



Fakultät für Medizin

Der Einfluss von Isofluran im Alzheimer-Mausmodell in Abhängigkeit des Geschlechts

Christoph Pötzl

Vollständiger Abdruck der von der

Fakultät für Medizin

der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer*innen der Dissertation:

1. Prof. Dr. Bettina E. Jungwirth
2. Prof. Dr. Timo Grimmer

Die Dissertation wurde am 17.03.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.10.2021 angenommen.



Fakultät für Medizin

Klinikum rechts der Isar

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerhard Schneider

**Der Einfluss von Isofluran im
Alzheimer-Mausmodell
in Abhängigkeit des Geschlechts**

von

Christoph Pötzl

aus Zwiesel

2021

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades des

Doktors der Medizin (Dr. med.)

genehmigten Dissertation.

Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit die männliche Form bei Substantiven und Pronomen verwendet. Dies soll jedoch keine Benachteiligung der anderen Geschlechtsidentitäten darstellen, sondern ergeht im Sinne einer Vereinfachung des Leseflusses als geschlechtsneutrale Formulierung.

Inhalt

Abkürzungen.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Die Alzheimer-Krankheit.....	6
1.2. Das Tg2576-Mausmodell.....	8
1.3. Lernen und Gedächtnis.....	8
1.4. Neuronale Rezeptoren.....	10
1.5. Isofluran als Anästhetikum.....	10
1.6. Postoperative kognitive Störungen.....	11
2. Fragestellung.....	12
3. Material und Methoden.....	13
3.1. Studienplanung.....	13
3.2. Zeitlicher Ablauf.....	13
3.3. Rechtliche Grundlage.....	14
3.4. Zucht und Haltung der Versuchstiere.....	14
3.5. Narkose.....	15
3.6. Modifizierter Holeboard Test (mHBT).....	15
3.6.1. Prinzip.....	15
3.6.2. Durchführung des mHBT.....	17
3.7. Organentnahme und Verarbeitung des Gehirns.....	18
3.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	19
3.8.1. Prinzip.....	19
3.8.2. Probenaufbereitung.....	20
3.8.3. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	20
3.8.4. Bestimmung der A β -1-42-Konzentration.....	21
3.9. Methoxy-Färbung.....	22
3.9.1. Prinzip.....	22
3.9.2. Auswahl der Hirschnitte.....	22
3.9.3. Färbung der Hirschnitte.....	23
3.9.4. Mikroskopie und Zählung der Plaques.....	23
3.10. Western Blot (WB).....	25
3.10.1. Prinzip.....	25
3.10.2. Herstellung der SDS-Page-Gele.....	25
3.10.3. Probenaufbereitung, Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung.....	26
3.10.4. Vorbereiten der Proben und Auftrennen der Proteine.....	27
3.10.5. Übertragen der Proteine (Blotting).....	28
3.10.6. Markierung der Proteine und verwendete Antikörper.....	29
3.10.7. Auswertung der Antigenkonzentrationen.....	30
3.11. Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	32
4. Ergebnisse.....	33

4.1. Modifizierter Holeboard Test (mHBT).....	33
4.1.1. Verhalten.....	33
4.1.2. Neurokognition.....	37
4.1.3. Motorik.....	40
4.2. Molekularbiologische Analytik.....	42
4.2.1. Lösliches Amyloid- β -1-42 (A β -1-42).....	42
4.2.2. Amyloid-Plaques (Methoxy-Färbung).....	42
4.2.3. Amyloid-Precursor-Protein (APP).....	42
4.2.4. NMDA-Rezeptor-2B (NR2B).....	43
4.2.5. Metabotroper Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5).....	43
4.2.6. GABA-A-Rezeptor α 1-Untereinheit (GABA-A α 1).....	43
4.2.7. Caspase 3.....	43
4.2.8. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α).....	43
4.3. Regressionsanalysen mit Parametern des mHBT.....	47
5. Diskussion.....	52
5.1. Methoden.....	52
5.1.1. Tg2576-Mausmodell.....	52
5.1.2. Narkose mit Isofluran.....	54
5.1.3. Der modifizierte Holeboard Test (mHBT) als Verhaltenstest.....	55
5.1.4. Analytische Methoden.....	56
5.2. Ergebnisse des Modifizierten Holeboard Test (mHBT).....	59
5.2.1. Verhalten und Motorik.....	59
5.2.2. Neurokognition.....	60
5.2.3. Einfluss der Narkose.....	62
5.2.4. Einfluss des Geschlechts.....	64
5.3. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen.....	66
5.3.1. Alzheimer-Korrelate.....	66
5.3.2. Neuroinflammation, Apoptose.....	69
5.3.3. Rezeptoren.....	71
5.4. Schlussfolgerung und Ausblick.....	73
6. Zusammenfassung.....	74
7. Literaturverzeichnis.....	75
8. Abbildungsverzeichnis.....	84
9. Tabellenverzeichnis.....	85
10. Danksagung.....	86
11. Lebenslauf.....	87

Abkürzungen

AD	<i>Alzheimer's Disease (Morbus Alzheimer)</i>	nm	<i>Nanometer</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>	NMDAR	<i>N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor</i>
Aqua bidest	<i>Doppelt destilliertes Wasser</i>	NR2B	<i>N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor 2B</i>
A β	<i>Amyloid-β</i>	OE	<i>Omission Error</i>
BSA	<i>bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)</i>	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
c	<i>Konzentration</i>	POCD	<i>Postoperative kognitive Dysfunktion (engl. postoperative cognitive dysfunction)</i>
ca.	<i>circa</i>	POD	<i>Postoperatives Delir</i>
CHV	<i>Correct Hole Visit</i>	PONV	<i>postoperative nausea and vomiting</i>
CI	<i>Konfidenzintervall</i>	PVC	<i>Polyvinylchlorid</i>
cm	<i>Zentimeter</i>	px	<i>Pixel</i>
d.h.	<i>das heißt</i>	RC	<i>Repeated Choices</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	ROI	<i>Region of Interest</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>	RR	<i>Rearing</i>
EKG	<i>Elektrokardiographie</i>	s	<i>Sekunden</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>	SB	<i>Sample Buffer</i>
engl.	<i>Englisch</i>	SC	<i>sensorischer Kortex</i>
g	<i>Gramm</i>	SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
GABA	<i>γ-Amino-Buttersäure</i>	SPF	<i>spezifisch pathogenfrei</i>
GLM	<i>general linear model</i>	TBS/T	<i>Tris buffered saline with Tween 20</i>
GR	<i>Grooming</i>	TFI	<i>Time Food Intake</i>
HC	<i>Hippocampus</i>	TIVA	<i>total intravenöse Anästhesie</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)</i>	TOB	<i>Time On Board</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>	TT	<i>Time Trial</i>
LC	<i>Line Crossings</i>	U/min	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
LFBE	<i>Latency First Board Entry</i>	UHV	<i>Unsuccessful Hole Visits</i>
LFHV	<i>Latency First Hole Visit</i>	UNIANOVA	<i>univariate analysis of variance</i>
LTP	<i>Long-Term-Potentiation</i>	UV	<i>Ultraviolett</i>
MAC	<i>minimale alveoläre Konzentration</i>	v.a.	<i>vor allem</i>
mbar	<i>Millibar</i>	Vol.-%	<i>Volumenprozent</i>
MCI	<i>Mild cognitive impairment</i>	w	<i>Massenanteil</i>
mg	<i>Milligramm</i>	WB	<i>Western Blot</i>
mGluR5	<i>metabotroper Glutamatrezeptor 5</i>	WC	<i>Wrong Choices</i>
mHBT	<i>modifizierter Holeboard Test</i>	WCT	<i>Wrong Choices Total</i>
min	<i>Minuten</i>	z.B.	<i>zum Beispiel</i>
ml	<i>Milliliter</i>	ZAS	<i>Zentrales anticholinerges Syndrom</i>
mm	<i>Millimeter</i>	β	<i>Massenkonzentration</i>
MPFC	<i>motorischer präfrontaler Kortex</i>	μ l	<i>Mikroliter</i>
MWM	<i>Morris Water Maze</i>	μ m	<i>Mikrometer</i>
NBE	<i>Number of Board Entries</i>		

1. Einleitung

1.1. Die Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Erkrankung (Alzheimer Demenz, engl. Alzheimer's Disease, AD) stellt in der modernen Gesellschaft mit ihrer stets steigenden Lebenserwartung ein zunehmendes Problem dar. Dies entsteht nicht nur auf persönlicher Ebene des Erkrankten durch die resultierenden Beeinträchtigungen in der Lebensführung, sondern auch in der Umgebung durch zunehmende wirtschaftliche Belastungen. Beim Vergleich der AD mit anderen Erkrankungen, die zum Tod führen, konnte gezeigt werden, dass die AD fast 60 % mehr Sozialkosten in den letzten fünf Lebensjahren verursacht, wobei Teile davon aus dem Familienvermögen gedeckt werden müssen (Kelley et al. 2015). Insbesondere die Angehörigen sind einer nicht zu unterschätzenden psychischen und körperlichen Belastung ausgesetzt, sofern sie mit der Pflege des dementen Angehörigen betraut sind. Damit einher geht, dass sie ihre eigenen Bedürfnisse, wie Gesundheit oder Ernährung zurückstellen. Dabei gibt ein größerer Teil an, dass die Pflege emotional belastender sei als die rein physische Beanspruchung (Grabher 2018).

Für eine steigende Prävalenz der AD sorgt die zunehmende Lebenserwartung der Menschen. So konnten Berechnungen in den USA fast eine Verdreifachung der Prävalenz der AD zwischen den Jahren 2010 und 2050 zeigen (Hebert et al. 2013). Der Anteil an Frauen in der Gruppe der Menschen mit hoher Lebenserwartung wird dabei größer sein als der der Männer, sodass dies verbunden mit dem weiblichen Geschlecht als unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung einer AD, zu einer größeren Zahl an Alzheimer-Patientinnen führen wird (Gao et al. 1998; Kontis et al. 2017). Somit ist von einer kontinuierlich zunehmenden Belastung der Gesellschaft und des Gesundheitssystems durch die AD auszugehen.

Die AD ist eine langsam fortschreitende, meist im höheren Lebensalter auftretende Erkrankung des zentralen Nervensystems, die schließlich durch kollektiven Verlust der exekutiven Funktionen und daraus resultierenden Komplikationen, wie zum Beispiel der Aspirationspneumonie, zum Tode führt. Sie muss als Unterform der dementiellen Erkrankungen von anderen Vertretern dieser Kategorie, wie beispielsweise der Lewy-Körperchen- oder vaskulären Demenz, unterschieden werden. Die AD macht dabei mit 60 bis 80 Prozent die größte Untergruppe aus (Alzheimer's Association 2020). Eine strikte Trennung ist jedoch nicht immer möglich, da es zur Überlappung der einzelnen Formen kommen kann. Die Diagnose dieser gemischten Demenz ist durch das Fehlen diagnostischer Richtlinien oder unterscheidender Biomarker erschwert (Kapasi et al. 2017). Alle Erkrankungen aus dem dementiellen Formenkreis (*Demenz* nach ICD-10, F00-F03) vereint eine gemeinsame Symptomatologie bestehend vor allem aus Störungen der höheren kortikalen Funktionen, wie Gedächtnisproblemen, Verlust der (Schrift-) Sprache, progrediente Orientierungslosigkeit oder gestörte Denkprozesse, die bei den jeweiligen Formen unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Begleitet werden diese von Veränderungen der emotionalen Kontrolle und des Sozialverhaltens (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, ICD-10-GM Version 2021, Kapitel V Psychische und Verhaltensstörungen (F00-

F99), <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2021/block-f00-f09.htm#F00>, abgerufen am 12.10.2020 um 16.42 Uhr)

Die Alzheimer-Demenz wurde erstmals von ihrem Namensgeber Alois Alzheimer im Jahre 1907 beschrieben. Er berichtete über die 51 Jahre alte Auguste Deter, welche unter fortschreitender kognitiver Beeinträchtigung, zunehmenden Verlust des Gedächtnisses sowie delirantem Verhalten litt und nach viereinhalb Jahren Krankheitsdauer verstarb. Bereits Alzheimer konnte bei der histopathologischen Untersuchung von Deters Gehirn senile Plaques und abnorme Neurofibrillen nachweisen (Alzheimer 1907). Später konnte durch weitere Untersuchungen ihrer DNA in den Gehirnzellen eine Mutation im Presenilin-1-Gen (PSEN1) nachgewiesen werden, weshalb bei Auguste Deter post mortem in Zusammenschau mit der Klinik und dem Erkrankungsalter eine früh einsetzende AD (early onset AD) retrospektiv diagnostiziert wurde (Müller et al. 2013). Dieser Befund wurde allerdings durch weitere Untersuchungen, die keine solche Mutation in der DNA Auguste Deters finden konnten, angezweifelt (Rupp et al. 2014). Der wahre Grund für Deters beeinträchtigte Kognition bleibt also bis dato ungelöst.

Die Prävalenz der AD in Europa beträgt ca. fünf Prozent, wobei der Anteil mit 6,88 % in Südeuropa etwas höher ist als mit 4,31 % in nordeuropäischen Ländern. Mehr Frauen (7,13 %) als Männer (3,31 %) sind dabei von der AD betroffen (Niu et al. 2017). Unterschiede ergeben sich auch bei der Prävalenz in den einzelnen Altersklassen: Zwischen 65 und 74 Jahren sind knapp ein Prozent erkrankt, zwischen 75 und 84 bereits 7,66 % und über 85 Jahren 22,53 % (Niu et al. 2017). Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer AD sind dabei der genetische Hintergrund der Person (v.a. der Apolipoprotein-Status), die Familienanamnese bezüglich AD und das Alter des Patienten (Alzheimer's Association 2020). Besondere genetische Varianten (Trisomie 21, Mutationen des Amyloid Precursor Proteins oder des Presenilin-1- oder 2-Gens) führen zu einem früheren Beginn der AD (early onset AD) vor dem 65. Lebensjahr (Alzheimer's Association 2020).

Pathophysiologisch werden als maßgebliche Auslöser der AD extrazelluläre senile Alzheimer-Plaques sowie intrazelluläre Tau-Fibrillen verantwortlich gemacht, welche konsekutiv zu Neuroinflammation und zum Untergang von Nervenzellen und damit zur Neurodegeneration führen (Eratne et al. 2018).

Die Amyloid-Kaskade beginnt mit dem Amyloid-Vorläufer-Protein (engl. Amyloid Precursor Protein, APP), welches als membranständiges Protein von verschiedenen Enzymen gespalten werden kann. Die α -Sekretase bildet lösliches APP α , welches neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Die γ -Sekretase und β -Sekretase bilden Amyloid- β (A β), ein Peptid aus 39 bis 43 Aminosäuren (z.B. A β -1-42), welches akkumuliert, Oligomere und schließlich senile Plaques bildet (Schaeffer et al. 2011). Diese Ablagerungen führen zum Verlust von Synapsen, Inflammationsreaktionen mit Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten sowie zur Induktion von Tau-Fibrillen. Diese Vorgänge münden in den neuronalen Tod von anfälligen Zellen (Herrup 2010). Nervenzellen in Gebieten, die häufig von der AD betroffen sind, beinhalten große, nicht membranständige Faserbündel, die große Anteile des perinukleären Plasmas umgeben. Sie bestehen aus dem Mikrotubulus assoziierten Protein Tau und können auch unabhängig von den

amyloiden Plaques auftreten. Es wird aber auch beschrieben, dass sie reaktiv nach der Ablagerung von A β entstehen (Selkoe 2001).

