belastung in der dort lokalisierten Purkinjellschicht (17), wohingegen keine Informationen zur Anpassung der MCT1-Expression durch Training bestehen. Eine genauere Betrachtung belastungsinduzierter Veränderungen in Angiogenese und MCT1 Expression in der BHS dieser Areale ist Ziel dieser Arbeit.

## 2.1. Laktat und Monocarboxylattransporter

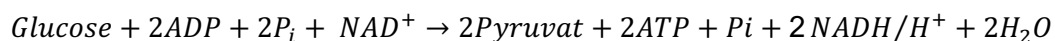
Basis für die in dieser Arbeit untersuchten strukturellen und quantitativen Veränderungen an der Kapillaren der BHS des Mäusehirns bilden das Laktat sowie die Monocarboxylattransporter. Laktat wirkt hierbei als Induktor der Angiogenese und fördert die Expression der Monocarboxylattransporter (138, 121). Der Monocarboxylattransporter 1 ist hierbei das Ziel der im experimentellen Teil dieser Arbeit immunohistochemisch angefärbten Hirnstrukturen. Ein Überblick über Struktur, Synthese, Funktion und Lokalisation des Stoffwechselmetaboliten Laktat und der Transportproteine MCT soll in diesem Kapitel gegeben werden.

### 2.1.1. Laktat

Die Bedeutung dieses Moleküls hat in der modernen sportmedizinischen Forschung erheblich zugenommen. Wurde es früher nur als Verursacher muskulärer Azidose angesehen, wird es heute als zentraler Botenstoff für Adaptionsprozesse auf metabolischer, genetischer und hämodynamischer Ebene betrachtet. In diesem Sinne hat sich der Begriff „Lacthormon“ etabliert (53/27). Ein Überblick über die Entstehung des Laktats, dessen Bedeutung und damit verbunden die Bedeutung des Laktattransports soll hier gegeben werden.

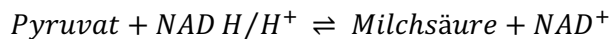
Als Laktat (Milchsäure) wird ein mögliches Folgeprodukt der Glykolyse bezeichnet. Es kann aus einem Zielprodukt der Glykolyse, dem Pyruvat, bei mangelnder Möglichkeit des aeroben Abbauweges über Zitronensäurezyklus und Atmungskette gebildet werden (19). Ort der Glykolyse ist dabei das Zytoplasma (20, S.44).

Gesamtbilanz der Glykolyse:



Die Bildung von Pyruvat aus Glucose ist verbunden mit einer Anhäufung des Reduktionsäquivalents  $\text{NADH}/\text{H}^+$ . Da nur begrenzte Mengen  $\text{NAD}^+$  zur Verfügung stehen, muss dieses reproduziert werden, um die Glykolyse aufrecht zu erhalten. Die Reproduktion von  $\text{NAD}^+$  erfolgt je nach Stoffwechselaktivität aerob in der Atmungskette oder anaerob in der Milchsäuregärung. Im anaeroben Weg wird das entstandene Pyruvat zu Laktat umgesetzt und das gebildete  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  reduziert. Dies kann wieder als Wasserstoffakzeptor in der Glykolyse fungieren und somit die Glykolyse aufrecht- erhalten.

Laktatentstehung:



Wichtig ist hierbei, dass die Umwandlung in Laktat reversibel ist, dieses also durch Umwandlung in Pyruvat wieder als Substrat genutzt und in die aeroben Stoffwechselprozesse eingeschleust werden kann.

Obgleich die für die Muskelkontraktion nötige ATP Ausbeute der Glykolyse ( $2 \text{ mol ATP} / \text{mol Glucose}$ ) und der anschließenden Umwandlung des Pyruvats in Laktat viel geringer ist als die, welche sich aus der aeroben Weiterverarbeitung ergeben würde ( $32 \text{ mol ATP} / \text{mol Glucose}$ ), gewinnt die Glykolyse mit zunehmender Belastungsintensität höheren Anteil an der Energiebereitstellung.

Unter physiologischen Bedingungen liegt das Laktat zu 99 % dissoziiert, also in  $\text{H}^+$  und Laktat vor. Dies führte zu der Annahme, dass eine Bildung von Laktat mit einer Produktion von  $\text{H}^+$  im Zytoplasma einhergeht und somit Ursache für die muskuläre Übersäuerung ist.

Jedoch gibt es hierzu konträre Ansichten. Nach Robergs & Amann (2003) ist die Reaktion der Bildung des Laktats aus Pyruvat verbunden mit einer  $\text{H}^+$  Aufnahme (21).

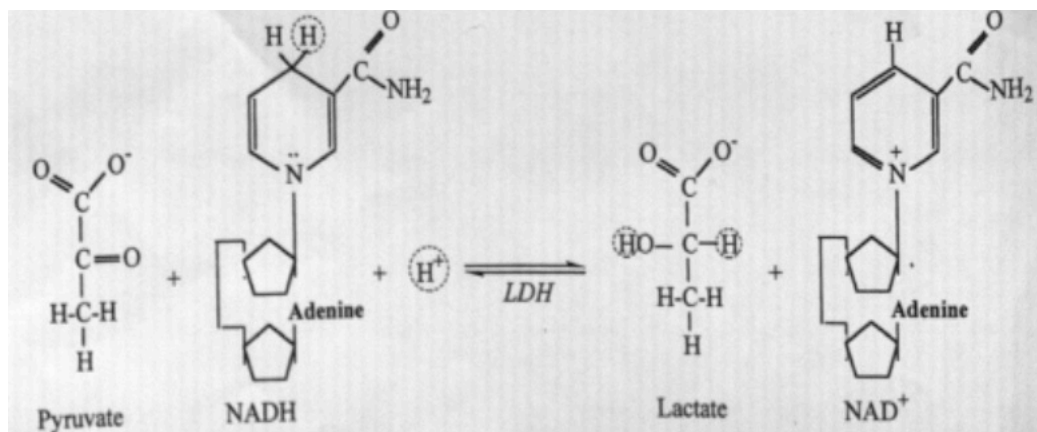


Abbildung 1: Darstellung Laktatdehydrogenase Reaktion nach Robergs und Amann (21)

Die Autoren gehen davon aus, dass durch einen veränderten Anlagerungsmechanismus der Protonen direkt die dissoziierte Form der Milchsäure entsteht und somit keine Protonenfreisetzung, sondern eine Protonenaufnahme erfolgt. Grund für die belastungsbedingte Azidose ist ihrer Meinung nach die protonenproduzierende ATP-Hydrolyse, deren Protonenequivalent nicht durch die mitochondriale Respiration beseitigt werden kann (21).

Die Laktat-Leistungsdagnostik basiert auf der Annahme, dass die Menge an ausgeschüttetem Laktat dem Protonenausstoß äquivalent ist. Diese Annahme wäre demnach unzutreffend.

Laktat wird im Gegenteil ein puffernder Effekt bei zunehmender Azidose eingeräumt. Zudem ermöglicht das Laktat eine Stimulierung der Cl<sup>-</sup> Kanäle, welche essenziell für das Auslösen der Aktionspotentiale im Muskel ist. Somit hält Laktat die muskuläre Arbeit aufrecht (22).

Weiter unterliegt die Laktatverteilung im Gewebe vielen endogenen Einflüssen: der maximalen Laktatproduktionsrate, der Laktatdehydrogenase-Verteilung, der metabolischen Kapazität, der Blutflussgeschwindigkeit, dem pH-Gradient zwischen den einzelnen Kompartimenten und dem Laktattransport (23).

Bereits seit längerem weiß man von einem breiten Aufgabenbereich des Laktats in der Steuerung von Zellprozessen. So kann Laktat den Redoxstatus einer Zelle verändern. Je nach Reaktionsrichtung können durch Umwandlung in Pyruvat Veränderungen im Verhältnis NAD<sup>+</sup>/NADH H<sup>+</sup> erzeugt werden. Durch Abtransport und Aufnahme an anderem Ort ergibt sich so ein Regelmechanismus (24).

Weitere Bedeutung kommt dem Laktat in der Gefäßneubildung zu. Angiogene (gefäßbildende) Prozesse können durch Laktat und Hypoxie via hypoxia-induced-factor(HIF-1) abhängige Wachstumsfaktoren stimuliert und reguliert werden (25,90). HIF-1 ist dabei ein Transkriptionsfaktor, welcher auf Veränderungen im Sauerstoffhaushalt der Zelle reagiert. Geringe Erhöhungen der Laktatkonzentration haben dabei ähnliche Wirkungen wie eine Hypoxie unter aeroben Bedingungen (23).

Zudem kann Laktat durch Stimulierung verschiedener Prozesse zu einer verbesserten Kollagen-Synthese führen, welche essenziell für die Gefäßneubildung ist, um dem Blutfluss zu widerstehen (26).

Laktat wirkt sich darüber hinaus auf die Regulierung der Transportproteinverteilung aus. An L6-Myozyten konnte gezeigt werden, dass Laktat die Expression des MCT1 verbessert und dessen Biogenese durch die Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und ROS-reaktiven Transkriptionsfaktoren verbessert (27, 28). So sorgt Laktat für die Verbesserung seines eigenen Transportes.

Es kann zwischen den verschiedenen Muskelfasertypen oder innerhalb der Zelle transportiert werden (29,30). Dies geschieht durch verschiedene Shuttle-Prozesse wie dem Zell-Zell-Shuttle, also dem Austausch zwischen zum Beispiel zwei Muskelzellen oder auch intrazellulären Shuttle, so zum Beispiel die Aufnahme des Laktats durch das Mitochondrium. Diese Shuttle-Prozesse stützen die Vorstellung des Laktats, sowohl Produkt als auch Substrat zu sein, je nach Zelltyp und Lokalisation. Dies wird in Abbildung 2 verdeutlicht.

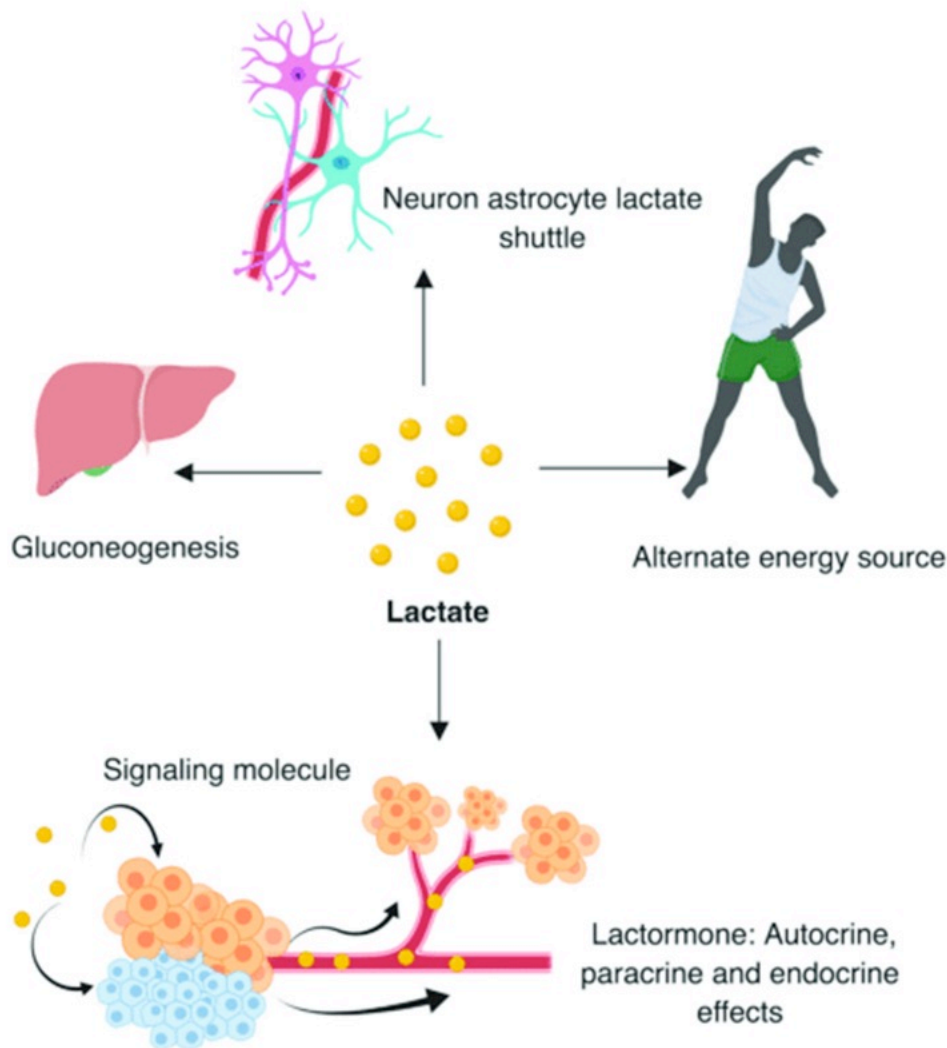


Abbildung 2: Laktatshuttle Mishra, Deepshikha & Banerjee, Debabrata. (2019)

Weiterhin sind die Shuttle-Prozesse wichtig in Anbetracht des Eliminationsortes des Laktats. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass oxidativ arbeitende Fasern unter Belastung bei 2,5 mmol/l Laktat von der Abgabe zur Aufnahme wechseln, glykolytisch arbeitende dagegen erst bei 4 mmol/l Laktat (31). Die oxidativ arbeitenden Fasern bilden also den Ort der Elimination, wogegen in den glykolytisch arbeitenden Fasern produziert wird. Weiterer Eliminationsort des Laktats ist die im Herzen lokalisierte glatte Muskulatur, wobei neuere Studien auch dessen Elimination im Hirn belegen und damit verbunden ein wichtiges alternatives Substrat zur Glucose zur Aufrechterhaltung der kortikalen Homeostase existiert (10). Entgegen der früheren Meinung, Laktat lediglich als Stoffwechselendprodukt zu sehen, wird ihm heute eine bedeutende Rolle als Stoffwechselmetabolit / Energielieferant und Signalmolekül zugute geschrieben. Weitestgehend hat sich der Begriff Laktormon etabliert. (53/27). Die Bedeutung Laktormon bezieht sich auch auf die regulatorischen Effekte des Laktats. So wird durch dessen

Signalwirkung die MCT Expression am Erythrozyten gesteigert, Wundheilung gefördert, Angio- und Vaskulogenese stimuliert, das Targeting von Stammzellen beeinflusst sowie die Migration von Endothelzellen beeinflusst (88, 89, 34, 90).

Akut wirkt Laktat als Metabolit, welches bei Ausschüttung eine regionale Vasodilatation und damit eine Hyperperfusion erwirkt (24). Seine negativ überschießende Akkumulation im Rahmen der schockassoziierten Laktatazidose führt damit zu einer nicht kompensierbaren zentralen Hypoperfusion und einer Akkumulation von weiteren Metaboliten.

### **2.1.2. Die Familie der Monocarboxylattransporter**

Die Familie der Monocarboxylattransporter bildet eine Gruppe von 16 SCLS ( solute carriers 16), welche an den verschiedensten Lokalisationen im Körper den transmembranen Transport von Substraten und Metaboliten, Hormonen (36, 37, 38, 39, 40) sowie der Distribution von Pharmazeutika regulieren. Diesbezüglich spielen Sie eine essenzielle Rolle in der zellulären Homeostase. Eine veränderte Expression oder Mutation zeigen Assoziationen zu verschiedenen systemischen und organspezifischen Erkrankungen, wobei die Überexpression in verschiedenen Tumorerkrankungen aktuell im Mittelpunkt der Forschung spezifischer Pharmazeutika zur targeted Therapie steht. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die einzelnen bekannten Isoformen gegeben werden, wobei der Fokus entsprechend der in dieser Arbeit behandelten Thematik dem MCT1 zukommt. Im Weiteren werden regulatorische Prozesse diskutiert. Die Verteilung der MCTs in den Kompartimenten zeigt Abbildung 5. Die Mikrostruktur des MCT1 wird in Abbildung 4 verdeutlicht.

#### **2.1.2.1. MCT1,2 und 4**

Unter den verschiedenen Eigenschaften der MCT Isoformen besteht vor allem Kenntnis über die Isoformen MCT1 und MCT4, welche beide im skelletalen Muskel zu finden sind. Der MCT1 ist gleichzeitig die einzige Isoform, welche im Erythrozyten nachgewiesen werden konnte (37). Zudem befindet sich MCT1 auch im Mitochondrium der Zelle (34), was auch im Tierexperiment mit Ratten belegt werden konnte (35). Um die Bedeutung dieser Transporter auch für den gesamten Organismus zu verstehen sei hier die Bedeutung für den peripheren Stoffwechsel skizziert

Die Expression der MCT1/4 in den Muskeln ist dabei vom Fasertyp abhängig. MCT1 kommt dabei vornehmlich in den oxidativ langsam arbeitenden roten Fasern (so z.B. im M. Soleus) vor, wogegen die höchste MCT4 Expression in der glykolytisch arbeitenden weißen Muskulatur, z.B. den weißen Muskelfasern des M. Gastrocnemius zu finden ist. Der rote Intermediärtyp weist hohe Konzentrationen beider MCTs auf (so zum Beispiel die roten Fasern des Gastrocnemius) (41, 42, 43). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte MCT1 Konzentration mit einer höheren Laktataufnahme im Muskel verbunden ist (44), und die MCT1 somit



vornehmlich für die Laktataufnahme zuständig ist, und MCT4 aufgrund seiner Präsenz in den glykolytisch arbeitenden Fasern für die Ausschleusung des Laktats (41, 42). Dies ist auf verschiedene kinetische Eigenschaften der beiden MCTs zurück zu führen, welche anschließend genauer beschrieben werden.

Eine wichtige Funktion nehmen die MCT in der pH-Regulation des Muskels ein. Die Protonen  $H^+$  und das Laktat<sup>-</sup> werden immer im Verhältnis 1:1 abtransportiert (45). Bei moderater Belastung erfolgt der größte Teil des Protonenabtransportes durch ein  $Na^+/H^+$  Austauschsystem, welches mittels eines Transportproteins (NHE) geregelt wird. Insbesondere bei hoher Belastung jedoch erfolgt der Großteil des Abtransportes durch MCT1 und MCT4 und verhindert somit die zelluläre Übersäuerung (46).

Weitere wichtige Transportvorgänge zur Regelung des intrazellulären pHS bilden der  $Na^+/Bikarbonat$ -Kotransport (NBC), wobei im Astrozyten der NBCe1 eine herausragende Rolle spielt (93, 94), der  $Na^+/H^+$  Antiport (NHE) sowie eine Diffusion von  $CO_2$  durch die Membranen.

Um den pH aufrecht zu erhalten sorgt die Carbonanhydrase für den Umsatz von  $CO_2$  und  $H_2O$  zu  $HCO_3^-$  und  $H^+$  Ionen, wonach das Proton nun aktiv durch den NHE entfernt werden kann.

Im ZNS bestehen vor allem die CA-Isoformen II, IV, XII und XIV. Dort konnte für die Isoform CAII eine nicht-enzymatische Steigerung der MCT1 Transportrate nach Blockierung der Katalysefunktion gezeigt werden. Somit scheint diese zusätzlich als eine Art Coenzym zu agieren, welches als Protonenantenne wirkt (95, 96). Ein ähnlicher Effekt besteht für die Isoform MCT4 (97). Durch all diese Prozesse wird die Glycolyse moduliert. Schematisch sind diese Prozesse in Abbildung 3 dargestellt.

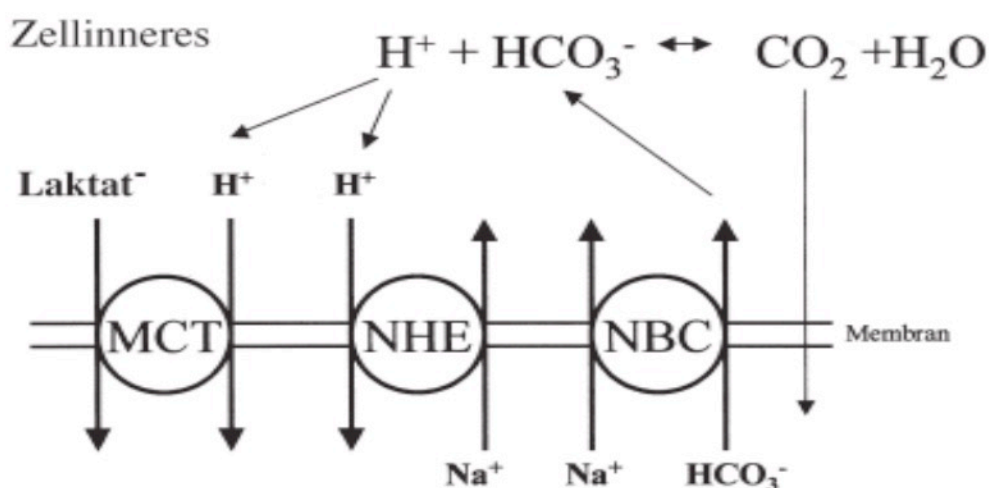


Abbildung 3: Darstellung der pH-Regulation im Muskel nach Juel (14)

Die MCTs spielen also eine wichtige Rolle beim transmembranen Transport des Laktats, was einen Zusammenhang zwischen deren Expression und Transportkapazität nahelegt. So

konnte eine positive Korrelation zwischen Nettolaktatfreisetzung und der sarkolemmalen MCT1 und MCT4 Expression der Beinmuskulatur bei fünfminütiger Belastung von 65 %  $\dot{V}O_2$  max. gezeigt werden (47).

Eine verringerte MCT1 Expression im Muskel, sowohl bei Kranken des Diabetes Typ II (48) als auch bei körperlich inaktiven Menschen (49) um 35 % zur Kontrollgruppe wiesen andere Studien auf. Beide Gruppen werden dabei mit einem verringerten Laktatmetabolismus in Verbindung gebracht.

Die Expression der MCTs lässt sich durch Training beeinflussen. So belegen diverse Studien eine trainingsinduzierte Erhöhung der MCT Dichte in der Muskulatur bei Ausdauer-, Intervall- und Krafttraining (46). Auch die diabetesbedingt verringerte Konzentration an MCT1 im Muskel konnte durch ein 90-minütiges Krafttrainingsprogramm normalisiert werden (48).

