

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

Klinikum rechts der Isar

Direktor: Prof. Dr. Gerhard Schneider

Analyse von Neurotoxizität verschiedener Amyloid-beta Subformen - Auswirkungen im modifizierten Holeboard-Test

Finn Vincent Syryca

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende/-r der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Bettina E. Jungwirth
2. Prof. Dr. Paul Lingor

Die Dissertation wurde am 28.04.2020 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.10.2020 angenommen.

Meinen Eltern und meinem Bruder Janik gewidmet, die mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	5
II. Abbildungsverzeichnis	7
III. Tabellenverzeichnis	8
IV. EINLEITUNG	9
1. Die Alzheimer-Krankheit.....	9
2. Pathophysiologie.....	10
2.1 A β -Plaques.....	10
2.2 Neurofibrillenbündel.....	14
3. Allgemeine Risikofaktoren	15
4. Anästhesie und die Alzheimer-Krankheit	16
V. FRAGESTELLUNG	19
VI. MATERIAL UND METHODEN	20
1. Versuchstiere.....	20
2. Versuchsplan	20
3. Intraventrikuläre Kanülen-Implantation.....	22
3.1 OP-Vorbereitung	22
3.2 Implantation	22
4. Aβ-Injektion	24
5. Isoflurannarkose und „Sham“-Prozedur.....	25
5.1 Narkosevorbereitung	25
5.2 Narkoseeinleitung und -führung.....	26
5.3 Narkoseausleitung.....	26
6. Modifizierter Holeboard-Test.....	27
6.1 Testprinzip	27
6.2 Versuchsaufbau	27
6.3 Versuchsvorbereitung	30
6.4 Versuchsablauf	30
6.5 Dokumentation	31
6.6 Untersuchte Parameter.....	32
6.7 Statistische Analyse.....	34

VII. ERGEBNISSE	35
1. Körpergewicht	35
2. Kognitionsparameter	36
3. Angstparameter	38
4. Verhaltensparameter	40
VIII. DISKUSSION	42
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	42
2. Diskussion der Methoden	43
2.1 Verwendetes Maus Modell	43
2.2 Implantation der ICV-Kanüle und intracerebroventrikuläre Aβ-Injektion	44
2.3 Isofluran als Narkosegas	45
3. Diskussion der Ergebnisse	49
3.1 Neurotoxizität der Aβ Subformen	49
3.2 Einfluss von Isofluran	53
4. Limitationen der Studie	56
IX. ZUSAMMENFASSUNG	58
X. REFERENZEN	59

I. Abkürzungsverzeichnis

3NTyr10-A β	Nitrierung von Amyloid-beta an Position 10
A β	Amyloid-beta
A β 40	A β 1-40
A β 42	A β 1-42
A β 1-40	Amyloid-beta bestehend aus 40 Aminosäuren
A β 1-42	Amyloid-beta bestehend aus 42 Aminosäuren
A β nitro	3NTyr10-A β
A β pyro	A β pE3-42
A β pE3-42	Pyroglutamylierung von Amyloid-beta an Position 3
A β pE11-42	Pyroglutamylierung von Amyloid-beta an Position 11
Abb.	Abbildung
AK	Alzheimer-Krankheit
AKT/PKB	Protein Kinase B
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BACE-1	β -site aspartyl-protease cleaving enzyme-1
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl (protein)	B-cell lymphoma (protein)
Cdk5	Cyclin-abhängige Kinase 5
CSF	Liquor
ECE	Endothelin-umwandelndes Enzym
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
FiO ₂	Fraction of inspired oxygen
GABA	Gamma-Aminobutyric-Acid
GSK-3 β	Glykogen Synthase Kinase-3beta
HFIP	Hexafluorisopropanol
ICV	intracerebroventricular
IDE	Insulin-abbauendes Enzyme

IL	Interleukin
IP3	Inositol Triphosphat
Iso	Isofluran
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MARK	Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase
mHBT	Modifizierter Holeboard-Test
MW	Mittelwert
NEP	Neprysilin
NFT	Neurofibrillenbündel
NMDA	N-Methy-D-Aspartat-Antagonist
NO	Stickstoffmonoxid
NOS2	Stickstoffmonoxid-Synthase 2
N.s.	Nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
PBS	Phosphate Balanced Saline
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PHF	Paarige spiralförmige Filamente
PP	Protein-Phosphatase
PSEN	Präsenilin
SEM	Standardfehler
Sig.	Signifikant
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Graphische Darstellung der geschätzten Prävalenz von Demenz weltweit im Verlauf der Jahre 2001 bis 2040 (Rizzi et al. 2014)	10
Abb. 2: Übersichtsdarstellung des amyloidogenen sowie nicht-amyloidogenen Weges mit den verschiedenen Spaltprodukten ausgehend von APP	11
Abb. 3: Darstellung von Modifikationsmöglichkeiten an verschiedenen AS innerhalb des Peptids A β 1-42 (Kummer and Heneka 2014).....	12
Abb. 4: Darstellung aller bekannten AK-assoziierten Genmutationen, der beteiligten Chromosomen sowie der Mechanismen, über die die Menge an A β -Peptiden erhöht wird (Jiang and Jiang 2015)	16
Abb. 5: Darstellung der Zunahme des prozentualen Anteils sowohl der älteren Bevölkerung per se (gelber Balken), als auch des prozentualen Anteils des Bedarfs an Anästhetika innerhalb der älteren Bevölkerung (lila Balken) im Verlauf der Jahre bis 2051 (Silbert et al. 2011)	18
Abb. 6: Übersicht der Einteilung der Versuchstiere in 12 Untergruppen	21
Abb. 7: Chronologische Reihenfolge der Experimente.....	21
Abb. 8: Foto eines Versuchstiers im Stereotakt vor ICV-Implantation.....	22
Abb. 9: Versuchsapparatur bestehend aus der in neun Rechtecke eingeteilten Versuchsarena sowie dem zentral liegendem Holeboard mit zehn aufgesteckten Zylindern (Fendl 2013)	28
Abb. 10: Schemahafte Darstellung eines unmarkierten Zylinders mit Mandel unterhalb des Gitters (links) sowie eines markierten Zylinders mit Mandel oberhalb und unterhalb des Gitters (rechts) (Fendl 2013)	29
Abb. 11: Systematische Übersicht über die Einteilung des Langzeitgedächtnisses mit den jeweils beteiligten Hirnstrukturen (Squire and Zola 1996).....	32
Abb. 12: Körpergewichtsentwicklung im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler.....	35
Abb. 13: Kognitionsparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler; oben: Wrong Choices Total, unten: Time Trial	36
Abb. 14: Angstparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler; oben: Time on Board, unten: Latency First Board Entry	38
Abb. 15: Verhaltensparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler; oben: Grooming, mittig: Correct Hole Visit, unten: Line Crossings	40

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Konzentrationen und Eigenschaften der verschiedenen injizierten A β Subformen.....	25
Tab. 2: Übersichtstabelle der randomisierten Verteilung der Mandeln auf die jeweiligen Zylinder an den verschiedenen Tagen (nach Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“, Klinikum rechts der Isar, München).....	29
Tab. 3: Neurotoxizität der verschiedenen A β Subformen	49
Tab. 4: Interaktion von Isofluran mit den einzelnen A β Subformen	53

IV. EINLEITUNG

1. Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Krankheit (AK) ist eine multifaktoriell bedingte, neurodegenerative Erkrankung, deren typisches Symptom der fortschreitende kognitive Abbau ist (Kumar and Tsao 2018). Dieser kann sich in Gedächtnisverschlechterung, Orientierungslosigkeit, vermindertem Urteilsvermögen und reduzierter Denkfähigkeit äußern (Jiang and Jiang 2015). Weiterhin sind Verhaltensänderungen, motorische Einschränkungen und psychiatrische Abnormitäten wie Depression oder Agitation möglich (Alzheimer's Association 2019). Da die AK bisher noch nicht kausal therapierbar ist, kann sie sekundär durch die kognitive Einschränkung eintretende Komplikationen, wie Immobilität und Kachexie und daraus resultierenden Zweiterkrankungen, wie Pneumonien oder Lungenembolien zum Tode führen. Mit einem Anteil von 60% ist sie die häufigste Form der Demenz, welche mit einer geschätzten Prävalenz von weltweit über 40 Millionen Menschen eine gesellschaftsrelevante Erkrankung darstellt (Rizzi et al. 2014, **Abb. 1**). Darunter sind allein in Amerika bei den über 65-Jährigen 13%, bei den über 85-Jährigen bereits 43% von der AK betroffen (Thies and Bleiler 2011). Eine Meta-Analyse aus dem Jahre 2019 geht davon aus, dass sich die Anzahl der Patienten mit Demenz alle fünf Jahre verdoppeln wird. Die Kosten belaufen sich dabei je nach Stadium (mild – moderat – stark) auf 14.675 bis 29.709 Dollar pro Patient pro Jahr (Marešová et al. 2019). Eine steigende Lebenserwartung und rückläufige Geburtenraten führen zu einer weiteren Zunahme der Anzahl alter Menschen. Ohne einen medizinischen Durchbruch könnte bereits im Jahre 2050 jeder 85. Mensch von der AK betroffen sein und das Gesundheitssystem vor eine kaum zu lösende Aufgabe gestellt werden (Brookmeyer et al. 2007).

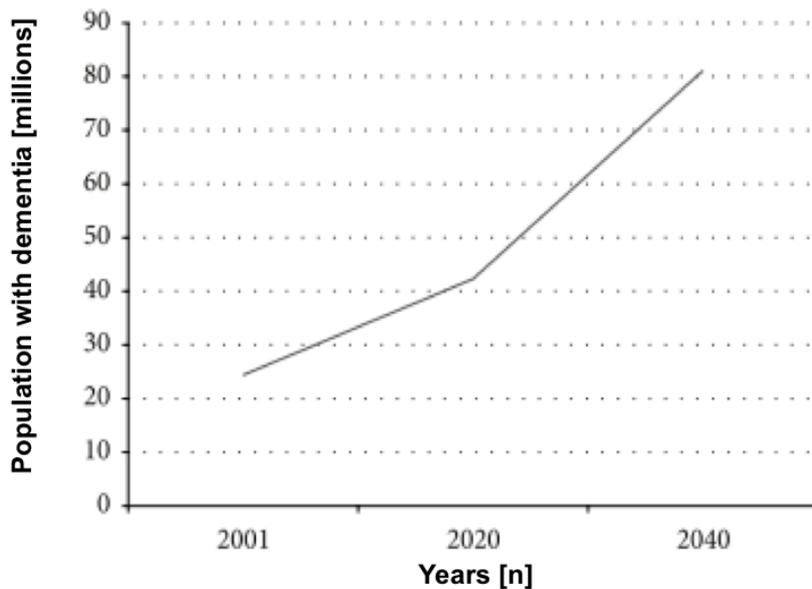


Abb. 1: Graphische Darstellung der geschätzten Prävalenz von Demenz weltweit im Verlauf der Jahre 2001 bis 2040 (Rizzi et al. 2014)

2. Pathophysiologie

Es wird eine multifaktorielle Ätiogenese der AK angenommen, wobei zwei neuropathologische Vorgänge von besonderer Bedeutung sind: die Bildung von Amyloid-beta ($A\beta$)-Plaques und die Bildung von Neurofibrillenbündeln (Sperling et al. 2019).

2.1 $A\beta$ -Plaques

2.1.1 Entstehung der $A\beta$ -Peptide

Im Jahr 1907 entdeckte Alois Alzheimer bei der histologischen Untersuchung des Gehirns seiner Patientin Auguste Deter erstmalig im Bereich der gesamten Hirnrinde zugrunde gegangene Nervenzellen sowie Eiweißablagerungen, sog. „Plaques“ (Castellani et al. 2010). Pathologische $A\beta$ -Peptide stellen dabei den Hauptbestandteil dieser Plaques dar (Tekirian 2001).

$A\beta$ -Peptide entstehen aus ihrem Vorläuferprotein, dem sog. Amyloid Precursor Protein (APP), welches aus 695 bis 770 Aminosäuren (AS) besteht. Die häufigste Isoform, APP 695, besitzt eine 597-638 AS lange Domäne, aus der später $A\beta$ entsteht (Kummer and

Heneka 2014). APP kann über zwei unterschiedliche Wege von drei verschiedenen Enzymen gespalten werden: der α -Sekretase, der β -Sekretase und γ -Sekretase (**Abb. 2**).

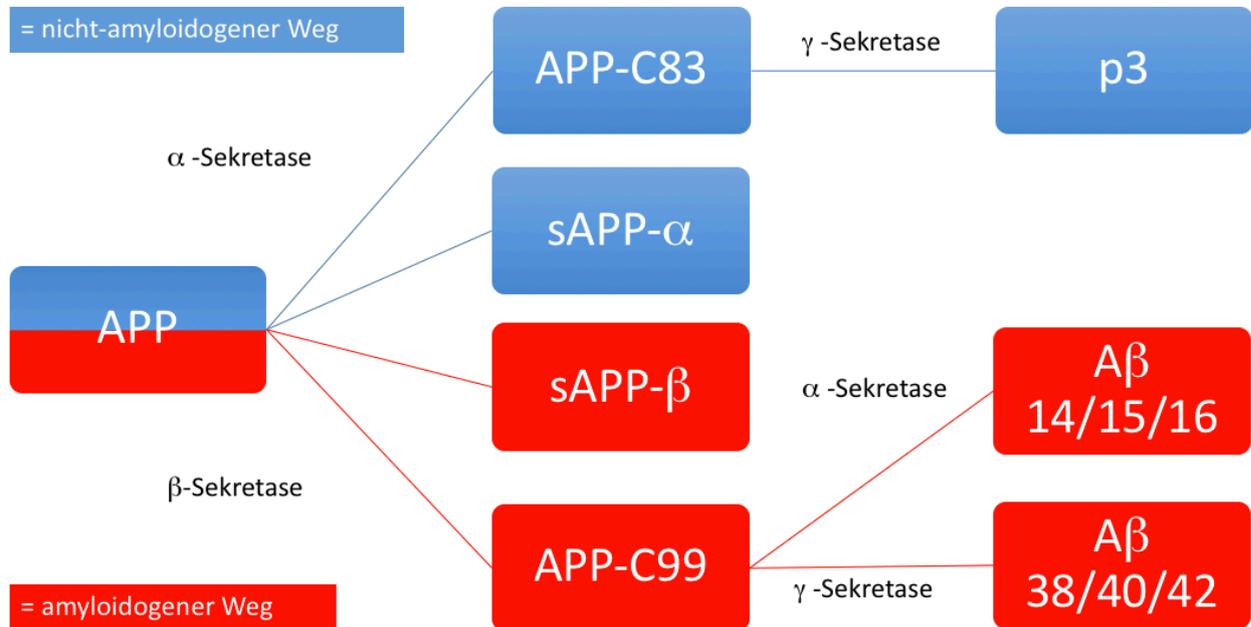


Abb. 2: Übersichtsdarstellung des amyloidogenen sowie nicht-amyloidogenen Weges mit den verschiedenen Spaltprodukten ausgehend von APP

Beim physiologischen, sog. „nicht-amyloidogenen Weg“, wird APP durch eine α -Sekretase zwischen Position 16 und 17 gespalten. Als Produkte entstehen einerseits sAPP- α , andererseits das aus 83 Aminosäuren bestehende C-terminale Fragment APP-C83. Letzteres wird anschließend von einer γ -Sekretase in das Endpeptid p3 gespalten. Dieses spielt bei der Pathogenese der AK jedoch keine Rolle (Jiang and Jiang 2015). Beim pathologischen, sog. „amyloidogenen Weg“, wird APP vor Position 1 sowie zwischen Position 10 und 11 von einer β -Sekretase, der Aspartyl-Protease BACE-1, gespalten (Vassar et al. 1999). Es entstehen sAPP- β und APP-C99, welches wiederum durch eine γ -Sekretase gespalten wird. So entstehen die pathologischen C-terminal abgeschnittenen Amyloid-Peptide mit 38, 40 oder 42 AS-Länge (Kummer and Heneka 2014). Besonders A β 42 neigt zu Aggregation und spielt bei der Bildung der Plaques die bedeutendste Rolle (Haass and Selkoe 2007). Alternativ kann APP-C99 statt der γ -

Sekretase durch eine α -Sekretase in kürzere A β -Formen von nur 14/15/16 AS-Länge gespalten werden (Kummer and Heneka 2014). In welchen Fällen APP-C99 durch die γ -Sekretase oder die α -Sekretase gespalten wird, ist noch unklar. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass sich bei Inhibition der γ -Sekretase die kürzeren A β -Formen vermehren (Portelius et al. 2010).

2.1.2 Pathologische Veränderungen der A β -Peptide

Im Rahmen der Pathogenese der AK spielen verschiedene Modifikationen der A β -Peptide eine wichtige Rolle. Dabei kommt es am N-Terminus der A β -Peptide nach deren Synthese zu pathologischen Veränderungen, die letztlich zur Plaqueaggregation führen. **Abb. 3** zeigt das Peptid A β 1-42, das an verschiedenen AS von pathologischen Modifikationen wie Oxidation, Phosphorylierung, Glykosylierung, Nitrierung, Pyroglutamylierung, Isomerisierung und Razematierung betroffen sein kann (Kummer and Heneka 2014).

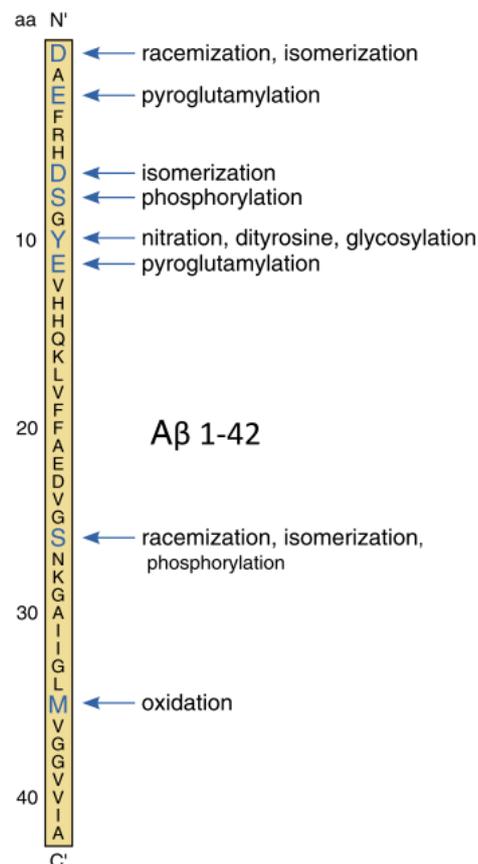


Abb. 3: Darstellung von Modifikationsmöglichkeiten an verschiedenen AS innerhalb des Peptids A β 1-42 (Kummer and Heneka 2014)

Bei der Genese der AK wird eine pathologische Nitrierung von A β vermehrt beobachtet (Castegna et al. 2003). Bei dieser Modifikationsart spielt die Stickstoffmonoxid-Synthase 2 (NOS2), das Enzym, das Stickstoffmonoxid (NO) produziert, eine entscheidende Rolle. NOS2 ist bei der AK hochreguliert (Kummer et al. 2011, Vodovotz et al. 1996). Durch NO kommt es zur Bindung von S-Nitrothiol an Cystein sowie Nitrierung und Dityrosinierung an Tyrosin (Radi et al. 2002). Das Tyrosin an Position 10 ist dabei besonders mit der Aggregation von Plaques assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass in vitro die Reaktion von A β mit Peroxynitrit, einem Zwischenprodukt von NO, über die Bildung von nitriertem sowie dityrosiniertem A β die Plaqueaggregation fördert (Radi et al. 2002). Im Maus Modell wurde weiterhin gezeigt, dass nitriertes A β die synaptische Kopplung im Hippocampus, die sog. „Langzeit-Potenzierung“ (LTP), unterdrückt (Kummer et al. 2011). Oxidativer Stress, der im Gehirn von AK-Patienten auftritt, fördert die Bildung dieser pathologischen A β -Form (Al-Hilaly et al. 2013, Thiabaud et al. 2013).