Die pharmakologische Therapie der AD mit Medikamenten wie Memantin oder Rivastigmin konzentriert sich auf die temporäre Verbesserung der kognitiven Leistungen, stellt allerdings lediglich eine symptomatische Therapie dar. Sie ist nicht in der Lage, den neurodegenerativen Prozess aufzuhalten, geschweige denn diesen rückgängig zu machen. Deshalb wird der nicht-pharmakologischen Therapie (Gedächtnistraining, Musiktherapie etc.) mittlerweile ein höherer Stellenwert zugeschrieben (Alzheimer's Association 2020).

1.2. Das Tg2576-Mausmodell

In der vorliegenden Studie wird das Tg2576-Mausmodell, Tg(HuAPP695.K670N-M671L)2576, verwendet, welches durch *Hsiao et al.* 1996 beschrieben wurde. Es beruht auf der Überexpression eines veränderten Amyloid-Precursor-Proteins (APP). Dies steht am Beginn der Alzheimer-Kaskade. Das humane APP_{K670N,M671L} besteht aus 695 Aminosäuren, wobei Lysin⁶⁷⁰ durch Asparagin⁶⁷⁰ und Methionin⁶⁷¹ durch Leucin⁶⁷¹ ersetzt wurde und steht unter der Kontrolle eines Hamster-Prion-Proteins. Die Mäuse zeigen eine ca. 5,5-fache Überexpression des APPs, verglichen mit Mäusen, die das Wildtyp-APP exprimieren. Konsekutiv ergeben sich erhöhte Werte für Amyloid- β -1-40 und Amyloid- β -1-42/43 (*Hsiao et al.* 1996). Die zweite Ziffer steht dabei für die Anzahl der Aminosäuren. Die ursächliche veränderte Isoform des APP konnte bei der familiären Form von zwei großen schwedischen Familien nachgewiesen werden, weshalb sie auch als APP_{SWE}-Mutation bezeichnet wird (*Mullan et al.* 1992).

1.3. Lernen und Gedächtnis

Um alltägliche Aufgaben bewältigen zu können, werden verschiedene Anteile des Gedächtnisses benötigt, die bei einer Schädigung charakteristische Ausfallerscheinungen bedingen. *Squire und Dede* unterscheiden zwischen deklarativem und nicht deklarativem (implizitem) Gedächtnis. Das deklarative Gedächtnis enthält dabei die Erinnerung an Fakten, Klänge oder Bilder, die aktiv wieder ins Bewusstsein geholt werden können. Im impliziten Gedächtnis ist Erlerntes gespeichert, das nicht bewusst erinnert werden kann, z.B. komplexe motorische Fähigkeiten, klassisch konditioniertes Verhalten oder das implizite Wahrnehmungslernen, d.h. verbesserte Diskrimination oder leichteres Erkennen nach wiederholter Exposition (*Squire und Dede* 2015).

Hiervon muss das Arbeitsgedächtnis unterschieden werden, welches auf der kurzzeitigen Speicherung von visuellen und auditorischen Eindrücken beruht. Längerfristiges Erinnern ist damit nicht möglich und bedarf der oben genannten Gedächtnisentitäten (*Squire and Dede* 2015). *Repovs und Baddeley* unterteilen es in zwei funktionell unterschiedliche Bestandteile: In die phonologische Schleife (engl.

phonological loop) und den räumlich-visuellen Notizblock (engl. visuospatial sketchpad). Die phonologische Schleife dient der Speicherung auditorischer und sprachlicher Eindrücke. Das räumlich-visuelle Arbeitsgedächtnis kann sowohl einfache optische Eindrücke wie Form oder Farbe von Objekten als auch Informationen zur räumlichen Orientierung abspeichern. Als Moderator dieser beiden Teile dient die sogenannten zentrale Exekutive (engl. central executive), die die Aufmerksamkeit je nach Bedarf lenken kann und somit bei komplexen kognitiven Aufgaben eine wichtige integrative Rolle zwischen der phonologischen Schleife und dem visuell-räumlichen Notizblock übernimmt. Zudem wird ein episodischer Puffer (engl. episodic buffer) beschrieben. Dieser stellt einen separaten multimodalen Speicher dar, der Informationen aus unterschiedlichen Gedächtnissystemen, inklusive des Langzeitgedächtnisses, zu Episoden und Szenen zusammenfügt (Repovs and Baddeley 2006).

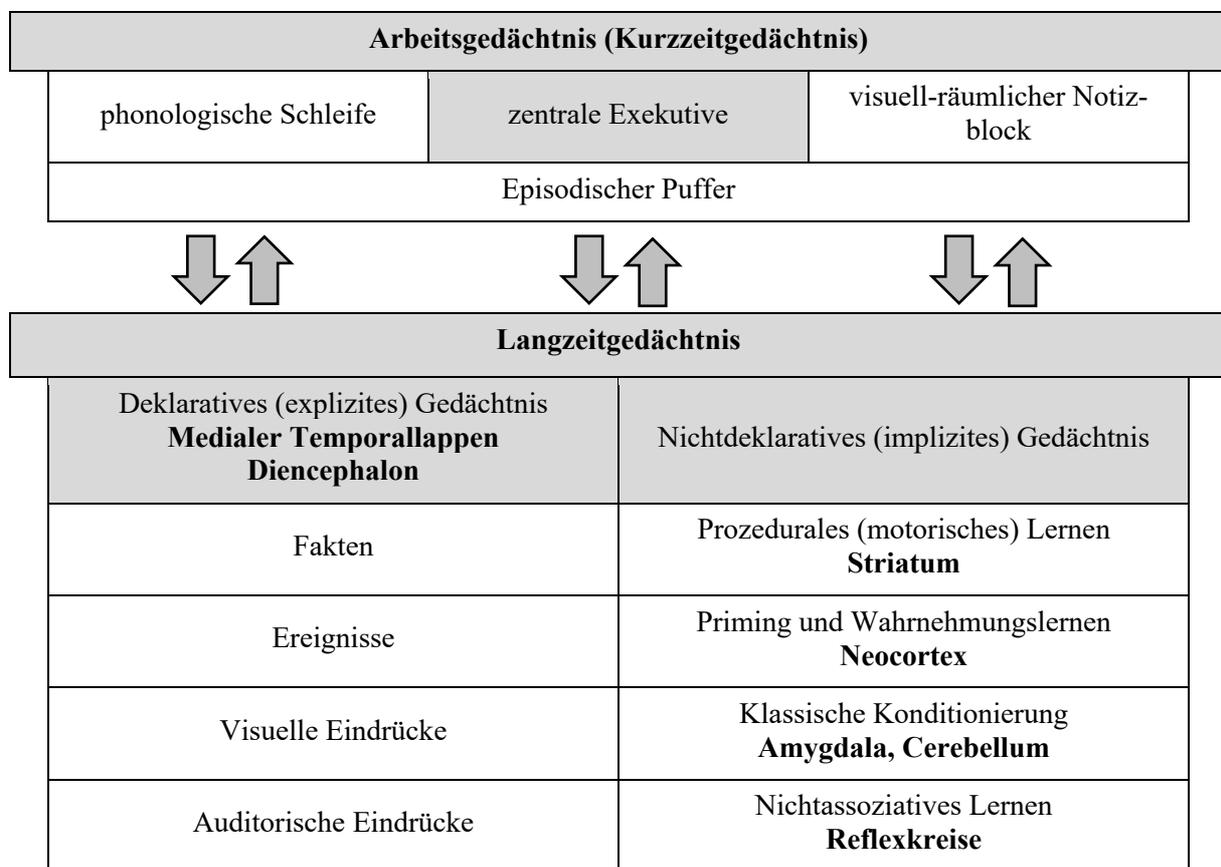


Tabelle 1: Unterteilung des menschlichen Gedächtnisses in Arbeits- und Langzeitgedächtnis (modifiziert nach Squire und Dede 2015, Repovs und Baddeley 2006)

Das Gedächtnis kann auch aus Sicht des Zeitpunktes unterschieden werden, nämlich in anterogrades (Speicherung von neuen Erinnerungen) und retrogrades (Erinnern an bereits gespeicherte Inhalte) Gedächtnis; neue Informationen können dabei von außen über die Sinnessysteme zugeführt oder intern durch das Gehirn selbst generiert werden (Calabrese und Markowitsch 2003). Für das deklarative Gedächtnis folgt eine kurze Zwischenspeicherung in Strukturen des Frontal- und Parietallappens, ehe die Eindrücke im limbischen System bewertet und einer längerfristigen Speicherung zugeführt werden.

Diese Fixierung als explizite Gedächtnisinhalte erfolgt durch weitreichende neuronale Netzwerke des zerebralen Kortex (Calabrese und Markowitsch 2003). Von hieraus können die Informationen dem Bewusstsein wieder zugeführt werden.

Auch im Mausmodell ist es möglich, die einzelnen Gedächtnisfunktionen in Kognitionstests zu untersuchen. So kann im verwendeten modifizierten Holeboard-Test (mHBT) das deklarative Gedächtnis vom Arbeitsgedächtnis getrennt analysiert und Rückschlüsse auf das Lernverhalten der Mäuse gezogen werden. Parallel dazu wird die Angst und Erregung der Tiere gemessen, wodurch es möglich ist, diese beeinflussenden Faktoren der Gedächtnis- und Lernleistung separat zu betrachten (Tabelle 4, Ohl et al. 2003; Schmid et al. 2019).

1.4. Neuronale Rezeptoren

In der vorliegenden Studie wurde der GluN2B (NR2B), ein Subtyp der glutamatergen NMDA-Rezeptor-Gruppe (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor, NMDAR), näher betrachtet. Er bildet gemeinsam mit der GluN1 Untereinheit den tetrameren GluN1/GluN2-Rezeptorkomplex. Dieser gehört zur Gruppe der ionotropen Glutamatrezeptoren, welche als ligandengesteuerte Ionenkanäle funktionieren und wird nachfolgend vereinfachend als NMDAR oder NR2B bezeichnet. Nach der Aktivierung mittels Glutamat als Agonist und einem Co-Agonisten (in der Regel Glycin) kommt es zur Öffnung des Kanals selektiv für Kationen, insbesondere für Kalzium-, Natrium- und Kalium-Ionen (Vyklícky et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der NMDAR zu einer Phosphorylierung des CREB (cAMP response element) und einer Aktivierung verschiedener Zielgene führt, welche für neuronales Überleben und die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses über die Langzeitpotenzierung (engl. Long-Term-Potentiation, LTP) relevant sind (Snyder et al. 2005).

Der metabotrope Glutamatrezeptor 5 (mGluR5) gehört zu den G-Protein gekoppelten Glutamatrezeptoren. Diese führen über eine intrazelluläre Signalkette zu einer veränderten Ausbildung von neuronalen Ionenkanälen und greifen in die Glutamat- und GABA-Freisetzung ein (Conn und Pin 1997).

Der untersuchte GABA-A Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal, welcher bei seiner Aktivierung zu einem Influx an Chlorid-Ionen und damit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran führt. Diese Hyperpolarisation federt exzitatorische Einflüsse ab und führt zu einer geringeren Erregbarkeit der Neuronen. Dadurch ist er ein wichtiger Angriffspunkt für (volatile) Anästhetika. Er besteht aus fünf Untereinheiten, darunter die untersuchte $\alpha 1$ -Untereinheit (Bonin und Orser 2008).

1.5. Isofluran als Anästhetikum

In der Inhalationsanästhesie werden heutzutage vor allem Sevo- und Desfluran verwendet. Die Blutlöslichkeit dieser Narkotika ist im Vergleich zu Isofluran nochmals geringer und die Narkose damit besser

steuerbar. Isofluran besitzt ein Methylethylether-Grundgerüst mit Fluorid- und Chlorid-Substituenten. Die Funktion der volatilen Anästhetika wird durch eine dämpfende Wirkung (beispielsweise durch Stimulation von GABA-A-Rezeptoren) auf die Neuronen im Hippocampus und Kortex erreicht. Auf Rückenmarksebene induzieren die Inhalationsnarkotika muskelrelaxierende und mitunter schmerzstillende Effekte. Sie sind damit Grundlage einer balancierten Anästhesie, in welcher die volatilen Anästhetika mit einem Opioid (z.B. Sufentanil) sowie nach Notwendigkeit mit einem Muskelrelaxans (z.B. Rocuronium) kombiniert werden (Wilhelm 2018).

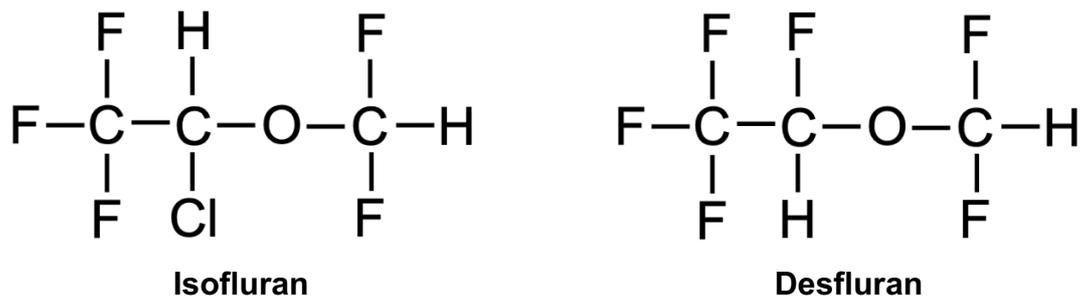


Abbildung 1: Die Strukturformeln der beiden volatilen Anästhetika Isofluran und Desfluran. Beide bestehen aus einem organischen Methylethylether-Grundgerüst mit Fluorid- und Chloridresten.

Neben einer guten Steuerbarkeit ist Isofluran durch eine geringe hepatische Metabolisierung (insbesondere Desfluran und Isofluran) und eine kardioprotektive Wirkung ausgezeichnet. Allerdings stellt Isofluran eine wichtige Triggersubstanz der malignen Hyperthermie dar und auch PONV (engl. *postoperative nausea and vomiting*, postoperative Übelkeit und Erbrechen) tritt wesentlich häufiger auf als bei einer Narkose mit Propofol, wie sie im Rahmen einer total intravenösen Anästhesie (TIVA) durchgeführt wird (Striebel 2017).