Ein Weg, produziertes Laktat im Organismus zu befördern, führt über das Blut. Der Transport des Laktats erfolgt dabei immer absteigend, das heißt er ist abhängig vom Konzentrationsunterschied des Laktats in Muskel und Blut (26).

Die Aufnahmefähigkeit der Erythrozyten für Laktat und  $H^+$  spielt dabei eine entscheidende Rolle in Laktatmetabolismus. Untersuchungen zeigten, dass sich bei 30 Sekunden maximaler Belastung das Ruheverhältnis von  $\sim 0.5$  (Erythrozyten Laktat/ Plasma Laktat) auf  $\sim 0.32$  verschiebt. Die Transportkapazität der Erythrozyten wird dabei überschritten und es scheint, als wäre deren Transportvermögen hier ein limitierender Faktor (50). Einen positiven Effekt auf den MCT1 Gehalt zeigt chronische Hypoxie, induziert durch längerfristigen Aufenthalt in größerer Höhe. Diese führte in einer Untersuchung zur Adaption von 405 % des ursprünglichen MCT1 Gehalts in Erythrozyten (41).

Im Rahmen eines ausdauerbetonten Interventionsprogramms an Kranken des Diabetes Typ II konnte bereits gezeigt werden, dass die MCT1 Expression in Ruhe im Blut durch Training ansteigt. Dagegen senkte sich die Expression des MCT1 nach Belastung deutlich unter Ausgangswert (52). Die Ergebnisse legen eine belastungsbedingte Translokation des MCT1 nahe.

Unter den oben genannten Monocarboxylattransportern spielen die Isoformen MCT1, MCT2 und MCT4 eine wichtige Rolle im neuronalen Energiestoffwechsel und wurden im ZNS nachgewiesen (15,55). Sie katalysieren auch dort den Transport von Monocarboxylaten wie Laktat in Kombination mit einem Proton und verhindern auch hier die zelluläre und lokale metabolische Azidose und haben wichtigen Einfluss auf die pH Regulation (55). Dabei ist der Transport stereoselektiv für L-Laktat, elektronenneutral und ATP unabhängig.

MCT4 zeigt eine niedrige Affinität zu Laktat ( $K_m$  für Laktat 17–35 mM) und ist in glykolytisch Aktiven Zellen wie o. g. der Muskelfaser Typ I oder in unserem Fall dem Astrozyten vertreten. MCT1 zeigt eine höhere Affinität zu Laktat ( $K_m$  für Laktat 3–5 mM). Diesbezüglich ergeben

sich auch andere Funktionen. Er stellt mit seiner ubiquitären Lokalisation sozusagen die „Allzweckwaffe“ des Laktattransports da sorgt für die Aufnahme von Laktat nach intrazellulär, also aus dem Blutstrom über die kapillare in den Astrozyt oder ins Interstitium wogegen der MCT4 für die Ausfuhr des Substrats zuständig ist (54). MCT2 zeigt die höchste Affinität zu Laktat ( $K_m$  für Laktat 0,5–1 mM), eine spezifische Lokalisation in den Neuronen und sorgt für die Aufnahme des zirkulierenden Laktats in da Neuron (55).

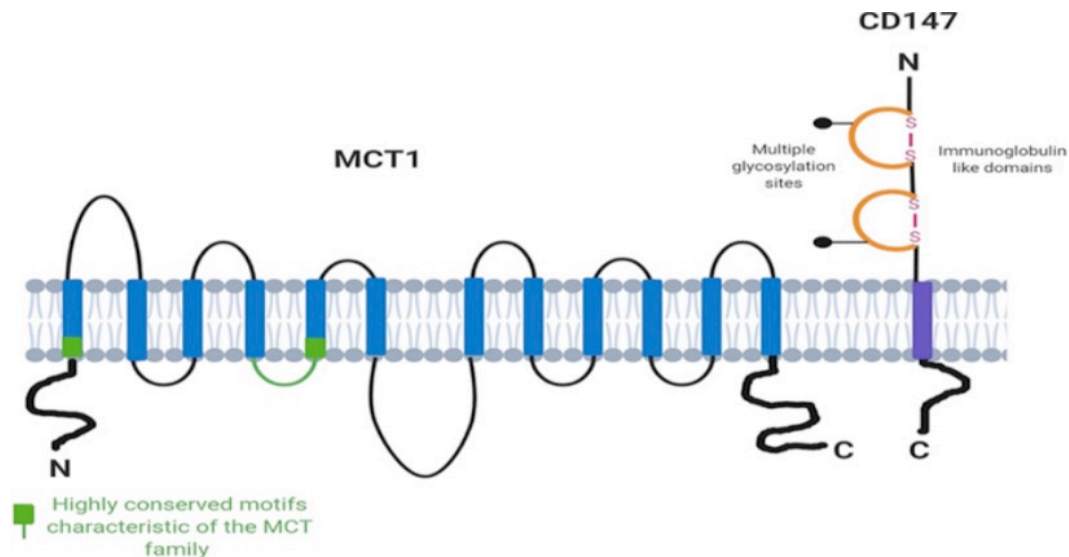


Abbildung 4: Struktur des MCT1 (38)

#### 2.1.2.2. MCT3

Die Hauptfunktion des MCT3 ist der Laktattransport aus der Retina mit einer Lokalisation in der basalen Membran des retinalen Pigments (56,57).

#### 2.1.2.3. MCT 5

Eine genaue und Funktion Substratspezifität konnte bis heute nicht beschrieben werden. Jedoch wird eine Überexpression bei gastrointestinalen Tumoren beschrieben (58,59).

#### 2.1.2.4. MCT6

Dieser Transporter schein eine Rolle zu spielen bei dem Transport verschiedener Xenobiotika im Darm (60).

#### 2.1.2.5. MCT7

Der MCT7 spielt eine Rolle im Transport von Ketonkörper wie  $\beta$ -Hydroxybutyrat. Mutationen des entsprechenden Transporters sind assoziiert mit Lebererkrankungen wie der Steatosis hepatis im Tiermodel (61).

### 2.1.2.6. MCT8 und 10

Der MCT8 ist für die Aufnahme von L-Thyroxin in die Zeller verantwortlich. Eine Mutation der genetischen Struktur bedingt das sogenannte Allan-Herndon-Dudley Syndrom (AHDS) welches mit kognitiven Defiziten einhergeht (62,63). Der MCT10 spielt hierbei ebenso eine wenn auch nicht soweit erforschte Rolle in der Thyroxinhormonhomeostase (64)

### 2.1.2.7. MCT12

Eine genetische Mutation des Transporters ist dem Katarakt assoziiert. Der zelluläre Mechanismus diesbezüglich ist jedoch noch Gegenstand der Forschung. Der Effekt ist wohl partiell durch die Anwesenheit von CD147 zu kompensieren (65).

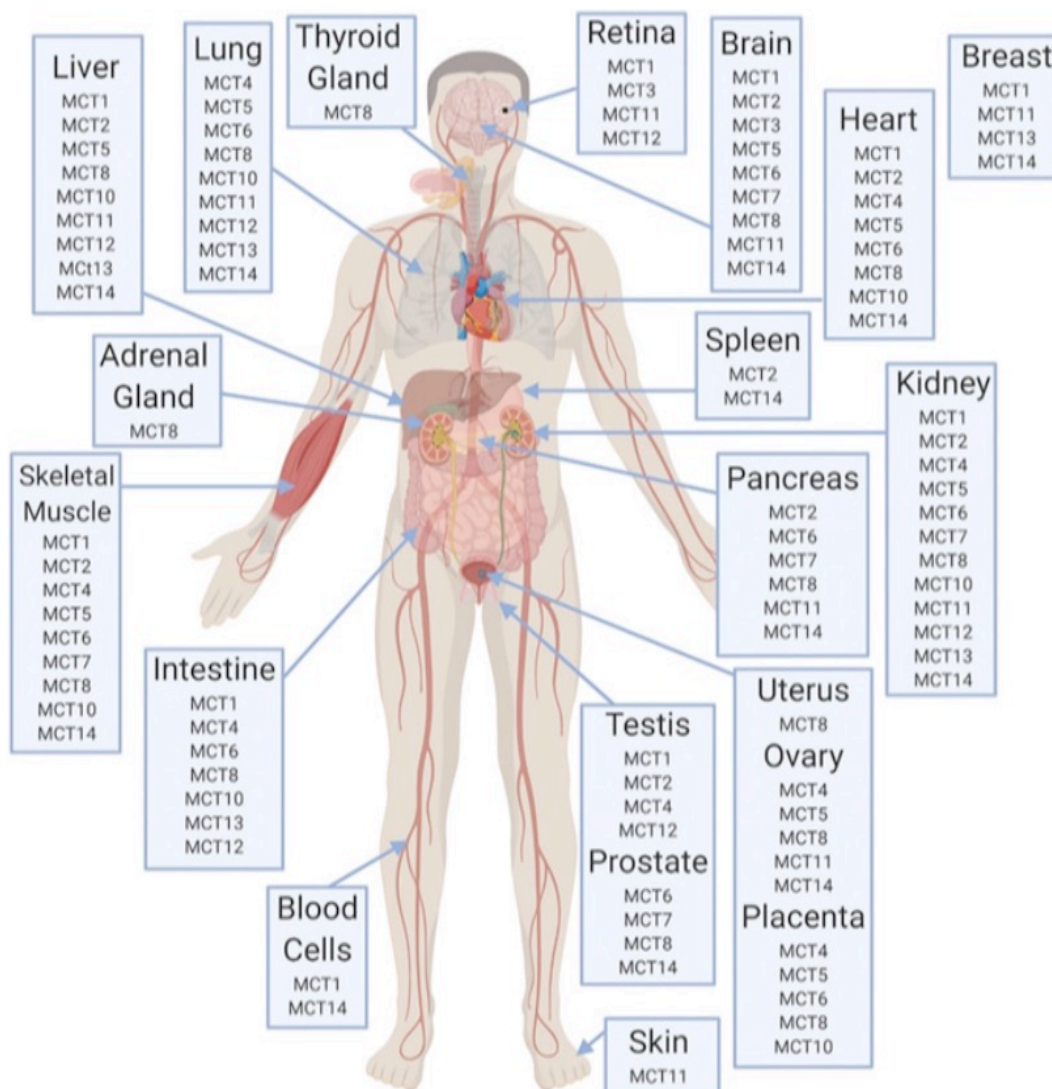


Abbildung 5: Verteilung der MCT in den Geweben (152)

## **2.2. Der zentralnervöse Metabolismus**

Aufgabe des zentralnervösen Metabolismus ist die Aufrechterhaltung des neuronalen Zellstoffwechsels sowie die Sicherstellung der adäquaten Neurotransmission. Hierbei integrieren sich das Substrat Laktat sowie die Monocarboxylattransporter in diesen komplexen Kreislauf. Ein Überblick über die beteiligten Zellkompartimente und biochemischen Abläufe wird im Folgenden gegeben.

### **2.2.1. Die Bluthirnschranke**

Die sogenannte Bluthirnschranke bestehend aus kapillärem Endothel, endothelialer Basalmembran sowie Perizyten und Astrozytenfortsätzen bildet die wichtige Barrierefunktion am Übergang von Blut sowie Interstitium und Intrazellulärraum des Gehirns (66, 67). Weiter ist der endotheliale Verbund durch Tight-Junctions, vernetzt die eine transendotheliale Barriere bilden (68, 69). Hierbei besteht eine Schutzfunktion welche den Influx von endogenen und exogenen Toxinen verhindert. Gleichzeitig stellt sie die Versorgung mit existentiellen Substraten wie Glucose, Laktat, Sauerstoff und Aminosäuren sicher (70). Eine weitere Aufgabe bildet die Aufrechterhaltung der Homeostase. Hierbei ist die zelluläre Funktionstüchtigkeit nur unter sehr speziellen Bedingungen in pH, Substrat und Elektrolytkonstellation möglich (71, S. 9). Schematisch ist die Anatomie in Abbildung 6 verdeutlicht.

Neben den Mechanismen der einfachen Diffusion bedient sich dabei die Bluthirnschranke diverser Transporter die den Stoffaustausch mittels vereinfachter Diffusion oder sogar aktivem Transport möglich machen. In diesem Kontext spielt die intracerebrale „Hürde“ eine existentielle pharmakodynamische Rolle, da bereits hierbei die Anreicherung verschiedener Medikamente verhindert wird und so z. B. Chemotherapeutika Ihre Targets nicht erreichen. Umso wichtiger ist es die verschiedenen Transportmechanismen an der BHS herauszufinden um hierbei neben potentiellen Targets auch neue Schleusen für Pharmaka und somit Therapieansätze zu entwickeln.

Die Astrozyten bilden ähnlich wie die Podozyten der renalen Glomerulie eine Umkapselung der Kapillaren. Die Zellsomata kleiden dabei weiter den interneuronalen Raum aus. Ihre Aufgabe ist hierbei die Stabilisierung der extrazellulären Ionenkonzentration sowie die Versorgung der Neuronen mit Substrat (72). Die Astrozyten spielen daher eine existentielle Rolle als Vermittler zwischen metabolischen Zellen des Gehirns und dem Blutstrom (73,74) Neben der existentiellen Rolle in der BHS zeigen Studien Ihre Bedeutung für die Lern und Denkprozesse da Ihre Anzahl im Gehirn unter kognitiver Belastung steigt (75).

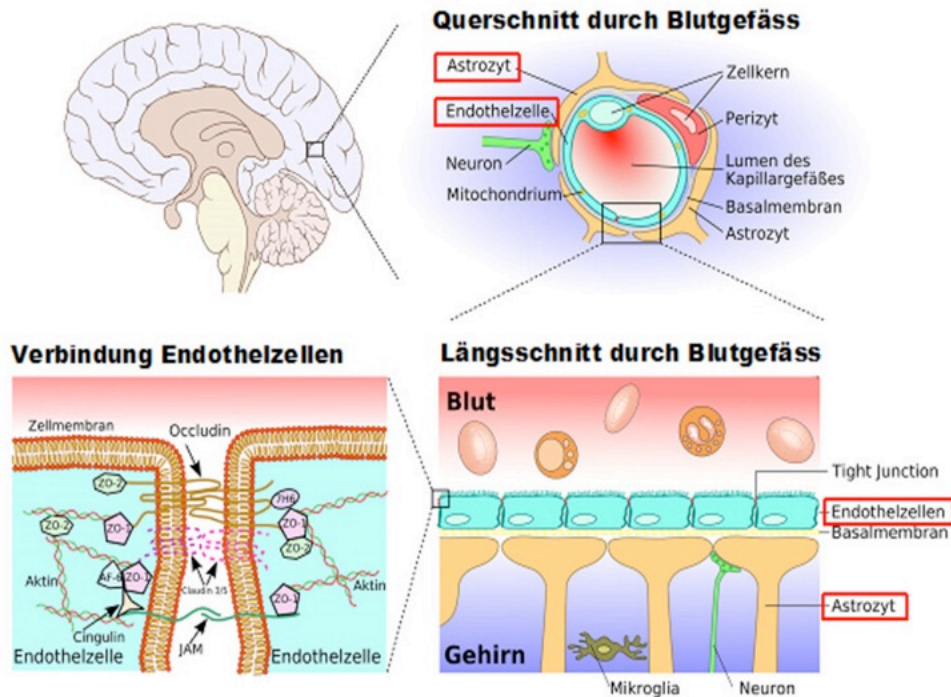


Abbildung 6: Anatomie der Blut-Hirn-Schranke (158)

### 2.2.2. Zentralnervöse Energieträger

Für die mögliche Synthese von ATP für den neuronalen und cerebralen Energiestoffwechsel stehen verschiedene Möglichkeiten zur Synthese bereit. Hierbei differenziert man:

- Anaerob alaktazid aus Kreatinphosphat
- Anaerob laktazid in Form der anaeroben Oxidation
- Sowie aerob alaktazid in Form der aeroben Oxidation (Atmungskette)

Die verschiedenen Formen der Energiebereitstellung spielen hierbei in unterschiedlichen Geweben zu unterschiedlichen metabolischen Situationen eine Rolle. Prinzipiell steht hierbei das Kreatinphosphat als initialer Pool für Rückgewinnung von ATP vor allem im Muskel bereit, Glykolyse und Atmungskette gewinnen hierbei abhängig vom Belastungszustand an Bedeutung. Besondere Bedeutung kommt hierbei dem Pyruvat / bzw. Laktat zu, welches als Endprodukt der Glykolyse und Substrat der Atmungskette eine entscheidende Rolle spielt und Thema dieser Arbeit ist. Die Entstehung wurde bereits im Kapitel 1.2. diskutiert

Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen in die Atmungskette eingeschleust und führt zu einer Potenzierung der ATP Ausbeute. Der Ablauf der Atmungskette über die einzelnen beteiligten Komplexe zeigt Abbildung 7.

**Bilanz der Atmungskette:**  $10 \text{ NADH} + \text{H}^+ + 2 \text{ FADH}_2 + 32 (\text{ADP} + \text{P}) + 6 \text{ O}_2 \rightarrow 10 \text{ NAD}^+ + 2 \text{ FAD} + 12 \text{ H}_2\text{O} + 32 \text{ ATP}$ . Die Mechanismen sind in Abbildung 7 verdeutlicht.

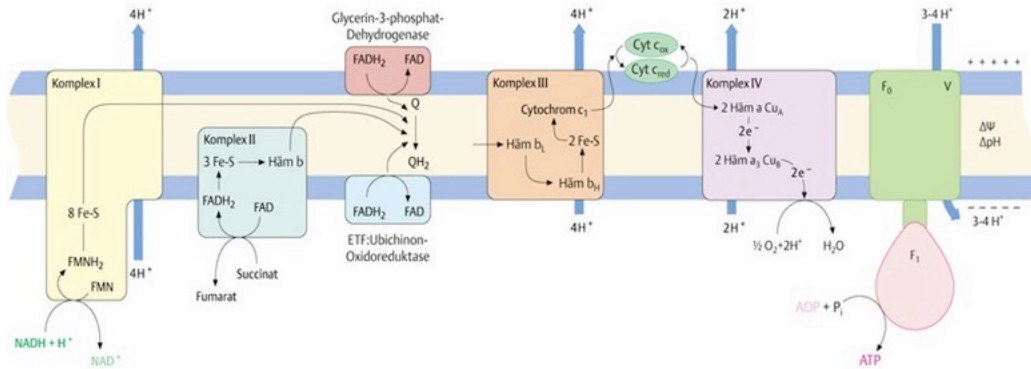


Abbildung 7: Energiegewinn der Atmungskette (159)

### 2.2.3. Zentralnervöser Substratumsatz

Der Hauptlieferant für den cerebralen Energieverbrauch bildet mit 98 % Glucose. Diese wird mittels erleichteter Diffusion über sogenannte Hexosetransporter der GLUT-Familie transportiert. Hierbei befindet sich der Vertreter GLUT1 am Erythrozyten und den Kapillaren der BHS. (76,77,78). Der Transport erfolgt hierbei nach dem Prinzip der vereinfachten Diffusion. Um den hierfür notwendigen Gradienten aufrecht zu erhalten wird Glucose unmittelbar in Glucose-6-Phosphat umgewandelt. So zeigt sich im cerebralen Interstitium unter regulären Bedingungen lediglich eine Glucosekonzentration von 1-2 mM gegenüber 5 mM Blutglucosekonzentration. Der GLUT 1 ist hierbei an den Fortsätzen der Astrozyten lokalisiert und sorgt für den Großteil des Umsatzes. Über den GLUT 3 erfolgt die Aufnahme direkt in die Neurone. Hierbei sind die Astrozyten vorwiegend glykolytisch aktiv, wogegen die an der Neurotransmission beteiligten Neuronen energieeffizient oxidativ arbeiten und sich der astrozytäre Stoffwechsel dies unterstützt. Beide Zelltypen sind jedoch prinzipiell zu oxidativer und glykolytischer Arbeit fähig. Entsprechend dem favorisierten Metabolismus unterscheidet sich hierbei die enzymatische Ausstattung.

Ein wichtiges alternatives Substrat bildet hierbei das Laktat. Hierbei zeigt sich eine deutlich verringerte Glucoseaufnahme um ca. 25 % bei gleichzeitig erhöhtem Laktatinput (79) unter Belastung. Gleichzeitig besteht eine gesteigerte cerebrale Laktatverwertung um ca. 33 % (80). Die Aufnahme des Laktats erfolgt dabei durch die in dieser Arbeit behandelten MCT-Transporter. Eine deutlich erhöhte Laktatkonzentration mit ca. 3-4-facher Konzentration des Blutplasmas findet sich in der interstitiellen Gerinfflüssigkeit. (82). Eine Kompensation des stressbedingt erhöhten Energieumsatzes und einer konsekutiv en neuro-glukopenischen Status durch erhöhten Laktatumsatz konnte diesbezüglich gezeigt werden. (87),

Im neuronalen Netzwerk wird Laktat und Glucose zur Synthese von Glutamat, als Neurotransmitter am synaptischen Spalt benötigt. Diese entsteht aus den Citratzyklus mittels Ammonisierung von alpha -Ketoglutarat.

Nach Entleerung der präsynaptischen Vesikel in den synaptischen Spalt kommt es hierbei zur Wiederaufnahme der des Glutamats in die Astrozyten mittels spezifischer Transporter. Hierbei wird mittels der Glutaminsynthase Glutamin synthetisiert, welches nach Transport in das Interstitium erneut in die Neuronen transportiert und mittels Glutaminase in Glutamat umgewandelt wird. Dieser Mechanismus spielt z. B. eine besondere Rolle bei hochgradig exzitatorischen Neuronen des Tractus perforans (81).