Eine zweite bedeutende pathologische Modifikation ist die Pyroglutamylierung. Bei dieser Form kommt es an Position 3 (A β pE3-42) oder an Position 11 (A β pE11-42) zur N-terminalen Modifikation mit Pyroglutamat (Mori et al. 1992, Näslund et al. 1994, Liu et al. 2006). Dabei werden bei 3pE-A β zunächst die ersten beiden AS durch das Enzym Aminopeptidase A entfernt (Sevalle et al. 2009). Dadurch wird A β hydrophober und aggregiert leichter (He and Barrow 1999). Experimentell konnten die schlechte Löslichkeit und das Vorkommen von pyroglutamyliertem A β in Plaques gezeigt werden (Saido et al. 1995). Bei 11pE-A β wird der Vorgang durch das Enzym Glutaminyl-Cyclase katalysiert, das bei der AK hochreguliert ist. So kommt es zu Verschlechterung von Gedächtnis und Lernfähigkeit sowie vermehrter Ausbildung von Plaques (Wirhth et al. 2009, Schilling et al. 2008). Pyroglutamyliertem A β wird eine ähnliche Toxizität wie A β 40 und A β 42 zugeschrieben (Tekirian 2001, Youssef et al. 2008).

Im Gegensatz zu den eben beschriebenen pathologischen Modifikationen mit resultierender Plaqueaggregation wird A β physiologisch nach Synthese aus APP in die Blutbahn bzw. den Liquor (CSF) ausgeschieden oder durch verschiedene Enzyme wie das Insulin-abbauende Enzym (IDE), Nephrisilin (NEP), das Endothelin-umwandelnde Enzym (ECE-)1 und ECE-2 zu weniger toxischen Metaboliten abgebaut (Miners et al. 2008, Bates et al. 2008, Eckman and Eckman 2005).

2.1.3 Bildung von extrazellulären A β -Plaques

Die neuropathologischen Mechanismen der AK sind noch nicht vollends verstanden. Dies zeigt sich anhand der unterschiedlichen Hypothesen, die in den letzten 25 Jahren aufgestellt wurden. Im Jahr 1992 wurde von Hardy et al. erstmalig die Amyloid-Kaskaden-Hypothese veröffentlicht, die in den folgenden Jahren mehrfach modifiziert wurde (Hardy and Higgins 1992, Hardy and Selkoe 2002, Herrup 2010).

Die klassische Amyloid-Hypothese geht davon aus, dass es durch APP- und Präsennilin-Mutationen (familiäre Form von AK) oder vermindertem A β -Abbau (sporadische Form der AK) zu erhöhten extrazellulären A β -Spiegeln in verschiedenen Arealen des Gehirns kommt. In der Folge werden vermehrt extrazelluläre A β -Plaques gebildet. Diese führen zu Dysfunktion und Verlust von Nervenzellen und Synapsen, wodurch diese Hirnareale atrophieren und es zu Gedächtnisverlust und weiteren typischen AK-Symptomen kommt (Wirhth and Bayer 2009). Gegenstand aktueller Diskussionen ist jedoch die Rolle intrazellulärer A β -Akkumulationen, die der Ablagerung erster extrazellulärer Plaques vorausgehen und vor allem bei Patienten mit beginnender Demenz und kurzer Krankheitsdauer nachgewiesen werden konnten (Gouras et al. 2010). Laut der modifizierten Amyloid-Hypothese kommt es nach erhöhten intrazellulären A β -Spiegeln zu einer gesteigerten Akkumulation extrazellulärer, löslicher A β -Peptide, insbesondere der toxischen Subform A β 42 (Wirhth and Bayer 2009).

2.2 Neurofibrillenbündel

Neben der Entstehung von pathologischen A β -Peptiden und konsekutiver Aggregation von extrazellulären A β -Plaques spielt das Tau-Protein eine wichtige Rolle. Es kommt in Axonen von Neuronen vor und dient dort physiologisch der Stabilisierung der Mikrotubuli (Binder et al. 1985, Sergeant et al. 2008). Durch verschiedene Enzyme wird dabei die Homöostase von Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Tau-Proteine aufrechterhalten. Kinasen wie die Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), die Mikrotubuli-Affinität regulierende Kinase (MARK), die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), die Extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), die Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II, die c-Jun N-terminale Kinase, Protein Kinase B (AKT/PKB) sowie die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) vermitteln eine Phosphorylierung. Auf der

anderen Seite sorgen die Protein-Phosphatasen (PP) 2A, 2B und 1 für eine Dephosphorylierung. PP 2A stellt dabei die wichtigste Phosphatase dar und ist bei der AK herunterreguliert (Iqbal and Grundke-Iqbal 2008). Es folgt eine Hyperphosphorylierung und somit eine pathologische Störung der Enzym-regulierten Homöostase des Tau-Proteins. Dadurch verliert das Protein seine Mikrotubuli-bindenden Eigenschaften und löst sich von diesen ab. Stabilisierung und Weitertransport sind im Axon somit nicht mehr gewährleistet (Feinstein and Wilson 2005, Mandelkow et al. 2003). Das hyperphosphorylierte Tau-Protein wird anschließend in das somatodendritische Kompartiment verschoben. Dort bilden sich paarige spiralförmige Filamente (PHF) und pathologische Neurofibrillenbündel (NFT) werden formiert (Trojanowski and Lee 1994). Dies führt zu Zelltod und dem bei der AK typischen Symptom der Gedächtnisverschlechterung (Guillozet et al. 2003).

Neben der Akkumulation von A β und der Bildung von Fibrillen gibt es zunehmend Hinweise auf weitere Pathomechanismen wie mitochondriale Dysfunktion und Neuroinflammation, die sich gegenseitig zu beeinflussen und auch zu verursachen scheinen. Man vermutet, dass A β und pathologische Tau-Proteine die Mitochondrien auf struktureller und bioenergetischer Ebene beschädigen und auch die Transport- und Kommunikationsfunktion der Mitochondrien negativ beeinflusst wird. Insuffiziente Mitochondrien können letztlich nicht mehr die Energie liefern, die für die neuronale Integrität und Funktionalität gebraucht wird und über die Ausschüttung von verschiedenen Zytokinen wie TNF- α und IL-8 eine Neuroinflammation induzieren, wie sie bei der AK zu beobachten ist. Viele Forschungsgruppen setzen sich mittlerweile das Ziel, über eine Verbesserung der mitochondrialen Funktion neurodegenerative Erkrankungen wie die AK präventiv zu verhindern.

3. Allgemeine Risikofaktoren

Die beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge der AK können durch eine Reihe von verschiedenen Risikofaktoren begünstigt werden. Alter stellt den wichtigsten Risikofaktor dar (Querfurth and Laferla 2010, Hussain et al. 2014). Weiterhin können vaskuläre Risikofaktoren wie Hypertonus, Diabetes Mellitus oder Hypercholesterinämie, weibliches Geschlecht, Schädel-Hirn-Traumata sowie ungünstige Ernährung mit Vitamin B12-Mangel, Folsäure-Mangel oder Homocysteinämie die Pathogenese von AK fördern

(Cheng et al. 2012, Craft 2009, Lobo et al. 2000, Miech et al. 2002, Mortimer et al. 1985, Seshadri et al. 2002).

Daneben sind aber auch genetische Ursachen bekannt (**Abb. 4**): So erhöht ein Polymorphismus des Apolipoprotein E4 (APOE4)-Allels nachweislich die A β Menge im Gehirn (Selkoe 2001, Schoemaker et al. 2017, Yamazaki et al. 2019). Gene, die die Proteine APP, Presenilin-1 (PSEN-1) und PSEN-2 kodieren, steigern die Produktion von pathologischen A β 42-Peptiden und sind Ausgangspunkt der familiären Form der AK (Selkoe 2001).

Chromosome	Protein	Function	Gene defect	Phenotype
21q21.2	APP	A β generation	APP mutation	Inc. production of all A β peptides or A β 40 peptide
14q24.3	PSEN1	A β generation	PSEN1 mutation	Inc. production of A β 42 peptide
1q31-q42	PSEN2	A β generation	PSEN2 mutation	Inc. production of A β 42 peptide
10q.23.33	IDE	A β degradation	IDE mutation	Dec. degradation of A β peptides
19q13.2	APOE	A β clearance/export, A β oligomerization	APOE-4 polymorphism	Dec. density of A β plaques and vascular deposits

Inc., increased; Dec., decreased; APP, amyloid precursor protein; A β , β -amyloid; PSEN, presenilin; IDE, insulin-degrading enzyme; APOE, apolipoprotein E.

Abb. 4: Darstellung aller bekannten AK-assoziierten Genmutationen, der beteiligten Chromosomen sowie der Mechanismen, über die die Menge an A β -Peptiden erhöht wird (Jiang and Jiang 2015)

4. Anästhesie und die Alzheimer-Krankheit

Neben den bereits genannten Risikofaktoren ist auch die Verwendung von Anästhetika bei älteren Menschen problematisch. Eckenhoff et al. konnten in einem experimentellen Setting den neurotoxischen Einfluss einiger inhalativer Anästhetika nachweisen (Eckenhoff et al. 2004, Tang and Eckenhoff 2013). Diese steigerten die pathologische A β -Akkumulation und potenzierten die A β -induzierte Zytotoxizität in Rattenzellen. Weiterhin zeigte sich im Maus Modell weiterer Studien eine Verschlechterung von Gedächtnis und Lernfähigkeit nach einer Isoflurannarkose (Bianchi et al. 2008).

Anästhetika nehmen bekanntermaßen direkten Einfluss auf den Hippokampus, einer wichtigen Struktur für das Kurzzeitgedächtnis (Ologunde and Ma 2011). Dort antagonisieren sie N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und aktivieren inhibierende Gamma-Aminobutyric-Acid (GABA)-Rezeptoren (McGaugh and Izquierdo 2000). So bewirken sie schon in niedrigen Konzentrationen eine kurzzeitige Amnesie. Über eine Verschiebung des Neurotransmitterverhältnisses kann es somit zu Dysregulationen im Hippokampus, kognitiver Dysfunktion und neuronaler Apoptose kommen (Ikonomidou et al. 2009). Weiterhin werden nikotinerge Acetylcholin-Rezeptoren, denen eine wichtige Rolle bei kognitiven Prozessen zugeschrieben wird, pathologisch verändert (Mandal et al. 2009, Hogg et al. 2003). So konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass inhalative Anästhetika das Gedächtnis und Lernprozesse verschlechtern sowie funktionelle Veränderungen im zentralen Nervensystem (ZNS) bewirken (Menuet et al. 2012, Olney et al. 2002, Jevtovic-Todorovic et al. 2003). Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass durch Isofluran proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL- β und IL-6 freigesetzt werden (Vanderweyde et al. 2010, Wu et al. 2012). Diese können Gliazellen im Gehirn dazu anregen, weitere Zytokine auszuschütten und somit eine die AK zusätzlich verschlechternde Neuroinflammation zu begünstigen (Akiyama et al. 2000, Cameron and Landreth 2010, Wilson et al. 2002, Mcgeer and Mcgeer 1995).

Ein weiterer neurotoxischer Mechanismus inhalativer Anästhetika besteht außerdem in der Störung der Calcium-Homöostase (Wei and Xie 2009, Yang et al. 2008). Physiologisch spielt Calcium bei der Ausschüttung von Neurotransmittern eine wichtige Rolle. Durch den stimulierenden Effekt inhalativer Anästhetika auf den Rezeptor Inositol Triphosphat (IP3) wird aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermehrt Calcium ausgeschüttet. Dadurch kommt es zu einer pathologischen Missbalance, die die Neurotransmission stört (Ologunde and Ma 2011, Yang et al. 2008).

Die Relevanz der Untersuchung des Zusammenhangs von Narkose und der AK wird besonders vor dem Hintergrund deutlich, dass jedes Jahr über 234 Millionen Menschen weltweit für eine Operation narkotisiert werden müssen, wovon circa 66 Millionen älter als 65 Jahre sind (Xie and Xu 2013). Bei einer Inzidenz der AK von 13% (siehe Punkt 1.) in dieser Alterskategorie ist also bei 8,5 Millionen AK-Patienten jedes Jahr eine Narkose erforderlich. Weiterhin lässt **Abb. 5** beispielhaft nicht nur einen Zuwachs der älteren Bevölkerung im Verlauf der Jahre bis 2051 vermuten, sondern auch eine Zunahme des Bedarfs an Anästhetika innerhalb dieser älteren Bevölkerung. Es ist somit von großer Bedeutung, mögliche neurotoxische Einflüsse von Anästhetika aufzudecken.

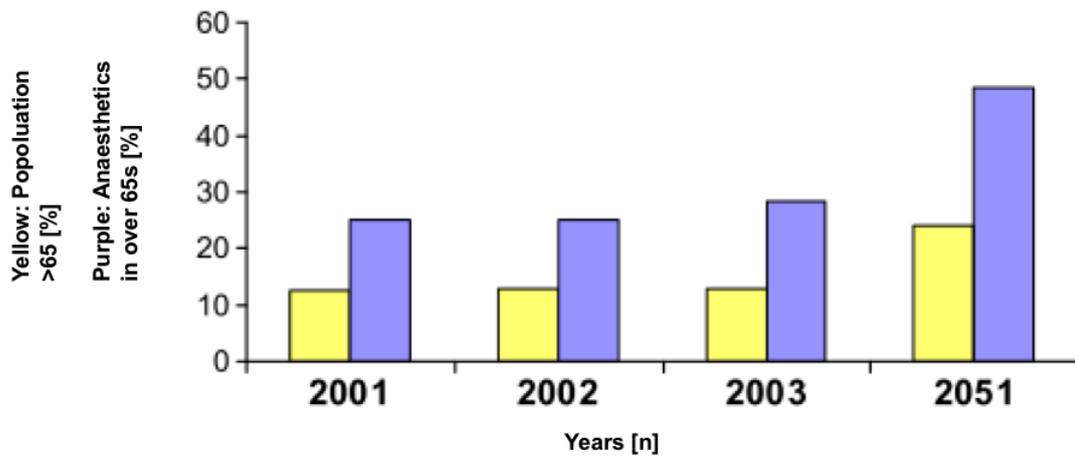


Abb. 5: Darstellung der Zunahme des prozentualen Anteils sowohl der älteren Bevölkerung per se (gelber Balken), als auch des prozentualen Anteils des Bedarfs an Anästhetika innerhalb der älteren Bevölkerung (lila Balken) im Verlauf der Jahre bis 2051 (Silbert et al. 2011)

V. FRAGESTELLUNG

In der vorliegenden experimentellen Arbeit soll im Maus Modell die Neurotoxizität verschiedener löslicher A β Subformen mittels Injektion in den Seitenventrikel untersucht werden. Hierfür wurden entweder A β 1-42 (A β 42), A β 1-40 (A β 40), 3NTyr10-A β (A β nitro), A β pE3-42 (A β pyro), eine isopotente Mischform aller Subformen (A β mix) oder Phosphate Balanced Saline (PBS) über eine zuvor implantierte intracerebroventrikuläre Kanüle injiziert.

Einige Untersuchungen deuten auf einen neurotoxischen Effekt einer Narkose mit Isofluran hin. Im Rahmen dieser Studie soll deshalb auch die Interaktion von Isofluran mit den oben genannten A β Subformen näher analysiert werden.

Die eine Hälfte der Tiere wurde deshalb vier Tage nach Injektion für zwei Stunden mit Isofluran narkotisiert, während die andere Hälfte einer „Sham“-Prozedur unterzogen wurde.

Mittels modifiziertem Holeboard-Test wurden Kognition und Verhalten analysiert.

VI. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Die durchgeführten Experimente wurden durch die Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-111-12) genehmigt. Es wurden 72 männliche C57BL/6 Versuchsmäuse (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von zehn Wochen verwendet. Sie waren in einem speziell für Tierhaltung konzipierten Raum der Klinik für Anästhesiologie des Klinikums rechts der Isar bei Temperaturen zwischen 21 und 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % ± 15% untergebracht. Eine Zeitschaltautomatik gewährleistete einen natürlichen Hell-Dunkel Rhythmus von jeweils 12 Stunden. Dabei dauerte die Dunkelphase von 15 Uhr bis 3 Uhr. Jeweils ein Tier wurde in einem Laborstandardkäfig (Makrolonkäfig Typ II) mit Wasser und Pellets (Altromin Haltungsdiät, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage) ad libitum untergebracht. Die Käfige waren mit Holzspänen, autoklaviertem Heu und einer durchsichtigen roten Plastikröhre als Behausung ausgestattet. Die Pflege und Beobachtung der Versuchstiere erfolgte täglich durch Mitarbeiter der Klinik. Einmal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt.

2. Versuchsplan

Für die Studie wurden insgesamt 72 Versuchstiere verwendet. Diese wurden mittels einer Computer-generierten Randomisierungsliste in sechs Gruppen zu je 12 Tieren eingeteilt: Aβ 40, Aβ 42, Aβ pyro, Aβ nitro, Aβ mix und PBS. In jeder Gruppe erhielt die eine Hälfte (n=6) eine Isoflurannarkose, die andere Hälfte (n=6) erhielt eine „Sham“-Prozedur. Es ergaben sich letztlich 12 verschiedene Untergruppen (**Abb. 6**).

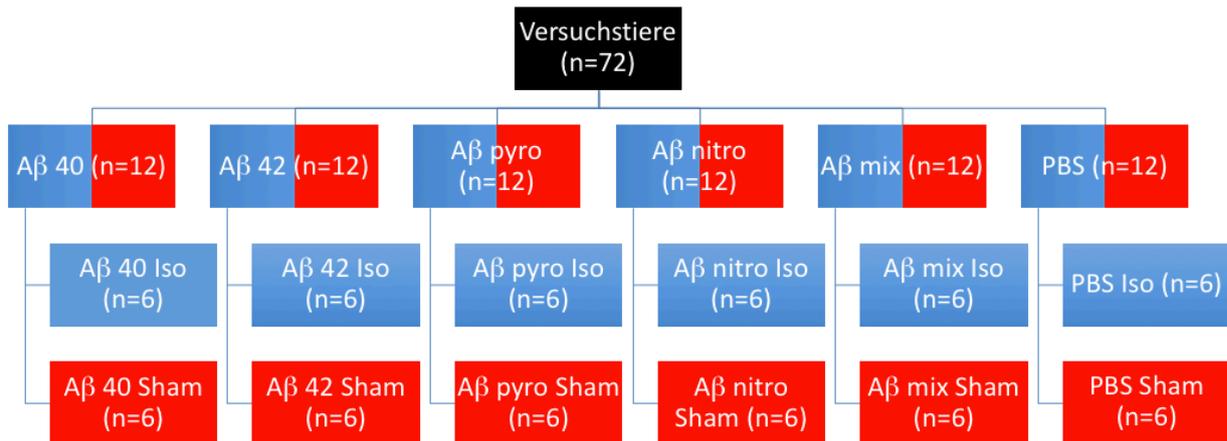


Abb. 6: Übersicht der Einteilung der Versuchstiere in 12 Untergruppen

Insgesamt dauerte die Versuchsreihe 28 Tage. Die chronologische Reihenfolge der Experimente ist dabei in **Abb. 7** dargestellt. An Tag 1 wurde jedem Versuchstier eine Kopfkanüle in den lateralen Seitenventrikel implantiert. Die Mäuse erholten sich dann 14 Tage lang von der Operation. An Tag 15 wurde über die implantierte Kanüle eine der folgenden Substanzen injiziert: Aβ 40, Aβ 42, Aβ nitro, Aβ pyro, eine Mischung der oben genannten (Aβ mix) oder Phosphate Balanced Saline (PBS). An Tag 19 fand eine Isofluran- bzw. „Sham“-Prozedur statt. Ein Tag später erfolgte dann der modifizierte Holeboard-Test (mHBT), mit dessen Hilfe der geblindete Untersucher für acht Tage Kognition, Verhalten sowie Motorik der Tiere testete. Am folgenden Tag wurden die Tiere in tiefer Isoflurannarkose dekapitiert, ihr Gehirn und eine Liquorprobe entnommen, welche zur weiteren biochemischen Analyse aufbewahrt wurden.