1.6. Postoperative kognitive Störungen

Nach einer Allgemeinanästhesie können am Menschen verschiedene klinische Beeinträchtigungen beobachtet werden. Hierbei muss zwischen postoperativem Delir (POD), postoperativer kognitiver Dysfunktion (engl. *postoperative cognitive dysfunction*, POCD) und dem zentralen anticholinergen Syndrom (ZAS) unterschieden werden (Jungwirth et al. 2009). Das ZAS tritt unmittelbar nach der Narkose auf und kann sowohl durch Exzitation als auch Stupor oder Koma gekennzeichnet sein; die Diagnose wird ex juvantibus durch eine schnelle Erholung nach Therapie mit dem Acetylcholinesterasehemmer Physostigmin gestellt (Schneck und Ruprecht 1989). POD tritt abrupt innerhalb von Stunden oder Tagen auf und kann von hyperaktiver oder hypoaktiver Natur sein. Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus, der Orientierung, des Bewusstseins sowie der Emotionen stellen typische Einschränkungen dar. Die Diagnose kann durch klinische Tests und Beobachten des Patienten gestellt werden (Inouye 2006). POCD stellt eine langanhaltende Beeinträchtigung der kognitiven Leistung der Patienten nach einem operativen

Eingriff dar, welche durch prä- und postoperativ durchgeführte neuropsychologische Tests gesichert werden kann. Allerdings fehlen hier einheitliche Richtlinien, sodass eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien nur erschwert möglich ist (Newman et al. 2007). POCD steht auch mit der AD in Verbindung, was in Kapitel 5.2.3 näher betrachtet wird.

2. Fragestellung

Durch die insgesamt gestiegene Lebenserwartung und der Fortentwicklung der Allgemeinanästhesie, die auch bei hochbetagten Menschen eine sichere Narkoseführung erlaubt, werden zunehmend im höchsten Alter erfolgreich Operationen in Vollnarkose durchgeführt. Zieht man in Betracht, dass eine Narkose in höherem Alter möglicherweise das Auftreten der postoperativen kognitiven Dysfunktion (POCD) begünstigt und diese als bedeutender Risikofaktor für die AD gilt (Chen et al. 2014a, b; Bratzke et al. 2018), so stellt dies in Anbetracht der Entwicklung der Bevölkerungspyramide eine besondere Risikokonstellation dar. Hier ist eine weitere Erforschung der genauen Hintergründe wünschenswert, da die wissenschaftliche Datenlage sehr heterogen ist und eine einheitliche Lehrmeinung bisher nicht existiert.

Um eine Grundlage für klinische Untersuchungen zu schaffen, untersucht die vorliegende Arbeit die Auswirkungen einer zweistündigen Allgemeinanästhesie mit Isofluran auf das postanästhetische Outcome von genetisch modifizierten Alzheimer-Mäusen und Wildtypen. Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen einer Narkose auf Verhalten, Neurokognition und Motorik der Mäuse (analysiert mithilfe des modifizierten Holeboard-Tests, mHBT) sowie die pathophysiologischen Veränderungen in deren Gehirnen zu untersuchen. Dementsprechend wurde der Frage nachgegangen, ob eine zweistündige Narkose mit Isofluran positive, negative oder gar keine Veränderungen bei den Versuchstieren hervorruft. Mittels molekularbiologischer Methoden wurden zudem die Alzheimer-Kaskade, Neuroinflammation, Apoptose und Rezeptorexpression in den Gehirnen, sowie die Auswirkungen einer Narkose darauf untersucht. Bisherige Untersuchungen in diesem Feld beschränken sich zumeist allein auf männliche oder weibliche Versuchstiere (Bianchi et al. 2008; Rammes et al. 2009; Haseneder et al. 2013; Eckel et al. 2013). Deshalb wurde bei allen genannten Aspekten das Geschlecht in die Betrachtung miteinbezogen, um etwaige Einflüsse detektieren zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Studienplanung

Insgesamt wurden 85 Tiere (41 Wildtypen, 44 Tg2576-Mäuse) in einem Alter von zehn Monaten in die Studie eingeschlossen. Es ergeben sich folgende acht Versuchsgruppen:

Alter (Monate)	Geschlecht	Genotyp	Intervention	Anzahl der Mäuse
10	weiblich	Wildtyp	Sham	11
10	weiblich	Wildtyp	Isofluran	10
10	männlich	Wildtyp	Sham	10
10	männlich	Wildtyp	Isofluran	10
10	weiblich	Tg2576	Sham	12
10	weiblich	Tg2576	Isofluran	11
10	männlich	Tg2576	Sham	9
10	männlich	Tg2576	Isofluran	12

Tabelle 2: Versuchsgruppensdesign

Da es sich bei dem vorliegenden Versuch um eine Orientierungsstudie handelt, konnte keine formale Fallzahlplanung durchgeführt werden. Aus Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe ist jedoch bereits bekannt, dass die kognitiven Parameter stark streuen (Fendl 2013; Schmid et al. 2019). Weil die transgenen Mäuse eine erhöhte Mortalität in den ersten sechs bis zwölf Lebensmonaten aufweisen (King und Arendash 2002; Fendl 2013), wurde eine Versuchstieranzahl von zehn Tieren pro Versuchsgruppe als angemessen betrachtet.

3.2. Zeitlicher Ablauf

14 Tage vor Beginn der Studie wurden die weiblichen Mäuse einzeln gesetzt, um zu den Männchen äquivalente Bedingungen zu schaffen. Diese (insbesondere die männlichen Tg2576-Mäuse) müssen bereits nach dem Absetzen vom Muttertier aufgrund ihres aggressiven Sozialverhaltens einzeln gesetzt werden. Vier Tage, bevor der mHBT durchgeführt wurde, wurden die Mäuse durch Anfüttern mit den gleichen Mandeln, die auch später im mHBT verwendet wurden, an die Belohnung gewöhnt. Am nächsten Tag wurde die zweistündige Narkose an den Mäusen durchgeführt. Es folgten acht Tage der Verhaltenstestung mittels mHBT und am neunten Tag die Probengewinnung nach Dekapitation der Mäuse in tiefer Narkose. Die asservierten Proben wurden tiefgefroren und in der Zeit danach den einzelnen molekularbiologischen Analysemethoden zugeführt (Abbildung 2).

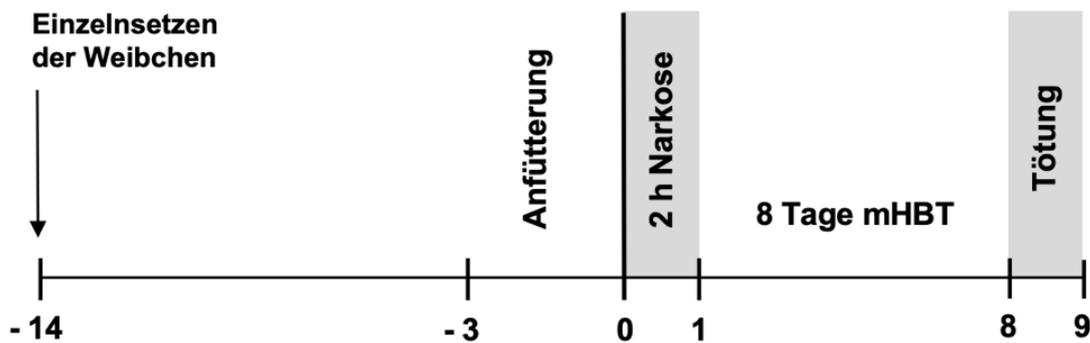


Abbildung 2: Schema und zeitliche Planung der Studie.

3.3. Rechtliche Grundlage

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden gemäß Tierversuchsantrag (TVA) Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-67-2016 (genehmigt durch die Regierung von Oberbayern, Maximilianstr. 39, 80538 München, Deutschland, Dr. Britta Wirrer) durchgeführt.

3.4. Zucht und Haltung der Versuchstiere

Die Mäuse der Studie wurden gemäß des oben genannten TVA in einer separaten Zuchtumgebung aus männlichen B6;SJL-Tg(APPSWE)2576Kha-Mäusen (Taconic Europe, Lille Skensved, Dänemark) und weiblichen C57B6/SJL-Mäusen (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) gezüchtet. Der Genotyp der Tiere wurde mittels DNA-Material aus den Schwänzen der Mäuse durch Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bestimmt. Mäuse mit einer homozygoten rd1-Mutation wurden aufgrund der daraus resultierenden Blindheit aus der Studie ausgeschlossen (Wolf et al. 2016). Die Tiere waren in den Räumen der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum rechts der Isar (Trogerstraße 16, 81675 München, Gebäude 537, 1. UG Raum 3701.3) untergebracht. Unter spezifisch pathogenfreier (SPF) Haltung wurden entsprechend des Geschlechts entweder eine Maus (Männchen ab einem Alter von acht Wochen) oder eine Gruppe von bis zu drei Mäusen (Weibchen) gehalten. Es herrschte eine Raumtemperatur von 21 ± 2 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von $60 \% \pm 15 \%$. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden wurde eingehalten. Die Tiere wurden in offenen Makrolonkäfigen (Typ 3) gehalten. Diese enthielten Einstreu, Nestbau- bzw. Beschäftigungsmaterial in Form von Zellstoff und autoklaviertem Heu und ein Versteck aus rotem Polycarbonat (ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Futter (Erhaltungsfutter, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Einmal pro Woche wurden die Käfige gemeinsam mit Inhalt, Futter und Wasser erneuert.

3.5. Narkose

Die Narkose wurde in den Räumen der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum rechts der Isar (Trogerstr. 32, 81675 München, Gebäude 543, 1. UG, Raum 4301.11) durchgeführt.

Die Einleitung der Narkose mit Isofluran erfolgte in einer Plexiglasbox mit einem Gasgemisch aus 50 % Sauerstoff und 4,5 Vol.-% Isofluran (Isofluran Baxter vet, Illinois, USA) durch einen Vapor der Firma Dräger (Lübeck, Deutschland). Nach dem Verlust der Stellreflexe wurden die Mäuse auf eine Wärmeplatte mit 42 °C gelegt und die Schnauze in eine Nasenkammer platziert. Hierüber wurden zur Narkoseaufrechterhaltung 1,6 Vol.-% Isofluran (entspricht einem MAC von 1,0 bei Mäusen) und 40 Vol.-% Sauerstoff mit einem positiv endexpiratorischen Druck (engl. positive endexpiratory pressure, PEEP) von 5 mbar appliziert. Über subkutan platzierte EKG-Elektroden und Impedanzmessung wurde die Herzfrequenz (Referenzbereich 400-600 Schläge pro Minute) und Atemfrequenz (Referenzbereich: 80-120 Atemzüge pro Minute) gemessen. Die Gaskonzentrationen und Vitalparameter wurden über einen Monitor (Datex Ohmeda S/5 Anästhesie Monitor F-CM1-05 mit MNESTPR Modul, Datex-Ohmeda GmbH, Duisburg, Deutschland) überwacht. Die Körperkerntemperatur wurde über eine rektal einliegende Messsonde ermittelt (Zieltemperatur: $37,5 \pm 0,5$ °C). Die Augen der Mäuse wurden mit Bepanthen® (Dexpanthenol, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt und der Körper mit einer Kompresse zugedeckt. Nach Ablauf der zwei Stunden Allgemeinanästhesie wurden die Mäuse gewogen und zur Ausleitung wieder in die Plexiglasbox platziert. Diese war geflutet mit 100% Sauerstoff. Nachdem die Versuchstiere ihre Stellreflexe wiedererlangt hatten, wurden sie zurück in ihre Käfige verbracht.

Die Tiere der Kontrollgruppe („Sham“-Gruppe, engl. Täuschung) wurden entsprechend der Einschlaf- und Aufwachzeit der Interventionsgruppe für zehn Minuten in identischen Plexiglasboxen platziert, gewogen und anschließend in ihre Käfige zurückgebracht.

3.6. Modifizierter Holeboard Test (mHBT)

3.6.1. Prinzip

Der mHBT ist eine Kombination aus Openfield- und Holeboard Test. Er dient der simultanen Untersuchung von zahlreichen Parametern des Verhaltens und der Motorik von Nagetieren (Ohl et al. 2001a). Die im Folgenden dargelegte Variante ist speziell für Mäuse angepasst und ermöglicht zusätzlich die Untersuchung der Neurokognition (Ohl et al. 2003).

Das modifizierte Holeboard besteht aus der Versuchsarena (quadratische Box mit Kantenlänge 52 cm) aus grauem Polyvinylchlorid (PVC), dessen Boden mit weißem Klebeband in neun gleich große Quadrate (Kantenlänge 16 cm) unterteilt ist. In der Mitte der Arena befindet sich das Holeboard (PVC, Abmessungen: $35 \times 18 \times 1$ cm) mit zehn eingelassenen Löchern (Durchmesser: 3,2 cm, Tiefe: 0,3 cm) auf

deren Grund ein Mandelstück (ca. 0,05 g, Mandeln gehackt, Dr. Oetker, Bielefeld) platziert wird. Auf einem Absatz des Loches wird ein Gitter sowie darüber ein Zylinder (PVC, Höhe: 3,4 cm) eingepasst, sodass die Mandel nicht erreicht werden kann (Abbildung 3). Drei der zehn Zylinder sind mit weißem Klebeband markiert. Darin befindet sich oberhalb des Gitters eine für die Mäuse erreichbare Mandel. Die Konfiguration der markierten Zylinder wechselt an jedem Versuchstag, sodass diese von den Mäusen neu identifiziert werden müssen (Tabelle 3).

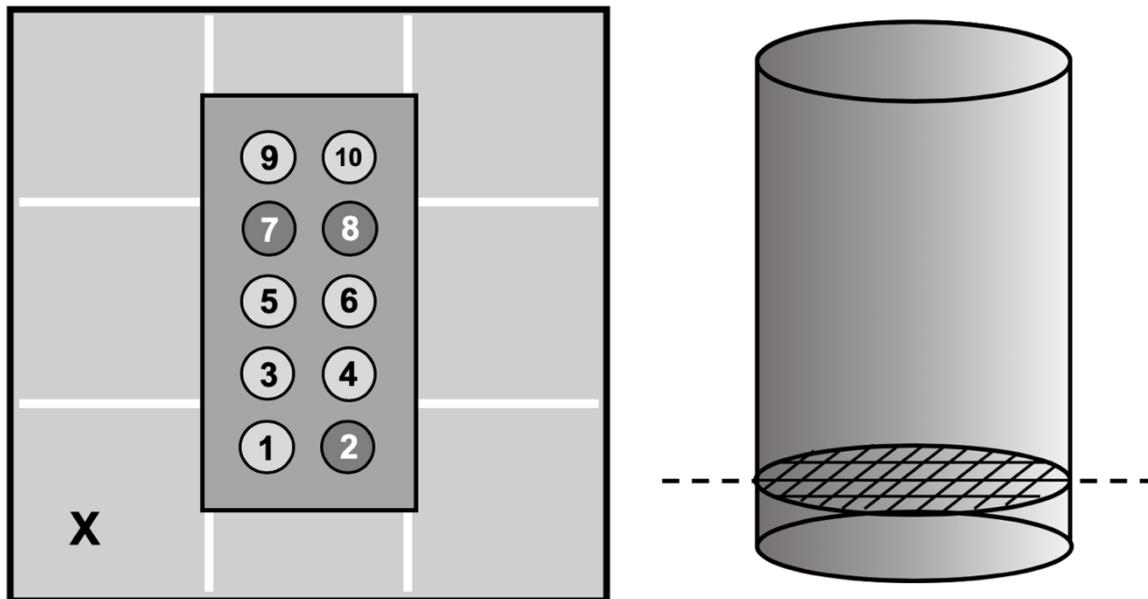


Abbildung 3: Versuchsarena in der Draufsicht mit Zylinderkonfiguration des ersten Tages (markierte Zylinder dunkel) sowie Startposition der Maus (X). Querschnitt eines Zylinders mit Gitter, Mandeln nicht eingezeichnet. Gestrichelte Linie symbolisiert die Ebene des Holeboards (rechts).