Für diese Prozesse wird Energie benötigt. Die für die Glutamat anreicherung nötige Energie stammt aus dem durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit hohem Energieverbrauch generierten Ionengradienten. Ebenso ist die neuronale Kommunikation am synaptischen Spalt abhängig von der Aufrechterhaltung eines Ionengradienten mittels der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Die für die Energiegewinnung nötige Glykolyse und Laktatproduktion erfolgt im Zytoplasma der Astrozyten und wird durch die glutamaterge Aktivität der Synapse gesteigert (40). Für die neuronale Energiegewinnung wird das Laktat aus den Astrozyten via MCTs in die Neuronen überführt wo es via Laktatdehydrogenase 1 (LDH1) in zu Pyruvat oxidiert und in die Atmungskette eingeschleust werden kann (82,83)

Laktat wird hierbei zum einen durch die Astrozyten via LDH5 produziert, kann aber auch über die MCTs direkt über die BHS diffundieren. Hierbei konnten 3-5fache Laktatkonzentrationen in extrazellulären Kompartimenten des Gehirns als im Blutplasma nachgewiesen werden (84). Ebenso entspricht die Permeabilität des Laktats ca. 50 % der Glucose, sodass via MCT von einem direkten Substrateinsatz des Laktats ohne den astrozytären Weg auszugehen ist (85,86). In der Summe spielt somit Laktat eine bedeutende Rolle im cerebralen Energiestoffwechsel. Die einzelnen Prozesse sind hierbei in Abbildung 8 verbildlicht.

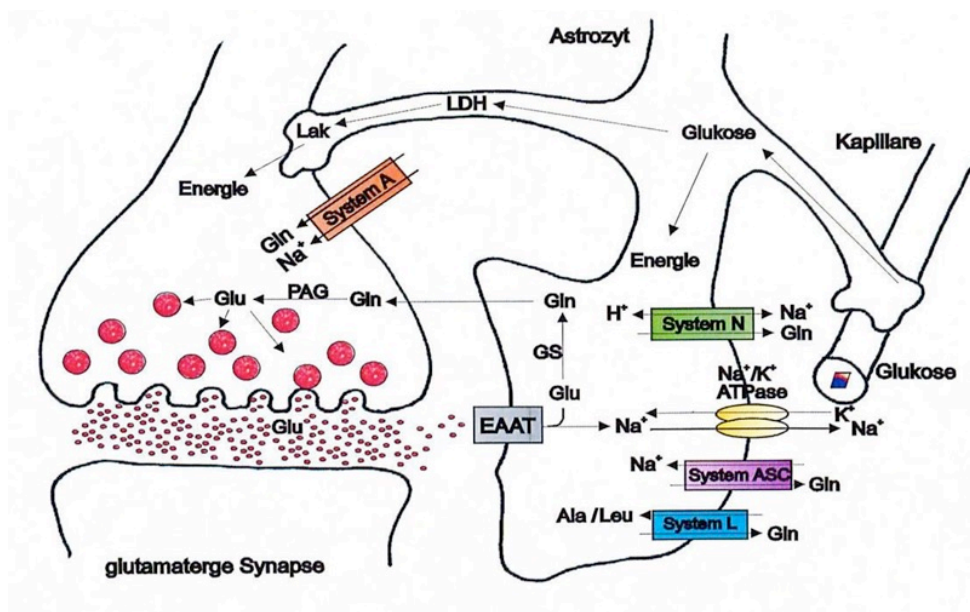


Abbildung 8: Funktion der glutamatergen Synapse (92)



## 2.2.4. Das Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle

Wie bereits in 3.2.1 beschrieben spielen im ZNS vor allem die MCT Isoformen 1,2 und 4 eine Rolle für die Schleusung von Laktat durch die Kompartimente.

In diesem Kontext wird vom Zell-Zell-Laktatshuttle gesprochen, welches im zentralnervösen Kontext auch als Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle bezeichnet wird. Intrazelluläre Shuttleprozesse also im Sinne eines intrazellulären Laktatshuttle meinen die Translokation Laktat in Mitochondrium und Peroxisomen über MCTs und LDH. (23,91)

In den Erythrozyten sowie dem vaskulären Endothel der BHS sind ausschließlich die die MCT1 exprimiert (71). Der Erythrozyt nimmt über 90 % des Laktats über diesen Transporter auf und kann über diesen Mechanismus das Laktat über die BHS als Substrat bereitstellen. Am Erythrozyten wurde bereits gezeigt das vermehrte Expression des MCT durch körperliches Training gesteigert werden kann (13). Der Induktionseffekt ist hierbei deutlich größer bei MCT1 als MCT 4 (14). In dieser Arbeit werden die Einflüsse des Induktionseffekts auf die Bluthirnschranke an Hippocampus und Cerebellum untersucht.

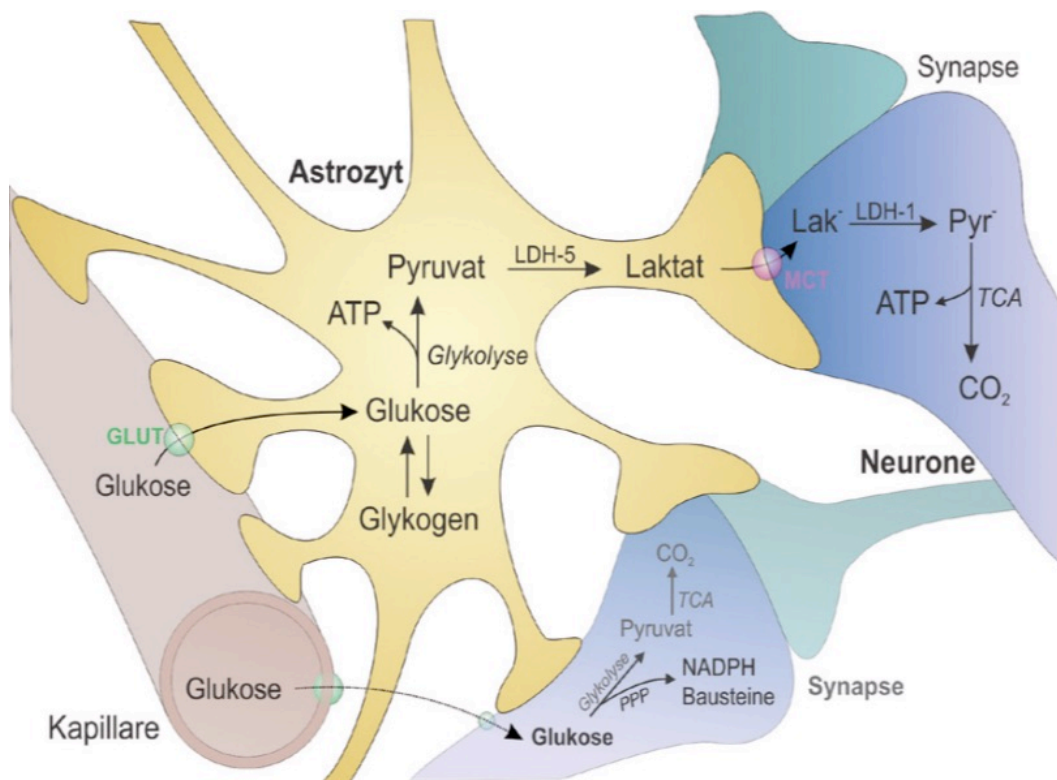


Abbildung 9: Die ANLS-Hypothese nach (98)

Entsprechend der kinetischen und molekularen Eigenschaften der Gewebe lässt sich also folgender Weg für das Laktat skizzieren. Glucose wird mittels des GLUT Transporter in den Astrozyten über dessen Fortsätze aufgenommen, Über die Glycolyse in Pyruvat umgesetzt und

über die vorwiegend in diese Richtung katalysierende LDH5 in Laktat umgesetzt. Über den MCT4 erfolgt der Efflux und die Aufnahme durch den MCT2 an den Neuronen. Hier kann es durch die LDH 1 wieder in Pyruvat umgesetzt werden und in Citratzyklus und Atmungskette eingeschleust werden. Über den MCT1 ist auch der direkte Laktatefflux über die BHS möglich. Eine schematische Zeichnung der einzelnen Prozesse zeigt hierbei Abbildung 9.

### 2.3. Der Aufbau des Mäusehirns

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde an ein Ausdauerinterventionsprogramm an der Maus durchgeführt und im Anschluss Hippocampusformation und Cerebellum exemplarisch untersucht. Im Anschluss soll eine anatomische Übersicht und Funktionsbeschreibung der Gehirnareale erfolgen.

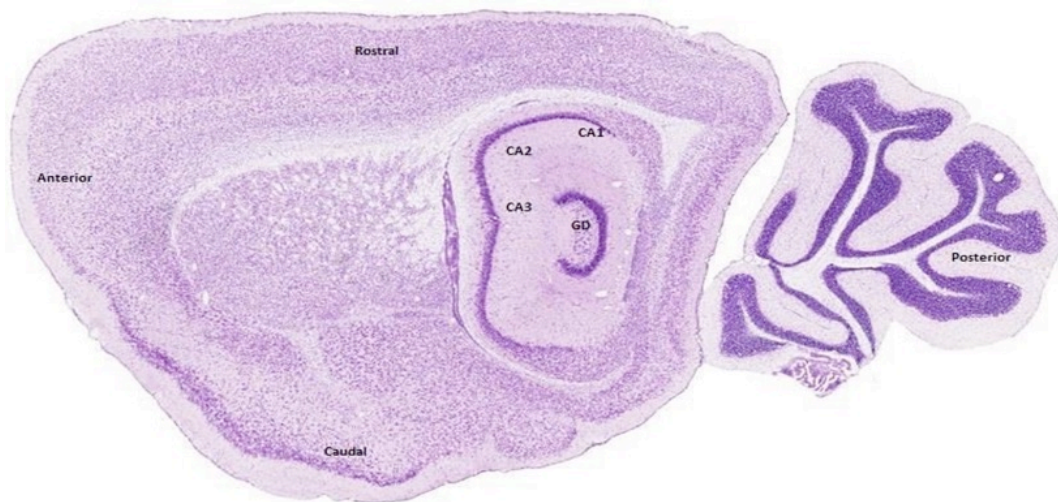


Abbildung 10: Sagittalschnitt des Mäusehirns in HE-Färbung

#### 2.3.1. Die Entwicklung des Mäusehirns

Die Entwicklung des Mäusehirns vollzieht sich ähnlich dem Primaten als Abkömmling des Ektoderms. Das ZNS wird sowohl bei der Maus als auch beim Menschen in Prosencephalon, Diencephalon, Telencephalon, Mesencephalon und Cerebellum unterteilt. Es bestehen zwei Hemisphären aufgeteilt in Substantia grisea und alba sowie den Hirnkernen, Hippocampus, Amygdala und Gyrus cinguli (99,100,101). Der Cortex cerebri, Teil des Telencephalon, ist bei Rodentia (Nager), als auch beim Primaten in 4 Primärfelder, Occipital, Temporal, Parietal und Frontal aufgeteilt. Sie sind Teil des Isocortex /Neocortex (99,100). Der Neocortex gewinnt dabei mit zunehmender Größe und Konnektivität der kortikalen Schaltkreise an Bedeutung (102). Unterschieden wird hierbei in Assoziationskortex, primär somatosensorischem Kortex sowie primär motorischen Kortex, wobei die Verarbeitung sensorischer Reize und motorischer Befehle bei der Maus anteilig sehr hoch ist (99). Im Gegensatz hierzu bilden Assoziationsfelder einen

großen Teil des Neocortex des Primaten. Die damit verbundene Regulierung im Sinne vermehrt zielgerichteter Handlungen bei Primaten erschweren einen validen direkten Vergleich zwischen Neocortex von Maus und Primaten (99). Der histologische Aufbau des Neocortex besteht aus vier Laminationen entgegen sechs beim Menschen (103) Es bestehen Afferenzen und Efferenzen zu zahlreichen Endhirnarealen .

### **2.3.2. Der Hippocampus**

Die Struktur der Hippocampus ist Teil des Archiocortex und zeigt eine typisch eingerollte Struktur. Es besteht eine ausgeprägt konservierte, grundlegende zytoarchitektur und Interkonnektivität unter den Mammalia (104). Prozentual bildet er 23 % des Gesamtcortex des Rodentia jedoch nur 2 % des Humanen. (105, S511). Im Hippocampus werden Antrieb, Emotion, Gedächtnis als auch Lernprozesse gesteuert. Existentiell hierbei ist die Funktion in der Gedächtnisbildung von Primär bis Tertiärgedächtnis (12). Afferenzen kommen aus breiten neocortikalen Arealen wie präfrontaler Cortex, Thalamus, Gyrus cinguli und enthorinalem Cortex. Efferenzen laufen von der Fornix ins Septum, zur Amygdala und zum Hypothalamus. Das so gebildete System nennt sich Papez-Neuronenkreis (12). Über diesen Neuronenkreis sollen rezente Gedächtnisinhalte ins Primär, Sekundär und Tertiärgedächtnis überführt werden (106). Betrachtet man den Morbus Alzheimer so zeigt sich eine Dysfunktion des HC. Hierbei besteht eine anterograde Amnesie bei erhaltenem Langzeitgedächtnis (107). Bereits gespeicherte Wissensinhalte können abgerufen werden, jedoch scheitert die Integration neuer Gedächtnisinhalte. Die Hippocampale Region unterteilt sich in die Hippocampale Formation und die Parahippocampale Region (108). Es besteht ein Unterschied in Verschaltung und kortikaler Schichtung (99). Die Hippocampale Formation umfasst drei zytoarchitektonische Bereiche, Gyrus dentatus, Hippocampus proper und das Subiculum (99). Beim Nagetier sind beide Hemisphären des HC durch ventrale und dorsale Kommissuren verbunden welche beim Primaten inapparent sind (104). Der Hippocampus proper teilt sich in die Regionen CA 1-4 tangential C-förmig über das Cornu ammonis. Histologisch liegt Innen liegt zunächst der Alveus (weiße Substanz), in dem die Efferenzen des Hippocampus verlaufen und der sich in den Fornix fortsetzt. Von dort prägt er einen langen Strang zum Rückenmark aus. An den Alveus grenzt das Stratum oriens mit den Korbzellen, die von den Pyramidenzellen des angrenzenden Stratum pyramidale aktiviert werden und die Pyramidenzellen hemmen. Das Stratum pyramidale wird in die Felder CA1, CA2, CA3 und CA4 gegliedert. An diese Schicht grenzt das Stratum radiatum, gefolgt vom Stratum lacunosum-moleculare. Im Feld CA3 liegt zwischen Stratum radiatum und dem Stratum pyramidale noch das Stratum lucidum. Die afferenten Fasern verlaufen im Tractus perforans, der an das Stratum lacunosum-moleculare angrenzt, und terminieren an den Dendriten der Pyramidenzellen.

### 2.3.3. Die Erregungsausbreitung im Hippocampus – intrinsischer Schaltkreis

Der HC besitzt ein komplexes intrinsisches Verschaltungsmuster. Als morphologisches Korrelat dient es der Bildung von Gedächtnisinhalten zum Lernen und Integrieren neuer Informationen (101). Das Verschaltungsmuster bildet einen Kreislauf von Afferenzen und Efferenzen: den Papez-Neuronenkreis (12). Aus nahezu allen Assoziationsarealen des Neokortex sowie des limbischen Systems gelangen afferente Nervenimpulse in den Entorhinalen Cortex der Parahippocampalen Region (104). Von dort aus beginnt die trisynaptische Erregungsleitung. Aus der superfizialen Schicht des enthorinalen Cortex durchquert der Tractus perforans das Subikulum und erreicht den Gyrus dentatus. Dabei werden zuerst die distalen Granulozyten aktiviert, die im Anschluss über nicht-myelinisierten Moosfasern die proximalen Pyramidenzellen der CA 3-Region und im nächsten Schritt die CA 1-Region erregen (99, S.125; 101, S.165). Der Tractus perforans aktiviert also die Zellen des Gyrus dentatus. Er kann aber auch direkt die apikalen Dendriten der CA 3- Region stimulieren. Wenige Nervenfasern aus dem Entorhinalen Cortex können ebenfalls direkt das CA 1-Areal erregen (104, S.18f). Die Axone der Pyramidenzellen der CA sind efferente Faserbündel und steuern in die Fornix. Sie dienen als Ausgang der Nervenfasern des Hippocampus. Von hier aus können der orbitofrontale Kortex im basalen Vorderhirn, ein Teil des präfrontale Cortex, und die Nuclei des Hirnstamms angeregt werden. Zusätzlich existiert ein stark divergentes System an Efferenzen, die zum Ursprungsort der kortikalen Afferenzarealen zurücklaufen (101, S.19f; 104, S.165f). Das komplette Verschaltungssystem arbeitet mit dem Neurotransmitter Glutamat (109). Dieser übernimmt für die explizite Gedächtnisprozessierung, verantwortlich für das Erlernen neuer Fakten, eine wichtige Funktion (111). Die Erregungsausbreitung ist nach Abbildung 11 nachvollziehbar.

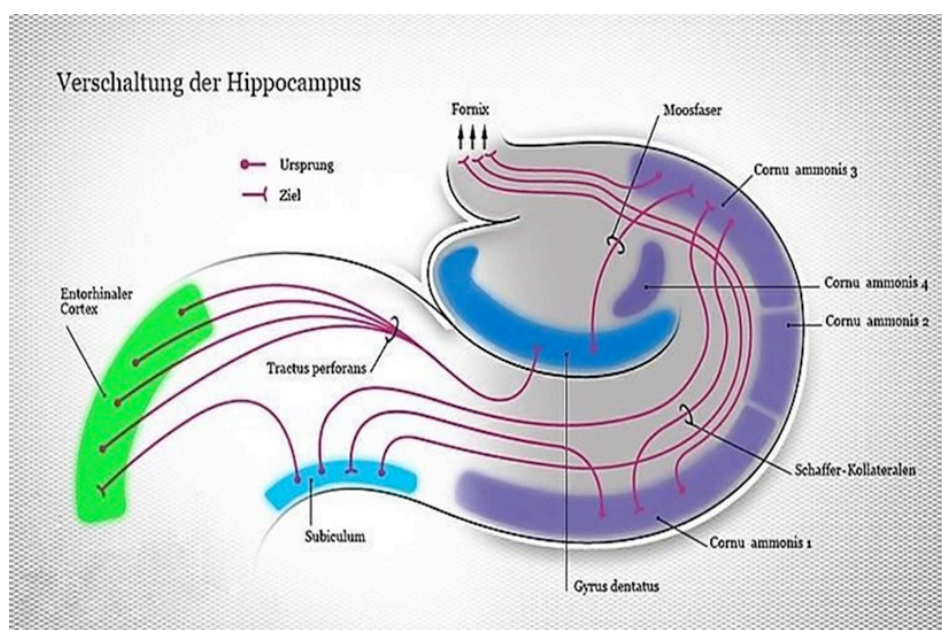


Abbildung 11: Intrinsisches Verschaltungsmuster des Hippocampus (160)

### 2.3.4. Das Cerebellum der Maus

Das Cerebellum in der hinteren Schädelgrube der Maus zeigt einen komplexen makroskopischen und mikroskopischen Aufbau. Ein Überblick über Anatomie, Mikroskopie sowie Zelltypen und komplexe Verschaltung soll im Folgenden gegeben werden.

#### 2.3.4.1. Anatomische Grundlagen

Wie auch Menschen liegt das Cerebellum in der hinteren Schädelgrube und wird durch das Tentorium cerebelli vom Cerebrum getrennt. Es besteht aus zwei Hemisphären welche im Zentrum durch den Vermis verbunden sind. Nach rostral reicht das Cerebellum an den Colliculus inferior und den kaudalen Anteil des Cortex. Es bildet das Dach des vierten Ventrikels. Mit dem Hirnstamm ist es über die beidseits 3 Pendunculi cerebelli verbunden. Der Vermis ist feiner Unterteilt in 10 Lobuli und deutlich prominenter als im humanen Cerebellum durch Fissuren geteilt.

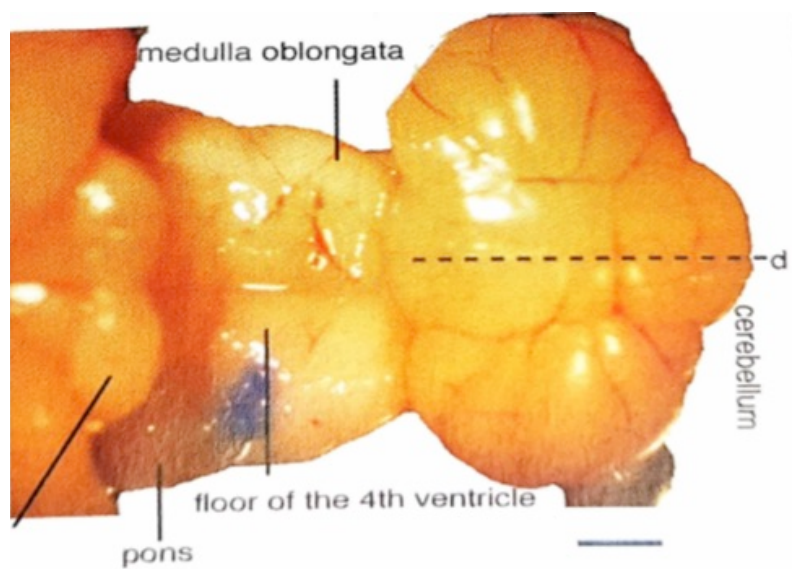


Abbildung 12: Makroskopie des Mäusecerebellums nach (27, S. 361)

Im humanen Cerebellum werden die Hemisphären durch die Fissura prima in den Lobus anterior und posterior und der Lobus posterior durch die Fissura Flocculonodularis vom Lobus Flocculonodularis getrennt. Dorsal befindet sich an beiden Hemisphären, der Flocculus der über den Nodus an den Vermis reicht. Gemeinsam bilden Sie den Lobus Flocculonodularis. Die Oberfläche ist hierbei durch linienförmige Fissuren aufgeworfen. Die kaudalste Struktur grenzend ans Foramen magnum bilden die Kleinhirntonsillen.

In der Maus teilen die Hemisphären von rostral nach kaudal in den einfachen Lobus, crus 1 des anisoformen Lobus, Crus 2 des anisoformen Lobus, den paramedianen Lobus und die Copula der Pyramis auf. Auch diese sind durch Fissuren getrennt. Die Copula der Pyramis

geht in die Struktur des Paraflocculus über welcher in den Cortex des Flocculus übergeht (27, S. 360 ff). Eine apikale Darstellung zeigt Abbildung 12.