Abb. 7: Chronologische Reihenfolge der Experimente

3. Intraventrikuläre Kanülen-Implantation

3.1 OP-Vorbereitung

Gemäß des in **Abb. 7** gezeigten Experimentierplans erfolgte an Tag 1 die Implantation der Kanüle in den Seitenventrikel der Mäuse (ICV-Implantation). Dabei wurden die Mäuse vor der Kanülen-Implantation gewogen. Anschließend wurde die Narkose in einer Plexiglasbox mit 4 Volumenprozent (Vol. %) Isofluran eingeleitet. Nach Erlöschen der Stellreflexe wurde die Maus am Kopf rasiert (Aesculap exacta, Aesculap Suhl GmbH, Germany) und im Stereotakt (Scientifica, Uckfield, UK) fixiert. Die Narkose wurde mit 1,4 - 1,6 Vol. % Isofluran perioperativ fortgeführt.

3.2 Implantation

Zunächst erfolgte eine Lokalanästhesie im Bereich zwischen Kopf und Nacken durch 2%-iges Xylocain (Lidocainhydrochlorid, AstraZenaca GmbH, Wedel, Deutschland) subkutan. Dann wurde die Haut median bis zum Nacken inzidiert, um den Schädelknochen freilegen zu können (**Abb. 8**).

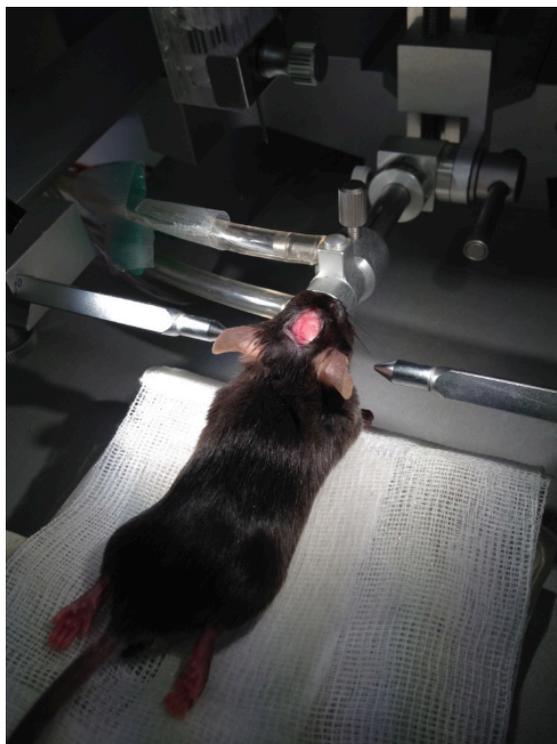


Abb. 8: Foto eines Versuchstiers im Stereotakt vor ICV-Implantation

Anschließend wurde der Stereotakt kalibriert, indem die Kanüle mittig auf Bregma platziert wurde. Von diesem Ausgangspunkt erfolgte die Markierung des Zielpunktes an den Koordinaten: x-Achse: 0,32 mm und y-Achse: 1,0 mm. Nachdem der Schädelknochen mit einem ätzenden Dentaladhäsiv (Optibond All-In-One KIT, Kerr Corporation, Orange, USA) aufgeraut wurde, wurde dort mit einem Bohrer (Hager und Meisinger GmbH, Neuss, Germany) ein kleines Loch bis zur weichen Hirnsubstanz gefräst. Mit dem Stereotakt wurde die Implantationskanüle (10 mm Länge, stumpfe Kanüle, 23 G, Sterican Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) 2,80 mm tief (z-Achse) im Seitenventrikel platziert. Die Platzierung erfolgte mittels Software gesteuerten Motoren am Stereotakten (Scientifica LinLab 2, Scientifica, Uckfield, UK). Mit einem Schraubendreher (Karmann & Droll e.K., Karlsfeld, Deutschland) wurde nach Bohren eines weiteren Lochs eine Schraube (DIN 84 Zylinderschrauben mit Schlitz AM 1,0 x 2 Niro A1, Karmann & Droll e.K., Karlsfeld, Deutschland) ca. 5 mm kaudal der Kanüle angebracht. Kanüle und Schraube wurden daraufhin mit Zahnzement (Dual Cement Base und Catalyst, Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein) verklebt, um die Kanüle am Kopf zu stabilisieren. Der Verschluss der Haut erfolgte mit jeweils einem Polypropylenfaden (Ethicon Prolene 4-0, Johnson & Johnson Intl., USA) vor und hinter der Kanüle. Das Tier erhielt zur postoperativen Schmerzlinderung gewichtsadaptiert (0,01 mg/g) Buprenorphin (Temgesic Ampullen, Indivior Eu Limited, Berkshire, Großbritannien) intraperitoneal.

Bis zum vollständigen Erlangen des Bewusstseins erholten sich die Tiere in der Aufwachbox (Wärmelampe, 100% Sauerstoff). Nach vollständiger Erholung wurden die Mäuse einzeln in Käfige gesetzt, um zu verhindern, dass sie sich gegenseitig an den ICV-Kanülen manipulieren.

4. A β -Injektion

Nachdem sich die Mäuse 14 Tage von der Operation erholten hatten, fanden an Tag 15 die Injektionen mit A β 1-42 (A β 42), A β 1-40 (A β 40), 3NTyr10-A β (A β nitro), A β pE3-42 (A β pyro), einer isopotenten Mischform aller Subformen (A β mix) oder PBS statt. Eine Hamiltonspritze (Microsyringe, Hamilton AG, Bonaduz, Schweiz) wurde mittels Schläuchen mit einer stumpfen Kanüle (30Gx1/2“ 0.30x12 mm BL/LB, B. Braun Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden. Diese wurde mit Silikon (RTV-1 Siliconkautschuk E41, Wacker Chemie AG Elastosil, München, Deutschland) am zweiten Schlauchstück befestigt, um das System abzudichten. Zur Aufbereitung von A β 1-42 wurde zunächst monomeres A β 1-42, das bei -20 °C gelagert und mit Hexafluorisopropanol (HFIP) aliquotiert wurde, in einem Wasserbad bei 37 Grad für zehn Minuten erwärmt und für 30 Sekunden in einem Ultraschallbad behandelt. Anschließend wurden 2 μ g des aliquotierten A β in 50 μ l NaOH (20 mmol/l, pH 12.2) gelöst und mit 775 μ l PBS verdünnt, um den Oligomerisierungsprozess zu starten. Dann wurde die Lösung wieder für 30 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und weitere 30 Sekunden mittels Vortexer durchmischt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, bevor die Lösung auf Eis gelegt wurde. Die fertige A β 1-42 Lösung wurde dann zwischen 15 und 45 Minuten nach Aufbereitung verwendet und 5 μ l dieser Lösung zehn Minuten vor Injektion in das Schlauchsystem aufgezogen. A β 1-40, A β 1-42 nitro und A β 1-40 pyro wurden mittels destilliertem Wasser (Aqua dest.) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Injektion wurden die Substanzen mit der in **Tab. 1** angegebenen Menge an PBS gemischt, um isopotente Konzentrationen herzustellen, die aus anderen Versuchen bekannt sind (Rammes et al. 2018). Bei diesen Konzentrationen konnte bereits eine in vitro Toxizität auf die LTP in hippokampalen Gehirnschnitten beobachtet werden. Auch hier erfolgte eine Injektion von 5 μ l in den Seitenventrikel. Die Subform A β mix ist eine Mischung von jeweils gleiche Mengen A β 1-42, A β 1-40, A β 1-42 nitro und A β 1-40 pyro. Nachdem die verschiedenen Subformen aufbereitet und in das Schlauchsystem aufgezogen wurden, wurde für den Injektionsvorgang das Tier aus dem Käfig genommen und am Nacken fixiert. Anschließend wurde die Spitze des Schlauchsystems in die Kopfkannüle der Maus gefädelt und die raumtemperaturwarme Lösung über einen Zeitraum von einer Minute in den Seitenventrikel der Maus injiziert. Nach der Injektion wurde das Tier in seinen Käfig zurückgesetzt und über einen Zeitraum von zehn Minuten beobachtet.

	Aβ 1-42	Aβ 1-40	Aβ nitro	Aβ pyro
Aliquotierungsmedium	HFIP	Aqua dest.	Aqua dest.	Aqua dest.
Molekulargewicht in g/mol	4.514,04	4.329,90	4.556,00	4.309,90
Zielkonzentration in nmol/l	100	450	100	1700
Liquorvolumen in μl	35	35	35	35
Molmasse in pmol	3,5	15,8	3,5	59,5
Gewicht in ng	15,8	68,2	15,9	256,0
Zielkonzentration in nmol/l bei 5 μl Injektionsvolumen	700	3.200	700	11.900
Aβ Aliquot Gewicht in μg	2	5	2	10
Aβ Aliquot Volumen in μl		25	10	10
Verdünnungsmenge PBS in μl	775	342	617	185
Endvolumen in μl	825	367	627	195
Endkonzentration in nmol/l	700	3.200	700	11.900

Tab. 1: Konzentrationen und Eigenschaften der verschiedenen injizierten A β Subformen

5. Isoflurannarkose und „Sham“-Prozedur

5.1 Narkosevorbereitung

An Tag 4 nach Injektion der A β Subformen fand die Isoflurannarkose bzw. die „Sham“-Prozedur der Mäuse statt. Im Rahmen der Narkosevorbereitung wurde dazu zunächst für eine ruhige und verdunkelte Umgebung gesorgt. Im nächsten Schritt wurde die Narkosegasabsaugung aktiviert, Kompressen vor die Öffnungen in den Beatmungsschläuchen gelegt, der O₂- und Luft-Anschluss mit dem jeweiligen Wandauslass konnektiert und Isofluran im Vapor aufgefüllt. Das halboffene Narkosekreissystem wurde auf einen positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 5 mbar eingestellt. Zwei Monitore dienten der Überwachung von Herz- und Atemfrequenz sowie Temperatur. Die Einleitungsbox wurde mit 4,5 Vol% Isofluran und 50% O₂ geflutet.

5.2 Narkoseeinleitung und -führung

Für die anschließende Narkose wurde ein Tier in die Einleitungsbox gesetzt. Nach Verlust der Stellreflexe wurde die Schnauze des Tieres zügig in den Öffnungen der Beatmungsschläuche platziert. Die Tiere atmeten während der Narkose spontan. Mittels Isofluranvapor wurden 1,5 - 2,0 Vol.% Isofluran appliziert. Nach einer Phase der Äquilibration wurden folgende im Expirationsschenkel gemessene Zielwerte angestrebt: FiO₂: 0,5%, Isofluran: 1,6 Vol.% und PEEP: 5 mmHg. Sobald die Tiere narkotisiert waren, wurde ein subkutanes Elektrokardiogramm (EKG) und eine rektale Temperatursonde als Monitoring angebracht. Die Augen wurden mit einer Salbe (Bepanthen Augen und Nasensalbe, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) geschützt. Die Tiere wurden mit einer Kompresse zugedeckt, um sie vor Auskühlung zu schützen. Alle 10 - 15 Minuten wurden Herz- und Atemfrequenz sowie Temperatur in einem Narkoseprotokoll erfasst. Richtwerte waren dabei eine Herzfrequenz von 400/min, eine Atemfrequenz von 100/min sowie eine Temperatur von 37,5°C +/- 0,5. Im Rahmen der „Sham“-Prozeduren wurden die Tiere für zehn Minuten in die Narkosebox ohne Isoflurangas gesetzt, um die Ein- und Ausleitung zu simulieren.

5.3 Narkoseausleitung

Nach zwei Stunden wurde die Narkose ausgeleitet. Dabei wurde das Monitoring abgebaut, die Tiere wurden einzeln gewogen und in die Einleitungsbox mit 50% Sauerstoff zurückgelegt. Sobald sich die Tiere koordiniert in der Einleitungsbox bewegten, wurden sie zurück in ihre jeweiligen Käfige gesetzt.

6. Modifizierter Holeboard-Test

6.1 Testprinzip

Beginnend am Tag nach den Narkosen erfolgte schließlich der modifizierte Holeboard-Test über acht Tage. Dabei war der Untersucher geblindet, d.h. er wusste nicht, welche Maus zu welcher Gruppe gehörte. Der mHBT kann als räumlich-sensorisch orientierter Verhaltenstest verstanden werden, mithilfe dessen gleichzeitig Kognition, Verhalten und Motorik von Mäusen mittels spezieller Parameter analysiert werden können. Dazu wird der mHBT unter möglichst stressfreien und standardisierten Bedingungen bei der Maus durchgeführt. Durch die Untersuchung unterschiedlicher Parameter lassen sich dann Schlussfolgerungen auf die Funktionsfähigkeit verschiedener Gedächtnissysteme, auf bestimmte Verhaltensweisen wie Angst- oder Explorationsverhalten sowie auf die motorische Geschicklichkeit ziehen.

6.2 Versuchsaufbau

Die Apparatur des mHBT stellt dabei eine quadratische Box dar, die aus fünf 52 x 52 x 52 cm großen, undurchsichtigen grauen Polyvinylchlorid (PVC) Platten besteht. Das für Mäuse entwickelte Holeboard befindet sich im ungeschützten Zentrum dieses offenen Feldes, das durch Klebestreifen (1 cm Breite) in neun gleich große Rechtecke (ca. 16 cm x 16 cm) eingeteilt ist (**Abb. 9**).

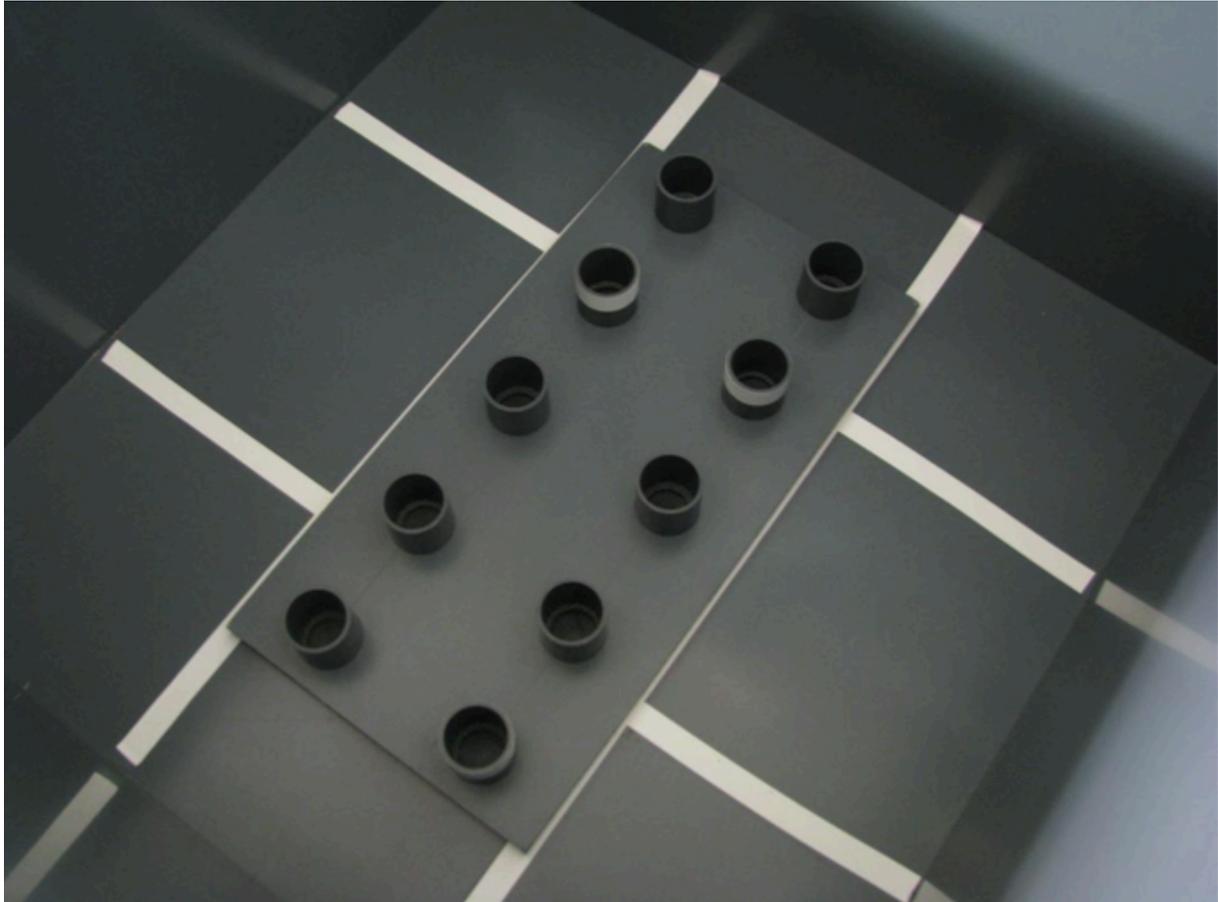


Abb. 9: Versuchsanordnung bestehend aus der in neun Rechtecke eingeteilten Versuchsanlage sowie dem zentral liegendem Lochbrett mit zehn aufgesteckten Zylindern (Fendl 2013)

Dieses Lochbrett besteht aus einer ebenfalls undurchsichtigen, grauen PVC-Platte mit den Maßen 35 cm x 18 cm x 1 cm (eigene Herstellung der Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“, Klinikum rechts der Isar, München). Darauf sind jeweils fünf 0,3 cm tiefe Löcher mit einem Durchmesser von 3,2 cm in zwei parallelen Reihen eingelassen. Diese besitzen einen äußeren ringförmigen Absatz, auf den die 3,4 cm hohen grauen PVC-Zylinder aufgesteckt werden können. Alle zehn Zylinder werden mit einem Mandelstück (Kalifornische Mandeln gehackt, REWE Group, Köln) versehen. Dabei bewirkt ein feinmaschiges Gitter, das auf den ringförmigen Absatz gelegt wird, dass die Mandeln für die Mäuse von außen unerreichbar sind. Jeweils drei der zehn Zylinder werden mit einem weißen Klebeband (1 cm Breite) optisch markiert und mit einer Mandel als Futterbelohnung oberhalb des Gitters versehen (**Abb. 10**).