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8
markierte Löcher	2 / 7 / 8	1 / 4 / 9	3 / 5 / 8	1 / 4 / 10	2 / 5 / 9	3 / 6 / 9	4 / 8 / 10	2 / 5 / 8

Tabelle 3: Konfiguration der markierten Zylinder je Versuchstag.

An acht auf die Narkose folgenden Tagen werden die Mäuse in jeweils vier Durchläufen zu maximal 300 Sekunden Dauer beobachtet. Das Ziel jedes Durchlaufs ist, dass die Maus die drei erreichbaren Mandelstücke findet und frisst. Ist ein Durchlauf erfolgreich abgeschlossen oder sind die 300 Sekunden verstrichen, wird die Beobachtung beendet und die Maus zurück in ihren Käfig gebracht. Um bei den folgenden drei Durchläufen die Reihenfolge zu ändern, ist das zuvor als Zweites getestete Versuchstier nun der erste Kandidat und das vormalig Erste das Letzte.

Mittels mBHT lassen sich Parameter zu Motorik, des Verhaltens sowie der Neurokognition aufzeichnen (Tabelle 4), die während eines Durchlaufs durch Tastatureingabe über einen Computer zeitkorreliert gespeichert werden (The Observer® 5.0, Noldus Information Technology BV, Wageningen, Niederlande).

Bezeichnung	Erklärung	Bedeutung
Neurokognition		
Wrong Choices (WC)	Besuch eines unmarkierten Zylinders	deklaratives Gedächtnis
Omission Error (OE)	Fehlender Besuch eines markierten Zylinders	
Wrong Choices Total (WCT)	Gesamtfehler eines Durchlaufs, Summe aus WC und OE	
Repeated Choices (RC)	Wiederholter Besuch eines bereits geleerten, markierten Zylinders	Arbeitsgedächtnis
Time Trial (TT)	Gesamtzeit eines Durchlaufs	Lernleistung und Motivation
Verhalten		
Latency First Hole Visit (LFHV)	Latenz des ersten Zylinderbesuchs	zielgerichtete Exploration
Correct Hole Visits (CHV)	Anzahl besuchter markierter Zylinder	
Rearing (RR)	Aufstellen auf die Hinterbeine	ungerichtete Exploration
Latency First Board Entry (LFBE)	Zeit, bis das Board zum ersten Mal betreten wird	Vermeidungsverhalten (Board: ungeschützter Bereich des offenen Feldes)
Number of Board Entries (NBE)	Anzahl des Betretens des Boards	
Time on Board (TOB)	Gesamtzeit auf dem Board	
Grooming (GR)	Gesamtzeit der Putzphasen	
Boli	Kotabsatz	Erregung
Immobility	Bewegungsstarre (ab drei Sekunden)	Angst, Stress
Motorik		
Line Crossings (LC)	Anzahl der überquerten Linien	allgemeine Bewegungsaktivität
Unsuccessful Hole Visits (UHV)	Besuch eines markierten Zylinders ohne Fressen der Mandel	Feinmotorik
Time Food Intake (TFI)	Zeit bis zum kompletten Verzehr der Mandel	

Tabelle 4: Parameter des mHBT der Kategorien Neurokognition, Verhalten und Motorik mit Erklärung (modifiziert nach Ohl et al. 2003 und Schmid et al. 2019).

3.6.2. Durchführung des mHBT

Spätestens 14 Tage vor Durchführung der Verhaltenstestung wurden die Versuchstiere zur Haltung in die spätere Versuchsumgebung gebracht. Als Ort der Durchführung diente der Tierhaltungsraum der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum rechts der Isar (Trogerstraße 16, 81675 München, Gebäude 537, 1. UG, Raum 3701.3). Weibchen, die zuvor in Zweier- oder Dreiergruppen gehalten

wurden, wurden einzeln gesetzt, um zu den Männchen äquivalente Versuchsbedingungen zu schaffen. Vier Tage vor Beginn des mHBT wurde jedem Versuchstier ca. zwölf Mandelstückchen angeboten, was die maximale Anzahl der zu findenden Mandeln an einem Versuchstag darstellt. Somit konnten die Mäuse bereits an die Belohnung gewöhnt werden (siehe Versuchsplanung Abbildung 2). Jeden zweiten Tag wurden die Tiere gewogen, um stressbedingten Gewichtsverlust zu bemerken. Der mHBT findet in der Aktivitätsphase der Mäuse statt und muss somit bei völliger Dunkelheit, lediglich unter Rotlicht, durchgeführt werden. Mäuse sind nachtaktive Säugetiere mit dichromatischem Visus; sie besitzen Sinneszellen mit Absorptionsmaxima bei 512 nm (Türkis) sowie 360 nm (Ultraviolett) und können damit Rotlicht mit Wellenlängen zwischen 700 und 630 nm nicht wahrnehmen (Jacobs 1993).

Vor Beginn jedes Versuchstages wurde das gereinigte Holeboard aus den Einzelteilen zusammengebaut und in der Versuchsarena platziert. Auf den Grund jedes Zylinders wurde ein Mandelstückchen und das passgenaue Gitter oberhalb platziert. Anschließend wurden die Zylinder nach dem jeweils tagesaktuellen Schema (Tabelle 3) angeordnet und in den mit weißem Klebeband markierten Zylindern ein zusätzliches Mandelstückchen oberhalb des Gitters platziert. Die Zylinder wurden mittels Vanillelösung (3,33 mg/ml Vanillepulver in Wasser; Th. Geyer, Höxter, Deutschland) und Wattestäbchen (Stieltupfer, Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland) ausgestrichen.

Beim ersten Durchlauf des ersten Versuchstages wurde in die linke untere Ecke der Versuchsarena eine zusätzliche Mandel gelegt, um den ersten Kontakt des Versuchstiers mit der Arena positiv zu gestalten. Dann wurde die zu testende Maus aus ihrem Haltungskäfig genommen und in die linke untere Ecke des modifizierten Holeboards platziert. Im gleichen Moment wurde der Startbefehl in der Software (The Observer 5.0, Noldus Information Technology BV, Wageningen, Niederlande) gegeben und damit die Aufzeichnungen für eine Beobachtung gestartet. Während der gesamten Versuchsdauer wurden die Befehle zur Erfassung der Parameter (Tabelle 4) zeitgleich zur Beobachtung auf einer geräuschlosen Tastatur eingegeben. Nach Ablauf der 300 Sekunden oder erfolgreichem Beenden eines Durchlaufes wurde die Maus wieder in ihren Haltungskäfig verbracht und die gespeicherten Befehle auf Falscheingaben überprüft. Die Versuchsarena wurde gereinigt, die Zylinder neu mit Mandeln bestückt und ein neuer Durchlauf mit dem nächsten Versuchstier gestartet.

3.7. Organentnahme und Verarbeitung des Gehirns

Am Tag nach Abschluss des mHBT, d.h. an Tag neun nach der Allgemeinanästhesie, wurden die Versuchstiere unter tiefer Narkose in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum rechts der Isar (Trogerstr. 32, 81675 München, Gebäude 543, 1. UG, Raum 4301.11) dekapitiert. Dazu wurde ein mit wenigen Tropfen Isofluran (Isofluran Baxter vet, Baxter, Deerfield, Illinois, USA) getränktes Papiertuch in eine Glasbox gelegt und das zu euthanasierende Tier hineingesetzt. Nach Eintreten eines tiefen Bewusstseinsverlustes wurde die Maus zunächst gewogen und dann mithilfe einer Guillotine (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Florida, USA) dekapitiert. Das austretende Blut aus dem

verbleibenden Körper wurde in einem Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gesammelt. Dieses wurde nach der Gehirnentnahme für fünf Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland), das überstehende Serum in ein weiteres Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert. Der Kopf der Maus wurde in eine Glasschale mit destilliertem Wasser gelegt und der knöcherne Schädel stumpf freipräpariert. Über das Foramen magnum wurde die Schädelhöhle von kaudal nach rostral mit einer Schere eröffnet und Kalotte sowie Hirnhäute mittels Pinzette vorsichtig vom Gehirn abgetrennt ehe es mit einem Spatel von der Schädelbasis gelöst wurde. Mithilfe eines kleinen Löffels wurde das Gehirn auf eine Gefrierplatte (gekühlt auf Trockeneis) gelegt und kryokonserviert. Nach ca. drei Minuten wurde das Gehirn in einen Zylinder aus Aluminiumfolie verpackt und bei -80°C gelagert.

Bei weiblichen Tieren wurde eine Zyklusbestimmung durchgeführt. Dazu wurde über eine Pasteur-Pipette (Ratiolab GmbH, Dreeich, Deutschland) destilliertes Wasser in die Scheide der Maus eingebracht und die Flüssigkeit mit vaginalen Zellen aspiriert. Diese wurde auf einen Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost® Plus Objektträger, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) getropft und ein Deckglas (Menzel-Gläser 24x50 mm, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgelegt. Die Zyklusbestimmung erfolgte mikroskopisch (Axioskop 40, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung nach *Caligioni* (2009).

Zur weiteren Verarbeitung wurde das gelagerte Gehirn zwölf Stunden vor dem Schneideprozess bei -20°C gelagert. Die beiden Hemisphären wurden getrennt und mittels Kryostat (Microm HM 560, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei -20°C Umgebungstemperatur geschnitten (Messertemperatur -14°C , Objekttemperatur -10°C). Eine Hälfte wurde dabei in motorischen präfrontalen Kortex (MPFC), sensorischen Kortex (SC), motorischen Kortex, Thalamus sowie Hippocampus (HC) und Rest aufgeteilt und zur weiteren Lagerung bei -80°C in ein Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg) überführt. Die andere Hälfte wurde in sagittale Hirnschnitte zerteilt, beginnend von medial, und diese auf Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost® Plus Objektträger, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) übertragen. Dazu wurden jeweils abwechselnd sechs Objektträger mit drei Schnitten à $50\ \mu\text{m}$ bzw. $10\ \mu\text{m}$ bestückt, bis die Hemisphäre komplett in Hirnschnitte geteilt war, d.h. das laterale Ende erreicht war. Auch diese wurden bei -80°C gelagert.

3.8. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

3.8.1. Prinzip

Der verwendete Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich-ELISA) beruht auf einer Antigen-Antikörperreaktion zwischen einem Antikörper, der sich am Boden der mit der Probe zu befüllenden Vertiefungen (Wells einer Mikrotiterplatte, siehe unten) befindet. Nach der Inkubation der Wells

mit der Antigenlösung und mehrfachen Waschvorgängen wird der primäre Antikörper hinzugefügt, welcher das Antigen gemeinsam mit dem Antikörper am Boden wie ein Sandwich gemeinsam einfasst. Dieser primäre Antikörper selbst kann bereits ein Enzym für den Nachweis beinhalten oder es wird nach weiteren Waschvorgängen ein sekundärer Antikörper hinzugefügt, welcher dann über eine enzymatische Reaktion die Konzentrationsbestimmung ermöglicht (Kato et al. 1977; Aydin 2015).

3.8.2. Probenaufbereitung

Zur Analyse des murinen Hirngewebes aus dem MPFC wurden einige Teilstücke daraus in ein Mikroreaktionsgefäß (2 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und das Gewicht mittels Feinwaage (LA 164i-M, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) bestimmt. Anschließend wurde das zehnfache Gewicht an eisgekühltem Guanidin-Puffer (Tabelle 5) hinzugegeben, mittels eines kleinen Mörsers (aus Sample Grinding Kit; 80-6483-37, GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) zerstoßen und für 3,5 Stunden bei Raumtemperatur auf einem 3D-Schüttler (Rocky® 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) inkubiert. Das zehnfache Gewicht dieser Lösung wurde als eisgekühlter Casein-Puffer (Tabelle 5) zugegeben und bei 4 °C und 13.000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorf-Gefäß (2 ml) gegeben und bei – 80 °C gelagert.

Guanidin-Puffer (pH = 8,0)		
Guanidin-HCl	c = 5,0 mol/l	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tris	c = 50 mmol/l	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Aqua bidest	Lösungsmittel	
Casein-Puffer (pH = 8,0)		
Casein	w = 0,25 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natriumazid	w = 0,05 %	
Aprotinin	β = 20 μ g/ml	
EDTA	c = 5 mmol/l	
Leupeptin	β = 10 μ g/ml	
PBS	Lösungsmittel	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Zusammensetzung der Extraktionslösungen für den ELISA. Konzentration (c), Massenanteil (w), Massenkonzentration (β).

3.8.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration des Homogenisats wurde mittels Bradford-Test bestimmt (Bradford 1976). Dieser wurde ebenfalls beim Western Blot (Kapitel 3.10) verwendet. In zwei Mikroreaktionsgefäße (0,2 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung in Aqua bidest hergestellt. In eine 96-Well-Mikrotiterplatte (BRANDplates®, BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) wurde zunächst die Standardreihe pipettiert (0, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000

$\mu\text{g/ml}$ (Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Serum Albumin (BSA) Set, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)) und dann die hergestellten Verdünnungen zu jeweils $5\ \mu\text{l}$ in drei Wells pro Verdünnung und Standard. Anschließend wurden $25\ \mu\text{l}$ DC™ Protein Assay Reagent A sowie $200\ \mu\text{l}$ DC™ Protein Assay Reagent B (beide Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) zugegeben und die Platte bei Raumtemperatur für 30 Minuten auf dem 2D-Schüttler (Inkubator 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Die digitale Auswertung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $620\ \text{nm}$ mittels Sunrise™ (Tecan Group, Maennedorf, Schweiz). Standardkurve und Proteinkonzentrationen wurden mittels der Software Magellan™ (Tecan Group, Maennedorf, Schweiz) errechnet.

3.8.4. Bestimmung der A β -1-42-Konzentration

Für die folgenden Analyseschritte wurde das „Human A β 42 ELISA Kit“ (KHB3442, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet. Falls nicht anders gekennzeichnet, beinhaltet dieses die verwendeten Chemikalien.