#### **2.3.4.2. Zelltypen und histologische Gliederung**

Wie auch beim Menschen wird der Cortex in 3 histologische Schichten unterteilt. In der oberflächlichen Molekularschicht befinden sich die Dendriten der Purkinjezellen sowie Axone der Körnerzellen und die Interneurone der Korbzellen. In der sich anschließenden Purkinjezellschicht befinden sich die Somata der Purkinjezellen sowie Candelabrum Zellen und Bergman Glia. In der Granularzellschicht befinden sich die Körnerzellen klein und eng gepackt. Hierbei zeigen sich weitere Interneurone wie Golgizellen und Lugarozellen (27, 366 ff).

##### **Die Purkinjezelle**

Die ist die zentrale Zelltyp der cerebellären Konnektivität. Sie bilden mit die größten Neurone des ZNS und haben eine GABAnerg inhibierende Transmission. Über die Weiße Substanz projizieren die Axone in die cerebellären und vestibulären Kerne in einem weitverzweigten Baumartigen Komplex bilden. Kollateralen reichen auch in den cerebellären Kortex und vermitteln ein Feedbackinhibition über dortigen Interneurone. Die Dendriten der Purkinjezellen bilden ein weiterverzweigtes Gitter mit den Parallelfasern der Körnerzellen in der Molekularzellschicht Sie sind besetzt von Dornfortsetzten (engl: spines) an denen sie Synapsen mit den Sternzellen sowie Kletterfasern bilden. An den Fortsetzten der terminalen Dendriten synaptisieren Sie mit den Parallelfasern.

##### **Körnerzellen**

Die Somata befinden sich klein und gepackt in der namensgebenden Schicht und stellen zahlenmäßig die häufigste Neuronenklasse im ZNS dar (die Anzahl übersteigt dabei das 1000 fache der Purkinjezellen). Es besteht eine excitatorische glutamaterge Transmission. Hiermit bilden Sie die einzige Glutamat verwendende Neuronenklasse cerebellär. Über Ihre Dendriten in der Granularzellschicht bilden Sie exzitatorische Afferenzen mit den Moosfasern sowie inhibitorische Synapsen mit den Golgizellen. Die Axone reichen in Molekularzellschicht in der Sie aufzweigen und die Parallelfasern bilden. Ebenso bilden Sie Synapsen mit den Purkinje Zellen und geben so die Information der Moosfasern potenziert weiter.

##### **Stern und Korbzellen**

Sie bilden inhibitorische Neurone in der Molekularzellschicht welche auf Dendriten der Purkinjezelle wirken. Ihre Erregung erhalten Sie von den Parallelfasern.

## **Glogizellen**

Sie befinden sich ebenfalls in der Granularzellschicht mit Dendriten in der Molekularzellschicht die durch Parallelfasern erregt werden. Ihre Synapsen bilden GABAnerg inhibitorische Verbindungen innerhalb des Synaptisch-glomerulären Komplexes mit den Dendriten der Granulozyten. Die Hauptfunktion hierbei scheint eine Feedbackinhibition des Granulozyten bei Erregung durch die Moosfasern zu sein.

## **Bergmann-Glia**

Sie bilden eine spezielle Form der Astrozyten, welche neben der Funktion als Stoffwechselregulator auch existentiell für die Entwicklung des Cerebellums sind.

### **2.3.4.3. Afferenzen und Efferenzen des Cerebellums**

Die Afferenzen des cerebellären Cortex bestehen im wesentlichen aus drei Systemen (27, S.371ff).

Den **Moosfasern** welche ihren Ursprung in Pons, Hirnstamm sowie dem Rückenmark haben und über eine Synaptogenese mit den Körnerzellen eine Potenzierung ihres Einflusses auf die Purkinjezellen ausüben. Sie bilden einen synaptischen Glomerulus mit den terminalen Dendriten der Granulozyten sowie den Golgizellen. Sie zweigen sich in der Granularzellschicht in viele Fasern auf, welche jeweils in einem synaptischen Glomerulus mündet und somit den Einfluss des Ursprungsneuron auf das Cerebellum vertausendfachen.

Den **Kletterfasern** welche aus dem kontralateralen Nucleus olivaris inferior der Medulla oblongata erhalten und direkte Synapsen mit proximalen Dendriten der Purkinjezellen bilden. Sie bilden eine der stärksten exzitatorischen Verbindungen in Säugetieren und die unbedingte und existentielle Verbindung zum motorischen System.

Ein **drittes System kommt aus diffusen Regionen des Gehirns** implizierend den Raphe Kernen sowie dem Locus coeruleus. Sie enden in allen Arealen des cerebellären Cortex sowie den Kleinhirnkernen. Ein Überblick über die neuronale Verschaltung des Cerebellums zeigt Abbildung 13.

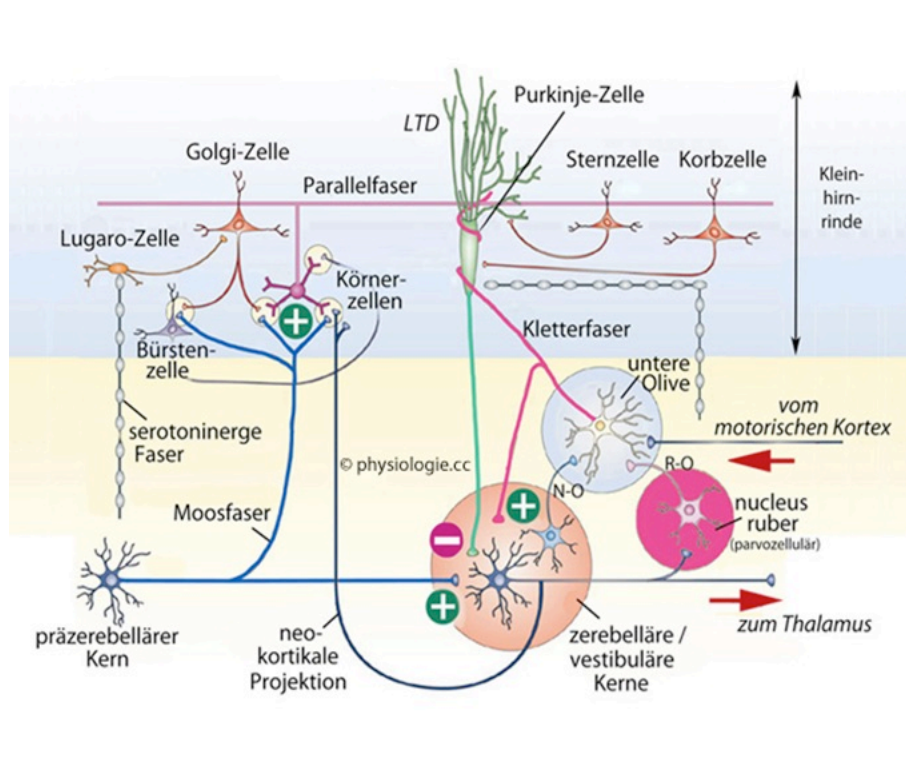


Abbildung 13: Die komplexe Verschaltung des Cerebellums (161)

#### 2.3.4.4. Kleinhirnkerne

Beim Menschen beschreibt man den Nucleus Dentatus, emboliformis, globosus und fastigii. Eine derart eindeutige Einteilung erfolgt bei der Maus nicht (152).

In der weißen Substanz des Cerebellums besteht eine mediale, eine zwischengeschaltete (Nucleus interpositus) und eine laterale Gruppe. Sie können weiter unterteilt werden und projizieren vorwiegend in Rückenmark und Thalamus (27, S.378ff).



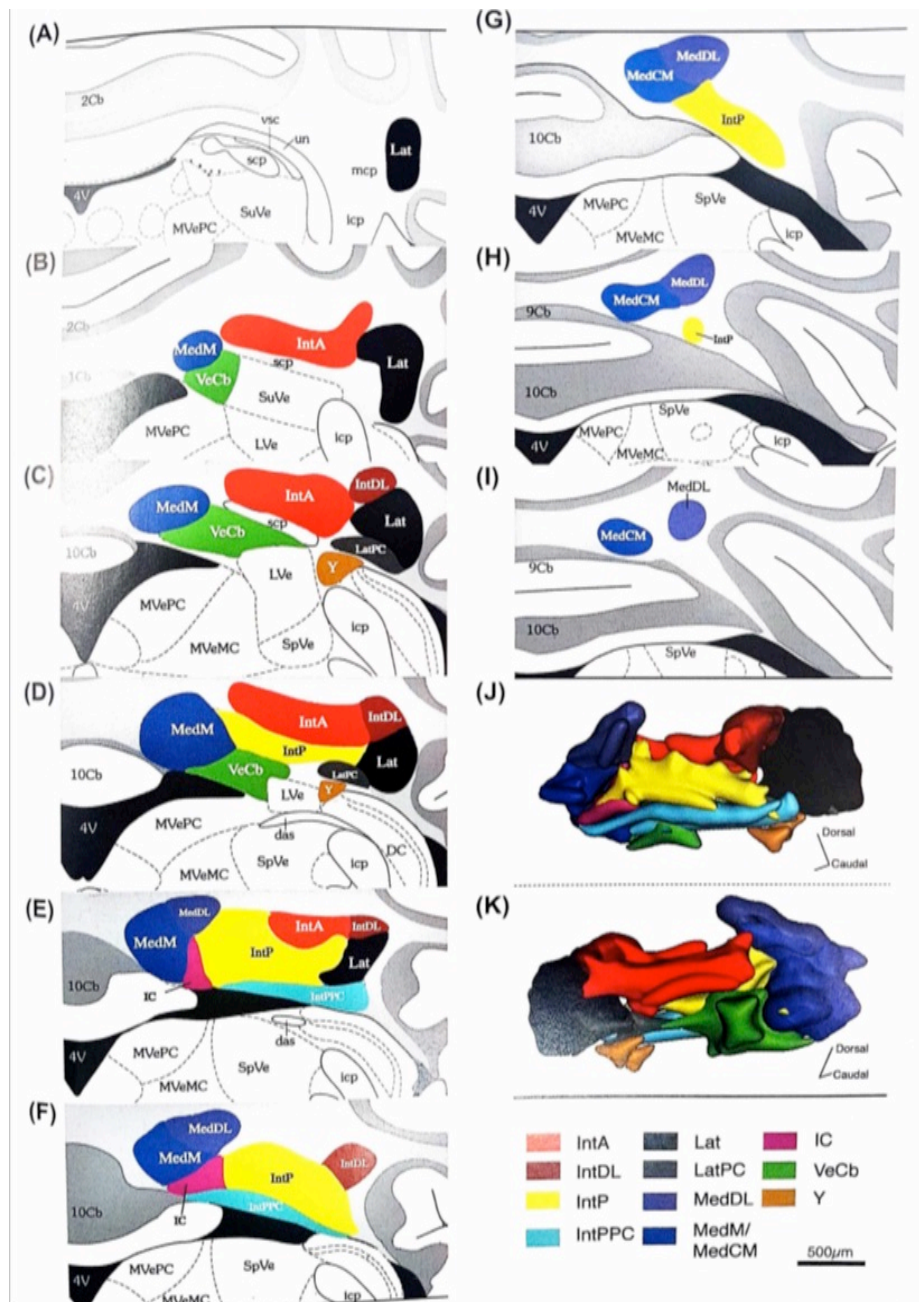


Abbildung 14: Die cerebellären Nuclei nach (27, S.379)

Die mediale Gruppe unterteilt sich in einen caudomedialen Nucleus (MedCM), einen rostromedialen Nucleus (MedM) und die dorsolaterale Tuberanz (MedDL). Der MedDL erhält Affenzen vom cerebellären Hinterlappen wohingegen die weiteren medialen Kerngruppe Affenzen vom Vermis erhalten. Der MedM hat Bedeutung in der Kontrolle von Gleichgewicht, und autonomen Funktion via Projektion auf das Nachhirn, Vestibulariskernen und retikulärem System. Der MedCM projiziert auf die Occulomotoriuskerne und via Thalamus auf den Cortex.

Auch der Nucleus interpositus (IntP) weist verschiedene Anteile auf. Man unterscheidet einen posterioren Anteil mit großen Neuronen sowie einen parvizellulären ventralen Anteil (IntPPC)

bestehend aus kleinen Neuronen am Dach des vierten Ventrikels. Beim Menschen entspricht der posteriore Anteil dem Nucleus globosus, der anteriore Anteil dem Nucleus emboliformis. Der IntP erhält Afferenzen von vielen Arealen so z. B. Nucleus ruber, dem Colliculus superior und dem Nucleus Darschewitz (153). Der medial-anteriore Teil der des IntP, das Int A Segment projiziert retrograd in den magnozellularen Teil de N. ruber und ist beteiligt am Eyeblink conditioning (154)

Der laterale Nucleus (Lat) projiziert vorwiegend auf parvozelluläre Teile des N. ruber sowie zum Thalamus.

Weiter besteht ein vestibulocellulärer Nucleus (VCB) und eine Nucleus Y (Y) mit enger Verbindung zu den cerebellären Kernen. Es bestehen Afferenzen vom Sacculus und somit zum vestibulären System. Ein Überblick über die Kerngruppen gibt hierbei Abbildung 14.

#### **2.3.4.5. Afferenzen und Efferenzen der cerebellären Kerne**

Die dominante Afferenz aller cerebellären Kerne bilden die Purkinje Zellen. Eine Mutation der Purkinje Zellen im Ratten Experiment führt hierbei zur mangelnden Ausbildung der cerebellären Kernneurone (155). Hierbei besteht eine topographische Orientierung. Extracerebelläre Projektionen bestehen von Rückenmark, pontinen Kernen, dem Nucleus olivaris inferior und dem Nucleus ruber (27, S. 378 ff).

Die cerebellären Kerngruppen haben eine charakteristische Efferenz. Hierbei projizieren fastigiale mediale Kerne gekreuzt und ungekreuzt zu den Vestibulariskernen, der Formatio reticularis und dem Thalamus. Die zwischenliegende Kerngruppe vorwiegend zum Nucleus ruber und die laterale Kerngruppe zum kontralateralen Thalamus.

In Zusammenschau lässt sich ein komplexes Verschaltungsmuster des Cerebellums darstellen. Anatomisch bestehen vor allem aufgrund der evolutionär alters engste Verwandtschaft zum humanen Cerebellum. Die Hauptaufgabe kommt hierbei vestibulären Kontrolle sowie der Moderation der Extrapyramidalmotorik via Nucleus ruber und der Afferenz über die Olivenkerne zu.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Versuchstiere und Untersuchungsdesign

Für die Studie wurden 12 Wochen alte Mäuse des Wildtyps in eine Trainings- und Kontrollgruppe (TG und KG) unterteilt.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Probanden, die Verteilung erfolgte randomisiert

Trainingsgruppe	Kontrollgruppe
M 3.1	M 3.10
M 3.3	M 4.13
M 4.11	M 4.14
M 7.3	M 7.11

Das Training erfolgt für die Dauer von vier Wochen nach folgendem Trainingsplan:

- 1 Stunde/Tag
- 5 Tage/Woche
- 4 Wochen insgesamt (28 Tage)
- 18 Meter/Minute
- Level-running (0° Steigung)

Die KG blieb während der gesamten Versuchsdauer im Käfig. Nach den vier Wochen wurden alle Mäuse direkt durch Genickbruch mortifiziert.

##### 3.1.2. Software und Geräte

Für die Auswertung der Präparate werden folgende Geräte verwendet:

In der linken Spalte stehen die verwendeten Geräte für die Ausarbeitung dieser Arbeit. Die rechte Spalte gibt Herkunft, Version und System des links stehenden Geräts wieder.

Tabelle 2: Beschreibung verwendeter Geräte

Geräte	System
BioCut Paraffinmikrotom	Leica, Jung RM 2035
Lichtmikroskop	KS 300, Imaging System Release 3.0, Halbermass Deutschland
Kamera	Sony MC-3255 AVT Horn, Aalen, Deutschland
Bildbearbeitungsprogramm	ImageJ Version 1.51d, National Institutes of Health, USA
Rechnerische Auswertung	Microsoft® Office Excel 2010
Graphische Auswertung	Microsoft® Office Excel 2010
Immunhistochemische Behandlung	Siehe Tabelle 3

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Histologische Bearbeitung

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der histologischen Ausarbeitung dargestellt:

Die Immunhistochemie des MCT 1 wird gemäß eines modifizierten Färbeprotokolls der Abteilung Molekulare und zelluläre Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln angefertigt. Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Auf die Ansätze zu den entsprechend Lösungen wird in der sich anschließenden Promotionsarbeit eingegangen.

Nach der Sezierung der Gehirne werden Paraffinschnitte mit dem BioCut Paraffinmikrotom in 7 µm dünne Scheiben geschnitten und mindestens zwei bis maximal vier Schnitte werden pro Maus auf einem Poly-L-Lysin-Objektträger fixiert. Von jeder Maus gibt es zwei Objektträger. Die rechte Hemisphäre der Mäusegehirne wird als Sagitalschnitt angefertigt, die linke Hemisphäre in der Frontalebene geschnitten. Ein Präparat pro Objektträger dient als Negativkontrolle (Immunhistochemische Kontrolle, IHC). Die anderen Schnitte wird am Ende der Ausarbeitung mit dem MCT 1-Antikörper (MCT 1-AK) bearbeitet.

Durch das Poly-L-Lysin-Eiweiß werden die Paraffinschnitte auf dem Objektträger automatisch fixiert. Für 12 Stunden werden die Präparate in einen Zitratpuffer (Ph = 6) eingelegt und bei 60°C inkubiert.

Am Folgetag beginnt die immunhistochemische Bearbeitung der Schnitte mit dem dreimaligen Waschen einer 0,05 Mol Tris-Pufferlösung (TBS) für jeweils zehn Minuten. Um im weiteren Verfahren die einzelnen Schnitte separat einfärben zu können, werden alle Schnitte auf den Objektträgern einzeln mit einem Fettstift (Dakopen s2002, Dänemark) eingekreist. Im nächsten Schritt erfolgt für 20 Minuten eine Inkubation durch ein Gemisch aus 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol. Dies dient dazu, eventuell vorhandene exogene Peroxidase zu blockieren. Nach 20 Minuten

Einwirkzeit werden die Objektträger erneut mit der TBS-Lösung zweimal für jeweils zehn Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wird eine Ammoniumchlorid-/Triton-X-Lösung für weitere zehn Minuten aufgetragen. Sie sorgt für eine Permeabilisierung der Zellmembran des Gewebes, damit sich der spätere MCT 1-AK durch das Triton- X leichter ans Antigen binden kann. Das Ammoniumchlorid löst die Aldehydvernetzungen auf und demaskiert das Gehirn. Erneut werden die Objektträger für zweimal zehn Minuten mit TBS gewaschen.

Bevor der erste Antikörper (AK) auf die Schnitte verteilt wird, erfolgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen durch das Protein Rinderalbumin (BSA). Dadurch kann sich der primäre AK nicht mehr an diese Rezeptoren binden.

Das BSA ist eine 5 % Lösung auf dem Schüttler in 0,05 Mol Tris-Puffer. Die Dauer der Blockierung benötigt ca. eine Stunde. Danach erfolgt die Inkubation des ersten AKs über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Der Primärantikörper wird in 0,08 % BSA in einem Verhältnis von 1:1.000 mit dem MCT 1-AK verdünnt. Die IHC wird mit 0,08 % BSA ohne AK benetzt. Am Folgetag werden die Objektträger viermal für zehn Minuten mit TBS gewaschen, im Anschluss der sekundäre MCT 1-AK auf die Schnitte aufgetragen, nachdem mit TBS im Verhältnis 1:400 verdünnt wurde. Während der 60 -minütigen Inkubationszeit reagiert der zweite AK gegen die Spezies, aus der der erste AK stammte. Dabei bindet der sekundäre AK an das freie Ende des primären AKs. Erneut werden die Objektträger viermal für zehn Minuten mit TBS gewaschen. Für weitere 60 Minuten werden die Schnitte mit der Horseradish-Peroxidase (HRP) inkubiert, die im Verhältnis 1:150 mit TBS verdünnt wird. Mit dem HRP wurde der sekundäre AK markiert, sodass er mittels einer Entwicklungsmethode – Diaminobenzidin (DAB) genannt – nachweisbar wird. Erneut folgen vier Waschvorgänge mit TBS mit zehn Minuten Dauer. Nach der letzten Waschung werden die Präparate mit der DAB-Lösung versetzt. Zur Kontrolle der Färbung wird die Wirkdauer unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach eingesetzter Färbung wird das DAB durch fünfmaliges Waschen mit TBS gestoppt. Am Ende werden die Objektträger zur Entwässerung und Reinigung in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 % Ethanol, Xylol) getaucht, anschließend die Präparate mit einem Tropfen Entellan und einem Deckgläschen luftdicht abgeschlossen. Durch diesen Schritt können die Objektträger mit den Präparaten für eine spätere Auswertung erneut verwendet werden.