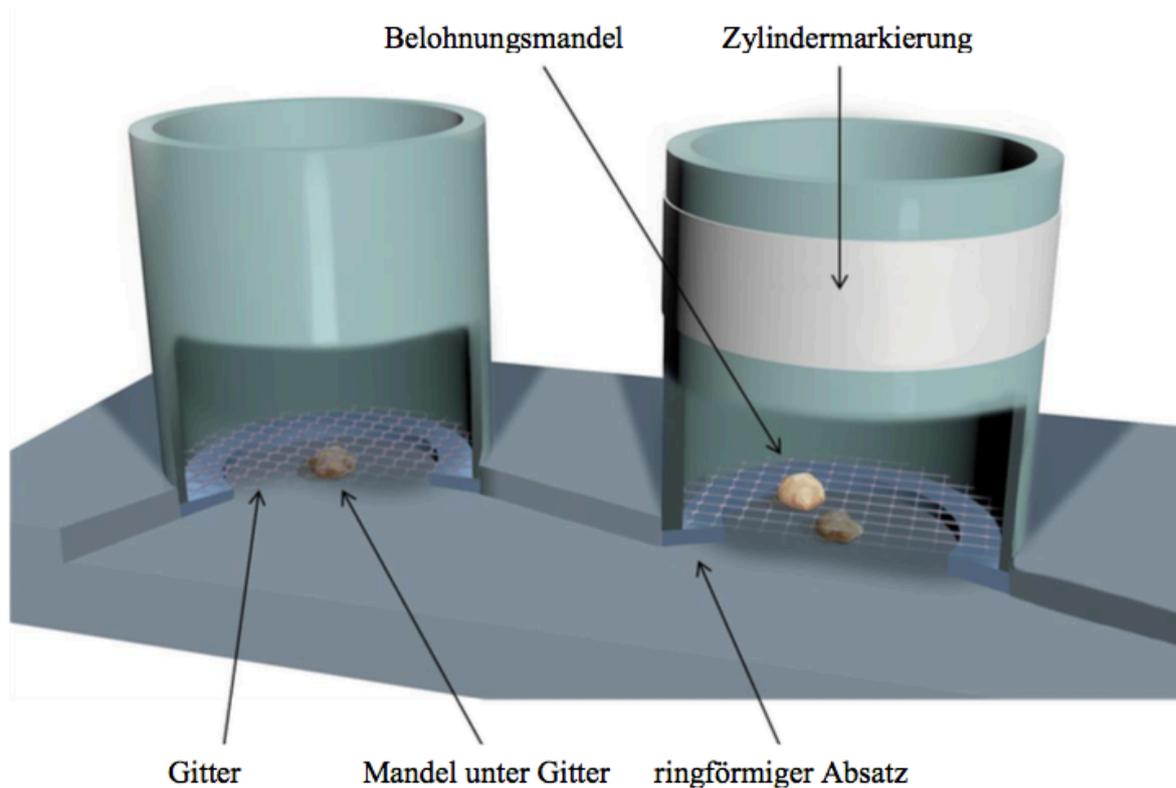


Abb. 10: Schemahafte Darstellung eines unmarkierten Zylinders mit Mandel unterhalb des Gitters (links) sowie eines markierten Zylinders mit Mandel oberhalb und unterhalb des Gitters (rechts) (Fendl 2013)

Die markierten Zylinder wechseln dabei jeden Versuchstag nach einem randomisierten Schema (**Tab. 2**).

Versuchstag	Lochnummern
Tag 1	2 / 7 / 8
Tag 2	1 / 4 / 9
Tag 3	3 / 5 / 8
Tag 4	1 / 4 / 10
Tag 5	2 / 5 / 9
Tag 6	3 / 6 / 9
Tag 7	4 / 8 / 10
Tag 8	2 / 5 / 8

Tab. 2: Übersichtstabelle der randomisierten Verteilung der Mandeln auf die jeweiligen Zylinder an den verschiedenen Tagen (nach Arbeitsgruppe „Experimentelle Anästhesie“, Klinikum rechts der Isar, München)

6.3 Versuchsvorbereitung

Bevor die Tiere im mHBT getestet werden konnten, musste eine Reihe von Vorbereitungen getroffen werden. Die Mäuse wurden vier Tage vor Testbeginn mit jeweils 12 Mandeln (maximal fressbare Anzahl von Mandeln pro Tag) angefüttert. Somit wurde verhindert, dass die Tiere initial scheues Verhalten zeigen, da sie die Mandeln als Futterbelohnung nicht kennen. Vor Versuchsbeginn wurde weiterhin unter das Gitter jedes einzelnen Zylinders ein Mandelstück gelegt sowie deren Innenseite mit 0,3% Vanillearomalösung (Th. Geyer GmbH & Co. KG, Höxter-Stahle) ausgestrichen, damit alle Löcher gleich rochen und die Tiere die Futterbelohnungen nicht mit ihrem Geruchssinn finden konnten. Da Randzeiten des Tag-Nacht-Rhythmus den optimalen Zeitpunkt für Verhaltenstests darstellen, wurde der mHBT jeden Tag um 15 Uhr begonnen, sobald es im Tierhaltungsraum dunkel wurde. Außerdem wurden die Tiere nach Versuchsbeginn alle zwei Tage gewogen.

6.4 Versuchsablauf

Der mHBT wurde an acht aufeinander folgenden Tagen zur Hauptaktivität der Mäuse in den ersten Stunden der Dunkelphase durchgeführt. Dabei fand der tägliche Versuchsablauf nach einem festen Schema statt. Zunächst wurde das Computerprogramm zur Erfassung der Daten (The Observer 5.0, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande) gestartet. Anschließend wurde der mHBT vorbereitet (siehe Punkt 6.3). Drei Zylinder wurden nach dem bereits oben beschriebenen randomisierten Schema mit einer Mandel oberhalb des Gitters bestückt. Beim ersten Durchlauf des ersten Versuchstages wurde eine zusätzliche Mandel in das Rechteck der Holeboard Arena gelegt, in das die Maus zu Beginn eines jeden Durchlaufs abgesetzt wurde. Dadurch konnte der erste Kontakt der Maus mit dem mHBT mit einem positiven Erlebnis verbunden werden. Der Untersucher, der zwischen Versuchsarena und Computer stand, nahm die Maus mit der linken Hand aus dem Käfig und setzte diese in das linke, obere Rechteck, während zeitgleich mit Loslassen des Tieres durch die rechte Hand die Datenerfassung auf der Computer Tastatur begonnen wurde. Diese fand zeitlich synchron zu den Tieraktionen statt. Der Durchlauf endete nach der letzten Futteraufnahme, andernfalls nach maximal fünf Minuten. Insgesamt fanden pro Versuchstag vier Durchgänge statt, wobei die Reihenfolge der Tiere in jedem Durchgang

und jedem Versuchstag variiert wurde. Nach jedem Durchgang wurde die Maus wieder in ihren Käfig zurückgesetzt und die Arena mit befeuchteten Zellstofftüchern gereinigt.

6.5 Dokumentation

Die Aktionen der Versuchstiere wurden während des mHBT digital erfasst. Zur Stressreduktion für die Tiere wurde eine geräuscharme Tastatur aus Silikon (Folable Keyboard „Fold-2000“, Taiwan) verwendet.

6.6 Untersuchte Parameter

Beim mHBT können die Tieraktionen durch eine Vielzahl verschiedener Parameter erfasst werden. Dabei lassen sich kognitive Leistungen, verschiedene Verhaltensmuster sowie motorische Fähigkeiten der Versuchstiere analysieren (Ohl et al. 2001, Gordan et al. 2012, Ohl 2003).

6.6.1 Kognitive Parameter

Durch Untersuchung von kognitiven Parametern können Lernleistung und Motivation von Versuchstieren beurteilt werden. Zudem können das deklarative Gedächtnis sowie das Arbeitsgedächtnis analysiert werden. Dabei lassen sich die einzelnen Gedächtnissysteme unterschiedlichen Gehirnstrukturen zuteilen und somit Rückschlüsse auf Lokalisationen der Beeinträchtigungen im Gehirn ziehen (**Abb. 11**).

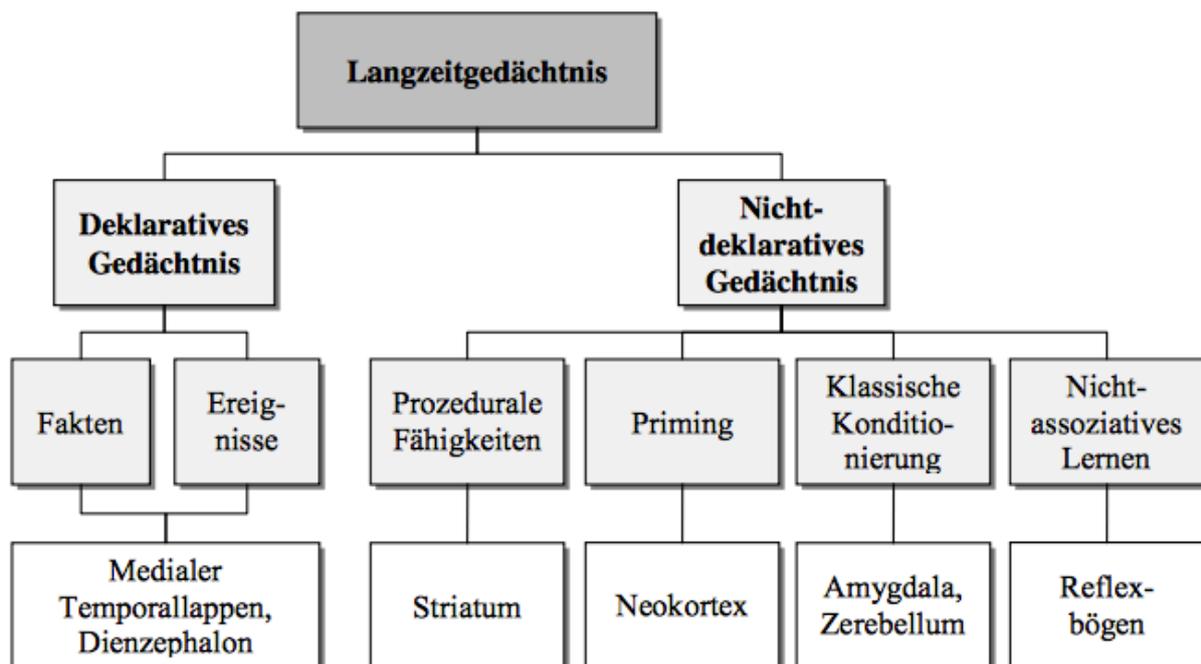


Abb. 11: Systematische Übersicht über die Einteilung des Langzeitgedächtnisses mit den jeweils beteiligten Hirnstrukturen (Squire and Zola 1996)

Im mHBT soll das Versuchstier lernen, die Zylinder mit der Futterbelohnung aufzusuchen. Die Gesamtzeit eines Durchlaufs („Time Trial“) dient somit als Indikator für Lernleistung

und Motivation. Das deklarative Gedächtnis, das im Hippokampus lokalisiert und damit bei dessen Schädigung beeinträchtigt ist, kann weiterhin durch die Anzahl der falsch besuchten Löcher ohne Markierung („Wrong Choices“) sowie der Anzahl nicht besuchter, markierter Löcher („Omission Errors“) dargestellt werden (Squire, Zola 1996). Der letztere Parameter wird weiterhin durch die Motivation des Versuchstiers beeinflusst. „Wrong Choices“ und „Omission Errors“ können zum Gesamtfehler eines Durchlaufs („Wrong Choices Total“) zusammengefasst werden. Das Arbeitsgedächtnis wird dagegen durch die Anzahl wiederholter Besuche von markierten, zuvor entleerten Löchern („Repeated Choices“) repräsentiert (Ohl and Fuchs 1999, Baddeley 2003).

6.6.2 Verhaltensparameter

Neben der Kognition kann beim mHBT ebenso das Verhalten untersucht werden. Dieses lässt sich in Angstverhalten, gerichtetes Explorationsverhalten, ungerichtetes Explorationsverhalten und Erregung unterteilen. Dabei wird das Angstverhalten durch die Gesamtzeitzeit bestimmt, die das Tier auf dem Board verbringt („Time on Board“) sowie durch die Latenzzeit bis zum ersten Betreten des Boards („Latency First Board Entry“). Zur Analyse der gerichteten Exploration wird die Latenzzeit bis zum ersten Lochbesuch („Latency First Hole Visit“) gemessen und die Gesamtzahl der besuchten Löcher mit Futterbelohnung („Correct Hole Visit“) gezählt. Die ungerichtete Exploration wird mittels der Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine („Rearings“) erfasst. Als Maß für die Erregung dient der Kotabsatz („Boli“) sowie die Gesamtzeit der Putzphasen („Grooming“).

6.6.3 Motorische Parameter

Weiterhin können durch den mHBT auch motorische Fähigkeiten von Mäusen untersucht werden. Dabei wird eine Unterscheidung zwischen lokomotorischer Aktivität und motorischer Geschicklichkeit gemacht. Der Parameter „Line Crossing“, d.h. die Anzahl der Linienüberquerungen, dient dabei der Darstellung lokomotorischer Bewegungsaktivität. Als Maß für die motorische Geschicklichkeit wird die Zeit gemessen, die das Tier für den Verzehr der Futterbelohnung benötigt („Time Food Intake“).

6.7 Statistische Analyse

Nachdem die Rohdaten des mHBT generiert wurden, erfolgte die Umwandlung mittels Excel 15.17 und die statistische Analyse des Körpergewichts und des mHBT in einem generalisierten linearen Modell durch Varianzanalyse. Um α -Fehler bei multiplem Testen zu vermeiden, wurde bei post hoc durchgeführten Einzelvergleichen eine Korrektur des Signifikanzniveau nach Bonferroni vorgenommen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert über alle Versuche innerhalb von zwei Tagen und Standardfehler dargestellt. Das Ergebnis galt als statistisch signifikant, sofern eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ vorlag. Die statistischen Ergebnisse wurden mithilfe des Computerprogramms IBM SPSS Statistics Version 23.0 (IBM Corporation, Armonk, USA) berechnet.

VII. ERGEBNISSE

1. Körpergewicht

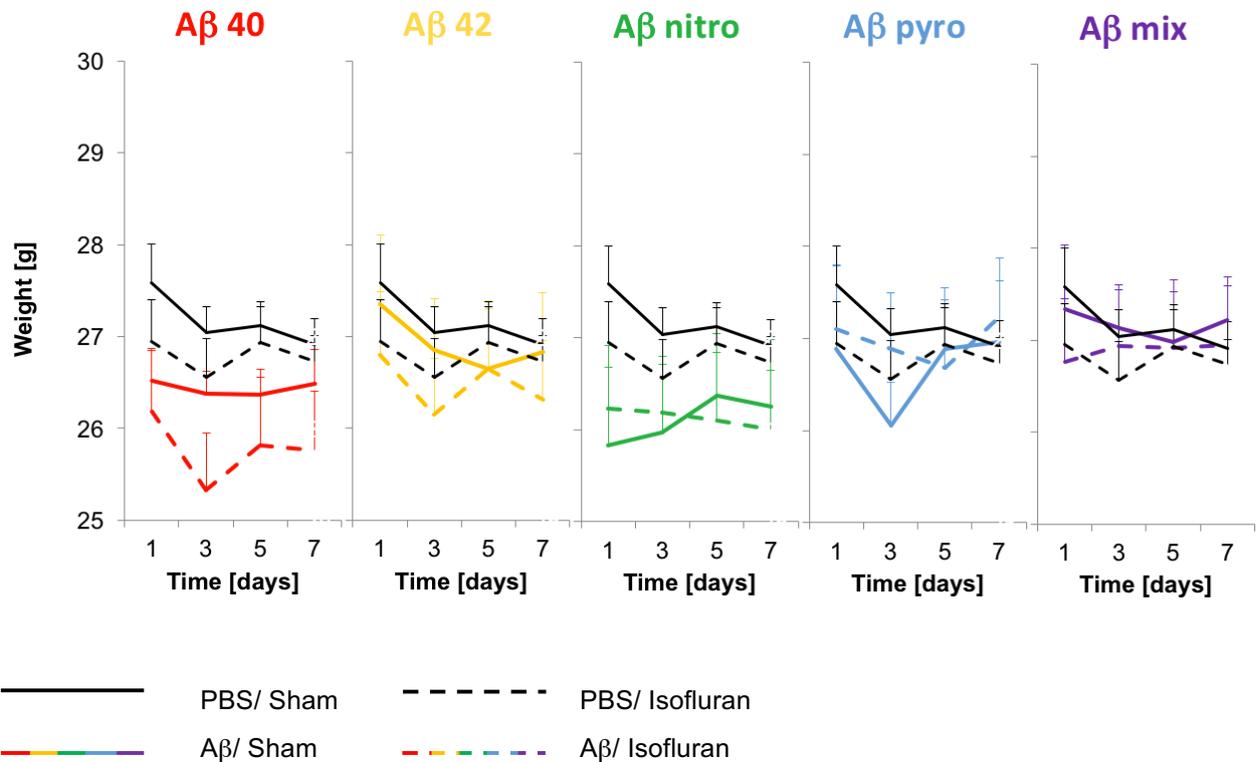


Abb. 12: Körpergewichtsentwicklung im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler

Alle zwei Tage wurden die Tiere vor Versuchsbeginn gewogen. **Abb. 12** zeigt, dass das Körpergewicht in allen Gruppen während der acht Versuchstage stabil blieb und den Zielvorgaben entsprach (25g +/- 10%). Es gab keinen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Sie waren bezüglich des Körpergewichts miteinander vergleichbar.