Um den Anteil des gelösten A β -1-42 an der Gesamtproteinkonzentration im MPFC zu bestimmen, wurden alle Homogenisate auf eine Einheitsproteinkonzentration von $0,08\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ mittels Standard Diluent Buffer, auf Eiswasser gekühlt, verdünnt. Es wurde eine Standardreihe (0; 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 pg/ml) aus dem aufgelösten Human-A β -1-42-Standard ($c = 1\ \mu\text{g/ml}$) in $1,4\ \text{ml}$ Reconstitution Buffer (Natriumbikarbonat (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) $c = 55\ \text{mmol/l}$, $\text{pH} = 9,0$) und dem Standard Diluent Buffer hergestellt. Zwei Wells der mit dem Antikörper gegen Human-A β -1-42 beschichteten 96-Well-Platte wurden mit $50\ \mu\text{l}$ der Standardreihe und der eingestellten Proben beschickt. Anschließend wurde $50\ \mu\text{l}$ des Human-A β -1-42 Detection Antibody pro Well hinzugefügt, die Platte versiegelt und bei $8\ ^\circ\text{C}$ auf einem 3D-Schüttler (D305, Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande) über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden $16\ \text{ml}$ des 25-fach Wash Buffers mit $384\ \text{ml}$ Aqua bidest auf eine 1-fache Konzentration verdünnt. Die 1-fache Anti-Rabbit-IgG-Horse-radish-peroxidase (HRP) Lösung wurde aus $1,2\ \text{ml}$ der 100-fachen Stammlösung durch Verdünnung mit $12\ \text{ml}$ HRP-Diluent gewonnen. Die inkubierte Platte wurde ausgeschüttelt und viermalig mittels $400\ \mu\text{l}$ Wash Buffer (einfach) gewaschen. Anschließend wurden pro Well $100\ \mu\text{l}$ der 1-fachen Anti Rabbit IgG HRP Lösung hinzugefügt, die Platte versiegelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem 3D-Schüttler (Rocky® 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) inkubiert. Danach erfolgte erneut viermaliges Waschen mittels $400\ \mu\text{l}$ 1-fach konzentriertem Wash Buffer und die Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ stabilisiertem Chromogen (Tetramethylbenzidin). Die Platte wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf einem 3D-Schüttler inkubiert, danach wurden $100\ \mu\text{l}$ Stop-Lösung hinzugegeben.

Die Analyse erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mittels Sunrise™ (Tecan Group, Maennedorf, Schweiz). Standardkurve und A β -1-42-Konzentration wurden mit Hilfe der Software Magellan™ (Tecan Group, Maennedorf, Schweiz) ausgewertet.

3.9. Methoxy-Färbung

3.9.1. Prinzip

Die Methoxy-Färbung beruht auf der hohen Affinität des Farbstoffes 1,4-bis(4'-hydroxystyryl)-2-methoxybenzen – Methoxy-X04 – zu den amyloiden Plaques, die dadurch effektiv markiert werden können. Er wird über Zwischenschritte aus Kongorot und Chrysamin G synthetisiert. Beide weisen eine hohe Affinität zu amyloiden Ablagerungen auf und eignen sich daher gut, um A β in Gehirnschnitten und -proben nachzuweisen (Klunk et al. 1995). Methoxy-X04 zeigt eine ähnlich hohe Affinität zu A β wie Chrysamin G. Es färbt sowohl amyloide Plaques als auch neurofibrilläre Bündel und vaskuläres Amyloid bei geringem Hintergrundrauschen, da normales Gewebe praktisch nicht angefärbt wird (Klunk et al. 2002). Nach der Färbung und Mikroskopie demarkieren sich senile Plaques, die anschließend elektronisch gezählt werden können.

3.9.2. Auswahl der Hirnschnitte

Zur Methoxy-Färbung wurden sagittale Hirnschnitte (Dicke 50 μ m) herangezogen, auf welchen vergleichbare Flächen von Hippocampus und Isocortex (Region of Interest, ROI) angeschnitten waren. Diese Gebiete sollten auf das Vorkommen von Alzheimer-Plaques untersucht werden. Die ROI erstreckt sich auf den Bereich zwischen ca. 600 μ m – 1900 μ m ab der Mittellinie zwischen den beiden Hirnhemisphären. Daher wurden für die Plaque-Färbung die Objektträger 5 – 6 sowie 13 – 17, also insgesamt $7 \times 3 = 21$ Hirnschnitte der gleichen Maus à 50 μ m, ausgewählt (Abbildung 4).

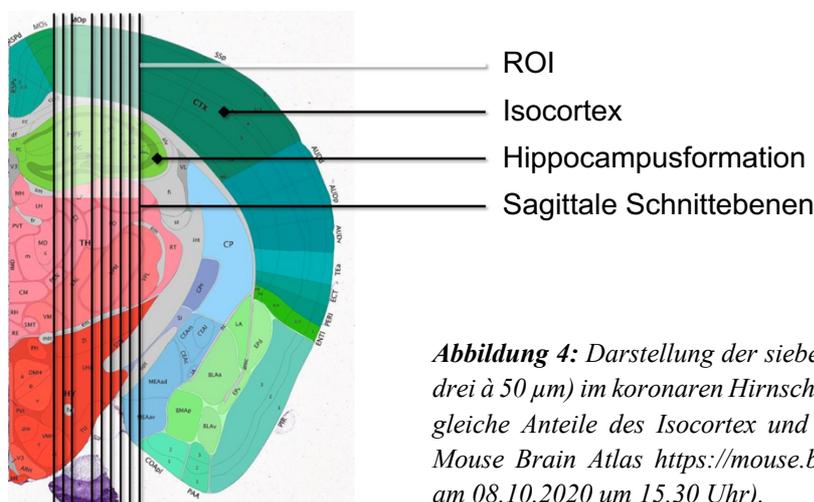


Abbildung 4: Darstellung der sieben ausgewählten Hirnschnitte (jeweils drei à 50 μ m) im koronaren Hirnschnitt einer Maus. Sie beinhalten in etwa gleiche Anteile des Isocortex und Hippocampus (Allen Institute, Allen Mouse Brain Atlas <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>; Abgerufen am 08.10.2020 um 15.30 Uhr).

3.9.3. Färbung der Hirnschnitte

Zur histochemischen Färbung der Hirnschnitte wurden diese mindestens 20 Minuten vor Beginn der Färbung von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Schnitte wurden 20 – 30 Minuten mit $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlter 1:1 Aceton-Isopropanol-Lösung (Aceton zur Analyse, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland; 2-Propanol anhydrous, 99.5%, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) fixiert. Anschließend wurden sie zweimal zehn Minuten mit 1-facher PBS-Ethanol mit Methylethylketon-Lösung (1:1) (PBS buffer (10X Dulbecco's)-Powder, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland; Ethanol absolut vollvergällt, Fischar Otto GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland) gewaschen und für 30 Minuten in Dunkelheit mit der Methoxy-X04 Färbelösung auf einem 3D-Schüttler (Rocky® 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) gefärbt. Die Färbelösung besteht aus 100 ml Ethanol (Ethanol absolute, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 100 ml 1-facher PBS-Lösung sowie 800 μl Stammlösung (Tabelle 6). Danach erfolgte dreimal ein Waschvorgang mit der 1-fachen PBS-Ethanol Lösung sowie dreimal mit Aqua bidest (jeweils für zehn Minuten). Die gefärbten Objektträger wurden für 30 Minuten in angewinkelter Stellung im Dunklen getrocknet und mittels Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako North America Inc., Carpinteria, Kalifornien, USA) und Deckgläsern (Menzel-Gläser 24x50 mm, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) eingedeckt und über Nacht belassen.

Methoxy-X04-Stammlösung		
Methoxy-X04	10 mg	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	100 μl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
1,2-Propandiol	450 μl	Krankenhausapotheke, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
1-fach PBS	450 μl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (1 mol/l)	50 μl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA

Tabelle 6: Bestandteile der Methoxy-X04-Stammlösung.

3.9.4. Mikroskopie und Zählung der Plaques

Um die Alzheimer Plaques sichtbar zu machen und anschließend zu zählen wurde mit Hilfe des Mikroskops Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eine digitale Aufnahme eines der drei Schnitte jedes gefärbten Objektträgers erstellt. Hierzu wurde zunächst unter 2,5-facher Vergrößerung orientierend der geeignetste Schnitt auf dem Objektträger ausgewählt und anschließend mit Hilfe der Software ZEN 2.3 pro (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) die ROI, d.h. Hippocampus und Isocortex, grob eingegrenzt (Abbildung 5). Die Aufnahmen wurden dann in zehnfacher Vergrößerung angefertigt mit zwölf Millisekunden Belichtungszeit. Dafür unterteilt das Mikroskop die vorher definierte ROI in Kacheln mit zehnfacher Vergrößerung, die dann vollautomatisch abgeliichtet und als *eine* große Bilddatei digitalisiert werden (Abbildung 6). Da die Oberfläche der Schnitte nicht planar vorliegt, mussten dem System für jeden Schnitt manuell mindestens vier Fokuspunkte (in Z-Richtung) über die gesamte ROI definiert werden. Anhand dieser Fokuspunkte errechnet das System für

jede Kachel die optimale Z-Position zur schärfsten Abbildung. Nachdem das gesamte Bild der ROI erstellt wurde erfolgte mit dem Befehl „Stitching“ durch die Software eine gleichmäßigere Anlagerung der einzelnen Kacheln, sodass sichtbare Kanten zwischen den Einzelbildern minimiert wurden.

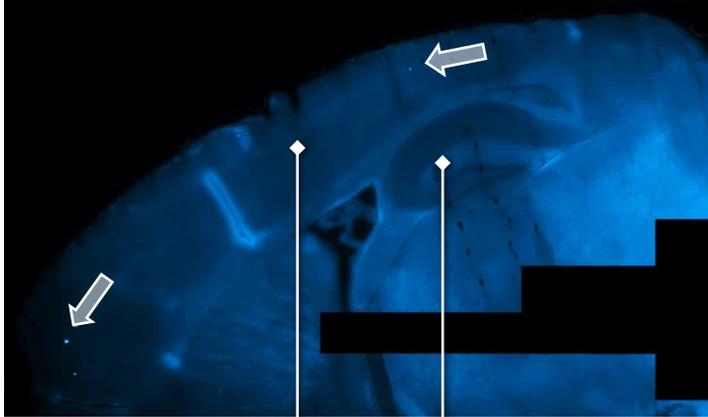


Abbildung 5: Digitales Abbild in der Sagittalebene eines Hirnschnitts (Tg2576, 10 Monate) mit wenigen Alzheimer-Plaques (weiße Pfeile). Identifikation der ROI anhand des Allen Mouse Brain Atlas (unten, Allen Institute, <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>; Abgerufen: 31.10.2019, 15.50 Uhr). linke Verbindungslinie: Isocortex. Rechte Verbindungslinie: Hippokampusformation.

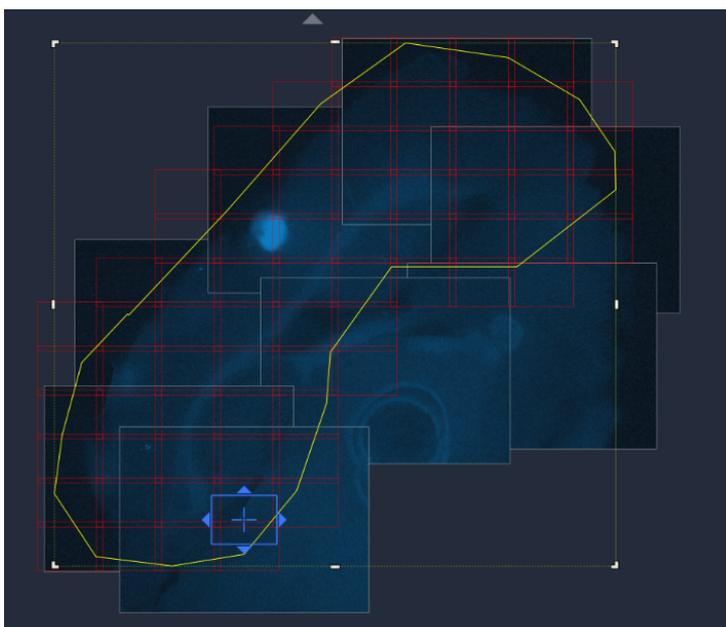
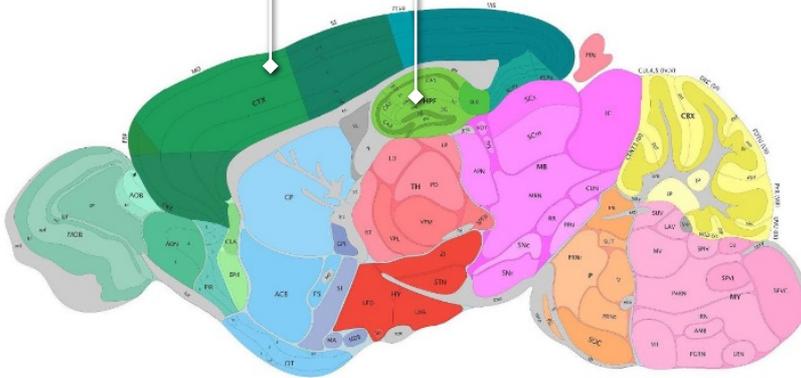


Abbildung 6: Grobe Auswahl der ROI (gelb) und Einteilung in Kacheln (rot). Jede Kachel wird in zehnfacher Vergrößerung abgelichtet und zu einem ganzen Bild zusammengefügt. Ansicht aus ZEN 2.3.

Die Identifikation der Plaques wurde elektronisch durch das Open-Source Programm ImageJ mit der Erweiterung Fiji (ImageJ 1.52h, <https://imagej.net/ImageJ>; Abgerufen: 31.10.2019, 16.17 Uhr) vorgenommen. Dazu wurden bei jedem Hirnschnitt Hippocampus und Isocortex getrennt analysiert. Die Auswahl wurde anhand des Allen Brain Atlas (<https://mouse.brain-map.org/static/atlas>; Abgerufen: 31.10.2019, 15.50 Uhr) getroffen (Abbildung 5). Dazu wurde das „Polygonal Selection Tool“ verwendet und über das Tool „Measure“ die Gesamtfläche der Auswahl in Pixel (px) ermittelt. Des Weiteren wurden nicht ausgewählte Bereiche gelöscht („Clear outside“). Der Hintergrund wurde subtrahiert („Subtract background“) um die Alzheimer-Plaques deutlicher abgrenzen zu können und ein für jedes Bild spezifischer Schwellenwert („Threshold“) festgelegt, der die Intensität festlegt, ab wann das System einen Alzheimer-Plaque erkennen sollte. Anschließend wurden die digital ausgewählten Partikel unter Berücksichtigung von Anzahl, Fläche und Anteil an der Fläche von Hippocampus und Isocortex gezählt („Analyze“) und das Ergebnis auf Plausibilität überprüft.

Es wurde der Mittelwert aus den prozentualen Anteilen der Plaques an der Fläche des Hippocampus oder Isocortex der sieben Schnitte pro Tier ermittelt und der statistischen Auswertung zugeführt.