Tabelle 3: Beschreibung verwendete Lösungen

Lösung	Ansätze	
Trispuffer (TBS) 0,05 Mol [pH = 7,6]	6,057 g Tris(hydroxymethyl-)aminomethan in 250 ml destilliertem Aqua lösen	
	8,766 g NaCl (= 150 mmol) dazu geben	
	Mit 1 n HCl (= 40 ml) auf pH = 7,6 einstellen	
	Mit destilliertem Aqua auf 1000 ml auffüllen	
25 ml Wasserstoffperoxidlösung	4,5 ml H <sub>2</sub> O	
	Mit 0,5 ml 3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mischen	
	20 ml Methanol (MeOH) dazugeben	
Ammoniumchlorid/Triton-X-Lösung	0,59 g des 0,5 M Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	
	Mit 0,05 ml Triton-X-100 mischen	
	20 ml vom 0,05 Mol TBS dazugeben	
Rinderalbumin (BSA)	5 %	0,5 g bovine Serumalbuminlösung in 10 ml, 0,05 Mol TBS auf Schüttler lösen
	0,8 %	0,08 g bovine Serumalbuminlösung in 10 ml mit 0,05 Mol TBS
Primärer Antikörper MCT 1	CHEMINON® international, rabbit anti-monocarboxylate transporter 1, polyclonal antibody	
Sekundärer Antikörper MCT 1	CHEMINON® international, goat anti-rabbit, polyclonal antibody	
Horseradish-Peroxidase (HRP)	Horseradish-Peroxidase Avidin D Cat. No. 18-4100, Emelca Bioscience	
	20 ml 0,05 Mol TBS	

### 3.2.2. Mikroskopische Auswertung

Untersucht werden die Sagittalschnitte der Mäuse mit einer 63 fachen Vergrößerung. Für jedes Mäusegehirn pro Objektträger wurde eine Serie von zehn Bildern erstellt auf denen hippocampale Regionen und Cerebellum zu sehen sind. Mit Hilfe einer Sony Kamera am Lichtmikroskop werden die Präparate abfotografiert, was wiederum ein Livebild des zu untersuchenden Schnitts auf einem Computer ermöglicht. Mittels ImageJ wird der densitometrische Graustufenwert des Hintergrunds von  $217 \pm 2,5$  densitometrischen Einheiten (dE) festgelegt. So kann bei späterer Analyse aller Schnitte die Expression des MCT 1 anhand der Graustufenbildung gemessen werden.

Zur Bestimmung der absoluten MCT 1 Expression werden nach der Berechnung des Hintergrunds die Schnitte erneut mit ImageJ ausgewertet. Der Vergrößerungswert der Schnitte wird auf die entsprechende mikroskopische Vorgabe (63-fache Vergrößerung) auf  $7,8 \text{ Pixel}/\mu\text{m}$  eingestellt. Für die Analyse der Graustufenwerte werden für die markierten Flächen folgende Werte ermittelt: Die gefärbte Fläche „Area“, der mittlere Graustufenwert „Mean Grey Value“ und dunkelste Graustufenwert „Min Grey Value“, sowie das Produkt aus Fläche und mittlerem Graustufenwert „Integrated Density“. Der densitometrische Einheitenbereich wurde für den Min und Mean Grey Value von 0 bis 195 festgesetzt. Die Verarbeitung und Auswertung der Rohdaten des Programms ImageJ werden mithilfe des Programms MS Excel dargestellt. Betrachtet wird der relative MCT 1-Gehalt pro Fläche der Kapillare sowie die absolute Dichte des MCT 1 pro Kapillare. Durch die Markierung der Blutgefäße kann automatisch die Anzahl der Kapillaren mitbestimmt werden. Nach Auswertung der Daten soll so eine reliable Aussage über eventuelle Unterschiede in Kapillarisation sowie der MCT1 Expression in den verschiedenen Untersuchungsgruppen sowie im weiteren der Vergleich zwischen den verschiedenen Hirnregionen (Hippocampus und Cerebellum möglich sein)

### 3.2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte für jede Gruppe separat. Durch die kleine Stichprobe mit vier Mäusen pro Gruppe ( $n_1 = 4$ ;  $n_2 = 4$ ) welche sich für die Auswertung des Cerebellums weiter reduzierte auf ( $n_1 = 3$ ;  $n_2 = 3$ ) und der unabhängigen Beurteilung kam der prüfstatistische Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung, um sowohl die Anzahl und Fläche der Kapillaren als auch die verschiedenen Kategorien der Graustufen als Synonym für die Expression des MCT 1 beider Gruppen miteinander zu vergleichen. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 23. Als Signifikanzniveau wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit von maximal 5 % ( $p < 0,05$ ) gewählt. Wird diese unterschritten, gilt das Ergebnis als signifikant und wird graphisch mit einem Stern „\*“ markiert. Die Daten welche in dieser Studie nicht selbst erhoben wurden sondern zum Vergleich übernommen wurden sind blau markiert und in Quelle

133 zu entnehmen. Im Folgenden sei vergleichend ein Schnittbild nach Färbung des Hippocampus sowie des Cerebellums vor und nach Markierung der Kapillaren gezeigt.

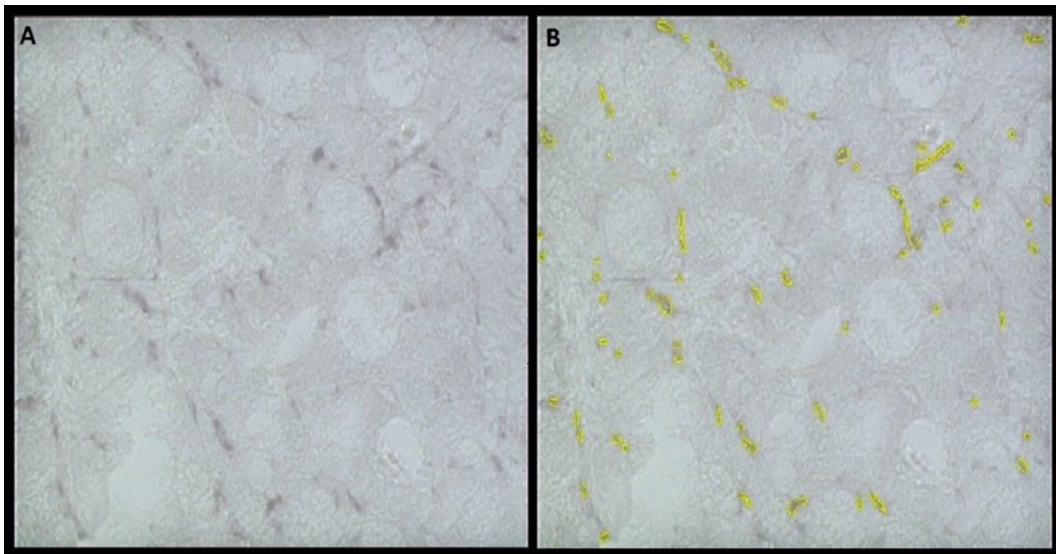


Abbildung 15: Darstellung des Hippocampus in Antikörperfärbung des MCT1. Links zeigt sich die lichtmikroskopische Aufnahme, rechts wurden die Kapillaren markiert (133)

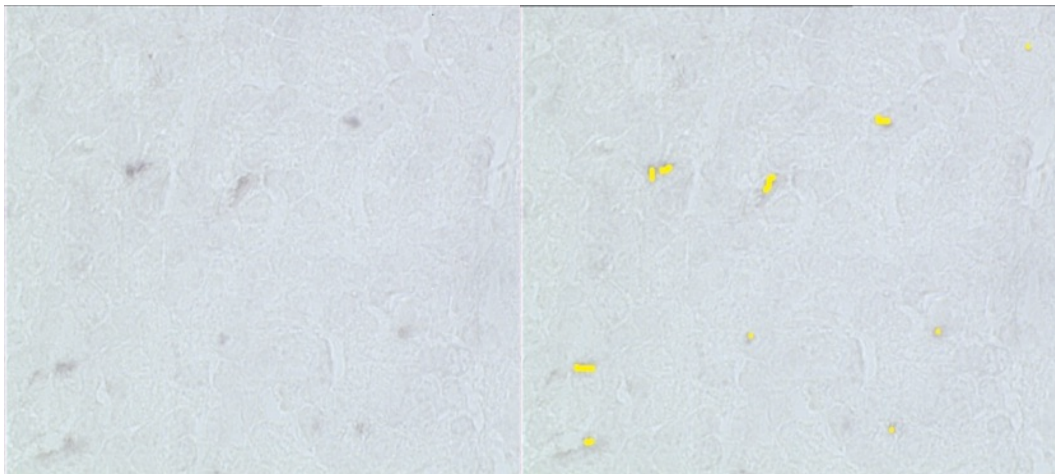


Abbildung 16: Darstellung des Cerebellum in Antikörperfärbung des MCT1. Links zeigt sich die lichtmikroskopische Aufnahme, rechts wurden die Kapillaren markiert



## 4. Ergebnisse

Es erfolgt eine Gegenüberstellung von Fläche und Anzahl der Kapillaren, maximaler Graustufenstärke, mittlerer Graustufenstärke sowie dem Produkt aus Kapillarfläche und mittlerer Graustufenstärke „*Integrated density*“. Betrachtet wurden Hippocampus und Kleinhirn von vormals immunohistochemisch präparierten Mäusehirnen. Zur Auswertung standen für den Hippocampus je 4 Mäuse für Trainings- und Kontrollgruppe zur Verfügung, für das Cerebellum aufgrund der auf den Objektträgern fehlenden cerebellären Anteile lediglich 3 Mäuse pro Gruppe. Statistisch signifikante Ergebnisse sind mit einem \* markiert. Übernommene Daten erhalten eine blaue Markierung und sind Quelle 133 entnommen.

### 4.1. Anzahl der Kapillaren

Tabelle 4: Anzahl der Kapillaren im Vergleich der Interventionsgruppen von Cerebellum und Hippocampus

Anzahl der Kapillaren					
Mäuse trainiert	Hippocampus	Cerebellum	Mäuse nicht trainiert	Hippocampus	Cerebellum
31a	283	49	310a	62	82
33a	370	37	413a	106	58
411a	375	56	711a	79	67
7.3a	210		4.14a	92	
Mittelwert	309,5*	47,33		84,75*	69
Stabw	78,64	9,61		18,75	12,12

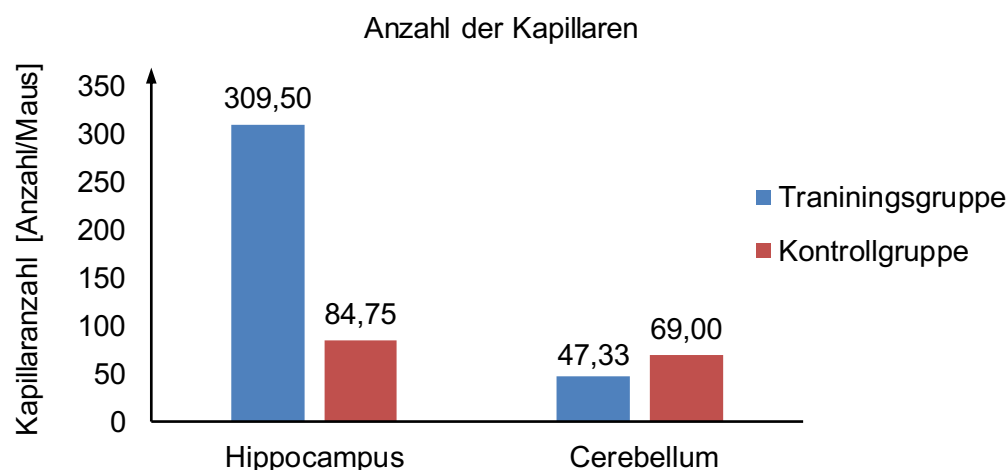
Um eine Aussage über die Anzahl der Kapillaren zu treffen wurden im Rahmen der Auswertung alle identifizierbaren Kapillaren farblich markiert. Anschließend wurde die Anzahl der Kapillaren aller 10 Schnitte, die pro Maus gebildet wurden aufsummiert. Hieraus wurde der Mittelwert gebildet und die Trainingsgruppe mit der Kontrollgruppe verglichen.

Obige Tabelle 4 zeigt die einzelnen Mäuse der Trainings- und Kontrollgruppe und die in den 10 histologischen Schnitten aufsummierten Anzahl der Kapillaren. Eine Tendenz für eine erhöhte Kapillarisation besteht innerhalb der Schnitte für eine Kapillarität von CA-3 nach CA-1 abnehmend. Diese jedoch ohne Signifikanz. Für die im Hippocampus erhobenen Daten zeigt

sich im Gruppenvergleich eine klar und signifikant erhöhte kapillare Anzahl im Vergleich zwischen Trainings- und Kontrollgruppe. Hierbei besteht nach dem Ausdauertraining eine deutlich erhöhte Anzahl an Kapillaren im Mittelwert von 309,5 in der Trainingsgruppe gegenüber 84,75 in der Kontrollgruppe. Auf mögliche Ursachen und Konsequenzen dieses Ergebnisses wird im Anschluss eingegangen.

Vergleicht man den Mittelwert der kapillaren Anzahl im Cerebellum von Trainings- und Kontrollgruppe, zeigt sich im Gegenteil eine erhöhte, wenn auch nicht signifikant erhöhte Anzahl der Kapillaren in der Kontrollgruppe. Weiter auffällig ist bei den Untersuchungen im Cerebellum weiter eine recht geringe Breite der Standardabweichung in der kapillaren Anzahl, sodass eine relativ homogene Anzahl an Kapillaren in den einzelnen Kleinhirnen zu finden war. Die Stichprobe ist hierbei allerdings deutlich zu klein um dabei eine verringerte Variabilität im Cerebellum postulieren zu können. Visualisiert sind die Ergebnisse in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Anzahl der Kapillaren im Vergleich der Interventionsgruppen (visuell)



Als Ursache für diese Darstellung ist neben einer tatsächlich reduzierten oder nicht ansteigenden Kapillaranzahl im Bereich des Cerebellums natürlich ein Fehler in der Untersuchungstechnik zu diskutieren. Die Schnittebene der Präparate wurde so gewählt, dass sich Hippocampus und die entsprechenden Subregionen optimal präsentieren und es wurde hierbei nur sekundär auf eine adäquate Schnittebene im Bereich des Cerebellums geachtet. Dies bedeutet, dass hier keine äquivalenten Anteile in Mark und Rinde geschnitten wurden und somit eine Verzerrung möglich ist. Möglich wäre natürlich auch eine in vielen Studien nachgewiesene verbesserte trainingsbedingte koordinative Fähigkeitsanpassung, die nicht mit einer Anzahlsvermehrung der Kapillaren einhergeht.

## 4.2. Maximale Graustufenstärke

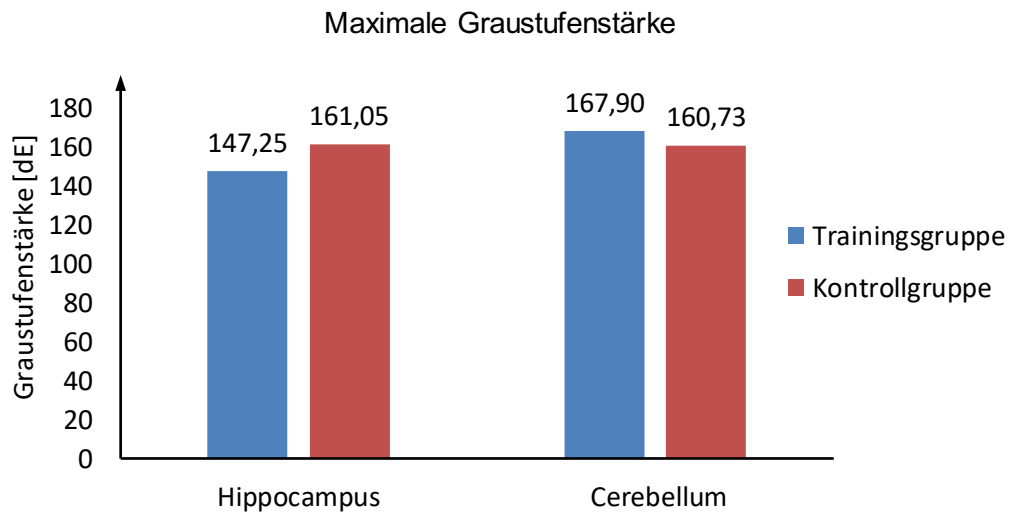
Tabelle 6: Maximale Graustufenstärke "Min Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum

„Min Grey Value“					
Mäuse trainiert	Hippocampus	Cerebellum	Mäuse nicht trainiert	Hippocampus	Cerebellum
31a	137,93	170,48	310a	163,12	166,73
33a	151,02	179,93	413a	161,61	159,52
411a	145,75	153,27	711a	162,44	155,95
7.3a	154,31		4.14a	157,03	
Mittelwert	147,25 *	167,90		161,05 *	160,73
stabw	7,15	13,52		2,75	5,50

Die maximale Graustufenstärke zeigt die stärkste Färbung und damit die höchste Konzentration des MCT1 in den jeweiligen Kapillaren. Vom Programm Image J wird hierbei der „Min Grey Value“ als Parameter ausgewählt. Der Wert ist umso kleiner je stärker die Färbung und damit die MCT1 Expression in der Kapillarwand ist. Somit steht ein niedriger Wert für eine stärkere Färbung damit höhere MCT1 Expression. Hierbei wurden alle Kapillaren der zehn Schnitte gefärbt und anschließend die Mittelwerte erhoben und folglich erneut der Mittelwert der jeweiligen Gruppen gebildet. Anschließend wurden die Trainings und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 und 7 dargestellt. Im Rahmen der Studie konnte hierbei eine deutlich niedrigerer „Min Grey Value“ als äquivalent für eine deutlich stärkere Färbung und somit auch MCT1 Expression in der Trainingsgruppe des Hippocampus mit 147,25dE gegenüber 161,05dE in der Kontrollgruppe gefunden werden.

Im Cerebellum bestand kein signifikanter Unterschied im „Min Grey Value“ bei 167,9 dE in der Trainingsgruppe und 160,73 dE in der Kontrollgruppe. Auffallend ist hierbei jedoch die deutlich erhöhte Streubreite im Bereich des Cerebellums.

Tabelle 7: Maximale Graustufenfärbung „Min Grey Value“ im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell)



Bei den unterschiedlichen Ergebnissen in den zwei Strukturen lässt sich natürlich postulieren, dass adaptive Prozesse in Cerebellum unter Belastung sich nicht im Rahmen einer Vaskularisierung bzw. im Laktattransport niederschlagen. Diskutiert werden muss hierbei erneut die Schnittebene, die speziell bei der vergrößerten Standardabweichung gegenüber dem Hippocampus eine Über- oder Unterrepräsentation verschieden vaskularisierter Anteile möglich machen könnte.

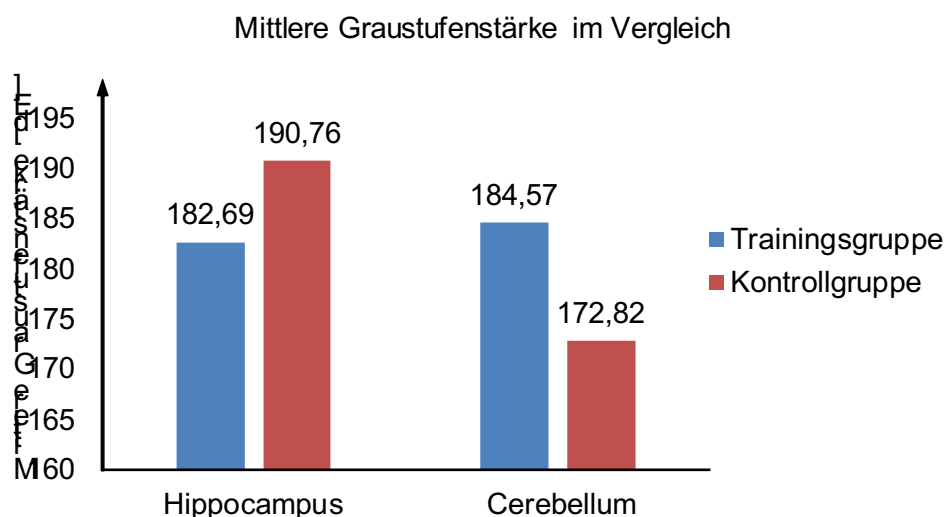
### 4.3. Mittlere Graustufenstärke

Tabelle 8: Mittlere Graustufenstärke "Mean Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum

Mittlere Graustufenstärke					
Mäuse Trainiert	Hippocampus	Cerebellum	Kontrollgruppe	Hippocampus	Cerebellum
31a	179,69	186,7	310a	190,83	182,47
33a	183,95	194,73	413a	191,07	168,77
411a	181,63	172,29	711a	192,11	167,22
7.3a	185,47		4.14a	189,01	
Mittelwert	182,69*	184,57		190,76*	172,82
stabw	2,55	11,37		1,29	8,40

Die mittlere Graustufenstärke im Programm „Image J“ bezeichnet als „Mean Grey value“ meint nicht die stärkste Färbung in der Kapillare, sondern die durchschnittliche Färbung im markierten Bereich der jeweiligen Kapillare und korreliert mit der durchschnittlichen Expression des MCT1 in der Kapillare. Hierbei wurde erneut der Mittelwert der Kapillaren aus den zehn Schnitten pro Maus gebildet und anschließend die Mittelwerte von Trainingsgruppe und Kontrollgruppe verglichen (siehe Tabelle 8 und 9). Das Ergebnis für den maximalen Graustufenwert wird auch bei der mittleren Graustufenstärke, wenn auch nicht ganz so eindeutig, bestätigt. Die Trainingsgruppe zeigt für den Hippocampus eine signifikant stärkere Färbung mit 182,69 dE als die Kontrollgruppe mit 190,76 dE. Der Mann-Whitney-U-Test ergibt hierbei eine Fehlerwahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ . Eine divergente Tendenz zeigen die Werte für das Cerebellum mit einem deutlich niedrigeren Wert in der Trainingsgruppe bei 184,57 dE und 172,82 dE in der Kontrollgruppe. Aufgrund der großen Streubreite in den verschiedenen Gruppen bei einer Standardabweichung von 11,37 dE in der TG und 8,34 dE in der KG zeigt das Ergebnis hierfür keine Signifikanz. Als Fehlerquellen und Kausalannahmen können die gleichen Annahmen wie für den „Min Grey value“ gelten.