2. Kognitionsparameter

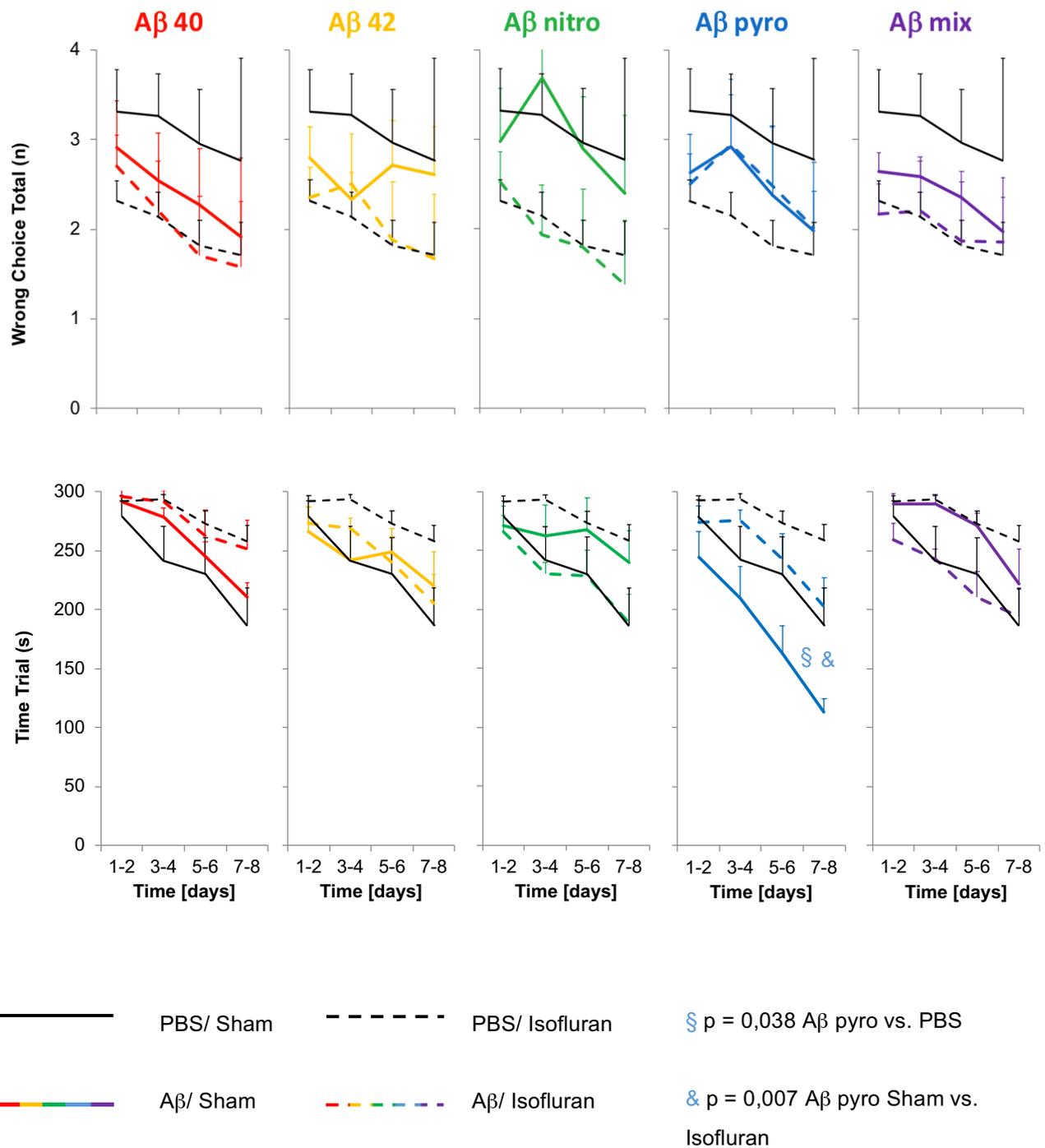


Abb. 13: Kognitionsparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler;
 oben: Wrong Choices Total, unten: Time Trial

Die Injektion von A β pyro reduzierte bei den Tieren dieser Gruppe die benötigte Zeit, um den Test zu beenden („Time Trial“). A β pyro verbesserte hier die kognitive Performance (A β pyro versus PBS: $p = 0,038$). Diese wurde durch die Isoflurannarkose rückgängig gemacht (A β pyro Sham versus Isofluran: $p = 0,007$). Das deklarative Gedächtnis, dargestellt durch „Wrong Choice Total“, war zwischen den verschiedenen A β Subformen und PBS vergleichbar.

3. Angstparameter

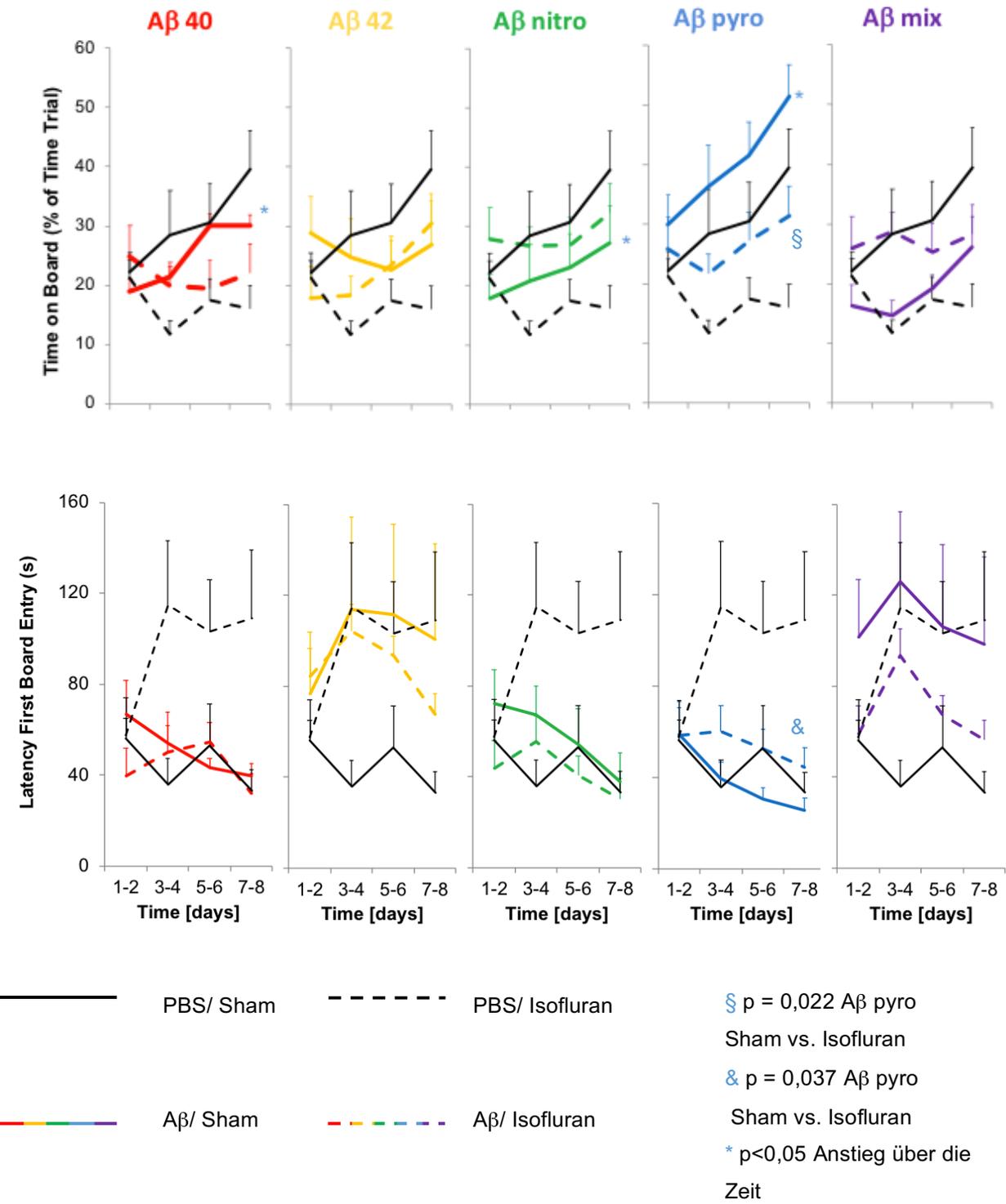


Abb. 14: Angstparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler;
oben: Time on Board, unten: Latency First Board Entry

Die Angst der Mäuse, repräsentiert durch den Parameter „Time on Board“, nahm über die Testtage in Aβ 40/Sham ($p = 0,007$), Aβ nitro/Sham ($p = 0,029$) und Aβ pyro/Sham ($p = 0,008$) ab. Diese Abnahme war bei den Mäusen, denen zuvor Aβ 42 injiziert worden war, nicht statistisch signifikant ($p = 0,079$). Bei der Latenz, bis zu der die Mäuse das erste Mal das Board betraten („Latency First Board Entry“) gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Aβ Subformen und PBS. Bei den Tieren, denen zuvor Aβ pyro injiziert worden war, nahm nach einer Isoflurannarkose die „Time on Board“ ab ($p = 0,022$) und die Latenz, bis zu der sie das Board das erste Mal betraten („Latency First Board Entry“), zu ($p = 0,037$).

4. Verhaltensparameter

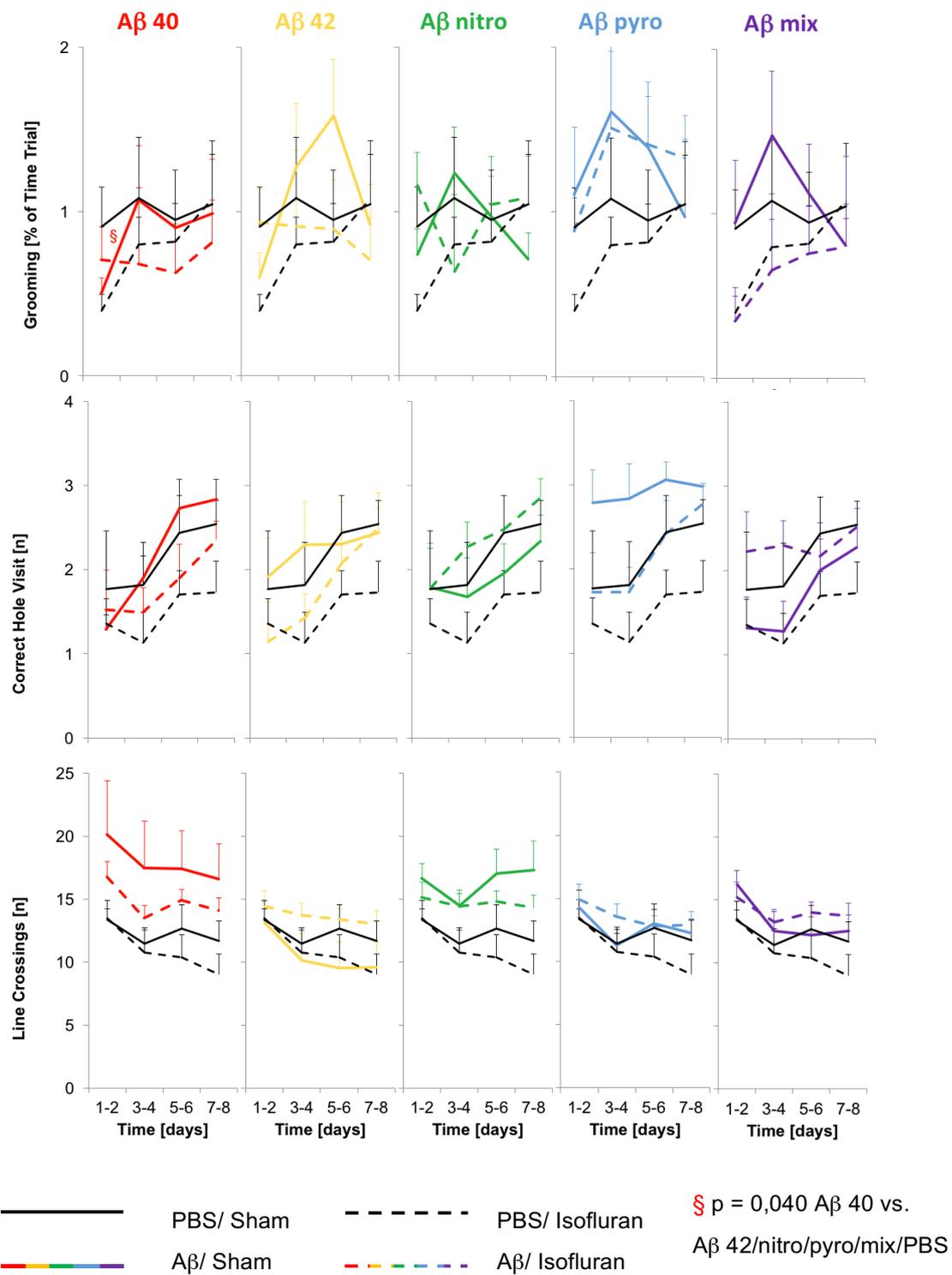


Abb.15: Verhaltensparameter im mHBT: Mittelwerte und Standardfehler;
oben: Grooming, mittig: Correct Hole Visit, unten: Line Crossings

Die Injektion von A β 40 führte zu einem signifikanten Anstieg des Parameters „Grooming“ ($p = 0,040$) im Vergleich zu den anderen getesteten Gruppen und PBS. Eine Isoflurannarkose hatte keinen Einfluss auf diesen Effekt. **Abb. 15** zeigt auch, dass es unter allen getesteten Gruppen keinen Unterschied bei den Parametern „Correct Hole Visit“ und „Line Crossings“ gab: es zeigte sich stets ein signifikanter linearer Anstieg der korrekt besuchten Löcher über die Zeit ($p < 0,05$) (wobei es keinen Unterschied zwischen den einzelnen A β Subformen bzw. keinen Einfluss von Narkose gab) sowie ein signifikanter linearer Abfall des Parameters „Line Crossings“ über die Zeit ($p < 0,05$).

VIII. DISKUSSION

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Injektion von A β pyro führte zu einer Reduktion der für den Test benötigten Zeit. A β pyro verbesserte also die kognitive Performance (A β pyro versus PBS: $p = 0,038$). Diese Verbesserung wurde durch eine Narkose mit Isofluran aufgehoben (A β pyro Sham versus Isofluran: $p = 0,007$). Das deklarative Gedächtnis, welches durch „Wrong Choice Total“ repräsentiert wurde, war zwischen den verschiedenen A β Subformen und PBS vergleichbar.

Das Angstverhalten der Mäuse, welches durch die „Time on Board“ dargestellt wurde, nahm im Verlauf der Zeit bei A β 40 ($p = 0,007$), A β nitro ($p = 0,029$) und A β pyro ($p = 0,008$) ab. Diese Abnahme zeigte sich nicht bei A β 42 ($p = 0,079$). So könnte die Injektion von A β 42 mit vermehrter Angst assoziiert sein. Bei „Latency First Board Entry“, einem anderen Angstparameter, zeigte sich kein Unterschied zwischen den A β Subformen und PBS. Bei Tieren, die A β pyro erhalten hatten, bewirkte eine Isoflurannarkose eine reduzierte „Time on Board“ ($p = 0,022$) sowie eine verlängerte „Latency First Board Entry“ ($p = 0,037$). Isofluran hatte also auf die Tiere mit A β pyro einen inhibierenden Effekt. Die Erregung der Tiere, dargestellt durch den Parameter „Grooming“, nahm im Verlauf der Zeit bei A β 40 zu ($p = 0,040$). Die Isoflurannarkose hatte darauf keinen Einfluss. Die lokomotorische Aktivität („Line Crossings“) und direkte explorative Motivation („Correct Hole Visit“) unterschied sich zwischen den Gruppen nicht.

2. Diskussion der Methoden

2.1 Verwendetes Maus Modell

Zur Untersuchung der AK bieten sich verschiedene Maus Modelle an. Bei der Auswahl des passenden Modells ist es wichtig, deren einzelne neuropathologische Eigenschaften zu kennen. Dabei kann man zwischen Wildtyp Mäusen (WT) und transgenen Maus Modellen unterscheiden. Von letzteren gibt es ca. 190 verschiedene Arten, wobei durch genetische Modifikationen pathologische Eigenschaften verändert werden können (Alzforum n.d.). Das Nutzen eines transgenen Maus Modells für diese Arbeit hätte den Vorteil gehabt, den invasiven Charakter der ICV-Implantation zu umgehen (und damit einerseits den Mäusen eine Operation zu ersparen sowie potenziell ungewollte durch Neuroinflammation induzierte Interaktionen in den folgenden Verhaltenstests zu umgehen). Weiterhin ist im Vergleich zur ICV-Injektion, die lediglich die Amyloidopathie repräsentieren kann, bei transgenen Modellen die Miteinbeziehung weiterer pathophysiologischer Einflüsse wie die Tauopathie möglich (Oddo et al. 2003). In dieser Studie wurde jedoch das Modell der ICV-Injektion gewählt - basierend auf einer Studie von Schmid et al. 2017, die bereits wenige Tage nach ICV-Injektion ein kognitives Defizit im mHBT detektieren konnten. Da es Ziel dieser Arbeit war, spezielle posttranslational veränderte lösliche A β Subformen zu untersuchen, deren einzelne Analyse in einem transgenen Modell bis dato nicht möglich ist, wurde die Methode der ICV-Implantation gewählt, bei der gezielt die einzelnen Subformen nach individueller Zubereitung injiziert wurden. In dieser Arbeit war es nicht möglich ein kognitives Defizit zu detektieren. Insgesamt stellt die ICV-Implantation somit keine ideale Methode dar, um die Komplexität der AK zu simulieren. Da A β zudem von Neuronen gebildet wird und der Liquor (in den bei der ICV-Injektion die Subformen injiziert werden) lediglich den Ausscheidungsort von A β darstellt, wäre eine intraparenchymatöse Injektion, wie es in einigen Laboren bereits praktiziert wird, eine Option, die es in kommenden Studien zu evaluieren gilt.

Nach Auswahl des ICV-Modells wurden Mäuse mit einem relativ jungen Alter von zehn Wochen genutzt, da in dieser Studie der Einfluss von löslichen A β Subformen untersucht werden sollte, die besonders bei erst beginnender Demenz und kurzer Krankheitsdauer pathologischerweise vorkommen. Zudem wurden eben genannte Mäuseart bereits von

Schmid et al. 2017 genutzt, wo es zu kognitiven Defiziten kam. Culley et al. postulierten 2003 außerdem, dass Isofluran bei jungen Versuchstieren einen potenziell neurotoxischen Effekt haben kann, sodass auch hinsichtlich der in dieser Studie gewünschten Untersuchung des Einfluss einer Isofluranexposition eine studienbasierte Grundlage existierte.

Weiterhin wurden männliche Tiere für diese Studie gewählt, da weibliches Geschlecht als Risikofaktor bei der AK angesehen wird und eine mögliche Verzerrung beim mHBT durch diesen Risikofaktor ausgeschlossen werden sollte (Seitz et al. 2013).

2.2 Implantation der ICV-Kanüle und intracerebroventrikuläre A β -Injektion

Um die Wechselwirkung von Isofluran und den verschiedenen löslichen A β Subformen genauer untersuchen zu können, mussten letztere zunächst in das Gehirn der Mäuse injiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine Kanüle in den Seitenventrikel der Mäuse implantiert und zwei Wochen später die A β Subformen injiziert. Jedoch bringt die Implantation der Kanüle zunächst einige Risiken mit sich: Durch den Eingriff kann es zu Gewebsverletzungen, Gehirnatrophie und letztlich Gedächtnisverschlechterung kommen (Nakamura et al. 2001). Weiterhin können der zerebrale Blutfluss reduziert und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 β freigesetzt werden, die wiederum die Ausschüttung anderer Entzündungsmediatoren wie IL-6 nach sich ziehen und zu einer Neuroinflammation führen (Vanderweyde et al. 2010, Caza et al. 2008). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass diese die AK-Pathogenese begünstigen. Die ausgeschütteten Zytokine fördern die Aggregation von Plaques, worauf die Plaques wiederum vermehrt Zytokine produzieren. Dadurch entsteht letztlich ein Teufelskreis, den es zu unterbrechen gilt (Cacquevel et al. 2004, Cunningham et al. 2009). Insgesamt beschränkt sich die Gefahr der ICV-Implantation aber nicht nur auf eine Entzündungsreaktion im Gehirn, sondern sie kann auch über Aktivierung der Glukokortikoid-Achse zu einer Stressantwort im gesamten Organismus führen, welche die AK-typischen Symptome zusätzlich verschlechtert (Vanderweyde et al. 2010, Ohl 2003). Außerdem kann durch die Operation am Gehirn eine pathologische Ischämie und Hypoxie von Hirnarealen verursacht werden (Snowdon et al. 1997). So besitzen Patienten mit bekanntem ischämischen Schlaganfall ein erhöhtes Risiko an der AK zu erkranken (Nagy et al. 1997).

Die Injektion erfolgte zwei Wochen nach ICV-Implantation, damit die Kanüle einheilen und die Mäuse sich vom operativen Eingriff ausreichend erholen konnten. Zunächst mussten die Tiere für die Injektion aus einem entfernten Maushaltungsraum geholt werden. Während des Weges waren die Tiere einem erhöhten Geräuschpegel durch Straßenlärm exponiert, der einen, wenn auch minimalen, Stresseffekt besitzt. Die Injektion selbst stellt für die Tiere ebenso ein Stressereignis dar, da sie für diesen Eingriff kurzzeitig fixiert werden müssen. Dies führt zu Angst- und Stressempfinden, was wiederum den mHBT beeinflussen kann. Um eine mögliche Interaktion möglichst gering zu halten wurde der mHBT bewusst ein Tag nach Injektion gestartet. Eine Kurznarkose für den Injektionsvorgang ist bei weiteren Studien zu evaluieren, um den Stresslevel der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten und eine stressbedingte Verzerrung des mHBT zu verhindern. Da in unserer Studie die Wirkung einer bestimmten Konzentration und Dauer von Isofluran untersuchen wollten, sollten zusätzliche Isofluranexpositionen vermieden werden.