3.10. Western Blot (WB)

3.10.1. Prinzip

Der Western Blot (WB) beruht im Wesentlichen auf zwei Schritten: Zunächst wird das Proteingemisch durch Elektrophorese und der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit der Proteine aufgrund deren Molekulargewicht aufgetrennt. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Übertragung (das eigentliche „Blotting“) der getrennten Proteine auf eine spezielle Membran, worauf später wiederum die Antigen-Antikörper-Reaktion stattfinden kann. Diese ermöglicht die spezifische Markierung der gesuchten Proteine (Antigene) und macht sie durch eine Enzymreaktion (ähnlich wie beim ELISA, Kapitel 3.8) sichtbar. Der geographische Name „Western Blot“ wurde analog zu den Verfahren „Southern Blot“ (zur Bestimmung von DNA-Sequenzen) und „Northern Blot“ (zur Bestimmung von RNA-Sequenzen) gewählt. Der WB erlaubt durch die oben genannten Schritte eine sensitive Methode zur Bestimmung spezifischer Proteine aus einer Mischung aus zahlreichen Antigenen (Burnette 1981).

3.10.2. Herstellung der SDS-Page-Gele

Zum Auftrennen der Proteine wurden SDS-PAGE-Gele (SDS, engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) benötigt, die aus zwei verschiedenen Fraktionen bestehen: Sammel- und Trenngel. Diese Gele wurden mithilfe einer speziellen nur oben geöffneten Kammer (Mini-PROTEAN® 3 Multi-Casting Chamber, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) hergestellt, in welche große und kleine Glasplatten (Mini-PROTEAN® Spacer Plates 1.0 mm und Short Plates, Bio-

Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) eingespannt wurden. Die großen Glasplatten enthielten eine 1,0 mm dicke Aussparung, wodurch Zwischenräume für das spätere Gel entstanden. Nachdem die Kammer unten dicht verschlossen wurde, folgte die Zugabe des Trenngels (Tabelle 7) mittels einer großen Spritze (50 ml Original Perfusor® Spritze, B. Braun, Melsungen, Deutschland) über eine passende Öffnung von vorne unten, bis der Flüssigkeitsstand die Höhe des „Bio-Rad“-Logos auf der Kammer erreicht hatte. Anschließend wurde mithilfe einer 5 ml Pipette das Sammelgel (Tabelle 7) von oben auf das Trenngel in die Aussparungen gegeben, bis die Zwischenräume der Glasplatten vollständig und ohne Luftblasen durch das spätere Gel ausgefüllt waren. Um 15 Geltaschen zu schaffen, wurden anschließend Käbme mit 1,0 mm Dicke (Mini-PROTEAN® Comb, 15-well, 1.0 mm, 26 µl, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) in die Zwischenräume gesteckt. Zum Auspolymerisieren der Gele wurden diese einige Zeit bei Raumtemperatur belassen und anschließend über Nacht feucht eingepackt im Kühlschrank (4 °C) gelagert.

Sammelgel (10 Gele)		
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid)	25 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris (1,5 mol/l; pH 8,8)	18,75 ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Aqua bidest	29,75 ml	
Natriumdodecylsulfat (10 %)	0,75 ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
2,2,2-Trichlorethanol	0,75 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	75 µl	
Ammoniumpersulfat (APS)	375 µl	
Trenngel (10 Gele)		
Rotiphorese® Gel 30 (Polyacrylamid)	4,2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris (1,25 mol/l; pH 6,8)	2,5 ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Aqua bidest	17,5 ml	
Natriumdodecylsulfat (SDS) (10 %)	0,25 ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	50 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	250 µl	

Tabelle 7: Bestandteile des Sammel- und Trenngels.

3.10.3. Probenaufbereitung, Konzentrationsbestimmung und Vorbereitung

Zur Analyse im Western Blot wurde bei – 80 °C gelagertes Hirngewebe aus dem Hippocampus (HC) sowie aus dem sensorischen Cortex (SC) herangezogen. Für die Aufbereitung wurden Mikroreaktionsgefäße (Grinding Tubes) sowie Mörser aus dem Sample Grinding Kit (80-6483-37, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) verwendet. Um hygroskopisch angezogenes Wasser in den Grinding Tubes zu

entfernen, wurden diese bei 12.000 U/min für drei Minuten zentrifugiert und das überstehende Wasser abpipettiert. Zur Proteinextraktion wurden entweder 200 µl (HC) oder 280 µl (SC, da mehr Hirngewebe) Extraktionslösung (Tabelle 8) in die Mikroreaktionsgefäße pipettiert, das Hirngewebe zugegeben und für ca. zwei Minuten mittels Mörser und Granulat der Grinding Tubes zerkleinert. Gearbeitet wurde auf Eiswasser. Das zerkleinerte Gewebe wurde bei 14.000 U/min bei 4 °C für 40 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überführt und die Zellhomogenisate bei – 20 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte analog zu Kapitel 3.8.3 nach Bradford.

Extraktionslösung (1 ml)		
Ripa Buffer	970 µl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (100×)	10 µl	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
cOmplete™ (50×)	20 µl	
Pepstatin (1 mg/ml)	1 µl	

Tabelle 8: Bestandteile des Extraktionspuffers zur Vorbereitung für die Gelelektrophorese.

3.10.4. Vorbereiten der Proben und Auftrennen der Proteine

Um einheitliche Proteinkonzentrationen zu erhalten, wurden die Homogenisate mittels Sample Buffer (SB) (4-fach: 1000 µl LDS-Buffer + 400 µl Sample Reducing Agent 10× (beide NuPage®, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA)) entweder auf 1 µg/µl oder 2 µg/µl verdünnt. Dies wurde über die Gesamtproteinkonzentration des Extrakts festgelegt. Bei zuzugebender Menge an SB von < 5 µl wurde 4-fach SB, bei > 5 µl wurde 2-fach SB verwendet; beides bei einer späteren Probenmenge von 20 µl. Bevor die Proteine getrennt werden konnten, mussten diese thermisch denaturiert werden. Hierzu wurden die eingestellten Proben mithilfe eines Thermoschüttlers (Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei 95 °C für fünf Minuten gekocht.

Die dicht abgeschlossene innere Elektrophoresekammer (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA) wurde mit Elpho-Buffer (Tabelle 9) vollständig gefüllt und in die Geltaschen je nach Konzentration der Proben 20 µl (2 µg/µl) oder 40 µl (1 µg/µl) hinzugefügt. Hierzu wurde eine 20 µl Pipette mit speziellen Spitzen (Pipet tips for gel loading with 25 mm capillary, VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA) verwendet. In die ersten beiden linken Taschen wurden 20 µl des Standards gegeben. Dieser wurde aus Hirnrestgewebe verschiedener Mäuse hergestellt und war bei allen durchgeführten Western Blots identisch. In die rechte Randtasche wurden 10 µl der Markerlösung (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA) gegeben. Die äußere Kammer wurde mit Elpho-Buffer (Tabelle 9) aufgefüllt, sodass die Elektroden-drähte bedeckt waren, um den Stromkreis zu schließen. Die Proteine wurden bei 100 Volt für 20 Minuten und anschließend bei 200 Volt für ca. 30 Minuten getrennt, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels angelangt war.

Die Gele wurden aus der Kammer und den Glasplatten gelöst und in Blotting-Puffer (Tabelle 9) gelegt. Mittels UV-Kammer (Universal Hood II Gel Doc System, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) wurden sie durch das „Stain Free Gel“-Protokoll (Image Lab 6.0, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) aktiviert und das Verteilungsmuster der Proteine sichtbar gemacht.

Elpho-Puffer ad 2 l Aqua bidest		
Tris	6 g	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Glycin	28,8 g	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
SDS	2 g	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Blotting-Puffer (10X) ad 1 l Aqua bidest		
Tris	30 g	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Glycin	69 g	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-buffered saline with Tween 20 (TBS/T) ad 2 l Aqua bidest		
Tris	6 g	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid	22,2 g	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Tween® 20	2 ml	

Tabelle 9: *Verwendete Pufferlösungen für den Western Blot.*

3.10.5. Übertragen der Proteine (Blotting)

Die Zielmembranen für den Proteintransfer (Amersham™ Hybond™ Low Fluorescence 0.2 µm PVDF, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) wurden für jeweils 15 Sekunden in Aqua bidest und Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) aktiviert und anschließend in den Blotting-Puffer gelegt. Die Blotting-Spangen wurden nach dem Schema in Abbildung 7 vorbereitet und die Gele an die entsprechende Position verbracht. Auf die Polung wurde geachtet, um eine Übertragung auf die Zielmembranen zu erreichen. Die Blotting-Kammer (Kammer, Spangen und Schwämme: Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) wurde mit Blotting-Puffer gefüllt und ein Kühlpack hineingelegt. Es folgte die Proteinübertragung für 60 Minuten bei 80 Volt.

Nach dem Blotting wurden die Membranen in TBS/T (Tabelle 9) eingelegt und ein Abbild mittels ImageLab 6.0 in einer UV-Kammer (Universal Hood II Gel Doc System; beide Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) erstellt (Protokoll „Stain Free Blot“). Die Membranen wurden parallel zur 80 kDa-Markierung (ermittelt durch den optisch sichtbaren Marker) zweigeteilt um sie entsprechend den Molekülgrößen der Antigene mit Antikörpern markieren zu können (Tabelle 10).

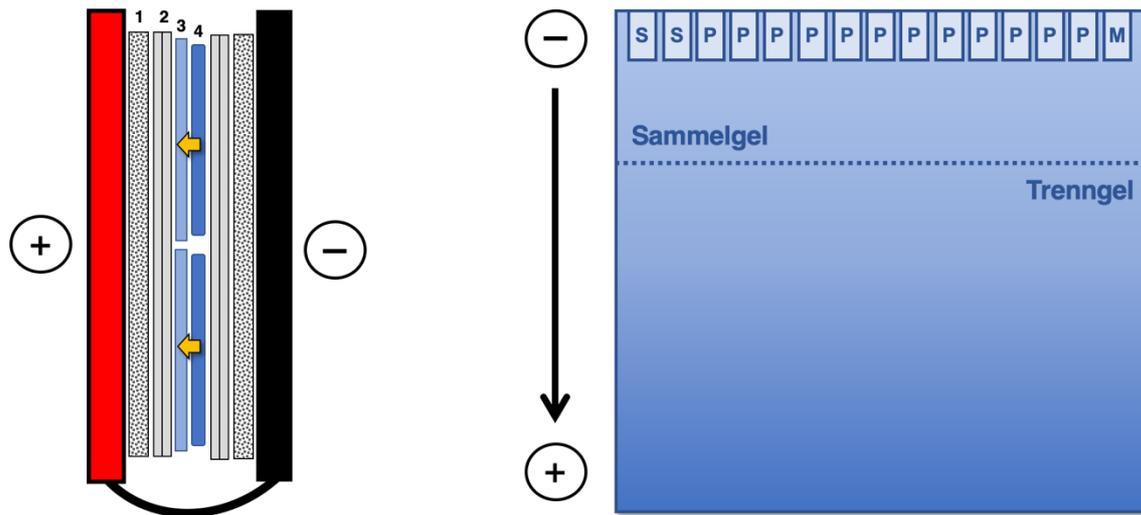


Abbildung 7: Links: schematische Darstellung der komplett bestückten Blotting-Spange im Querschnitt mit Schwämmen (1), zwei Lagen Filterpapier (2, Whatman™ 3MM CHR Sheets, GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK), Blotting-Membranen (3) und den SDS-PAGE-Gelen (4). Blotting-Richtung vom Minus- zum Pluspol (orange Pfeile). Rechts: schematische Darstellung des SDS-PAGE-Gels mit 15 Geltaschen (S: Standard, P: Proben, M: Marker), Laufrichtung vom Minus- zum Pluspol und Aufteilung in Sammel- und Trenngel.

3.10.6. Markierung der Proteine und verwendete Antikörper

Zu den Membranen wurden für 60 Minuten 10 ml einer 5 % Rinderserumalbumin-(BSA)-Lösung (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gegeben ehe 10 ml des primären Antikörpers (in Verdünnung 1:1000 in TBS/T, Tabelle 10) hinzugefügt wurden. Die Membranen wurden über Nacht mit dem primären Antikörper im Kühlschrank (8 °C) auf einem 3D-Schüttler (D305, Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande) inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen drei Mal mit TBS/T für fünf Minuten gewaschen und für 60 Minuten 10 ml des sekundären Anti-Rabbit-IgG (Verdünnung 1:10 000 in TBS/T, Tabelle 10) auf einem 3D-Schüttler (Rocky® 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau, Deutschland) hinzugegeben. Danach folgte erneut drei Mal das Waschen mit TBS/T für fünf Minuten. Um die markierten Proteine sichtbar zu machen, wurden die Membranen vor der Belichtung ca. eine Minute in das ECL-Reagenz (Tabelle 11) gelegt unter Lichtabschluss. Die Chemilumineszenz-Reaktion der ECL-Reagenz mit der Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase, HRP) gebunden an Anti-Rabbit-IgG wurde mit dem Programm ImageLab 6.0 (Protokoll „Chemi“) in der UV-Kammer (Universal Hood II Gel Doc System; beide Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) detektiert und die gewünschten Proteine selektiv sichtbar gemacht. Die Belichtungszeit wurde individuell an den maximal möglichen Schwarzwert angepasst. Die Membranen wurden nach dem Ablichten getrocknet und sicher aufbewahrt.

War es notwendig, eine Membran erneut mit einem anderen Antikörper zu markieren, so wurde diese drei Mal für fünf Minuten mit TBS/T gewaschen. Danach wurde zwei Mal für 15 Minuten Stripping-Buffer (Restore™ PLUS Western Blot Stripping Buffer, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) hinzugegeben und erneut zweimal für zehn Minuten mit TBS/T gewaschen. Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben mit 5% BSA inkubiert und das Verfahren analog fortgesetzt.

Zielantigen	Erklärung	Best.-Nr.	Hersteller
Anti-Rabbit-IgG	sekundärer Antikörper, mit HRP gekoppelt	#7074	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
GluN2B	NMDA-Rezeptor-2b (ionotroper Glutamat-Rezeptor)	#4207	
APP	Amyloid-Precursor-Protein	#2452	
Caspase 3	Caspase 3	#9662	
mGluR5	metabotroper-Glutamat-Rezeptor-5	ab53090	Abcam, Cambridge, UK
GABA-A α 1	γ -Amino-Buttersäure-Rezeptor A α 1	ab33299	ProSci Inc., San Diego, CA, USA
TNF- α	Tumornekrosefaktor α	XP-5284	

Tabelle 10: Verwendete Antikörper mit Zielantigen im Western Blot.

Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL-Reagenz)		
Aqua bidest	18 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Luminol (44,29 mg/ml in DMSO)	200 μ l	
p-Cumarsäure (14,78 mg/ml in DMSO)	80 μ l	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Lösungsmittel	
Tris (1 mol/l)	2 ml	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%) <i>als Startreagenz</i>	6,1 μ l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 11: Inhalt des Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL-Reagenz).