Tabelle 9: Mittlere Graustufenstärke "Mean Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell)



#### 4.4. Integrated Density

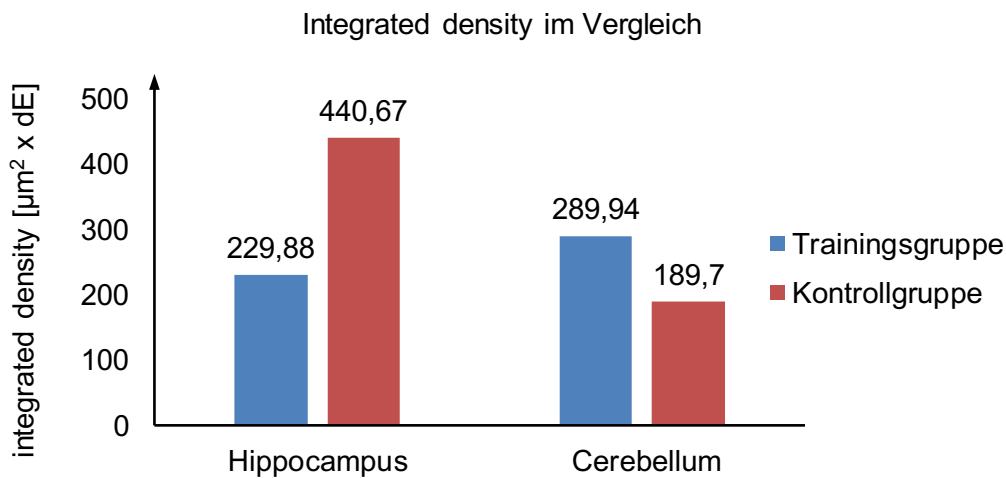
Tabelle 10: „Integrated density“ im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell)

„Integrated density“					
Maus Trainiert	Hippocampus	Cerebellum	Kontrollgruppe	Hippocampus	Cerebellum
31a	210,21	190,94	310a	372,69	277,77
33a	322,14	364,09	413a	348,37	91,66
411a	207,15	314,78	711a	439,73	199,77
7.3a	180,03		4.14a	601,89	
Mittelwert	229,88*	289,94		440,67*	189,73
stabw	62,98	89,21		114,21	93,46

In Tabelle 10 und 11 sind die Mittelwerte der auf den zehn Schnitten der Mäuse ermittelte „Integrated density“ aufgeführt. Hierbei handelt es sich um das Produkt aus mittlerer Graustufenstärke „Mean Grey Value“ und Kapillarfläche „Area“. Führt man auch hierbei einen Vergleich der Gruppen durch, wie beim „Min Grey Value“ ergibt sich selbiges Ergebnis wie beim „Mean Grey Value“. Der mittlere Wert der „Integrated density“ zeigt sich für die Trainingsgruppe im Hippocampus signifikant niedriger mit 229,88dE gegenüber 440,67dE in der Kontrollgruppe.

Das Cerebellum zeigt eine gegensätzliche nicht signifikante Tendenz. Hierbei besteht ein Wert von 289,94 dE in der TG gegenüber 189,73dE in der KG. Ebenso imponiert eine deutliche Streuung der Werte in den einzelnen Subgruppen.

Tabelle 11: "Integrated density" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell)



#### 4.5. Kapillarfläche

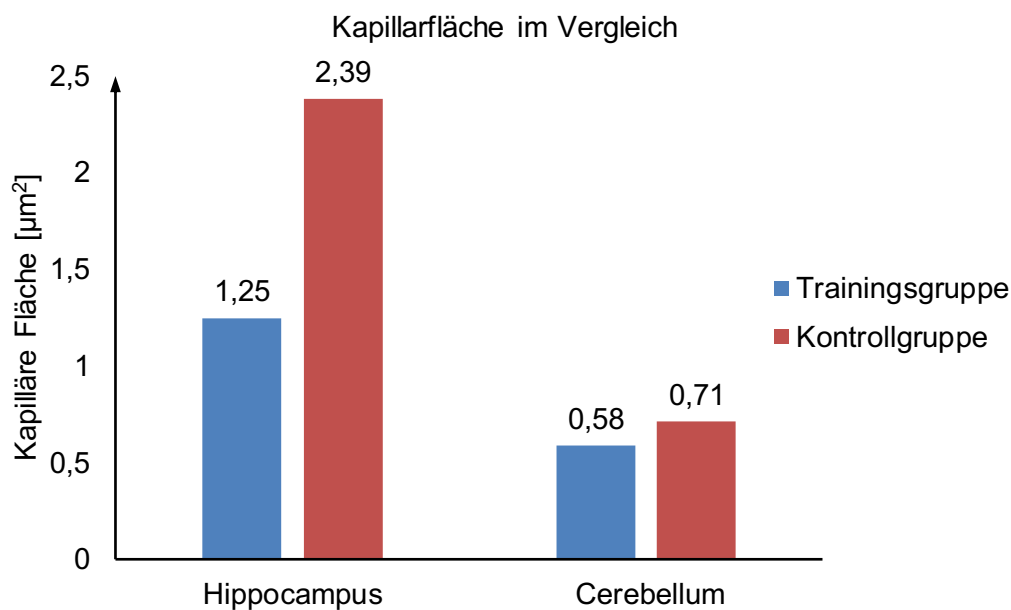
Tabelle 12: Kapillarfläche im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum

Kapillare Fläche in $\mu\text{m}^2$					
Maus Training	Hippocampus	Cerebellum	Kontrollgruppe	Hippocampus	Cerebellum
31a	1,17	0,40	310a	2,02	1,18
33a	1,69	0,57	413a	1,81	0,30
411a	1,15	0,78	711a	2,28	0,64
7.3a	0,97		4.14a	3,41	
Mittelwert	1,25*	0,58		2,39*	0,71
stabw	0,31	0,19		0,24	0,44

In der histologischen Untersuchung erfolgte weiter die Bestimmung der durchschnittlichen Flächengröße der Kapillaren in den beiden Hirnarealen. Hierbei wurde die Fläche der markierten Kapillaren die in den 10 histologischen Schnitten pro untersuchter Maus aufgefunden wurde aufsummiert und im Anschluss der Durchschnitt bezogen die 10 Abbildungen gebildet. Anschließend wurden die Trainingsgruppe und die Kontrollgruppe miteinander verglichen und in

Tabelle 11 und 12 dargestellt. Hierbei zeigt sich im Hippocampus eine signifikant niedrigere durchschnittliche Kapillarfläche in der Kontrollgruppe gegenüber der Trainingsinterventionsgruppe. Diese Tendenz bestätigt sich nicht im Cerebellum. Hier zeigt sich eine erhöhte Kapillarfläche in der TG. Es besteht hier bei massiver Streuung der Werte keine Signifikanz im Cerebellum für diese Tendenz. Die Ergebnisse sind hierbei nicht als absolute Fläche der Kapillaren zu sehen da die Schnittebene wechselnd einen longitudinalen, frontalen oder kombinierten Anschnitt bedingen und hierbei entsprechend des Kapillarverlaufs Varianzen auftreten. Betrachtet man die erhobenen Daten für die kapillare Anzahl, ergibt sich somit eine deutlich erhöhte kapillare Anzahl bei reduzierter kapillarer Durchschnittsfläche im Hippocampus. In wie fern diese Diskrepanz die These einer aktiven Angiogenese im Hippocampus stützen könnten wird in der anschließenden Ergebnisdiskussion vertieft.

Tabelle 13: Kapillarfläche im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell)





## **5. Diskussion**

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen eine signifikante Angiogenese sowie Erhöhung der MCT1 Expression im Hippocampus. Dies kann in den Auswertungen der cerebellären Anteile nicht nachvollzogen werden. Ursachen und Einschränkungen der Ergebnisse sollen im Folgenden beschrieben werden. Hierbei wird zunächst die angewandte Untersuchungstechnik diskutiert. Im Anschluss erfolgt eine Einordnung in die aktuelle Studienlage.

### **5.1. Methodendiskussion**

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen deutlich ambivalente Ergebnisse für den bereits im Vorfeld untersuchten Hippocampus (133) sowie das im praktischen Teil dieser Arbeit untersuchte Cerebellum. Beide untersuchten Areal zeigen jedoch eine sehr kurze Stichprobengröße von  $n=8$  für den Hippocampus sowie  $n=6$  für das Cerebellum da hier aufgrund der Schnitfführung das Cerebellum nicht bei allen Mäusen abgebildet war. Die Konsequenz ist die statistische Auswertung mittels eines Mann-Whitney-U-Test, welcher dem T-Test als paradigmatischem Test in der Qualität der Statistik unterlegen ist. Diesbezüglich empfiehlt sich eine breitere Stichprobengröße für eventuelle Nachuntersuchungen zu wählen um eine bessere Aussagekraft zu schaffen.

Die Durchführung des Trainingsprogramms über vier Wochen erfolgte nach einem bewährten Standardprotokoll des Instituts für Molekulare Sportmedizin der DSHS. Hierbei erfolgt ein Lauf- radtraining mit moderater Belastung ohne hochintensive Intervalle. Diesbezüglich ist nicht von einer massiven Laktatakkumulation auszugehen wie sie zum Beispiel bei einem High-intensity- Training im deutlich anaerob-laktaziden Bereich entstehen würde. Dies wird angenommen da eine direkte Laktatmessung im Versuchssetting nicht erfolgte. In einer Folgeuntersuchung sollte ein entsprechendes Trainingsprogramm miteinbezogen oder gewählt werden. Gegen- ebenfalls ließen sich auch hier direkte Vergleiche im Ausmaß der Kapillarisation ausmachen.

Die Trainingsintervention erfolgte ohne vorherige und nachträglich Durchführung von Testung der Kognitiven Fähigkeiten oder motorisch koordinativer Fähigkeiten. Diesbezüglich kann ein Einfluss auf den entsprechenden ZNS-Leistungen durch die Intervention nicht beurteilt werden. In einer Folgeuntersuchung könnte nach Erweiterung der Stichprobe eine derartige Testung mit angeschlossen werden.

Die histologischen Schnitte wurden mittels eines Mikrotoms geschnitten. Aus technischen Gründen, sowie interindividuell anatomischen Abberationen des Mäusehirns ist die vollkommen identische Abbildung der Hirnareale nicht möglich. Primär bestand hierbei die Absicht den Hippocampus gut darzustellen und nur sekundär darin das Cerebellum suffizient abzubilden. Dies reduzierte die Auswertbarkeit der cerebellären Schnitte auf ein  $n=6$ . Zudem zeigen sich

die geschnittenen Ebenen im Gegensatz zum Hippocampus deutlich divergent. Dies ist sicherlich eine mögliche Erklärung für die deutlich unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zum Hippocampus.

Für die Bestimmung der Kapillarflächen wurden deren Lumen markiert. Hierbei bestehen wie bereits oben beschrieben Unterschiede in der Schnittführung sodass die Ebenen nicht identisch vergleichbar sind, zudem gibt es natürlich eine anatomische Varianz im Verlauf der Kapillaren, sodass diese entsprechend orthogonal, longitudinal oder als Mischbild abgebildet sind. Je größer die Tendenz zur longitudinalen Abbildung, desto größer ist die präsentierte Fläche. Aufgrund der geringen Stichprobe und der geringen Anzahl an Schnitten kann diese Schnittführung den Flächengehalt massiv beeinflussen, sodass hier ein vollkommen valides Ergebnis zu diskutieren ist.

## **5.2. Ergebnisdiskussion**

### **5.2.1. Kapillarisation**

Es zeigt sich eine hochsignifikant erhöhte Anzahl an Kapillaren in den untersuchten Hippocampi der Mäuse der Trainingsgruppe gegenüber den Mäusen der Kontrollgruppe. Als Konsequenz kann davon ausgegangen werden dass eine Angiogenese stattgefunden hat, also die Bildung neuer Kapillaren erfolgt ist. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Publikationen, welche eine laktatvermittelte Induktion von VEGF und HIF-1 und eine konsekutiven folgende Angiogenese fanden. (110, 156).

Hierbei zeigt sich in den dargestellten Ergebnissen eine annähernd vierfache Anzahl an Kapillaren in den Hippocampi der trainierten Mäuse. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, welche die Vaskulogenese am Muskel und Cortex untersuchen ergeben sich deutlich geringere Einflüsseffekte auf die Kapillardichte durch eine Trainingsintervention mit ca. 15 % im Muskelgewebe sowie ca. 40 % im Gyrus dentatus (157, 138). Der Einfluss der Trainingsintervention auf die Vaskulogenese zeigt sich dabei deutlich größer im G. dentatus der Hippocampusformation als im sensomotorischen Kortex (138). Eine mögliche Erklärung für diese Abberanz bietet zum einen die Untersuchungsmethode, so wurde in anderen Untersuchungsdesigns die Kapillardichte bestimmt, wogegen in den hier gezeigten Daten die absolute Zahl bestimmt wurde. Zum anderen erfolgte die Darstellung der Kapillardichte über eine ATP-ase abhängige Färbung sowie Darstellung kollagener Strukturen und nicht über die MCT1- Färbung. Hierbei ist es möglich, dass Kapillaren aufgrund einer niedrigen MCT1-Dichte in den Hippocampi der Kontrollgruppe bei der Auslesung nicht detektiert wurden und so eine falsch niedrige Anzahl in der Kontrollgruppe angenommen wurde. Im Rahmen des Versuchsdesigns wurde um dies zu reduzieren die Auszählung der Kapillaren mehrfach durchgeführt um eine Plausibilität der Ergebnisse zu gewährleisten.

Im Cerebellum kann keine erhöhte Anzahl der Kapillaren in der Trainingsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu einigen Forschungsarbeiten, die eine klare Zunahme der Kapillarisation im Cerebellum unter Belastung nachweisen können (112). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass motorische Anpassungsprozesse nach Belastung mit einer Zunahme der Gliazellen und nicht mit einer erhöhten Kapillardichte korrelieren (113) und somit die Frage besteht ob die Vaskularisierung im Cerebellum tatsächlich eine Rolle für adaptive Prozesse spielt. In einer Studie, die komplex motorische Intervention mit einem Ausdauertraining vergleicht, zeigt sich eine deutlich erhöhte Anzahl an Kapillaren aber nicht der Synaptogenese des Cerebellums in der Trainingsgruppe. Diese wird führend durch komplexe motorische Aufgaben erreicht (112)

Als Hinweis für das Ausbleiben einer aktiven Angiogenese im Cerebellum kann wiederum ebenfalls der deutliche Anstieg von FLK-1 und FLT-1 Rezeptoren die als vaskulärer Zielpunkt für den VEGF dienen genommen werden, welcher nach einer Stevenson et al. bei Belastung nicht im Cerebellum jedoch im Hippocampus nachgewiesen werden kann. Das FLK-1 war im Cerebellum der Trainingsgruppe sogar reduziert (114). Ebenso konnten Morland et al. keine aktive Angiogenese unter Belastung am Cerebellum des Rodentia darstellen (138).

Eine zentrale Frage ist, ob die hier durchgeführten Untersuchungen eine relevante Laktatakkumulation postulieren lassen. Diese liegt sicherlich unterhalb der Werte die bei einer höheren Belastungsintensität zu erreichen ist. Jedoch findet nach Studienlage auch bei aerober Belastung eine Laktatakkumulation im oxidativ arbeitenden Muskel statt, welche die maximale Laktatakkumulationsrate im Blut übersteigt (115). Diese ist ausreichend um Gewebsanpassungen zu schaffen die mit einer Hypoxie unter aeroben Bedingungen vergleichbar ist (116). Somit ist auch ohne eine direkte Laktatmessung ein adäquater Effekt auf die Angiogenese anzunehmen. Es kommt demnach zu einer Migration von Endothel und Bildung weiterer Gefäße. Im Gegensatz zur reinen Hypoxie kommt es durch den laktatvermittelten Weg zu einer vermehrten gefäßstabilisierenden Kollagenbildung (117)

Angiogenetische Prozesse induzieren die Bildung kleiner Kapillaren mit einem geringeren Lumen als das Gefäß aus dem die Auswanderung bzw. Absprießung erfolgt. Legt man diese morphologische Besonderheit zugrunde, so ist bei einer floriden Angiogenese von einer erhöhten Gefäßanzahl mit deutlich geringerer luminaler Fläche auszugehen. Diese Beobachtung deckt sich mit den im Hippocampus erhobenen Daten. Hierbei besteht eine signifikant erhöhte Anzahl und Fläche der Kapillaren in der Trainingsgruppe, die Fläche zeigt sich signifikant kleiner korrespondierend mit oben beschriebener Annahme. Im Cerebellum zeigt sich eine ähnliche Tendenz jedoch ohne signifikante Darstellung.

In Zusammenschau ist also von einer Angiogenese im Hippocampus auszugehen. Im Cerebellum scheint dieser Prozesse eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies lässt sich auch

ohne den direkten Nachweis gefäßinduzierender Zytokine wie VEGF und EGF oder angiogenetische Marker wie Matrixmetalloproteasen postulieren

Eine belastungsinduzierte Vermehrung der zentralen hippocampalen Kapillarisation ist somit also anzunehmen. Beim Cerebellum sollten hier weitere Untersuchungen folgen um die dortigen Prozesse zu belegen. Es stellt sich die Frage, ob dies auch mit einer erhöhten cerebellären Potenz verbunden ist, oder ob eine cerebelläre Mehrperfusion als Anpassung einer systemisch verbesserten Laktatelimination dienen soll, oder gar eine bessere Versorgung mit Sauerstoff, Botenstoffen, Hormonen und Energie unter Belastungsbedingungen.

### **5.2.2. Expression der MCT1**

In den hier durchgeführten Untersuchungen erfolgte wie schon erwähnt keine direkte Messung des Laktatwertes. Der Laktattransport an der BHS ist jedoch gesteuert durch die MCT1. In den Untersuchungen am Hippocampus konnte mit dem „Min Grey Value“ eine deutlich erhöhte maximale Konzentration an MCT1 an den Kapillaren, mit dem „Mean Grey Value“ eine deutlich erhöhte durchschnittliche Konzentration und mit der „integrated density“ eine deutlich erhöhte MCT1 Expression bezogen auf die Kapillarfläche im Hippocampus der Trainingsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe dargestellt werden. Diese Beobachtung konnte leider beim Cerebellum nicht bestätigt werden. Als Konsequenz lässt sich also ein erhöhter Laktattransport und somit ein erhöhter neuronaler Laktatstoffwechsel über der Bluthirnschranke des Hippocampus der trainierten Mäuse gegenüber der Kontrollgruppe postulieren.

Die mittlere Laktatkonzentration im Kortex liegt im Rattenexperiment bei ca. 1-1,2 mmol/l, kann aber durch neuronale Stimulation auf einen Wert von ca. 1,9 mmol angehoben werden. (118)

Auch durch physische Belastung erhöht sich die Laktatkonzentration im neuronalen Gewebe, es findet also ein kongruenter metabolischer Prozess wie bei neuronaler Aktivierung statt. In einer Studie mit älteren Frauen erfolgte ein Training an der anaeroben Schwelle mit ca. 3,5 mmol/l Blutlaktatkonzentration. Eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit konnte hierbei erreicht werden (119). Keine Verbesserung bestand bei niedrigschwelliger und hochintensiver Belastung. Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben dieser Anpassungsprozesse unter hoch und niedrigschwelliger Belastung ist eine nicht ausreichende cerebrale Laktatakkumulation bei niedrigschwelliger Belastung sowie eine azidotische Stoffwechsellage einhergehend mit einer überschießenden Laktatakkumulation bei hochintensiver Belastung.

Hierbei lassen sich verschiedene Mechanismen für die mangelnde Adaptivität unter hochintensiver Belastung diskutieren. Es kommt bei zu hohen Laktatwerten im Rahmen der Azidose zu einer Inhibierung der weiteren Laktataufnahme, da sich die Stoffwechselkapazitäten erschöpfen. Bei der Azidose kommt es nicht nur zur Anreicherung von Laktat, sondern auch einer Vielzahl an Metaboliten, darunter auch potentiell toxische Stoffe wie freie Radikale, die

eine veränderte Homeostase erzeugen. In dieser Situation ist eine Limitierung des Laktatstoffwechsels zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Homeostase im Sinne des „Zellschutzes“ anzunehmen. Zudem führt physische Belastung zu neuronaler und astrozytärer Aktivität (118), die eine weitere Laktatakkumulation durch die anaerobe Glykolyse bewirkt. Durch die intrazelluläre Akkumulation kann zunehmend weniger extrazelluläres Laktat aufgenommen werden. Außerdem sinkt die Kapazität für die Laktatelimination über Effluxmechanismen (durch die erhöhte extrazelluläre Konzentration) aufgrund des sinkenden Gradienten. Es kommt zur Veränderung der intrazellulären Homeostase im Sinne einer pH Verschiebung in ein azidotisches Milieu. Hierdurch kommt es zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Prozesse. Ein pH abhängige Aufnahme und Umsetzung von Glutamat sollte in diesem Zusammenhang noch untersucht werden.

Der MCT1 befindet sich ebenso an der Bluthirnschranke des Cerebellums. Somit sollten bezüglich der zellulären Mechanismen und Einschränkungen der Stoffwechselkapazität gleiche Mechanismen gelten. Anpassungsprozesse erfolgen hier jedoch primär durch komplex motorische Intervention (112). Weiter ist die Aufnahme bzw. die Fusion der Neurotransmitter (Glutamat) direkt oder indirekt über die  $Na^+/K^+$  ATPase ATP abhängig. Ein mangelndes Angebot an ATP aufgrund ausgereizter Stoffwechselprozesse kann hier ebenfalls limitierend wirken.

Unter moderater Belastung steht jedoch durch Laktat eine schnellere Energieversorgung bereit als diese nur durch Glucose möglich ist. Die Synthese von Glutamat durch die Astrozyten wird optimiert und die Bereitstellung für die Neuronen gewährleistet. Ebenso steigt die Anzahl an Aktionspotentialen und damit die neuronale Aktivität die für die Anpassung kognitiver Prozesse Voraussetzung ist (120).

Im Hippocampus konnte durch Ausdauertraining eine erhöhte Dichte des MCT im Rattenexperiment gezeigt werden. Dieser Anstieg besteht auch 10 h nach Trainingsintervention noch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (121). Verbunden hiermit besteht eine Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit (122-124). Eine Abnahme der MCT1 Expression dagegen zeigt eine Verschlechterung der kognitiven Leistung (124). Um dies zu zeigen erfolgte eine Injektion von ODNs (Oxligodesoxynucleotid), welche zu einer Inhibition der MCT1 führt. Es konnte also gezeigt werden das MCTs existentiell für die Ausbildung von Langzeitgedächtnisbildung sind.