2.3 Isofluran als Narkosegas

Einen wichtigen Beitrag zur Aufdeckung der Neurotoxizität von inhalativen Anästhetika lieferten Eckenhoff et al. 2004: Sie postulierten, dass Isofluran im Tiermodell zu einer kognitiven Verschlechterung führt. Bianchi et al. zeigten 2008, dass sich Lernfähigkeit und Gedächtnis von WT Mäusen durch eine Isoflurannarkose verschlechterten. Dabei aktiviert Isofluran Caspase-3, erhöht die A β -Akkumulation sowohl in vitro als auch in vivo und induziert Apoptose (Xie et al. 2006, Xie et al. 2008). Xie et al. zeigten 2006 weiterhin, dass es in H4 humanen Neuroglioma Zellen nach sechsständiger Exposition von 2 Vol. % Isofluran zu Apoptose, Veränderungen der APP-Prozession und erhöhter Bildung von A β -Peptiden kommt. Studien weisen auf einen konzentrations- und zeitabhängigen dualen Effekt von Isofluran hin: So wirkt eine 20 bis 30-minütige Exposition von 2 Vol. % Isofluran neuroprotektiv, eine 60-minütige Exposition jedoch neurotoxisch (Lee et al. 2008). In einer anderen Studie besaß eine 1,5 bzw. 2,0 Vol. % Isoflurannarkose über 30 Minuten neuroprotektive Effekte, während bei gleicher Dauer 2,5 - 3,0 Vol. % Isofluran neurotoxisch wirkten (de Klaver et al. 2002). Eine zweistündige Exposition von 1,4 Vol. % Isofluran verstärkte bei Xu et al. 2011 die A β -induzierte Caspase-3 Aktivierung, während 0,7 Vol. % Isofluran für 30 Minuten diesen Effekt milderte. Es wird also deutlich,

dass Isofluran je nach Konzentration und Expositionsdauer unterschiedliche Effekte haben kann. Dabei wird vermutet, dass dieser duale Effekt von Isofluran durch Beeinflussung der Bcl-2/Bax Ratio verursacht wird. So kommt es nach sechsstündiger Exposition von 2 Vol. % Isofluran zu erhöhter mRNA Expression von Bax und verminderter Expression des Anti-Apoptose Faktors Bcl-2. Dies bewirkt eine Akkumulation von Reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS), die über die Schädigung von Mitochondrien zu Apoptose führen (Zhang et al. 2010). Ein weiterer Mechanismus, der hinter der Isofluran-induzierten Aktivierung von Caspase-3 und vermehrter A β -Akkumulation vermutet wird, ist die Erhöhung des zytosolischen Calcium-Levels. Durch Störung der Calcium-Homöostase kommt es zu Apoptose und neuronalem Zelluntergang (Zhang et al. 2008). Insgesamt ist die Studienlage jedoch nicht eindeutig und es sind weitere Studien zur Erforschung der neurotoxischen Mechanismen von Isofluran erforderlich.

Eine neurotoxische Wirkung konnte aber bisher nicht nur bei Isofluran, sondern auch bei Sevofluran festgestellt werden (Lu et al. 2010). Die Wirkmechanismen beruhen dabei ebenso wie bei Isofluran auf Caspase-3 Aktivierung und Sevofluran-induzierter Apoptose. So setzt eine zweistündige Narkose mit 2,5 Vol.% Sevofluran bereits nach sechs Stunden neuropathologische Vorgänge wie Caspase-3 Aktivierung und veränderte APP-Prozessierung mit vermehrter Bildung und Aggregation von A β in Gang. Diese Vorgänge führen wiederum über Apoptose-Induktion zum Untergang von Neuronen und wirken somit neurotoxisch (Dong et al. 2009). Da Sevofluran im klinischen Alltag häufig angewendet wird, ist dessen genauere Untersuchung ebenso von großem Interesse.

Desfluran hingegen scheint im Gegensatz zu Isofluran und Sevofluran keine neurotoxische Wirkung durch Caspase-3 Aktivierung und Apoptose-Induktion zu besitzen (Zhang et al. 2008). Durch Desfluran erholen sich sogar neurokognitive Funktionen postoperativ schneller als bei Isofluran (Tsai et al. 1992). So sind Patienten, die eine Narkose mit Desfluran erhalten haben, signifikant weniger verwirrt, weniger schläfrig und weniger unbeholfen als nach Isofluran oder Sevofluran (Patel and Goa 1995).

Insgesamt sind die Interaktionsmechanismen von inhalativen Anästhetika mit neuropathologischen Vorgängen jedoch noch nicht vollends verstanden und bedürfen weiterer Abklärung. In unserer Studie setzten wir die Versuchstiere 1,6 Vol. % Isofluran für zwei Stunden aus. Nach aktueller Studienlage ist bei dieser Konzentration und Dauer eine neurotoxische Wirkung anzunehmen, deren Interaktion mit verschiedenen A β Subformen getestet werden sollte.

Vor dem Hintergrund der älter werdenden Gesellschaft und dem vermehrten Bedarf an Narkosen ist es jedoch wichtig, alle klinikrelevanten Narkotika genauer zu untersuchen. So könnte, wie oben bereits angedeutet, Desfluran eine bessere Alternative zu Isofluran darstellen. Speziell der Einfluss auf altersassoziierte Erkrankungen wie die AK ist dabei von besonderer Bedeutung, um bei betroffenen Patienten nicht nur die richtige Wahl des Anästhetikums, sondern dieses auch in richtiger Dosierung und Dauer zu verwenden ohne die bestehende Krankheit weiter zu verschlechtern.

2.4 Modifizierter Holeboard-Test als Verhaltenstest

Nach Injektion der Aß Subformen und Durchführung der Isoflurannarkose bzw. „Sham“-Prozedur wurden ab dem Folgetag die Tiere mittels mHBT getestet. Prinzipiell werden Verhaltenstests durchgeführt, um kognitive Störungen und Veränderungen des Verhaltens zu erkennen und zugrundeliegende Pathologien verstehen zu können (Ohl et al. 2001). Idealerweise werden während des Tests möglichst viele verschiedene Daten erfasst, um pathologisches Verhalten und Kognitionseinschränkungen zu ermitteln. Da die Symptome bei der AK unter anderem durch Schädigung des Hippokampus zustande kommen, sollte der entsprechende Verhaltenstest diese Pathologie auch darstellen können. Der am häufigsten genutzte Test bei AK Tiermodellen ist dabei der Morris-Water-Maze-Test (MWM), bei dem die Versuchstiere in ein mit trübem Wasser gefülltes Becken gesetzt werden und eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform finden müssen (Tanila 2012). Da der MWM ursprünglich für den Einsatz von Ratten konzipiert ist, Mäuse hingegen aber streng terrestrische Tiere sind und somit größere Schwierigkeiten mit dem Schwimmen haben als Ratten, ist der MWM für diese Studie nicht geeignet. Ein weiterer Verhaltenstest ist der „Open-Field-Test“, bei dem Ratten in eine nach oben offene, hell erleuchtete, runde Arena gesetzt werden und dann deren Verhalten beobachtet wird (Hall and Ballachey 1932). Da durch diese Tests aber jeweils nur wenige Parameter untersucht werden können, es für eine möglichst genaue Abbildung von Kognition und Verhalten aber einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter bedarf, erfolgte die Weiterentwicklung zum modifizierten Holeboard-Test (Gordan et al. 2012). Dabei werden Eigenschaften des Open-Field-Tests mit dem Holeboard-Test kombiniert. Letzterer wurde ursprünglich genutzt, um das Erkundungsverhalten von Nagetieren analysieren zu können (File and Wardill 1975). Später wurde er für die Untersuchung von Kognition und Verhalten von Spitzhörnchen und Ratten modifiziert (Ohl et al. 1998). Der mHBT besteht letztlich aus

einer quadratischen, nach oben offenen Box, in die zentral das sog. Holeboard gelegt wird, welches mit zehn nach oben offenen Zylindern bestückt ist. Die Versuchstiere sollen lernen, dass nur drei der zehn Zylinder markiert und mit einer Futterbelohnung versehen sind. Ein Vorteil des mHBT ist, dass gleichzeitig die Leistungsfähigkeit des deklarativen Gedächtnisses sowie des Arbeitsgedächtnisses, die allgemeine Bewegungsaktivität, die motorische Geschicklichkeit und verschiedene Verhaltensmuster analysiert werden können (Ohl 2003). Es handelt sich um ein standardisiertes, replizierbares Verfahren, das auf positiver Motivation durch Futterbelohnung beruht und weitgehend stressarm durchgeführt werden kann. So werden die Tiere bereits vor dem Test mit Mandeln angefütert, um initial zögerliches Verhalten bei Futteraufnahme zu vermeiden. Weiterhin fand der Test im immer gleichen Raum unter gleichen Bedingungen statt, sodass Stressfaktoren wie Transport der Tiere oder veränderte klimatische Einflüsse ausbleiben. Insgesamt stellt der mHBT einen idealen Verhaltenstest zur gleichzeitigen Erfassung einer Vielzahl unterschiedlicher Parameter dar, um eine umfassende Untersuchung verschiedener Aspekte der Leistungsfähigkeit zu ermöglichen. So wird dieser etablierte Verhaltenstest bei verschiedenen Spezies erfolgreich eingesetzt (Gordan et al. 2012).

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1 Neurotoxizität der A β Subformen

Tab. 3 zeigt die in dieser Studie beobachteten Auswirkungen der einzelnen A β Subformen auf „Kognition“, „Angst“ und „Verhalten“ sowie die erwarteten Auswirkungen laut Literatur.

	Kognition		Angst		Verhalten	
	Ergebnis	Literatur	Ergebnis	Literatur	Ergebnis	Literatur
A β 42	0	- (Kummer and Heneka 2014, Morroni et al. 2016, Zhou and Bickler 2017, Schmid et al. 2017)	-	- (Kummer and Heneka 2014, Morroni et al. 2016, Zhou and Bickler 2017, Schmid et al. 2017)	0	- (Kummer and Heneka 2014, Morroni et al. 2016, Zhou and Bickler 2017, Schmid et al. 2017)
A β 40	0	- (Gao et al. 2010)	0	- (Gao et al. 2010)	-	- (Gao et al. 2010, Joe and Ringman 2020)
A β pyro	+	- (Jawhar et al. 2011a, Dammers et al. 2017)	0	- (Jawhar et al. 2011a, Dammers et al. 2017)	0	- (Jawhar et al. 2011a, Dammers et al. 2017)
A β nitro	0	- (Kummer and Heneka 2014)	0	- (Kummer and Heneka 2014)	0	- (Kummer and Heneka 2014)
A β mix	0	n. v.	0	n. v.	0	n. v.

Tab. 3: Neurotoxizität der verschiedenen A β Subformen

- „0“ zeigt an, dass kein Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „-“ zeigt an, dass eine Verschlechterung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „+“ zeigt an, dass eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „n.v.“ = nicht vorhanden

In dieser Studie hatten Mäuse mit einer Injektion von A β 42 mehr Angst. Kognition und Verhalten blieben durch Injektion dieser Subform unverändert. Laut Literatur wären jedoch nicht nur vermehrte Angst, sondern zusätzlich auch Kognitionsverschlechterung und Verhaltensabnormitäten als Ausdruck der AK-Symptomatik zu erwarten gewesen, da A β 42 als eine der toxischsten Subformen gilt und bewiesenermaßen einen großen Bestandteil innerhalb der A β -Plaques ausmacht (Kummer and Heneka 2014). A β 42 neigt dabei sehr stark zu Aggregation und setzt verschiedene Kaskaden in Gang, die letztlich zum Untergang von Neuronen führen. Morroni et al. zeigten 2016, dass es bereits zehn Tage nach Injektion von A β 42 durch oxidativen Stress, Caspase-9-Aktivierung und erniedrigte hippocampale Synaptophysin-Immunreaktivität zu Gedächtnisverschlechterung kommt. Schmid et al. konnten 2017 bereits zwei Tage nach Injektion von A β 42 ein kognitives Defizit feststellen. A β 42 scheint dabei auch auf die LTP zu wirken: So wurde in einer Studie nach Einwaschen von A β 42-Peptiden in hippocampale Gehirnschnitte die LTP im Vergleich zur Kontrollgruppe um 15% reduziert (Zhou and Bickler 2017). Warum es in dieser Arbeit nur zu vermehrter Angst, nicht aber zu Kognitionsdefiziten kam, widerspricht bisherigen Studien. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte sein, dass das bei den Mäusen beobachtete Angstverhalten so dominant war, dass geringere, aber möglicherweise dennoch vorhandene Auswirkungen auf kognitive Fähigkeiten im mHBT aufgrund Überlagerung nicht ausreichend sichtbar wurden. So verbrachten die Tiere von A β 42 beispielsweise deutlich weniger Zeit auf dem Board der Versuchsanordnung als die anderen A β Subformen, sodass zudem der Zeitraum kürzer war, um potenziell Fehler beim Besuchen der korrekten Löcher zu machen.

Ein weiterer Grund könnte auch sein, dass die Latenz zwischen Injektion der A β Subform und der Durchführung des mHBT zu kurz, sodass sich der volle Effekt der in der Literatur beschriebenen Toxizität noch nicht entfalten konnte.

A β 40 bewirkte in dieser Studie bei der entsprechenden Versuchsgruppe eine pathologische Verhaltensänderung im Sinne von vermehrter Agitation. Kognition und Angst blieben durch A β 40 jedoch unbeeinflusst. Auch bei dieser Subform hätten laut Literatur neben der pathologischen Verhaltensänderung weiterhin eine Kognitionsverschlechterung und vermehrte Angst erwartet werden können, da A β 40 eine wichtige Rolle im Rahmen der A β -Plaquetbildung und der damit verbundenen Gedächtnisverschlechterung spielt (Gao et al. 2010). Studien haben gezeigt, dass A β 40 Caspasen aktiviert, Apoptose induziert und im Rahmen der Gedächtnisverschlechterung die Plastizität von Synapsen verschlechtert (Yang et al. 2010, Nakagawa et al. 2000, Awasthi et al. 2005, Walsh et al. 2002, Shankar et al. 2008). Da vermehrte Agitation jedoch ein Frühzeichen für eine beginnende Demenz darstellen kann, bleiben die Auswirkungen von A β 40 in dieser Studie zwar hinter den Erwartungen gemäß aktueller Literatur zurück, gehen jedoch trotzdem in die tendenziell erwartete Richtung (Joe and Ringman 2020). Auch hier könnte ein Grund für fehlende kognitive Defizite die zu kurze Zeitspanne zwischen Injektion und Testung sein, die sich erst nach einem längeren Zeitraum offenbaren könnten.

Die Injektion von A β pyro führte bei den Versuchstieren zu verbesserter Kognition. Genau wie bei den anderen Subformen (mit Ausnahme von A β 42) kam es weiterhin zu einer Reduktion der Angst während der acht Versuchstage. Es kann geschlussfolgert werden, dass A β pyro über eine Angsthemmung die Kognition verbessert. Insgesamt steht dieses Ergebnis in Widerspruch zu aktueller Literatur, laut derer A β pyro neben A β 42 eine eher toxische Subform darstellt (Jawhar et al. 2011a). Da sich durch die post-translationalen Modifikation von A β in A β pyro die biochemische Struktur verändert, besitzt A β pyro eine höhere Hydrophobität und neigt somit stärker zu Aggregation (Dammers et al. 2017). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Glutaminyl Cyclase, das für die Pyroglutamilierung von A β verantwortliche Enzym, im Rahmen der AK hochreguliert ist (Jawhar et al. 2011b). In Maus Modellen, in denen dieses Enzym bewusst minderexprimiert wurde, zeigten sich erniedrigte A β 40- und A β 42 Level, weniger Plaquetaggregation, reduzierte Inflammation sowie verbesserte kognitive Fähigkeiten der Versuchstiere (Schilling et al. 2008). Das Entstehen bzw. Nicht-

Entstehen von A β pyro scheint also auch das Auftreten anderer A β Subformen zu beeinflussen und hat somit eine wichtige Rolle im Rahmen der AK Pathogenese. Das Ergebnis dieser Studie, bei der A β pyro sogar eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten der Versuchstiere bewirkte, ist überraschend und widerspricht aktuellen Studien. Ein möglicher Erklärungsversuch könnte sein, dass je nach verwendetem Maus Modell A β pyro teilweise erst in höherem Alter der Tiere detektiert werden kann. So tritt diese A β Subform im APP/PS1K1 Model nach 2 Monaten (Christensen et al. 2008), im Tg2576 Model nach 16 Monaten (Kawarabayashi et al. 2001) sowie im APP23 Model nach 15 Monaten auf (Schieb et al. 2011). In unserer Studie wurde zwar keine transgene Linie verwendet, jedoch wurde insgesamt möglicherweise nicht lange genug abgewartet bis sich der erwartete toxische Effekt von A β pyro post injectionem einstellen hätte können. Insgesamt stellt die in dieser Arbeit beobachtete Kognitionsverbesserung in der A β pyro Gruppe jedoch höchstwahrscheinlich eine Zufallstestung mit statistischer Signifikanz bei multiplem Testen dar. Eine Kognitionsverbesserung durch A β pyro erscheint nicht plausibel.

Die Injektion von A β nitro hatte in dieser Studie weder Einfluss auf Kognition, noch auf Angst oder Verhalten der Versuchstiere. Im Gegensatz dazu wäre eine Verschlechterung dieser Parameter erwartet worden. Im Rahmen der AK kommt es nämlich auf dem Boden einer entzündlichen Reaktion durch die Hochregulierung des Enzyms NOS2 bewiesenermaßen zu vermehrter Produktion von NO (Kummer and Heneka 2014). NO wiederum beeinflusst dann die bereits in 2.1.2 erwähnten post-translationalen Proteinveränderungen. Kummer et al. zeigten 2011, dass A β durch NO an Tyrosin 10 nitriert wird und es durch diese Strukturveränderung zu beschleunigter Aggregation des Proteins kommt. A β nitro wurde hier mittels (A β -) Antikörper IC16 und 3nTyr10-A β Antiserum im Kortex von 5 Monate alten APP/PS1 Mäusen detektiert und konnte durch orale Gabe des NOS2-Inhibitors L-NIL reduziert werden, wodurch sich die kognitive Dysfunktion der APP/PS1 Mäuse verringerte. Guivernau et al. postulierten 2016, dass nitriertes A β über Beeinflussung der NMDA-Rezeptoren zu erhöhten cytosolischen Calciumspiegeln führt, welche toxisch auf Neurone wirken. A β nitro kann also durchaus eine wichtige Rolle im Rahmen der AK Pathogenese zugesprochen werden und könnte potenziell ein therapeutisches Ziel in der Behandlung der AK sein.

Die Injektion von A β mix, einer isopotenten 1:1 Mischung der einzelnen in dieser Studie untersuchten Subformen, hatte weder Einfluss auf Kognition, noch auf Angst oder

Verhalten. Die Idee war, eine Mischung der einzelnen Komponenten zu erreichen, da auch bei der AK im Menschen eine Mischung der A β Subformen vorliegt (Kummer and Heneka 2014).