3.10.7. Auswertung der Antigenkonzentrationen

Die Auswertung der Antigenmengen wurde mit der Software ImageLab 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt. Hierzu wurde das Abbild der unmarkierten Membran (Kapitel 3.10.4) sowie der mit Antikörpern markierten Membran benötigt (Kapitel 3.10.5). Mithilfe der unmarkierten Membranen („Stain Free Blot“) wurden die vertikalen Spuren („Lanes“) der aufgetrennten Proteine und somit die Gesamtproteinmenge in Form der Intensität der Lanes erfasst (Abbildung 8 rechts). Die erste Lane des Standards wurde dabei als Referenzmenge genutzt. Darüber wurde ein Normalisierungsfaktor gegenüber den restlichen Lanes ermittelt, der mit der Intensität der detektierten Banden des „Chemi Blot“ multipliziert wurde (Abbildung 8 links). Damit wurde eine unterschiedliche

Gesamtproteinmenge der Lanes bzw. verminderte Übertragungsqualität ausgeglichen, die die spezifische Intensität der Banden des Chemi Blots verfälschen und auf eine falsche Proteinmenge hinweisen würde.



Abbildung 8: Auswertung des Western Blot mittels ImageLab 6.0.1. Rechts der „Stain Free Blot“ mit markierten Lanes und der „Referenzlane“ 1, die mit „Norm“ bezeichnet wird. Links die Banden des Chemi Blot mit den gleichen Lanes wie rechts zur Normierung.

ImageLab ermittelt über den Normalisierungsfaktor eine „Normalisierte Intensität“, die mit der Menge an exprimiertem Protein korreliert. Dieser erste Schritt dient der intrinsischen Normierung jedes einzelnen Durchgangs bzw. jeder einzelnen Membran, die durch unterschiedliche Proteinmengen der einzelnen Lanes notwendig wird.

Mittels Microsoft Excel (Excel 2010, Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) wurde eine zweite Anpassung der Werte vorgenommen. Anhand der Intensitäten der Standards der einzelnen Membranen (Abbildung 8, die ersten beiden Banden links) konnten diese untereinander normalisiert werden, da die Proteinmenge der Standards bei allen Durchgängen konstant war. Aus den Mittelwerten ergab sich wieder ein Faktor, der mit den Intensitäten der Banden multipliziert die wahre Proteinexpression über alle Membranen hinweg möglichst genau wiedergab. Somit wurden die einzelnen Durchgänge untereinander normiert und die relativen Proteinexpressionen konnten miteinander verglichen werden.

3.11. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 25 (IBM, Armonk, New York, USA). Die mittels mHBT erhobenen abhängigen Variablen (aus Neurokognition, Motorik, Verhalten; siehe Tabelle 4) wurden auf zwei verschiedene Arten untersucht:

(1) Berechnungen mit dem allgemeinen linearen Modell (engl. general linear model, GLM) wurden zur Analyse des **Zeitverlaufs des Lernvorgangs** über die acht Versuchstage verwendet. Hierbei fungierten die Gruppen (Geschlecht, Genotyp, Intervention) als Zwischensubjektfaktoren und die Zeit (Tag 1 – 8) als Innersubjektfaktor. Signifikante Interaktionseffekte wurden mittels paarweiser Vergleiche der geschätzten Randmittel näher untersucht.

(2) Um das **Ergebnis des Lernprozesses an Tag 8** des mHBT zu bewerten wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (engl. univariate analysis of variance, UNIANOVA) berechnet mit Geschlecht, Genotyp und Art der Intervention als unabhängige Variablen und die Ergebnisse des mHBT an Tag 8 als abhängige Variable. Auch hier wurden Interaktionen mittels paarweiser Vergleiche der geschätzten Randmittel näher betrachtet.

Mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Analytik (jeweils die abhängige Variable) aus ELISA, Western Blot und Methoxy-Färbung wurde ebenfalls eine UNIANOVA mit Geschlecht, Genotyp und Intervention als unabhängige Variablen durchgeführt. Signifikante Interaktionseffekte zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels paarweiser Vergleiche der geschätzten Randmittel näher untersucht. Da die analytischen Ergebnisse nicht normalverteilt waren, wurde zuvor eine logarithmische Transformation durchgeführt.

Es wurden einfache lineare Regressionsanalysen mit allen Parametern des mHBT (Mittelwerte aus den Durchläufen aller 8 Tage) und den Ergebnissen aus ELISA, WB und Methoxy-Färbung durchgeführt. Bei ausgewählten Parametern wurde zudem der Einfluss des Geschlechts, des Genotyps sowie der Narikose auf die Korrelation untersucht.

Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1. Modifizierter Holeboard Test (mHBT)

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird in den folgenden Absätzen überwiegend der Begriff Carrier (engl. Träger) für Mäuse, die die Tg2576-Mutation tragen, verwendet. Mäuse ohne Mutation, d.h. mit normalem genetischem Hintergrund, werden als Wildtypen bezeichnet.

Mit Hilfe des mHBT können das Verhalten, die Neurokognition und die Motorik der Mäuse untersucht werden. Für eine detaillierte Darstellung der unterschiedlichen Parameter siehe Tabelle 4.

4.1.1. Verhalten

Verhaltensparameter bilden im mHBT gerichtete und ungerichtete Exploration sowie Vermeidungs- und Angstverhalten der Mäuse ab.

Zielgerichtete Exploration wird durch die Latenz bis zum ersten Besuch eines Zylinders (**Latency First Hole Visit, LFHV**) und die Anzahl besuchter markierter Zylinder (**Correct Hole Visits, CHV**) beschrieben.

Die LFHV nahm über die 8 Tage des mHBT ab (Zeit: $p < 0,001$). Wildtypen brauchten signifikant länger, bis sie zum ersten Mal einen Zylinder aufsuchten als Alzheimer-Mäuse (Genotyp: $p = 0,022$). Dieser Unterschied bestand in dieser Form auch an Tag 8 des mHBT (Genotyp Tag 8: $p = 0,006$) (Diagramm 1).

Bei den CHV konnte weder über die Zeit noch am letzten Tag des mHBT ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

Ungerichtete Exploration zeigt sich bei Mäusen durch Aufrichten auf die Hinterbeine (**Rearing, RR**). Über die Zeit nahm die Anzahl der Rearings signifikant ab (Zeit: $p < 0,001$). Wildtypen stellten sich signifikant häufiger auf die Hinterbeine als Carrier (Genotyp: $p < 0,001$).

Dies zeigte sich auch am letzten Tag des mHBT (Genotyp Tag 8: $p = 0,001$) (Diagramm 2). Weiter zeigte sich hier ein Interaktionseffekt zwischen Geschlecht und Narkose (Geschlecht \times Narkose $p = 0,022$). In der Gruppe der narkotisierten Tiere fand sich eine signifikant höhere Anzahl an Rearings bei Männchen im Vergleich zu Weibchen (männlich vs. weiblich: $p = 0,016$). Männliche narkotisierte Mäuse stellten sich signifikant häufiger auf die Hinterbeine als männliche Exemplare der Kontrollgruppe (Isofluran vs. Sham: $p = 0,018$).

Latency First Hole Visit (LFHV)

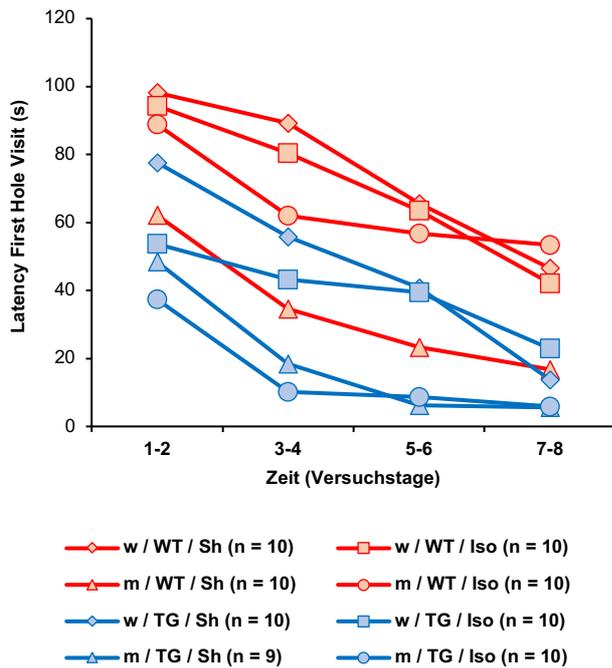


Diagramm 1 A: Latenz bis zum ersten Besuch eines Lochs in Sekunden (LFHV). Mittelwerte der Versuchsgruppen (in Sekunden) aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

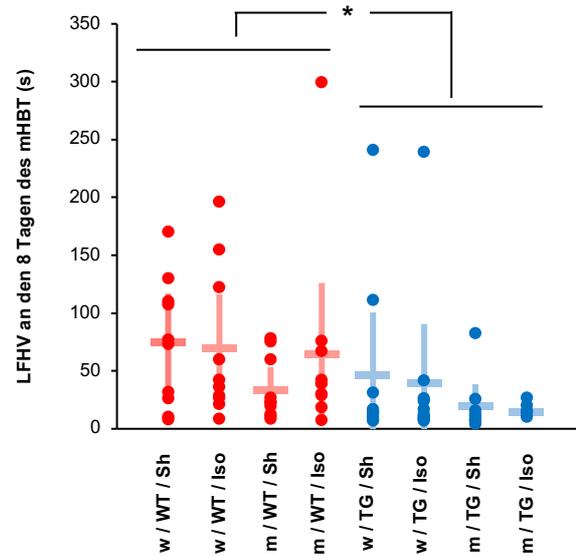


Diagramm 1 B: Latenz bis zum ersten Besuch eines Lochs (LFHV). Mittelwerte in Sekunden aus den vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p = 0,022$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Die gemessene Zeit bis zum ersten Betreten des Boards (**Latency First Board Entry, LFBE**), die Anzahl der Besuche auf den Board (**Number Of Board Entries, NBE**) und die gesamte Zeit, die die Mäuse auf dem Board verbringen (**Time On Board, TOB**) geben Hinweise auf das Vermeidungsverhalten der Mäuse, da das Board als ungeschützter Bereich des mHBT gilt (Ohl et al. 2003).

Bei Betrachtung der LFBE ergaben sich lediglich an Tag 8 des mHBT signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Alzheimer-Mäusen. Wildtypen brauchten länger, um das Board zum ersten Mal zu betreten als Carrier (Genotyp Tag 8: $p = 0,044$).

Unabhängig von der Versuchsgruppe machten alle Tiere über die acht Tage des mHBT weniger Besuche auf dem Board (Zeit: $p < 0,001$).

Die auf dem Board verbrachte Zeit (TOB) nahm über den Versuchszeitraum zu (Zeit: $p = 0,026$). Carrier verbrachten signifikant mehr Zeit auf dem Board als Wildtypen (Genotyp: $p = 0,024$). Dieser Effekt zeigt sich auch an Tag 8 (Genotyp Tag 8: $p < 0,001$) (Diagramm 3).

Rearing (RR)

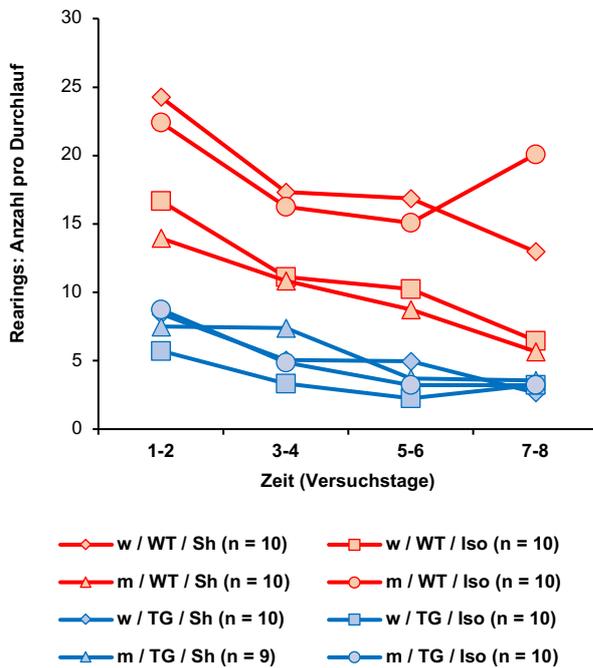


Diagramm 2 A: Anzahl der Rearings (RR) pro Durchlauf. Mittelwerte der Versuchsgruppen aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

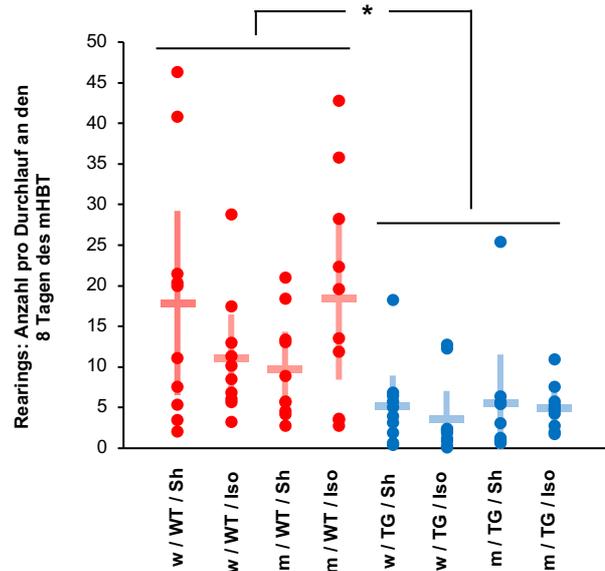


Diagramm 2 B: Anzahl der Rearings. Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p < 0,001$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Angst und Erregung der Tiere werden im mHBT anhand der Gesamtzeit der Putzphasen (**Grooming, GR**), Anzahl der abgesetzten Kothaufen (**Boli**) sowie die Dauer einer Bewegungsstarre (**Immobility**) gemessen.

Die Gesamtzeit, in der sich die Mäuse putzen, veränderte sich nicht signifikant über die Zeit, jedoch verbrachten Wildtypen signifikant mehr Zeit mit Grooming als Carrier (Genotyp: $p = 0,017$). Dies ließ sich auch an Tag 8 des mHBT beobachten (Genotyp Tag 8: $p = 0,018$) (Diagramm 4).

Die Tiere setzten weniger Kothaufen über die acht Tage des mHBT ab (Zeit: $p < 0,001$). Dieser Effekt war abhängig vom Genotyp (Zeit \times Genotyp: $p = 0,019$). Wildtypen machten im Verlauf der 8 Tage signifikant mehr Boli als Carrier (Genotyp: $p = 0,048$). Dieser Effekt konnte an Tag 8 nicht beobachtet werden.