Neben der Funktion als Energielieferant für die Zelle sowie Substrat für die Synthese von Glutamat fördert Laktat auch neurogenetische Aspekte. Hierbei kommt es laktatvermittelt zu einer Ausschüttung von Neutrophinen welche die Neurogenese stimulieren (125). Dabei korreliert eine Bildung von Neuronen im Hippocampus mit einer vermehrten kognitiven Leitungsfähigkeit (126). Als Basis hierfür bestehen mitotische Vorläuferzellen im Hippocampus welche nach Stimulation zu Körnerzellen mit axonaler Projektion in den Gyrus dentatus ausdifferenzieren. Die

entsprechenden Prozesse wurden in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht direkt untersucht sind aber aufgrund des ähnlichen Settings bei vergleichbaren Studien anzunehmen.

Neben der Verbesserung des neuronalen Stoffwechsels spielt Laktat auch eine entscheidende Bedeutung als Energielieferant für die Oligodendroglia und den Erhalt der axonalen Myelinisierung und damit der interneuronalen Kommunikation. So konnte gezeigt werden, dass ein Glucose Mangel in der weißen Substanz von Corpus callosum und Cerebellum zu einer Schädigung der Myelinisierung führt die durch Laktat als Substrat via MCT1 Aufnahme der Oligodendrozyten kompensiert werden kann (127). Dieser Zusammenhang ist auch hinsichtlich der Pathogenese von Krankheiten wie der Leukencephalopathie, die über einen lokalen Glucosemangel eine Demyelinisierung bewirken wichtig, da durch MCT1 Induktion eine potentielle Kompensation möglich sein könnte. Auch dieser Mechanismus könnte in verschiedenen Hirnarealen eine unterschiedliche Bedeutung innehaben.

In Zusammenschau zeigt sich in den hier durchgeführten Untersuchungen eine deutliche Erhöhung der Kapillarisation und der MCT1 Expression an der Blut-Hirn-Schranke des Hippocampus, nicht jedoch am Cerebellum, im Rahmen eines mehrwöchigen Ausdauertrainings. Anzunehmen ist hierbei die verbesserte Versorgung des zentralen Nervensystems mit Laktat als Substrat. Die direkte Laktatmessung findet in den hier dargestellten Daten keine Repräsentation. Die Erhöhung der Laktatexpression durch ein moderates Ausdauertrainings ist beim Menschen (47) als auch in weiteren Rattenexperimenten belegt (130). Somit ist eine Erhöhung des Laktatspiegels auch im angewandten Versuchssetting anzunehmen.

Es scheinen im Cerebellum zumindest teilweise andere Prozesse in der Anpassung eine Rolle zu spielen als im Hippocampus. Die Beeinflussung der MCT1 Expression zeigt so zum Beispiel auch bei Induktion von prioner mRNA eine Hochregulierung im Cerebellum, wogegen im Hippocampus eine Reduktion der MCT1-Expression divergente Prozesse in Gang setzt (127). Eine deutliche Hochregulierung konnte hierbei im Cerebellum unter ketogener Diät bei Ratten dargestellt werden (128), sodass hier ggf. andere molekulare Mechanismen eine Rolle spielen könnten. Fraglich bleibt jedoch wie diese sich im Cerebellum beschreiben lassen. In der Purkinjzellschicht des Cerebellums befinden, sich lokalisiert neben den Delta-glutamat-Transporten der MCT-2 Transporter, welche einen Laktatinfux erlauben (131). Hier konnte gezeigt werden, dass durch Ausdauertraining eine erhöhte Expression erreicht werden kann (17). Dagegen scheint in dem sich entwickelnden Gehirn der Laktatstoffwechsel cerebellär eine geringere Rolle zu spielen als im Cerebrum (132). Somit scheint sich für das Cerebellum kein vollkommen vergleichbares Geschehen bezüglich der MCT Induktion und Laktatfunktion zu ergeben wie im Hippocampus. Auch die Funktion der entsprechenden Transporter für embryogenetische und adaptive Prozesse scheint zu divergieren, sodass hier weitere Forschungen angeschlossen werden sollten.

### **5.3. Beurteilung**

In den durchgeführten Untersuchungen konnte also gezeigt werden, dass im Hippocampus des Mäusehirns eine signifikante Kapillarisation und Erhöhung der MCT1 Expression unter einem moderaten Ausdauertraining erfolgt. Am Cerebellum konnten die Veränderungen nicht nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, welche Konsequenzen aus diesen Beobachtungen abgeleitet werden können.

#### **5.3.1. Hippocampus**

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Parkinson, Multiple Sklerose oder der Morbus Alzheimer gehen mit einem Untergang von Nervenfasern im Rahmen einer mangelnden oxidativen Versorgung einher (134). Ebenso besteht bei der cerebralen Mikroangiopathie eine sukzessiv mangelnde Versorgung aus unterschiedlichen pathogenetischen Ursachen (135).

Im Hippocampus welcher vor allem beim M. Alzheimer affiziert ist kann durch Ausdauerbelastung ein Anstieg der neuronalen Plastizität gezeigt werden (136,137). Ebenso bei mikro und makrovaskulären Schädigungen zeigt sich ein positiver Effekt durch aerobe Ausdauerintervention (139). Weiter kann eine aktive cerebrale Angiogenese durch Belastung nachgewiesen werden (138). Die in den hier aufgezeigten Daten nachgewiesene Kapillarisation im Hippocampus der Maus unter Belastung legen nahe, dass Ausdauerintervention ein potentiell therapeutischer Ansatz zur Primär- und Sekundärprofilaxe neurodegenerativer und neuroischämischer Erkrankungen sein kann.

Neben dem Effekt auf die Angiogenese kann via Laktat eine aktive Neurogenese induziert werden. Hierbei kommt es durch Induktion der Neutrophine BDNF und VEGF, welche nach Studienlage einen den Krankheitsverlauf positiv beeinflussenden Effekt auf neurodegenerative Erkrankungen wie M. Alzheimer, M. Parkinson und MS haben (139, 140). Speziell beim M. Alzheimer, bei dem aufgrund einer hippocampalen Schädigung eine mangelnde Überführung von neuen Gedächtnisinhalten in das Primärgedächtnis erfolgt (141), besteht nach einer Metaanalyse ein hochrelevanter protektiver Effekt, welcher durch Neurogenese und moderater aerober Belastung erreicht werden kann (142). Als Wirkmechanismus können die hier gezeigte Angiogenese und MCT1-vermittelte Laktattransportkapazität diskutiert werden.

Kehrt man von pathologischen Veränderungen ab, so ist der positive Effekt von sportlicher Aktivität auf die kognitive Leistungsfähigkeit hinlänglich belegt. So kann zum einen in Untersuchungen bei sportlich aktiven Kindern mittels c-MRT eine vergrößerte hippocampale Struktur dargestellt werden (143,144), welche mit einer besseren kognitiven Performance korreliert (145, 146). Eine breite Metaanalyse bestätigt zum anderen die bessere kognitive Testung bei sportlich aktiven Erwachsenen in allen Lebensphasen (147).

### 5.3.2. Cerebellum

Im Gegensatz zur Leitstruktur für kognitive Prozesse, dem Hippocampus, lässt sich ein positiver Effekt auf die Funktion des supportiv motorischen Systems, des Kleinhirns nicht darstellen. Eine Studie kann hierbei zwar eine vermehrte Kapillarisation im Cerebellum nach Training nachweisen, jedoch geht diese nicht mit einer Vermehrung der Synaptogenese einher (112). Eine Hypertrophie der Gliazellen sowie eine vermehrte Synaptogenese wird dabei vornehmlich durch Intervention mit komplex-motorischen Aufgaben im Rattenexperiment erreicht (113). Konträr dazu konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der VEGF Rezeptor FLK-1 in Cerebellum unter Belastung herab reguliert wird, was einer aktiven Vaskulogenese nach VEGF Induktion entgegenwirken würde. Bezüglich der MCT Expression konnte eine vermehrte Expression des in dieser Arbeit nicht behandelten MCT-2 in der Purkinjellschicht nach Belastung nachgewiesen werden (17). Die Induktion des MCT1 erfuhr im Cerebellum einen deutlichen Anstieg durch eine ketogene Diät (128). Eine durch prione-mRNA vermittelte Erhöhung des cerebellären MCT1 legt jedoch eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung des Cerebellums nahe. Durch Ausdauertraining kann eine veränderte Genexpression unter Laufbandintervention gezeigt werden (148). Dies gibt Hinweis auf belastungsinduziert neurogenetische Potenz im Cerebellum. Korrespondierend führt ein Ausdauertraining auch hier zu einem Anstieg von BDNF und damit einem Neutrophinanstieg im Cerebellum (149).

In der Betrachtung der cerebellären Ataxie als neurodegenerative Erkrankung des Kleinhirns kann in einer breiten Metaanalyse verschiedener therapeutischer Interventionen keine klare Empfehlung oder Vorteil einer Trainingsintervention getroffen werden (150). Dies unterstützt die in dieser Arbeit erhobenen Daten, welche keine morphologischen Veränderungen in Kapillarisation oder MCT1 Expression zeigen konnte. Interessanterweise besteht jedoch ein protektiver Effekt gegenüber  $\beta$ -Amyloid Toxizität im fetalen Cerebellum bei maternalem Ausdauertraining (151) und somit auch hier ein nachweisbarer Effekt auf neurodegenerative Erkrankungen.

In Zusammenschau bleibt die Rolle der Kapillarisation und MCT1 Expression im Cerebellum unter Belastung unklar. Sollte dort eine relevante Kapillarisation und MCT1 Expression durch Ausdauerintervention nach zu weisen sein, stellt sich die Frage, ob die Adaption im Sinne einer verbesserten Laktatelimination und Substratversorgung unter Belastungsbedingungen erfolgt, ohne eine wesentliche Adaption neurogener Prozesse zu bewirken. Der primäre Trigger für Anpassungen scheint hier eine komplex motorische Intervention zu sein. Weiter spielen die MCTs sicher in embryogenetischen Prozesse eine Rolle.



#### **5.4. Forschungsausblick**

Betrachtet man die Inhalte der Ergebnisse zum Hippocampus sowie die Studienlage zum Einfluss von Sportintervention auf die kognitive Leistungsfähigkeit so legen diese einen hochrelevanten Angriffspunkt für sowohl Förderung der kognitiven Potenz in Entwicklung als auch ein interessantes therapeutisches Angriffsziel für die Therapie neurologischer Erkrankungen nahe. Speziell in der leitliniengerechten Therapie der beschriebenen Erkrankungen (M. Alzheimer, M. Parkinson, Multipler Sklerose, Vaskulopathie) sind aktive Bewegungsprogramme nicht ausreichend in ihrem Möglichen therapeutischen Impact berücksichtigt. Es bedarf sowohl einer weiteren Diversifikation der sporttherapeutischen Möglichkeiten, als auch einer Erforschung der molekularen Mechanismen um einen optimalen Benefit für die Erkrankten und die Prävention der Erkrankungen zu erreichen. Herausragend ist hierbei die nebenwirkungsfreie und ubiquitäre Verfügbarkeit des „Medikaments“ sportliche Intervention.

Bezüglich des Impacts auf die Entwicklung der supportiven motorischen Adaption des Kleinhirns ergeben sich eher Hinweise als klare Aussagen für den Benefit einer Ausdauerintervention. Hier bedarf es alternativer Versuchsdesigns und weiterer Grundlagenforschung um ein mögliches Bewegungskonzept zu schaffen, welche die Funktionen nachweislich verbessert, sofern hier ein Angriffspunkt besteht.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Klaperski S.**, Seelig H., Fuchs R. Sportaktivität als Stresspuffer. Zeitschrift für Sportpsychologie. 2015.
2. **Brehm W.**, Bös K., Graf C., Hartmann H., Pahmeier I., Pfeifer K., et al. Sport als Mittel in Prävention, Rehabilitation und Gesundheitsförderung. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. 2013;**56(10)**:1385-9.
3. **Gibala M.J.**, Little J.P., MacDonald M.J., Hawley J.A. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. The Journal of Physiology. 2012;**590(5)**:1077-84.
4. **Rohrer T.**, Haller M. Sport und soziale Ungleichheit–Neue Befunde aus dem internationalen Vergleich. KZfSS Kölner Zeitschrift für Soziologie und Sozialpsychologie. 2015;**67(1)**:57-82.
5. **Barnes D.E.**, Santos-Modesitt W., Poelke G., et al. The Mental Activity and eXercise (MAX) trial: a randomized controlled trial to enhance cognitive function in older adults. JAMA internal medicine. 2013;**173(9)**:797-804.
6. **Zimmer P.**, Oberste M, Bloch W. Einfluss von Sport auf das zentrale Nervensystem – Molekulare und zelluläre Wirkmechanismen. Dtsch Z Sportmed. 2015; **66**: 42-49
7. **Murray D.K.**, Sacheli M.A., Eng J.J., Stoessl A.J. The effects of exercise on cognition in Parkinson's disease: a systematic review. Translational neurodegeneration. 2014;**3(1)**:1.
8. **Bansi J.**, Bloch W, Gamper U, Kesselring J. Training in MS: influence of two different endurance training protocols (aquatic versus overland) on cytokine and neurotrophin concentrations during three week randomized controlled trial. Mult Scler. 2013 Apr;**19(5)**:613-21.
9. **Wens I.**, Keytsman C., Deckx N., Cools N., Dalgas U., Eijnde B. Brain derived neurotrophic factor in multiple sclerosis: effect of 24 weeks endurance and resistance training. European journal of neurology. 2016;**23(6)**:1028-35.
10. **Rasmussen P.**, Wyss M.T., Lundby C. Cerebral glucose and lactate consumption during cerebral activation by physical activity in humans. The FASEB Journal. 2011;**25(9)**:2865-73.
11. **Märten S.** Proteomanalyse der Blut-Hirn-Schranke: TU Darmstadt; 2004.
12. **Li W.**, Antuono P.G., Xie C., et al. Aberrant functional connectivity in Papez circuit correlates with memory performance incognitively intact middle-aged APOE4 carriers. Cortex. 2014 Aug;**57**:167-76.

13. **Aoi W.**, Iwashita S., Fujie M., Suzuki M. Sustained swimming increases erythrocyte MCT1 during erythropoiesis and ability to regulate pH homeostasis in rat. *International journal of sports medicine*. 2004;**25(5)**:339-44.
14. **Juel C.** Laktattransport im Skelettmuskel: Trainingsinduzierte Anpassung und Bedeutung bei körperlicher Belastung. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2004;**55(6)**:157-160.
15. **Brenner P.** Die Struktur der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke: Imu; 2006.
16. **Halabchi F**, Alizadeh Z, Sahraian MA, Abolhasani M. Exercise prescription for patients with multiple sclerosis; potential benefits and practical recommendations. *BMC Neurol*. 2017 Sep 16;**17(1)**:185
17. **Hoshino D**, Setogawa S, Kitaoka Y, *et al.* Exercise-induced expression of monocarboxylate transporter 2 in the cerebellum and its contribution to motor performance. *Neurosci Lett*. 2016 Oct 28;**633**:1-6.
18. **Feng YS**, Yang SD, Tan ZX, Wang MM, Xing Y, Dong F, Zhang F. The benefits and mechanisms of exercise training for Parkinson's disease. *Life Sci*. 2020 Mar 15;**245**:117345.
19. **Berg**, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie* (6.Aufl.) (S.485-530). München: Elsevier GmbH. 2007
20. **Weineck**, J. *Sportbiologie* (9.Aufl). Balingen: Spitta Verlag. 2004
21. **Robergs**, A., Amann, M. Belastungsbedingte metabolische Azidose: Woher kommen die Protonen?. *Österreichisches Journal für Sportmedizin*. 2003;**3**, .11-25.
22. **Pedersen**, T. H., Nielsen, O. B.; Lamb, G. D.; Stephenson, D. G. Intracellular acidosis enhances the excitability of working muscle. *Science*. 2004;**305(5687)**: 1144–7.
23. **Wahl**, P., Bloch, W., Mester, J. Moderne Betrachtungsweisen des Laktats: Laktat ein überschätztes und zugleich unterschätztes Molekül. *Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie*, 2009; 57(3):100–7.
24. **Philp**, A. Lactate - a signal coordinating cell and systemic function. *The journal of experimental biology*, 2005;**208(24)**:4561-75.
25. **Fries**, R., Wallace WA, Roy S, *et al.* Dermal excisional wound healing in pigs following treatment with topically applied pure oxygen. *Mutat Res*. 2005 Nov 11;**579(1-2)**:172-81.
26. **Hunt**, T. K., Aslam RS, Beckert S, *et al.* Aerobically derived lactate stimulates revascularization and tissue repair via redox mechanisms. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Aug;**9(8)**:1115-24.
27. **Brooks GA**, Brooks TG, Brooks S. Laktat als metabolisches Signal der Genexpression. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*. 2008;**59(12)**:280–86.

28. **Hashimoto T**, Hussien R, Oommen S, Gohil K, Brooks GA. Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB J*. 2007 Aug;**21(10)**:2602-12.
29. **Brooks GA**. Intra- and extra-cellular lactate shuttles. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 Apr;**32(4)**:790-9.
30. **Brooks GA**. Lactate shuttle – between but not within cells? *The Journal of Physiology*. 2002; **541(2)**:333–4.
31. **Pagliassotti MJ**, Donovan CM. Role of cell type in net lactate removal by skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1990 Apr;**258(4 Pt 1)**:E635-42.
32. **Halestrap AP**, Denton RM. Specific inhibition of pyruvate transport in rat liver mitochondria and human erythrocytes by alpha-cyano-4-hydroxycinnamate. *Biochem J*. 1974 Feb;**138(2)**:313-6.
33. **Halestrap AP**, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*. 1999 Oct 15;**343 Pt 2(Pt 2)**:281-99.
34. **Brooks GA**, Brown MA, Butz CE, Sicurello JP, Dubouchaud H. Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J Appl Physiol (1985)*. 1999 Nov;**87(5)**:1713-8.
35. **Butz CE**, McClelland GB, Brooks GA. MCT1 confirmed in rat striated muscle mitochondria. *J Appl Physiol (1985)*. 2004 Sep;**97(3)**:1059-66.
36. **Price NT**, Jackson VN, Halestrap AP. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J*. 1998 Jan 15;**329 (Pt 2)(Pt 2)**:321-8.
37. **Halestrap AP**, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*. 1999 Oct 15;**343 Pt 2(Pt 2)**:281-99.
38. **Halestrap AP** and Meredith D (2004) The SLC16 gene family - from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 447:619–628.
39. **Halestrap AP**, Meredith D. The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch*. 2004 Feb;**447(5)**:619-28.
40. **Jones RS**, Morris ME. Monocarboxylate Transporters: Therapeutic Targets and Prognostic Factors in Disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Nov;**100(5)**:454-463.
41. **Bonen A**, Miskovic D, Tonouchi M, Lemieux K, Wilson MC, Marette A, Halestrap AP. Abundance and subcellular distribution of MCT1 and MCT4 in heart and fast-

- twitch skeletal muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jun;**278(6)**:E1067-77.
42. **Wilson MC**, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF, Halestrap AP. Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J Biol Chem.* 1998 Jun 26;**273(26)**:15920-6.
  43. **Bonen A**, Tonouchi M, Miskovic D, Heddle C, Heikkila JJ, Halestrap AP. Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Nov;**279(5)**:E1131-8.
  44. **McCullagh KJ**, Poole RC, Halestrap AP, Tipton KF, O'Brien M, Bonen A. Chronic electrical stimulation increases MCT1 and lactate uptake in red and white skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1997 Aug;**273(2 Pt 1)**:E239-46.
  45. **Juel C**, Halestrap AP. Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol.* 1999 Jun 15;517 ( **Pt 3**)(**Pt 3**):633-42.
  46. **Juel C**. Lactate transport in skeletal muscle: Training-induced adaptation and significance in physical exercise. *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin.* 2004; **55(6)**: 157-60.
  47. **Dubouchaud H**, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks GA. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Apr;**278(4)**:E571-9.
  48. **Juel C**, Holten MK, Dela F. Effects of strength training on muscle lactate release and MCT1 and MCT4 content in healthy and type 2 diabetic humans. *J Physiol.* 2004 Apr 1;**556(Pt 1)**:297-304.
  49. **Pilegaard H**, Mohr T, Kjaer M, Juel C. Lactate/H<sup>+</sup> transport in skeletal muscle from spinal-cord-injured patients. *Scand J Med Sci Sports.* 1998 Apr;**8(2)**:98-101.
  50. **Wahl P**, Bloch W, Mester J. Moderne Betrachtungsweisen des Laktats: Laktat ein überschätztes und zugleich unterschätztes Molekül. *Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie.* 2009;**57(3)**:100–107
  51. **Juel C**, Lundby C, Sander M, Calbet JA, Hall Gv. Human skeletal muscle and erythrocyte proteins involved in acid-base homeostasis: adaptations to chronic hypoxia. *J Physiol.* 2003 Apr 15;**548(Pt 2)**:639-48.
  52. **Opitz D**. Messungen zum Monocarboxylat-Transporter (MCT) an Erythrozyten von Typ-2-Diabetikern im Rahmen eines ausdauerbasierten Interventionsprogramms. Deutsche Sporthochschule Köln, 2008.
  53. **Narumi K.**, Furugen A., Kobayashi M., Otake S., Itagaki S., Iseki K. Regulation of monocarboxylate transporter 1 in skeletal muscle cells by intracellular signaling pathways. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2010;33(9):1568-73.