3.2 Einfluss von Isofluran

Tab. 4 zeigt die in dieser Studie beobachteten Auswirkungen der Interaktion von Isofluran mit den einzelnen A β Subformen auf „Kognition“, „Angst“ und „Verhalten“ sowie die erwarteten Auswirkungen laut Literatur.

	Kognition		Angst		Verhalten	
	Ergebnis	Literatur	Ergebnis	Literatur	Ergebnis	Literatur
A β 42 ~ Iso	0	- (Bittner et al. 2011, Xie et al. 2006, Xie et al. 2008, Zhang et al. 2010, Bianchi et al. 2008, Tang et al. 2010) + (Zhou and Bickler 2017)	0	0/+ (Zhou and Bickler 2017)	0	0 / + (Zhou and Bickler 2017)
A β 40 ~ Iso	0	- (Ni C et al. 2013)	0	- (Ni C et al. 2013)	0	- (Ni C et al. 2013)
A β pyro ~ Iso	-	n. v.	-	n. v.	0	n. v.
A β nitro ~ Iso	0	n. v.	0	n. v.	0	n. v.
A β mix ~ Iso	0	n. v.	0	n. v.	0	n. v.

Tab. 4: Interaktion von Isofluran mit den einzelnen A β Subformen

- „0“ zeigt an, dass kein Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „-“ zeigt an, dass eine Verschlechterung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „+“ zeigt an, dass eine Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden konnte
- „n.v.“ = nicht vorhanden

An Tag 4 nach ICV-Injektion erhielten die Versuchstiere eine Isofluran- oder „Sham“-Prozedur. Am Folgetag wurde dann der mHBT durchgeführt. In vorherigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass nach Testbeginn die Tiere an Tag 2, 4 oder 8 eine kognitive Verschlechterung vorweisen (Schmid et al. 2017). Hier konnte also ein maximaler Interaktionseffekt von Anästhetikum und A β erwartet werden.

Die Interaktion von Isofluran mit A β 42 hatte jedoch in dieser Studie keinen Einfluss auf Kognition, Angst und Verhalten der Versuchstiere. Bezüglich der Interaktion von Isofluran mit A β 42 sind bisher bivalente Effekte beschrieben worden. So wurden in einer in vitro Studie A β 42-Peptide in hippokampale Gehirnschnitte von drei bis vier Wochen alten Ratten eingewaschen und diese mit 1,5%-igem Isofluran für eine Stunde exponiert. Es zeigte sich, dass A β 42 ohne Isofluranexposition die LTP verschlechterte, in Kombination mit Isofluran dieser Effekt jedoch ausblieb. Die Autoren schlussfolgerten, dass es durch Isofluran zu keiner Verschlechterung der LTP bzw. es sogar zu einer Vorbeugung der LTP-Verschlechterung durch kurzzeitige Isofluranexposition kommt (Zhou and Bickler 2017). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass Isofluran nach Interaktion mit A β 42 einen negativen Effekt haben kann. So zeigten mehrere Studien, dass Isofluran die Akkumulation von A β , vor allem von A β 42 und A β 40, sowohl in der Zellkultur und im Tiermodell erhöhen und einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung der AK leisten kann (Bittner et al. 2011, Xie et al. 2006, Xie et al. 2008, Zhang et al. 2010, Bianchi et al. 2008, Tang et al. 2010). Insgesamt ist der Interaktionseffekt von Isofluran somit nicht eindeutig und muss weiter untersucht werden.

Isofluran hatte in unserer Versuchsreihe keinen Einfluss auf Kognition, Angst und Verhalten der A β 40 Tiere. Laut aktueller Studienlage wird wie oben bereits genannt

von einem negativen Effekt von Isofluran auf A β 40 ausgegangen. Ni C et al. zeigten 2013, dass durch Isofluran im Hippokampus älterer Ratten vermehrt A β 40 gebildet wurde und über eine verminderte Expression der Acetylcholinesterase zu cholinergischer Dysfunktion führte. Eine weitere Studie untersuchte, wie sich Isofluran bzw. Desfluran auf die A β -Level im Liquor von Patienten auswirkte: Dabei führte die Exposition mit Isofluran zu einer Erhöhung der A β 40-Level im Liquor (Zhang et al. 2013).

Die Interaktion von Isofluran mit A β pyro bewirkte eine Verschlechterung sowohl der Kognition ($p = 0,007$) als auch der Angst ($p = 0,022$ und $p = 0,037$). Durch die Isoflurannarkose wurde die verbesserte kognitive Performance wieder auf ein „normales“ Level reduziert. Dies könnte durch eine gesteigerte Oligomerisierung und Zytotoxizität durch Isofluran erklärt werden, so wie bereits in mehreren Studien suggeriert (Eckenhoff et al. 2004, Perucho et al. 2010). Die teils gegenteiligen Effekte von Isofluran, wie sie schon bei A β 42 gezeigt wurden, konnten in dieser Studie nicht bestätigt werden (Zhou and Bickler 2017, Zhang et al. 2017).

Isofluran hatte keine Auswirkungen auf Kognition, Angst und Verhalten der Tiere mit den Subformen A β nitro und A β mix. Über diesen Zusammenhang sind bisher keine Untersuchungen bekannt, sodass kein bestimmter Effekt erwartet wurde.

Insgesamt ist die Interaktion von Isofluran mit bestimmten A β Subformen noch nicht ausgiebig untersucht. Es sind weitere in vivo Studien notwendig, um zugrundeliegende Mechanismen verstehen zu können.

4. Limitationen der Studie

A β 42 gilt als eine der toxischsten Subformen mit einem hohen Potenzial zur Aggregation (Mroczko et al. 2018). Negative Effekte auf Kognition und Verhalten konnten bereits in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden (Schmid et al. 2017, Lai et al. 2014). In dieser Studie war vermehrte Angst durch A β 42 der einzige Hinweis auf eine mögliche neurotoxische Wirkung dieser Subform. Ein direkter Effekt auf die kognitive Funktion konnte im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen nicht gezeigt werden (Schmid et al. 2017).

Eine Interferenz von vermehrter Angst mit kognitiver Performance im mHBT stellt eine Limitation dar und könnte ein mögliches kognitives Defizit verschleiern (Ohl et al. 2001). Eine weitere Limitation besteht in der Auswahl der ICV-Implantation und -Injektion als methodisches Mittel. In dieser Arbeit war es nicht möglich ein kognitives Defizit zu detektieren. Insgesamt stellt die ICV-Implantation somit keine ideale Methode dar, um die Komplexität der AK zu simulieren. Obwohl die ICV-Injektion von A β eine in der Fachwelt häufig genutzte Methode ist, beschränkt sie sich lediglich auf die Amyloidopathie. Weitere pathophysiologische Vorgänge wie die Tauopathie können nicht dargestellt werden. Durch den invasiven Charakter der ICV-Implantation besteht zudem ein durch Neuroinflammation erhöhtes Interaktionsrisiko im Verhaltenstest. Daneben stellt grundsätzlich jede Operation ein bakterielles Infektionsrisiko dar - speziell Eingriffe, die eine direkte Interaktion mit besonders kontaminationsgefährdeten Milieus wie Liquorflüssigkeit bedingen. So ist auch bei der ICV-Implantation sowie Injektion der Subformen ein erhöhtes Infektionsrisiko vorhanden, eine mögliche Beeinflussung des Verhaltenstest also möglich. Bei der Durchführung der Operationen wurde zwar auf möglichst steriles Arbeiten geachtet, die Tiere wurden regelmäßig gewogen und klinisch kontrolliert, ein sicherer Ausschluss einer Ventrikulitis konnte jedoch nicht gewährleistet werden.

Die ICV-Injektion wurde bei zehn Wochen alten Mäusen durchgeführt, welches ein relativ junges Alter darstellt. Da die AK eine ausgesprochen altersassoziierte Erkrankung darstellt, würde die Kognitionstestung bei älteren Tieren eine realitätsnähere Darstellung erlauben, sodass insgesamt das junge Alter der verwendeten Versuchstiere eine weitere Limitation dieser Arbeit darstellt.

Eine weitere Limitation der Arbeit besteht in der Zubereitung der A β Subformen: So wurde A β 1-42 mit HFIP gelöst, während die anderen Subformen lediglich mit Aqua dest. gelöst

wurden. Bei HFIP handelt es sich um eine invasive Substanz, die die Zellpermeabilität beeinflusst, sodass eine mögliche Interaktion im Rahmen von Kognitionstestungen möglich erscheint (Ennaceur and Sanderson 2005). Die fehlende Kontrollgruppe mit HFIP stellt eine Limitation dar.

Die Zielkonzentrationen der einzelnen A β Subtypen weichen stark voneinander ab und reichen von 700 über 3.200 bis 11.900 nmol/l, sodass auf den ersten Blick eine Vergleichbarkeit der Gruppen fraglich scheint. Die Zielkonzentrationen wurden gemäß einer Studie von Rammes et al. gewählt, die 2018 eine konzentrationsabhängige Toxizität verschiedener A β Subformen auf die CA1-LTP zeigten. Da es sich bei der Arbeit von Rammes et al. um eine in vitro Studie handelt, in unsere Arbeit jedoch ein in vivo Modell genutzt wurde, das keine kognitiven Defizite zeigte, scheint eine Übertragbarkeit der eben genannten Konzentrationen nicht möglich.

In dieser Studie wurden die Neurotoxizität von A β Subformen und die Interaktion mit Isofluran an Tag 4 nach ICV-Injektion untersucht. Da sich in dieser Arbeit jedoch kein kognitives Defizit detektieren ließ, könnte die Zeitspanne zwischen Injektion und Testung womöglich zu kurz sein, sodass sich noch keine klinisch relevanten A β Oligomere bilden und ihr neurotoxisches Potenzial entfalten konnten (Bao et al. 2012).

In dieser Studie wurden vier verschiedene A β Subformen sowie ein Inhalationsanästhetikum untersucht. Daneben gibt es jedoch noch viele andere post-translationalen Modifikationsmöglichkeiten von A β sowie eine Vielzahl anderer Narkosemittel, die es zu untersuchen gilt.

IX. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, die Neurotoxizität verschiedener A β Subformen, welche eine Rolle in der Pathogenese der AK spielen, sowie deren Interaktion mit einer Isoflurannarkose bei Mäusen zu untersuchen.

Nach staatlicher Genehmigung wurden Kanülen in die lateralen Seitenventrikel von 72 männlichen C57BL/6 Mäusen implantiert. 14 Tage später wurde den Versuchstieren randomisiert über die Kanülen entweder A β 1-40 (A β 40), A β 1-42 (A β 42), 3NTyr10-A β (A β nitro), A β pE3-42 (A β pyro) oder Phosphate Balanced Saline (PBS) injiziert. Vier Tage nach der Injektion wurde die Hälfte der Mäuse jeder Gruppe für zwei Stunden mit Isofluran anästhesiert, während bei der anderen Hälfte eine „Sham“-Prozedur durchgeführt wurde. Innerhalb der nächsten acht Tage wurden dann von einem geblindeten Untersucher Kognition und Verhalten mittels des mHBT evaluiert. Die Daten wurden mit General Linear Modelling (GLM) und Analysis of Variance (ANOVA) analysiert.

A β pE3-42 verbesserte, vermittelt durch eine Angstreduktion, die Gesamtkognition ($p = 0,038$). Diese kognitive Verbesserung wurde durch eine Narkose mit Isofluran aufgehoben ($p = 0,007$). Die Injektion von A β 1-42 war mit vermehrter Angst assoziiert. Die Analyse von verschiedenen A β Subformen zeigte eine geringere Toxizität von A β pE3-42, die durch die Exposition mit Isofluran aufgehoben wurde. Weiterhin konnte eine geringfügige Neurotoxizität von A β 1-42 gezeigt werden.

X. REFERENZEN

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, Finch CE, Frautschy S, Griffin WS, Hampel H, Hull M, Landreth G, Lue L, Mrak R, Mackenzie IR, McGeer PL, O'Banion MK, Pachter J, Pasinetti G, Plata-Salaman C, Rogers J, Rydel R, Shen Y, Streit W, Strohmeyer R, Tooyoma I, Van Muiswinkel FL, Veerhuis R, Walker D, Webster S, Wegrzyniak B, Wenk G and Wyss-Coray T (2000) *Inflammation and Alzheimer's disease*. *Neurobiology of Aging* 21:383-421.

Al-Hilaly YK, Williams TL, Stewart-Parker M, Ford L, Skaria E, Cole M, Bucher WG, Morris KL, Sada AA, Thorpe JR and Serpell LC (2013) *A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid- β in Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol Commun* 1:83.

Alzforum (n.d.) Retrieved on March 29, 2020 from <http://www.alzforum.org/research-models/alzheimers-disease>

Alzheimer's Association (2019) *2019 Alzheimer's Disease Facts and Figures*. *Alzheimers Dement* 15:321-87.

Awasthi A, Matsunaga Y and Yamada T (2005) *Amyloid-beta causes apoptosis of neuronal cells via caspase cascade, which can be prevented by amyloid-beta-derived short peptides*. *Exp Neurol* 196:282-289.

Baddeley A (2003) *Working memory: looking back and looking forward*. *Nat Rev Neurosci* 4:829-839.

Bao F, Wicklund L, Lacor PN, Klein WL, Nordberg A and Marutle A (2012) *Different β -amyloid oligomer assemblies in Alzheimer brains correlate with age of disease onset and impaired cholinergic activity*. *Neurobiol Aging* 33:825.e1-13.

Bates KA, Verdile G, Li QX, Ames D, Hudson P, Masters CL and Martins RN (2008) *Clearance mechanisms of Alzheimer's amyloid- β peptide: implications for therapeutic design and diagnostic tests*. *Mol Psychiatry* 14:469-486.

Bianchi SL, Tran T, Liu C, Lin S, Li Y, Keller JM, Eckenhoff RG and Eckenhoff MF (2008) *Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics*. Neurobiol Aging 29:1002-1010.

Binder LI, Frankfurter A and Rebhun LI (1985) *The distribution of tau in the mammalian central nervous system*. J Cell Biol 101:1371-1378.

Bittner EA, Yue Y and Xie Z (2011) *Brief review: Anesthetic neurotoxicity in the elderly, cognitive dysfunction and Alzheimer's disease*. Can J Anaesth.58:216:223.

Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K and Arrighi HM (2007) *Forecasting the global burden of Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement 3:186-91.

Cacquevel M, Lebeurrier N, Chéenne S and Vivien D (2004) *Cytokines in Neuroinflammation and Alzheimer's Disease*. Curr Drug Targets 5:529-534.

Cameron B and Landreth GE (2010) *Inflammation, microglia and Alzheimer's Disease*. Neurobiol Dis 37:503-509.

Castegna A, Thongboonkerd V, Klein JB, Lynn B, Markesbery WR and Butterfield DA (2003) *Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain*. J Neurochem 85:1394–1401.

Castellani RJ, Rolston RK and Smith MA (2010) *Alzheimer disease*. Dis Mon 9:484-546.

Caza N, Taha R, Qi Y and Blaise G (2008) *The effects of surgery and anesthesia on memory and cognition*. Prog Brain Res 169:409-422.

Cheng G, Huang C, Deng H and Wang H (2012) *Diabetes as a risk factor for dementia and mild cognitive impairment: A meta-analysis of longitudinal studies*. Intern Med J 42:484-491.

Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O and Bayer TA (2008) *Transient intraneuronal A β rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice.* Acta Neuropathol 116:647-655.

Craft S (2009) *The Role of Metabolic Disorders in Alzheimer Disease and Vascular Dementia: Two Roads Converged.* Arch Neurol 66:412-419.

Culley DJ, Baxter M, Yukhananov R and Crosby G (2003) *The memory effects of general anesthesia persist for weeks in young and aged rats.* Anesth Analg 96: 1004-1009.

Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JN and Perry VH (2009) *Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease.* Biol Psychiatry 65: 304-312.

Dammers C, Schwarten M, Buell AK and Willbold D (2017) *Pyroglutamate-modified Abeta(3-42) affects aggregation kinetics of Abeta(1-42) by accelerating primary and secondary pathways.* Chem Sci 8:4996-5004.

de Klaver MJ, Manning L, Palmer LA and Rich GF (2002) *Isoflurane pretreatment inhibits cytokine-induced cell death in cultured rat smooth muscle cells and human endothelial cells.* Anesthesiology 97:24-32.

Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Xia W, Marcantonio ER, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE and Xie Z (2009) *The common inhalational anesthetic sevoflurane induces apoptosis and increases beta-amyloid protein levels.* Arch Neurol 66:620-631.

Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, Carnini A, Kang B, Wei W, Pidikiti R, Keller JM and Eckenhoff MF (2004) *Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity.* Anesthesiology 101:703-709.

Eckman EA and Eckman CB (2005) *A β -degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention.* Biochem Soc Trans 33:1101-1105.

Ennaceur SM and Sanderson JM (2005) *Micellar aggregates formed following the addition of hexafluoroisopropanol to phospholipid membranes*. *Langmuir* 21:552-561.

Fendl D (2013) *Phänotypische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells der Alzheimer-Krankheit unter Bezug auf Alter und Geschlecht*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät 35-36.

Feinstein SC and Wilson L (2005) *Inability of tau to properly regulate neuronal microtubule dynamics: A loss-of-function mechanism by which tau might mediate neuronal cell death*. *Biochim Biophys Acta* 1739:268-279.

File SE and Wardill AG (1975) *Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board*. *Psychopharmacologia* 44:53-59.

Gao CM, Yam AY, Wang X, Magdangal E, Salisbury C, Peretz D, Zuckermann RN, Connolly MD, Hansson O, Minthon L, Zetterberg H, Blennow K, Fedynyshyn JP and Allauzen S (2010) *A β 40 oligomers identified as a potential biomarker for the diagnosis of Alzheimer's disease*. *PLoS ONE* 5:e15725.

Gordan ML, Jungwirth B, Ohi F, Kellermann K, Kochs EF and Blobner M (2012) *Evaluation of neurobehavioral deficits following different severities of cerebral ischemia in rats: A comparison between the modified hole board test and the Morris water maze test*. *Behav Brain Res* 235:7-20.

Gouras GK, Tsai J, Naslund J, Vincent B, Edgar M, Checler F, Greenfield JP, Haroutunian V, Buxbaum JD, Xu H, Greengard P and Relkin NR (2000) *Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain*. *Am J Pathol* 156:15-20.

Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC and Mesulam MM (2003) *Neurofibrillary Tangles, Amyloid, and Memory in Aging and Mild Cognitive Impairment*. *Arch Neurol* 60:729-736.

Guivernau B, Bonet J, Valls-Comamala V, Bosch-Morató M, Godoy J, Inestrosa N, Perálvarez-Marín A, Fernández-Busquets X, Andreu D, Oliva B and Muñoz F (2016) *Amyloid- β Peptide Nitrotyrosination Stabilizes Oligomers and Enhances NMDAR-Mediated Toxicity*. J Neurosci 36:11693-11703.

Haass C and Selkoe DJ (2007) *Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide*. Nat Rev Mol Cell Biol 8:101-112.

Hall C and Ballachey EL (1932) *A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology*. Univ Calif Publ Psychol 6:1-12.

Hardy J and Higgins G (1992) *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science 256:184-185.

Hardy J and Selkoe DJ (2002) *Amyloid and Hypothesis of Problems Alzheimer 's Road to Disease : the Therapeutics*. Sci Compass Rev 297:353-356.

He W and Barrow CJ (1999) *The A β 3-Pyroglutamyl and 11-Pyroglutamyl Peptides Found in Senile Plaque Have Greater β -Sheet Forming and Aggregation Propensities in Vitro than Full-Length A β* . Biochemistry 38:10871-10877.

Herrup K (2010) *Reimagining Alzheimer's Disease--An Age-Based Hypothesis*. J Neurosci 30:16755-16762.

Hogg RC, Raggenbass M and Bertrand D (2003) *Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function*. Rev Physiol Biochem Pharmacol 147:1-46.

Hussain M, Berger M, Eckenhoff RG and Seitz DP (2014) *General anesthetic and the risk of dementia in elderly patients: Current insights*. Clin Interv Aging 9:1619-1628.

Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K and Olney JW (2009) *Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain*. Biochemi Pharmacol 62:401-405.

Iqbal K and Grundke-Iqbal I (2008) *Alzheimer neurofibrillary degeneration: Significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention: Alzheimer Review Series*. J. Cell. Mol. Med. 12, 38–55.

Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW and Wozniak DF (2003) *Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits*. J Neurosci 23:876-882.

Jiang J and Jiang H (2015) *Effect of the inhaled anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane on the neuropathogenesis of Alzheimer's disease (Review)*. Mol Med Rep 12:3-12.

Jawhar S, Wirths O and Bayer TA (2011a) *Pyroglutamate amyloid- β (A β): A hatchet man in alzheimer disease*. J Biol Chem 286:38825-38832.

Jawhar S, Wirths O, Schilling S, Graubner S, Demuth HU and Bayer TA (2011b) *Overexpression of glutaminy cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A β formation, induces behavioral deficits, and glutaminy cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice*. J Biol Chem 286:4454-4460.

Joe E and Ringman JM (2020) *Cognitive symptoms of Alzheimer's disease : clinical management and prevention*. BMJ 367:l6217.

Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH and Younkin SG (2001) *Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. J Neurosci 21:372-381.

Kumar A and Tsao J (2018) *Alzheimer Disease*. Chem Asian J 22:3437-3447.

Kummer MP and Heneka MT (2014) *Truncated and modified amyloid-beta species*. Alzheimers Res Ther 6:28.

Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, König S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M and Heneka MT (2011) *Nitration of Tyrosine 10 Critically Enhances Amyloid β Aggregation and Plaque Formation*. *Neuron* 71:833-844.

Kummer MP, Hermes M, Delekarte A, Hammerschmidt T, Kumar S, Terwel D, Walter J, Pape HC, König S, Roeber S, Jessen F, Klockgether T, Korte M and Heneka MT (2011) *Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation*. *Neuron* 71:833-844.

Lai J, Hu M, Wang H, Hu M, Long Y, Miao MX, Li JC, Wang XB, Kong LY and Hong H (2014) *Montelukast targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 ameliorates Abeta1-42-induced memory impairment and neuroinflammatory and apoptotic responses in mice*. *Neuropharmacology* 79:707-14.

Lee JJ, Li L, Jung HH and Zuo Z (2008) *Postconditioning with isoflurane reduced ischemia-induced brain injury in rats*. *Anesthesiology* 108:1055-1062.

Liu K, Solano I, Mann D, Lemere C, Mercken M, Trojanowski J and Lee V (2006) *Characterization of A β 11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated A β species in the pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol* 112:163-174.

Lobo A, Launer LJ, Fratiglioni L, Andersen K, Di Carlo A, Breteler MM, Copeland JR, Dartigues JF, Jagger C, Martinez-Lage J, Soininen H and Hofman A (2000) *Prevalence of dementia and major subtypes in Europe : A collaborative study of population-based cohorts . Neurologic Diseases in the Elderly Research Group*. *Neurology* 54:4-9.

Lu Y, Wu X, Dong Y, Xu Z, Zhang Y and Xie Z (2010) *Anesthetic sevoflurane causes neurotoxicity differently in neonatal naïve and Alzheimer disease transgenic mice*. *Anesthesiology* 112:1404-1416.

Mandal PK, Schifilliti D, Mafrica F and Fodale V (2009) *Inhaled anesthesia and cognitive performance*. *Drugs of Today* 45:55-62.

Mandelkow EM, Stamer K, Vogel R, Thies E and Mandelkow E (2003) *Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic and starvation of synapses*. *Neurobiol Aging* 24:1079-1085.

Marešová P, Dolejš J, Mohelska H and Bryan LK (2019) *Cost of Treatment and Care for People with Alzheimer 's disease: A Meta-Analysis*. *Curr Alzheimer Res* 16:1245-1253.

McGaugh JL and Izquierdo I (2000) *The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation*. *Trends Pharmacol Sci* 21:208-210.

McGeer PL and McGeer EG (1995) *The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases*. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195-218.

Menuet C, Borghgraef P, Voituron N, Gestreau C, Gielis L, Devijver H, Dutschmann M, Van Leuven F and Hilaire G (2012) *Isoflurane anesthesia precipitates tauopathy and upper airways dysfunction in pre-symptomatic Tau.P301L mice: Possible implication for neurodegenerative diseases*. *Neurobiol Dis* 46:234-243.

Miech RA, Breitner JC, Zandi PP, Khachaturian AS, Anthony JC and Mayer L (2002) *Incidence of AD may decline in the early 90s for men, later for women: The Cache County study*. *Neurology* 58:209-218.

Miners JS, Baig S, Palmer J, Palmer L, Kehoe P and Love S (2008) *SYMPOSIUM: Clearance of A β from the Brain in Alzheimer's Disease: A β -Degrading Enzymes in Alzheimer's Disease*. *Brain Pathol* 18:240-252.

Mori H, Takio K, Ogawara M and Selkoe DJ (1992) *Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer 's disease*. *J Biol Chem* 267:17082-17086.

Morrone F, Sita G, Tarozzi A, Rimondini R and Hrelia P (2016) Early effects of A β 1-42 oligomers injection in mice: Involvement of PI3K/Akt/GSK3 and MAPK/ERK1/2 pathways. *Behav Brain Res* 314:106-115.

Mortimer JA, French LR, Hutton JT and Schuman LM (1985) *Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease*. *Neurology* 35:264-267.

Mroczko B, Groblewska M, Litman-Zawadzka A, Kornhuber J and Lewczuk P (2018) *Amyloid beta oligomers (AbetaOs) in Alzheimer's disease*. *J Neural Transm (Vienna)* 125:177-91.

Nagy Z Esiri MM, Jobst KA, Morris JH, King EM, McDonald B, Joachim C, Litchfield S, Barnettson L and Smith AD (1997) *The effects of additional pathology on the cognitive deficit in Alzheimer disease*. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:165-170.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA and Yuan J (2000) *Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta*. *Nature* 403:98-103.

Näslund J, Schierhorn A, Hellman U, Lannfelt L, Roses AD, Tjernberg LO, Silberring J, Gandy SE, Winblad B, Greengard P, Nordstedt C and Terenius L (1994) *Relative abundance of Alzheimer A β 3 amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8378-82.

Nakamura S, Murayama N, Noshita T, Annoura H and Ohno T (2001) *Progressive brain dysfunction following intracerebroventricular infusion of beta(1-42)-amyloid peptide*. *Brain Res* 912:128-136.

Ni C, Tan G, Luo A, Qian M, Tang Y, Zhou Y, Wang J, Li M, Zhang Y, Jia D, Wu C and Guo X (2013) *Melatonin Premedication Attenuates Isoflurane Anesthesia-Induced β -Amyloid Generation and Cholinergic Dysfunction in the Hippocampus of Aged Rats*. *Int J Neurosci* 123:213-220.

Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y and LaFerla FM (2003) *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron 39:409-421.

Ohl F, Holsboer F and Landgraf R (2001) *The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents*. Behav Res Methods Instrum Comput 33:392-397.

Ohl F (2003) *Testing for anxiety*. Clin Neurosci Res 3:233-238.

Ohl F and Fuchs E (1999) *Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew*. Brain Res Cogn Brain Res 7:379-387.

Ohl F, Oitzl MS and Fuchs E (1998) *Assessing cognitive functions in tree shrews: Visuo-spatial and spatial learning in the home cage*. J Neurosci Methods 81:35-40.

Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P and Ikonomidou C (2002) *Drug-induced Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain*. Brain Pathol 12:488-498.

Ologunde R and Ma D (2011) *Do inhalational anesthetics cause cognitive dysfunction?* Acta Anaesthesiol Taiwanica 49:149-153.

Patel SS and Goa KL (1995) *Desflurane: A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and its Efficacy in General Anaesthesia*. Drugs 50: 742-767.

Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, Gomez A, Rodriguez-Navarro JA, Solano RM, De Yébenes JG and Mena MA (2010) *Anesthesia with isoflurane increases amyloid pathology in mice models of Alzheimer's disease*. J Alzheimer's Dis 19:1245-1257.

Portelius E, Van Broeck B, Andreasson U, Gustavsson MK, Mercken M, Zetterberg H, Borghys H and Blennow K (2010) *Acute Effect on the A β Isoform Pattern in CSF in Response to γ -Secretase Modulator and Inhibitor Treatment in Dogs*. J Alzheimer's Dis 21: 1005-1012.

Querfurth HW and Laferla FM (2010) *Alzheimer's Disease*. Clin Trials 9:329-344.

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C and Castro L (2002) *Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria*. Free Radic Bio Med 33:1451-64.

Rammes G, Seeser F, Mattusch K, Zhu K, Haas L, Kummer M, Heneka M, Herms J and Parson CG (2018) *The NMDA receptor antagonist Radiprodil reverses the synaptotoxic effects of different amyloid-beta (A β) species on long-term potentiation (LTP)*. Neuropharmacology 140:184-92.

Rizzi L, Rosset I and Roriz-Cruz M (2014) *Global epidemiology of dementia: Alzheimer's and vascular types*. Journal of Biomedicine and Biotechnology (3):908915.

Saido TC, Iwatsubo T, Mann DM, Shimada H, Ihara Y and Kawashima S (1995) *Dominant and differential deposition of distinct beta-amyloid peptide species, A beta N3(pE), in senile plaques*. Neuron 14:457-466.

Schieb H, Kratzin H, Jahn O, Möbius W, Rabe S, Staufenbiel M, Wiltfang J and Klafki HW (2011) *Beta-amyloid peptide variants in brains and cerebrospinal fluid from amyloid precursor protein (APP) transgenic mice: comparison with human Alzheimer amyloid*. J Biol Chem 286:33747–33758.

Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M, Jagla W, Schlenzig D, Lindner C, Rudolph T, Reuter G, Cynis H, Montag D, Demuth HU and Rossner S (2008) *Glutaminy cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology*. Nat Med 14:1106-11.

Schmid S, Jungwirth B, Gehlert V, Blobner M, Schneider G, Kratzer S, Kellermann K and Rammes G (2017) *Intracerebroventricular injection of beta-amyloid in mice is associated with long-term cognitive impairment in the modified hole-board test*. Behav Brain Res 324:15-20.

Schoemaker D, Poirier J, Collins DL, Gauthier S and Pruessner JC (2017) *Familiarity deficits in cognitively normal aging individuals with APOE epsilon4: A follow-up investigation of medial temporal lobe structural correlates*. Alzheimer's Dement (Amsterdam, Netherlands) 9:21-24.

Seitz DP, Reimer CL and Siddiqui N (2013) *A review of epidemiological evidence for general anesthesia as a risk factor for Alzheimer's disease*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 47:122-127.

Selkoe DJ (2001) *Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy*. Physiological Reviews 81:741-766.

Sergeant N, Bretteville A, Hamdane M, Caillet-Boudin ML, Grognet P, Bombois S, Blum D, Delacourte A, Pasquier F, Vanmechelen E, Schraen-Maschke S and Buée L (2008) *Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders*. Expert Rev Proteomics 5:207-224.

Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, Wilson PW and Wolf PA (2002) *Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease*. N Engl J Med 346:476-483.

Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski MC, Roques B and Checler F (2009) *Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid β -peptide*. J Neurochem 109:248-256.

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, Brett FM, Farrell MA, Rowan MJ, Lemere CA, Regan CM, Walsh DM, Sabatini BL and Selkoe DJ (2008) *Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory*. Nat Med 14:837-842.

Silbert B, Evered L and Scott DA (2011) *Cognitive decline in the elderly: Is anaesthesia implicated?* Best Pract Res Clin Anaesthesiol 25:379-93.

Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA and Markesbery WR (1997) *Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer's disease: The Nun Study.* JAMA J Am Med Assoc 277:813-817.

Sperling RA, Mormino EC, Schultz AP, Betensky RA, Papp KV, Amariglio RE, Hanseeuw BJ, Buckley R, Chhatwal J, Hedden T, Marshall GA, Quiroz YT, Donovan NJ, Jackson J, Gatchel JR, Rabin JS, Jacobs H, Yang HS, Properzi M, Kirn DR, Rentz DM and Johnson KA (2019) *The impact of amyloid-beta and tau on prospective cognitive decline in older individuals.* Ann Neurol 2:181-193.

Squire LR and Zola SM (1996) *Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems.* Proc Natl Acad Sci 93:13515-13522.

Tang JX and Eckenhoff MF (2013) *Anesthetic effects in Alzheimer transgenic mouse models.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 47:167-171.

Tang J, Eckenhoff MF and Eckenhoff RG (2010) *Anesthesia and the old brain.* Anesth Analg 110:421-426.

Tanila H (2012) *Wading pools, fading memories-place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer's disease.* Frontiers in Aging Neuroscience 4:1-7.

Tekirian TL (2001) *Commentary: Aβ_N-Terminal Isoforms: Critical contributors in the course of AD pathophysiology.* J Alzheimers Dis 3:241-248.

Thiabaud G, Pizzocaro S, Garcia-Serres R, Latour JM, Monzani E and Casella L (2013) *Heme binding induces dimerization and nitration of truncated β-amyloid peptide Aβ₁₆ under oxidative stress.* Angew Chem Int Ed Engl 52:8041-8044.

Thies W and Bleiler L (2011) *Alzheimer's disease facts and figures*. *Alzheimer's Dement* 7:208-244.

Trojanowski JQ and Lee VM (1994) *Paired helical filament tau in Alzheimer's disease. The kinase connection*. *Am. J Pathol* 144:449-453.

Tsai SK, Lee C, Kwan WF and Chen BJ (1992) *Recovery of cognitive functions after anaesthesia with desflurane or isoflurane and nitrous oxide*. *Br J Anaesth* 69:255-258.

Vanderweyde T, Bednar MM, Forman SA and Wolozin B (2010) *Iatrogenic risk factors for Alzheimer's disease: surgery and anesthesia*. *J Alzheimers Dis* 3:91-104.

Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G and Citron M (1999) *Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE*. *Science* 286:735-741.

Vodovotz Y, Lucia MS, Flanders KC, Chesler L, Xie QW, Smith TW, Weidner J, Mumford R, Webber R, Nathan C, Roberts AB, Lippa CF and Sporn MB (1996) *Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease*. *J Exp Med* 184:1425-1433.

Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Cullen WK, Anwyl R, Wolfe MS, Rowan MJ and Selkoe DJ (2002) *Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo*. *Nature* 416:535-539.

Wei H and Xie Z (2009) *Anesthesia, Calcium Homeostasis and Alzheimer's Disease*. *Curr Alzheimer Res* 6:30-35.

Wilson CJ, Finch CE and Cohen HJ (2002) *Cytokines and cognition - The case for a head-to-toe inflammatory paradigm*. *J Am Geriatr Soc* 50:2041-2056.

Wirhth O, Breyhan H, Cynis H, Schilling S, Demuth HU and Bayer TA (2009) *Intraneuronal pyroglutamate-Abeta 3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model*. Acta Neuropathol 118:487-96.

Wirhth O and Bayer TA (2009) *Die modifizierte Amyloid-Hypothese der Alzheimer-Demenz - Intraneuronales Abeta induziert Neurodegeneration*. Neuroforum 15:76-82.

Wu X Lu Y, Dong Y, Zhang G, Zhang Y, Xu Z, Culley DJ, Crosby G, Marcantonio ER, Tanzi RE and Xie Z (2012) *The inhalation anesthetic isoflurane increases levels of proinflammatory cytokine TNF- α , IL-6 and IL-1 β* . Neurobiol Aging 33, 1364–1378.

Xie Z and Xu Z (2013) *General anesthetics and β -amyloid protein*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 47:140-146.

Xie Z, Dong Y, Maeda U, Alfilie P, Culley DJ, Crosby G and Tanzi RE (2006) *The common inhalation anesthetic isoflurane induces apoptosis and increases amyloid beta protein levels*. Anesthesiology 104:988-994.

Xie Z, Culley DJ, Dong Y, Zhang G, Zhang B, Moir RD, Frosch MP, Crosby G and Tanzi RE (2008) *The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo*. Ann Neurol 64:618-627.

Xu Z, Dong Y, Wu X, Zhang J, McAuliffe S, Pan C, Zhang Y, Ichinose F, Yue Y and Xie Z (2011) *The potential dual effects of anesthetic isoflurane on A β -induced apoptosis*. Curr Alzheimer Res 8:741-752.

Yang CA, Chen YH, Ke SC, Chen YR, Huang HB, Lin TH and Chen YC (2010) *Correlation of copper interaction, copper-driven aggregation, and copper-driven h(2)o(2) formation with a β 40 conformation*. Int J Alzheimers Dis 2011:607861.

Yang H, Liang G, Hawkins BJ, Madesh M, Pierwola A and Wei H (2008) *Inhalational anesthetics induce cell damage by disruption of intracellular calcium homeostasis with different potencies*. Anesthesiology 109: 243-250.

Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC and Bu G (2019) *Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies*. *Nature Reviews Neurology* 15:501-518.

Youssef I, Florent-Bécharde S, Malaplate-Armand C, Koziel V, Bihain B, Olivier JL, Leininger-Muller B, Kriem B, Oster T and Pillot T (2008) *N-truncated amyloid- β oligomers induce learning impairment and neuronal apoptosis*. *Neurobiol Aging* 29:1319-1333.

Zhang Y, Dong Y, Wu X, Lu Y, Xu Z, Knapp A, Yue Y, Xu T and Xie Z (2010) *The mitochondrial pathway of anesthetic isoflurane-induced apoptosis*. *J Biol Chem* 285:4025-4037.

Zhang G, Dong Y, Zhang B, Ichinose F, Wu X, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE and Xie Z (2008) *Isoflurane-induced caspase-3 activation is dependent on cytosolic calcium and can be attenuated by memantine*. *J Neurosci* 28:4551-4560.

Zhang B, Dong Y, Zhang G, Moir RD, Xia W, Yue Y, Tian M, Culley DJ, Crosby G, Tanzi RE and Xie Z (2008) *The inhalation anesthetic desflurane induces caspase activation and increases amyloid β -protein levels under hypoxic conditions*. *J Biol Chem* 283:11866-11875.

Zhang B, Tian M, Zheng H, Zhen Y, Yue Y, Li T, Li S, Marcantonio ER and Xie Z (2013) *Effects of anesthetic isoflurane and desflurane on human cerebrospinal fluid A β and τ level*. *Anesthesiology* 119:52-60.

Zhang S, Hu X, Guan W, Luan L, Li B, Tang Q and Fan H (2017) *Isoflurane anesthesia promotes cognitive impairment by inducing expression of beta-amyloid protein-related factors in the hippocampus of aged rats*. *PLoS One* 12:e0175654.

Zhou R and Bickler P (2017) *Interaction of Isoflurane, Tumor Necrosis Factor- α and β -Amyloid on Long-Term Potentiation in Rat Hippocampal Slices*. *Anesth Analg* 124:582-587.