54. **Dimmer K-S.**, Friedrich B., Florian L., Deitmer J.W., Bröer S. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochemical Journal*. 2000;350(1):219-27.
55. **Pierre K.**, Pellerin L. Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of neurochemistry*. 2005;94(1):1-14.
56. **Grollman EF**, Philp NJ, McPhie P, Ward RD, Sauer B. Determination of transport kinetics of chick MCT3 monocarboxylate transporter from retinal pigment epithelium by expression in genetically modified yeast. *Biochemistry*. 2000 Aug 8;39(31):9351-7.
57. **Philp NJ**, Yoon H, Grollman EF. Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6):R1824-8.
58. **Gill RK**, Saksena S, Alrefai WA, *et al.* Expression and membrane localization of MCT isoforms along the length of the human intestine. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Oct;289(4):C846-52.
59. **Lin WR**, Chiang JM, Lim SN, *et al.* Dynamic bioenergetic alterations in colorectal adenomatous polyps and adenocarcinomas. *EBioMedicine*. 2019 Jun;44:334-345.
60. **Murakami Y**, Kohyama N, Kobayashi Y, *et al.* Functional characterization of human monocarboxylate transporter 6 (SLC16A5). *Drug Metab Dispos*. 2005 Dec;33(12):1845-51.
61. **Hugo SE**, Cruz-Garcia L, Karanth S, Anderson RM, Stainier DY, Schlegel A. A monocarboxylate transporter required for hepatocyte secretion of ketone bodies during fasting. *Genes Dev*. 2012 Feb 1;26(3):282-93.
62. **Friesema EC**, Ganguly S, Abdalla A, Manning Fox JE, Halestrap AP, Visser TJ. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. *J Biol Chem*. 2003 Oct 10;278(41):40128-35.
63. **Schwartz CE**, May MM, Carpenter NJ, *et al.* Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet*. 2005 Jul;77(1):41-53.
64. **Müller J**, Mayerl S, Visser TJ, Darras VM, Boelen A, Frappart L, Mariotta L, Verrey F, Heuer H. Tissue-specific alterations in thyroid hormone homeostasis in combined Mct10 and Mct8 deficiency. *Endocrinology*. 2014 Jan;155(1):315-25.
65. **Stäubli A**, Capatina N, Fuhrer Y, *et al.* Abnormal creatine transport of mutations in monocarboxylate transporter 12 (MCT12) found in patients with age-related cataract can be partially rescued by exogenous chaperone CD147. *Hum Mol Genet*. 2017 Nov 1;26(21):4203-4214.

66. **Dunay IR** Therapie der Toxoplasma enzephalitis-In-vitro und In-vivo- Modelle zur Passage von antiparasitären Substanzen durch die Blut-Hirn-Schranke: Freie Universität Berlin; 2005.
67. **Pardridge WM.** Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular interventions.* 2003;**3(2)**:90.
68. **Goldstein GW,** Betz AL. Recent advances in understanding brain capillary function. *Annals of neurology.* 1983;**14(4)**:389-95.
69. **Forth W,** Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München, Jena, Deutschland: Urban und Fischer Verlag, 2001.
70. **Haseloff R,** Blasig I, Bauer H-C, Bauer H. In search of the astrocytic factor (s) modulating blood–brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and molecular neurobiology.* 2005;**25(1)**:25-39.
71. **Brenner P.** Die Struktur der Blut-Hirn- und der Blut-Liquor-Schranke. München, Deutschland: Imu, 2006.
72. **Abbott N.J.,** Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience.* 2006;**7(1)**:41-53.
73. **Schipke C.** Expression und Funktion von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten im intakten Hirngewebe der Maus: Freie Universität Berlin; 2005.
74. **Kupfernagel I,** Kandel E. Lernen und Gedächtnis. Neurowissenschaften: Eine Einführung: Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, Akademischer Verlag, 1995.
75. **Nedergaard M.,** Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences.* 2003;**26(10)**:523-30.
76. **Wood IS.,** Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition.* 2003;**89(01)**:3-9.
77. **Mueckler M,** Caruso C, Baldwin SA, *et al.* Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science.* 1985;**229(4717)**:941-5.
78. **Joost H-G.,** Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular membrane biology.* 2001;**18(4)**:247-56.
79. **Rasmussen P,** Wyss MT, Lundby C. Cerebral glucose and lactate consumption during cerebral activation by physical activity in humans. *The FASEB Journal.* 2011;**25(9)**:2865-73.
80. **Overgaard M.,** Rasmussen P, Bohm AM. *et al.* Hypoxia and exercise provoke both lactate release and lactate oxidation by the human brain. *The FASEB Journal.* 2012;**26(7)**:3012-20.

81. **Schipke C.** Expression und Funktion von Neurotransmitterrezeptoren auf Astrozyten im intakten Hirngewebe der Maus. Freie Universität Berlin, 2005.
82. **Johnsen J-R.** Interaktion von Laktat mit zentralen Glukosesensoren und  $\beta$ - Zellen des Pankreas. 2012.
83. **Bröer S,** Rahman B, Pellegrini G, *et al.* Comparison of Lactate Transport in Astroglial Cells and Monocarboxylate Transporter 1 (MCT 1) Expressing *Xenopus laevis* Oocytes Expression of two different Monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *Journal of Biological Chemistry.* 1997;272(48):30096-102.
84. **Abi-Saab WM,** Maggs DG, Jones T. *et al.* Striking Differences in Glucose and Lactate Levels Between Brain Extracellular Fluid and Plasma in Conscious Human Subjects; Effects of Hyperglycemia and Hypoglycemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2002;**22(3)**:271-9.
85. **Knudsen GM,** Paulson OB, Hertz MM. Kinetic analysis of the human blood-brain barrier transport of lactate and its influence by hypercapnia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 1991;**11(4)**:581-6.
86. **Smith D,** Pernet A, Hallett WA, Bingham E, Marsden PK, Amiel SA. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2003;**23(6)**:658-64.
87. **Hitze B,** Hubold C, Van Dyken R, *et al.* How the selfish brain organizes its supply and demand. *Frontiers in neuroenergetics.* 2010;**2:7.**
88. **Hashimoto T,** Brooks GA. Mitochondrial lactate oxidation complex and an adaptive role for lactate production. *Medicine and science in sports and exercise.* 2008;**40(3)**:486.
89. **Beckert S,** Farrahi F, Aslam RS, *et al.* Lactate stimulates endothelial cell migration. *Wound repair and regeneration.* 2006;**14(3)**:321-4.
90. **Milovanova TN,** Bhopale VM, Sorokina EM, *et al.* Lactate stimulates vasculogenic stem cells via the thioredoxin system and engages an autocrine activation loop involving hypoxia- inducible factor 1. *Molecular and cellular biology.* 2008;**28(20)**:6248-61.
91. **McClelland GB,** Khanna S, González GF, Butz CE, Brooks GA. Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochemical and biophysical research communications.* 2003;**304(1)**:130-5.
92. **Bak LK,** Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA- glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry.* 2006;**98(3)**:641-53.



93. **Theparambil SM**, Ruminot I, Schneider HP, Shull GE, Deitmer JW. The electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in cortical astrocytes. *J Neurosci*. 2014 Jan 22;**34(4)**:1148-57.
94. **Theparambil SM**, Deitmer JW. High effective cytosolic H<sup>+</sup> buffering in mouse cortical astrocytes attributable to fast bicarbonate transport. *Glia*. 2015 Sep;**63(9)**:1581-94.
95. **Becker HM**, Bröer S, Deitmer JW. Facilitated lactate transport by MCT1 when co-expressed with the sodium bicarbonate cotransporter (NBC) in *Xenopus* oocytes. *Biophys J*. 2004 Jan;**86(1 Pt 1)**:235-47.
96. **Becker HM**, Klier M, Deitmer JW. Carbonic anhydrases and their interplay with acid/base-coupled membrane transporters. *Subcell Biochem*. 2014;**75**:105-34
97. **Stridh MH**, Alt MD, Wittmann S, Heidtmann H, Aggarwal M, Riederer B, Seidler U, Wennemuth G, McKenna R, Deitmer JW, Becker HM. Lactate flux in astrocytes is enhanced by a non-catalytic action of carbonic anhydrase II. *J Physiol*. 2012 May 15;**590(10)**:2333-51.
98. **Deitmer W**, Shefteeq M, Theparambil SM, Ruminot H, Becker M. Unser hungriges Gehirn: Welche Rolle spielen Gliazellen bei der Energieversorgung?, *Neuroforum* 2017; **23(1)**: 2–12
99. **Watson C**. The mouse nervous system: Academic Press; 2012.
100. **Kahle W**, Frotscher M. Taschenatlas Anatomie, Nervensystem und Sinnesorgane 3d ed. 2016: Georg Thieme Verlag, 2013.
101. **Ulfig N**. Kurzlehrbuch Neuroanatomie: Georg Thieme Verlag, 2008.
102. **Kaas JH**. Reconstructing the organization of the forebrain of the first mammals. in Kaas JH, Krubitzer LA, eds: *Evolution of Nervous Systems*: London, Elsevier, vol 3: Mammals, 27–48, 2007.
103. **Amunts FPK.**, Zilles K. Funktionelle Neuroanatomie. Funktionelle MRT in Psychiatrie und Neurologie: Springer; 2007. 9-59.
104. **Garthe A**. Funktionale Relevanz adulter Neurogenese im Hippokampus der Maus: Freie Universität Berlin, 2008.
105. **Stephan H**. Allocortex. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Vol. IV/9. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1975.
106. **Jang SH**, Kwon HG. Perspectives on the neural connectivity of the fornix in the human brain. *Neural regeneration research*. 2014 Aug 1;**9(15)**:1434-6.
107. **Aggleton JP**, Pralus A, Nelson AJ, Hornberger M. Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit. *Brain : a journal of neurology*. 2016 Jul;**139(Pt 7)**:1877-90.

108. **Scharfman H.**, Witter M., Schwarcz R. The parahippocampal region- Implications for neurological and psychiatric diseases-Preface. *PARAHIPPOCAMPAL REGION*. 2000;**911**:IX-XIII.
109. **Andersen P**, Bliss TV, Skrede K. Unit analysis of hippocampal population spikes. *Experimental Brain Research*. 1971;**13(2)**:208-21.
110. **Constant JS**, Feng JJ, Zabel DD, *et al*. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair and Regeneration*. 2000;**8(5)**:353-60.
111. **Kandel E.R.** Zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis. *Neurowissenschaften Heidelberg*. 1996:685-714.
112. **Isaacs KR**, Anderson BJ, Alcantara AA, Black JE, Greenough WT. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992 Jan;**12(1)**:110-9.
113. **Anderson BJ**, Li X, Alcantara AA, Isaacs KR, Black JE, Greenough WT. Glial hypertrophy is associated with synaptogenesis following motor-skill learning, but not with angiogenesis following exercise. *Glia*. 1994 May;**11(1)**:73-80..
114. **Stevenson ME**, Behnke VK, Swain RA. Exercise pattern and distance differentially affect hippocampal and cerebellar expression of FLK-1 and FLT-1 receptors in astrocytes and blood vessels. *Behav Brain Res*. 2018 Jan 30;**337**:8-16.
115. **Gollnick PD**, Bayly WM, Hodgson DR. Exercise intensity, training, diet, and lactate concentration in muscle and blood. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1986;**18(3)**:334-40.
116. **Lu H**, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, Verma A. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;**280(51)**:41928-39.
117. **Safran M**, Kaelin WG. HIF hydroxylation and the mammalian oxygen- sensing pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2003;**111(6)**:779-83.
118. **Madsen PL**, Cruz NF, Sokoloff L, Dienel GA. Cerebral oxygen/glucose ratio is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery: excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1999;**19(4)**:393-400.
119. **Córdova C**, Silva V, Moraes CF, Simões HG, Nóbrega OdT. Acute exercise performed close to the anaerobic threshold improves cognitive performance in elderly females. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2009;**42(5)**:458-64.
120. **Stobart JL**, Anderson CM. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci*. 2013 Apr 10;**7**:38.

121. **Takimoto M**, Hamada T. Acute exercise increases brain region-specific expression of MCT1, MCT2, MCT4, GLUT1, and COX IV proteins. *Journal of Applied Physiology*. 2014;**116(9)**:1238-50.
122. **Takimoto M.**, Takeyama M., Hamada T. Prolonged exercise upregulates expression of MCT1, MCT2, and MCT4 mRNA in the cerebral cortex of rat brain. *The FASEB Journal*. 2013;**27(1 Supplement)**:lb782-lb.
123. **Van Praag H**, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;**96(23)**:13427-31.
124. **Suzuki A**, Stern SA, Bozdagi O, et al. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011;**144(5)**:810-23.
125. **Gómez-Palacio-Schjetnan A**, Escobar ML. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Neurogenesis and neural plasticity*: Springer; 2013. 117-36.
126. **Leuner B**, Gould E, Shors TJ. Is there a link between adult neurogenesis and learning? *Hippocampus*. 2006;**16(3)**:216-24.
127. **Inholm JE**, Hamilton NB, Kessaris N, Richardson WD, Bergersen LH, Attwell D. Regulation of oligodendrocyte development and myelination by glucose and lactate. *J Neurosci*. 2011 Jan 12;**31(2)**:538-48.
128. **Ramljak S**, Schmitz M, Repond C, Zerr I, Pellerin L. Altered mRNA and Protein Expression of Monocarboxylate Transporter MCT1 in the Cerebral Cortex and Cerebellum of Prion Protein Knockout Mice. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 4;**22(4)**:1566.
129. **Leino RL**, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR. Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem Int*. 2001 May;**38(6)**:519-27. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00102-9. PMID: 11248400.
130. **Nakai M**, Chen L, Nowak RA. Tissue distribution of basigin and monocarboxylate transporter 1 in the adult male mouse: A study using the wild-type and basigin gene knockout mice. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2006;**288(5)**:527-35.
131. **Bergersen L**, Waerhaug O, Helm J, *et al*. A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with delta-glutamate receptors in postsynaptic densities of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Exp Brain Res*. 2001 Feb;**136(4)**:523-34.
132. **Ferreira GC**, Karimi AJ, Waddell J, McKenna MC. Metabolism of [1,6-13 C]glucose in the cerebellum of 18-day-old rats: Comparison with cerebral metabolism. *J Neurochem*. 2021 Jun;**157(6)**:1946-1962.

133. **Marc Schuhmann**, Die Expression des Monocarboxylattransporters 1 (MCT 1) an der Bluthirnschranke des Hippocampus der Maus vor und nach einem mehrwöchigen Ausdauertraining, Bachelorarbeit im Studienfach der Sportwissenschaften, Deutsche Sporthochschule Köln 2016
134. **Lin MT**, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2006;**443(7113)**:787-95
135. **Litak J**, Mazurek M, Kulesza B, Szmygin P, Litak J, Kamieniak P, Grochowski C. Cerebral Small Vessel Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 20;**21(24)**:9729.
136. **Kohman RA**, Rodriguez-Zas SL, Southey BR, Kelley KW, Dantzer R, Rhodes JS. Voluntary wheel running reverses age-induced changes in hippocampal gene expression. *PLoS One*. 2011;**6(8)**:e22654.
137. **Ferreira AF**, Real CC, Rodrigues AC, Alves AS, Britto LR. Short-term, moderate exercise is capable of inducing structural, BDNF-independent hippocampal plasticity. *Brain research*. 2011;1425:111-22 Graff-Radford J. Vascular Cognitive Impairment. *Continuum (Minneapolis)*. 2019 Feb;**25(1)**:147-164.
138. **Morland C**, Andersson KA, Haugen ØP, *et al*. Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat Commun*. 2017 May 23;**8**:15557.
139. **Mattson MP**. Lifelong brain health is a lifelong challenge: from evolutionary principles to empirical evidence. *Ageing research reviews*. 2015;**20**:37-45.
140. **Gold SM**, Schulz KH, Hartmann S. *et al*. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *Journal of neuroimmunology*. 2003;138(1):99-105.
141. **Tanzi R**, Moir R, Wagner S. Clearance of Alzheimer's A $\beta$  peptide: the many roads to perdition. *Neuron*. 2004;43(5):605-8.
142. **Intlekofer KA**, Cotman CW. Exercise counteracts declining hippocampal function in aging and Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*. 2013;**57**:47-55.
143. **Chaddock L**, Erickson KI, Prakash RS, *et al*. A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. *Brain Research*. 2010;**1358**:172-83.
144. **Chaddock L**, Erickson KI, Prakash RS, *et al*. Basal Ganglia Volume Is Associated with Aerobic Fitness in Preadolescent Children. *Developmental Neuroscience*. 2010;**32(3)**:249-56.
145. **Chaddock L.**, Hillman CH, Pontifex MB, Johnson CR, Raine LB, Kramer AF. Childhood aerobic fitness predicts cognitive performance one year later. *Journal of sports sciences*. 2012;**30(5)**:421-30.

146. **Cohen NJ**, Ryan J, Hunt C, Romine L, Wszalek T., Nash C. Hippocampal system and declarative (relational) memory: Summarizing the data from functional neuroimaging studies. *Hippocampus*. 1999;9(1):83-98.
147. **Hillman CH**, Schott N. Der Zusammenhang von Fitness, kognitiver Leistungsfähigkeit und Gehirnzustand im Schulkindalter. *Zeitschrift für Sportpsychologie*. 2015.
148. **Lee M**, Cho HS, Yoon KJ, Lee W, Moon HY. Exercise-induced changes of gene expression in the cerebellum of aged mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Jan 22;521(4):952-956.
149. **Inoue T**, Ninuma S, Hayashi M, Okuda A, Asaka T, Maejima H. Effects of long-term exercise and low-level inhibition of GABAergic synapses on motor control and the expression of BDNF in the motor related cortex. *Neurol Res*. 2018 Jan;40(1):18-25.
150. **Hartley H**, Cassidy E, Bunn L, Kumar R, Pizer B, Lane S, Carter B. Exercise and Physical Therapy Interventions for Children with Ataxia: A Systematic Review. *Cerebellum*. 2019 Oct;18(5):951-968.
151. **Klein CP**, Hoppe JB, Saccomori AB, *et al.* Protective effect of maternal exercise against amyloid- $\beta$  neurotoxicity in the male rat offspring's cerebellum. *J Dev Orig Health Dis*. 2020 Oct;11(5):521-532.
152. **Morris ME**, Felmler MA. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J*. 2008 Jun;10(2):311-21.
153. **Voogd J**, Cerebellum, Praxinos G Ed. The rat nervous system, San Diego: Academic Press; 2004
154. **Chen L**, Bao S, Thompson RF. Bilateral lesions of the interpositus nucleus completely prevent eyeblink conditioning in Purkinje cell-degeneration mutant mice. *Behav Neurosci*. 1999 Feb;113(1):204-10.
155. **Triarhou LC**, Norton J, Ghetti B. Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res*. 1987;66(3):577-88.
156. **Hunt TK**, Aslam R, Hussain Z, Beckert S. Lactate, with oxygen, incites angiogenesis. *Oxygen Transport to Tissue XXIX*: Springer; 2008. 73-80.
157. **Zwetsloot KA**, Westerkamp LM, Holmes BF, Gavin TP. AMPK regulates basal skeletal muscle capillarization and VEGF expression, but is not necessary for the angiogenic response to exercise. *J Phy*
158. Onlinequelle: [https://de.wikipedia.org/wiki/Konzepte\\_zur\\_%C3%9Cberwindung\\_der\\_Blut-Hirn-Schranke](https://de.wikipedia.org/wiki/Konzepte_zur_%C3%9Cberwindung_der_Blut-Hirn-Schranke) Zugriff 3.4.2022

159. Onlinequelle: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/547276/538837/subject/biochemie/oxidation+von+brennstoffmolek%C3%BClen/atmungskette+prinzip+und+komponenten> Zugriff 5.2.2022
160. Onlinequelle: <https://www.dasgehirn.info/entdecken/anatomie/verschaltung-der-hippocampus-8026>. Zugriff; 6.6.2022
161. Onlinequelle: <https://www.kenhub.com/de/library/anatomie/kleinhirn-cerebellum>  
Zugriff: 3.7.2022

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung Laktatdehydrogenase Reaktion nach Robergs und Amann (21).	11
Abbildung 2: Laktatshuttle Mishra, Deepshikha & Banerjee, Debabrata. (2019).....	13
Abbildung 3: Darstellung der pH-Regualtion im Muskel nach Juel (14).....	15
Abbildung 4: Struktur des MCT1 (38) .....	17
Abbildung 5: Verteilung der MCT in den Geweben (152) .....	18
Abbildung 6: Anatomie der Blut-Hirn-Schranke (158).....	20
Abbildung 7: Energiegewinn der Atmungskette (159).....	21
Abbildung 8: Funktion der glutaminergen Synapse (92).....	22
Abbildung 9: Die ANLS-Hypothese nach (98).....	23
Abbildung 10: Sagitalschnitt des Mäusehirn in HE Färbung.....	24
Abbildung 11: Intrinsisches Verschaltungsmuster des Hippocampus (160) .....	26
Abbildung 12: Makroskopie des Mäusecerebellums nach (27, S. 361) .....	27
Abbildung 13: Die komplexe Verschaltung des Cerebellums (161).....	30
Abbildung 14: Die cerebellären Nuclei nach (27, S.379) .....	31
Abbildung 15: Darstellung des Hippocampus in Antikörperfärbung des MCT1. Links zeigt sich die lichtmikroskopische Aufnahme, rechts wurden die Kapillaren markiert (133).....	38
Abbildung 16: Darstellung des Cerebellum in Antikörperfärbung des MCT1. Links zeigt sich die lichtmikroskopische Aufnahme, rechts wurden die Kapillaren markiert ....	38

### 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Probanden, die Verteilung erfolgte randomisiert .....	33
Tabelle 2: Beschreibung verwendeter Geräte .....	34
Tabelle 3: Beschreibung verwendete Lösungen.....	36
Tabelle 4: Anzahl der Kapillaren im Vergleich der Interventionsgruppen von Cerebellum und Hippocampus .....	39
Tabelle 5: Anzahl der Kapillaren im Vergleich der Interventionsgruppen (visuell).....	40
Tabelle 6: Maximale Graustufenstärke "Min Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum .....	41

Tabelle 7:	Maximale Graustufenfärbung „Min Grey Value“ im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell).....	42
Tabelle 8:	Mittlere Graustufenstärke "Mean Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum .....	42
Tabelle 9:	Mittlere Graustufenstärke "Mean Grey Value" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell).....	43
Tabelle 10:	"Integrated density" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell) .....	44
Tabelle 11:	"Integrated density" im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell) .....	45
Tabelle 12:	Kapillarfläche im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum.....	45
Tabelle 13:	Kapillarfläche im Vergleich der Interventionsgruppen von Hippocampus und Cerebellum (visuell) .....	46