Die Dauer der Immobilitätsphasen nahm über die Zeit hinweg unabhängig von der Versuchsgruppenzugehörigkeit ab (Zeit: $p < 0,001$). An Tag 8 fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Time on Board (TOB)

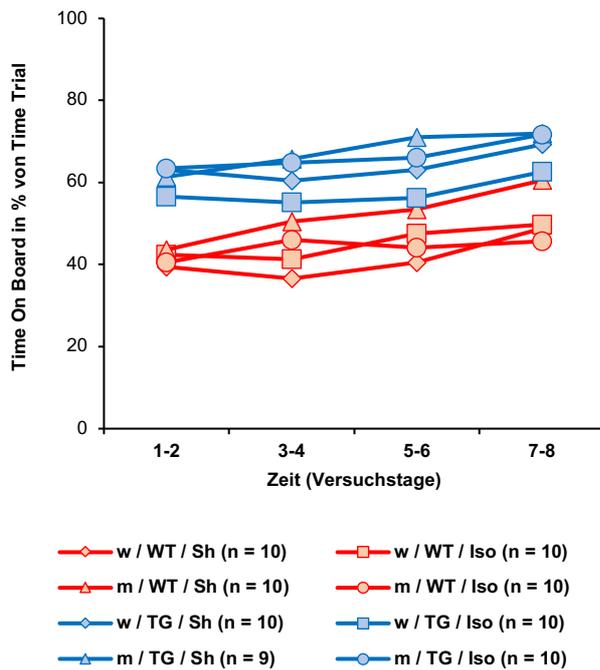


Diagramm 3 A: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse auf dem Board verbringen, in Prozent (TOB). Mittelwerte aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

Wildtypen zeigten ein ausgeprägteres Vermeidungs- und Angstverhalten als die Tg2576-Mäuse. Zielgerichtete Exploration war bei den Alzheimer-Mäusen ausgeprägter, wohingegen Wildtypen häufiger ungerichtetes Erkundungsverhalten zeigten. Narkose und Geschlecht beeinflussten diese Parameter nicht.

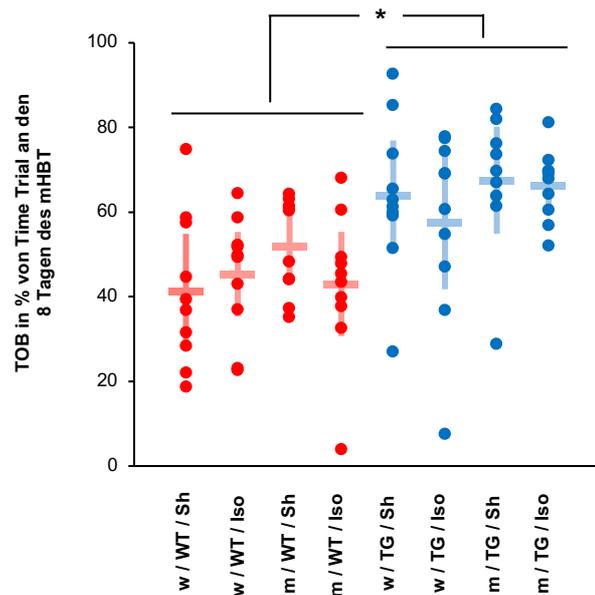


Diagramm 3 B: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse auf dem Board verbringen, in Prozent (TOB). Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p = 0,024$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Grooming (GR)

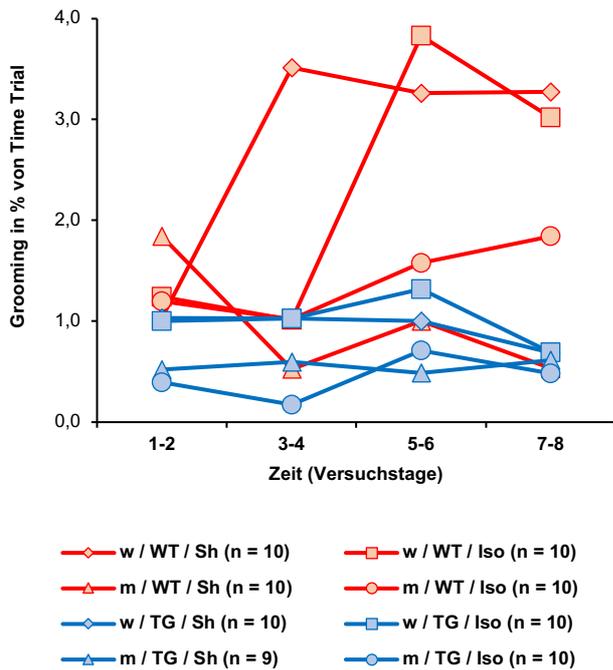


Diagramm 4 A: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse mit Putzphasen verbringen, in Prozent (Grooming). Mittelwerte aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

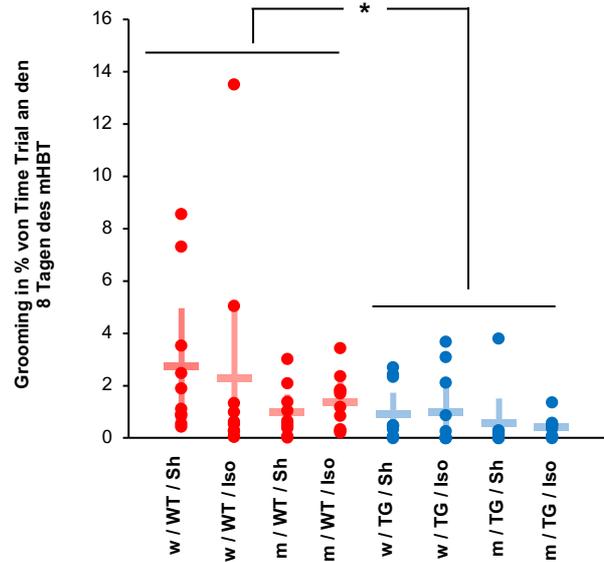


Diagramm 4 B: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse mit Putzphasen verbringen (Grooming). Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p = 0,017$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

4.1.2. Neurokognition

Parameter der Neurokognition im mHBT spiegeln die Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Wrong Choices, Omission Errors, Wrong Choices Total), des Arbeitsgedächtnisses (Repeated Choices), der Lernleistung und der Motivation (Time Trial) wider.

Bei den wiederholten Besuchen von bereits geleerten Löchern (**Repeated Choices, RC**) ergab sich über die acht Versuchstage keine signifikante Veränderung (Zeit: $p > 0,05$). Die Anzahl der RC war bei den Carriern signifikant höher als bei den Wildtypen (Genotyp: $p < 0,001$), unabhängig von den Faktoren Geschlecht und Narkose.

Repeated Choices (RC)

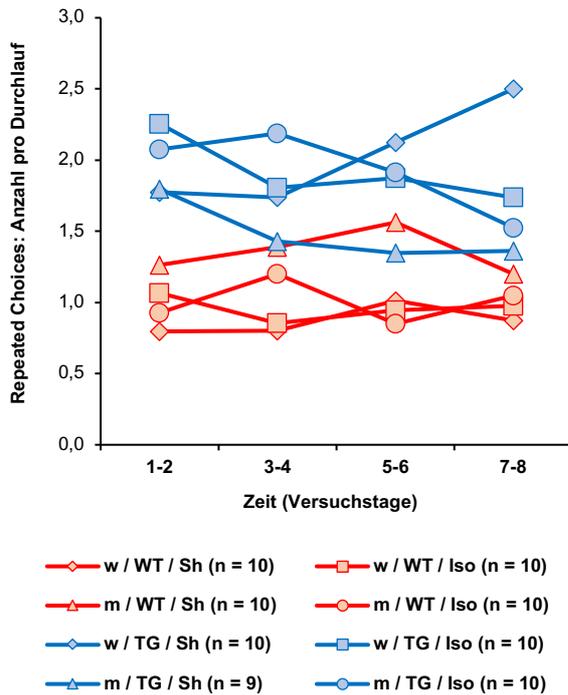


Diagramm 5 A: Anzahl der Repeated Choices (RC). Mittelwerte aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

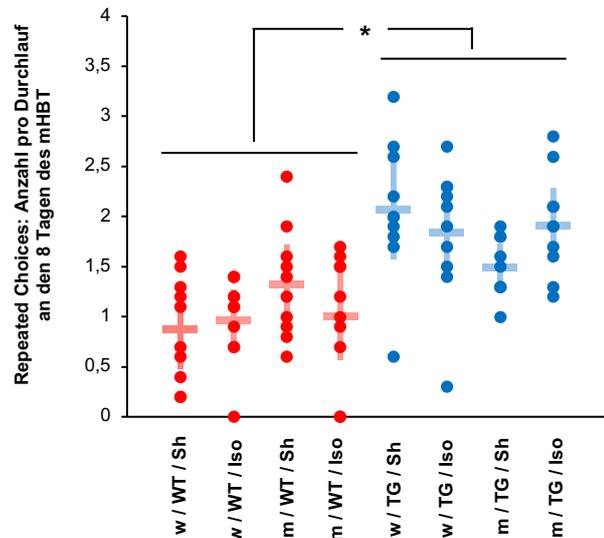


Diagramm 5 B: Anzahl der Repeated Choices (RC). Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p < 0,001$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Die Anzahl der RC an Tag acht, dem letzten Tag des mHBT, unterschied sich signifikant zwischen Alzheimer-Mäusen und Wildtypen. Carrier zeigten am achten Tag mehr RC als Wildtypen (Genotyp Tag 8: $p < 0,001$) (Diagramm 5).

Die Anzahl der Besuche von unmarkierten Zylindern (**Wrong Choices, WC**) nahm über die acht Versuchstage hinweg ab (Zeit: $p < 0,001$). Carrier machten signifikant weniger WC als Wildtypen (Genotyp: $p < 0,001$). Der Vergleich an Tag 8 zeigte signifikant weniger WC bei Alzheimer-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen (Genotyp Tag 8: $p = 0,016$).

Es zeigten sich weniger ausgelassene Besuche eines markierten Lochs (**Omission Errors, OE**) im Zeitverlauf des mHBT (Zeit: $p < 0,001$). Wildtypen machten signifikant mehr OE als Alzheimer-Mäuse (Genotyp: $p = 0,035$).

Die Anzahl der OE am letzten Versuchstag des mHBT war bei den Wildtypen signifikant höher als bei den Carriern (Genotyp Tag 8: $p = 0,047$). Hier waren die Einflüsse von Geschlecht, Genotyp und Art der Intervention voneinander abhängig (Geschlecht \times Genotyp \times Narkose Tag 8: $p = 0,027$). So zeigten sich lediglich bei den männlichen Wildtypen signifikante Unterschiede in den Interventionsgruppen:

Narkotisierte, männliche Wildtypen machten mehr OE an Tag 8 als die Tiere in der Kontrollgruppe (Isofluran vs. Sham: $p = 0,019$). Nur in der Gruppe der männlichen, narkotisierten Tiere zeigten sich signifikant mehr OE bei Exemplaren mit der Alzheimer-Mutation im Vergleich zu den Wildtypen (männlich vs. weiblich: $p = 0,014$).

Die Summe aus WC und OE wird Anzahl der Gesamtfehler (**Wrong Choices Total, WCT**) bezeichnet. Sie nahm während den acht Tagen des mHBT ab (Zeit: $p < 0,001$). Wildtypen machten sowohl über den Gesamtzeitraum (Genotyp: $p < 0,001$) als auch am letzten Tag (Genotyp Tag 8: $p = 0,016$) signifikant mehr WCT als Carrier (Diagramm 6).

Wrong Choices Total (WCT)

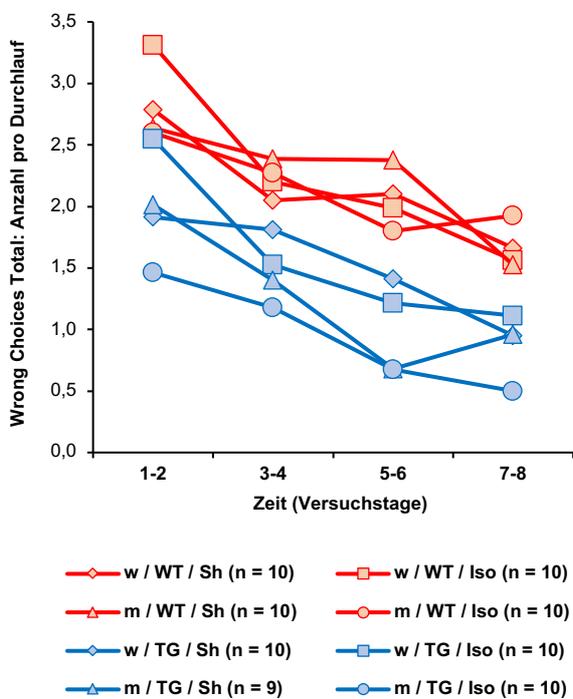


Diagramm 6 A: Anzahl der Wrong Choices Total (WCT). Mittelwerte aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

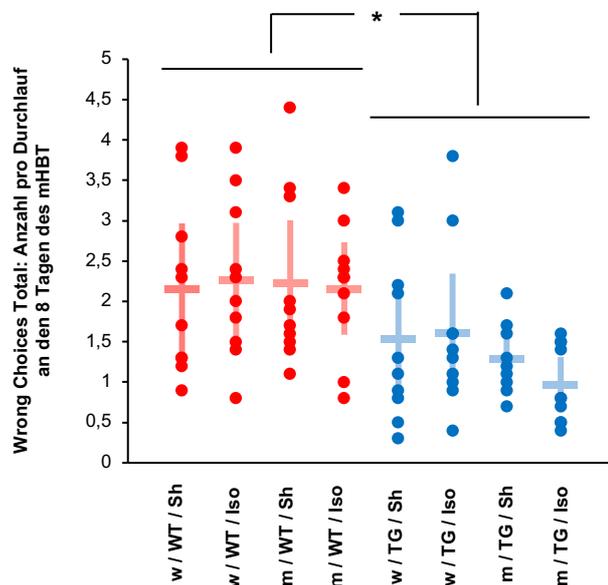


Diagramm 6 B: Anzahl der Wrong Choices Total (WCT). Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p < 0,001$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Betrachtet man die benötigte Gesamtzeit für den Abschluss eines Durchlaufs (**Time Trial**), d.h. bis die drei Zylinder aufgefunden wurden und die Belohnungen gefressen wurden oder die fünf Minuten verstrichen waren, so nahm diese über den Zeitverlauf ab (Zeit: $p < 0,001$). Wildtypen benötigten signifikant länger als Alzheimer-Mäuse, um eine Runde zu beenden (Genotyp: $p < 0,001$). Dies ließ sich auch an Tag 8 beobachten (Genotyp Tag 8: $p = 0,001$).

Träger der Alzheimer-Mutation zeigten eine bessere Testperformance als Wildtypen, die sich in besseren Werten für WC, OE sowie WCT niederschlug. Lediglich bei den RC schnitten Carrier schlechter als Wildtypen ab. Narkose und das Geschlecht zeigten keinen signifikanten Einfluss.

4.1.3. Motorik

Parameter der Motorik, die im mHBT erhoben werden, lassen Aussagen über die allgemeine Bewegungsaktivität sowie die Funktion der Feinmotorik der Tiere zu.

Die Anzahl der überquerten Linien auf dem modifizierten Holeboard (**Line Crossings, LC**) gibt Hinweise auf die allgemeine Bewegungsaktivität. Eine Veränderung über die Zeit des mHBT ergab sich nicht. Carrier machten signifikant mehr LC als Wildtypen (Genotyp: $p = 0,025$). An Tag 8 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mehr (Diagramm 7).

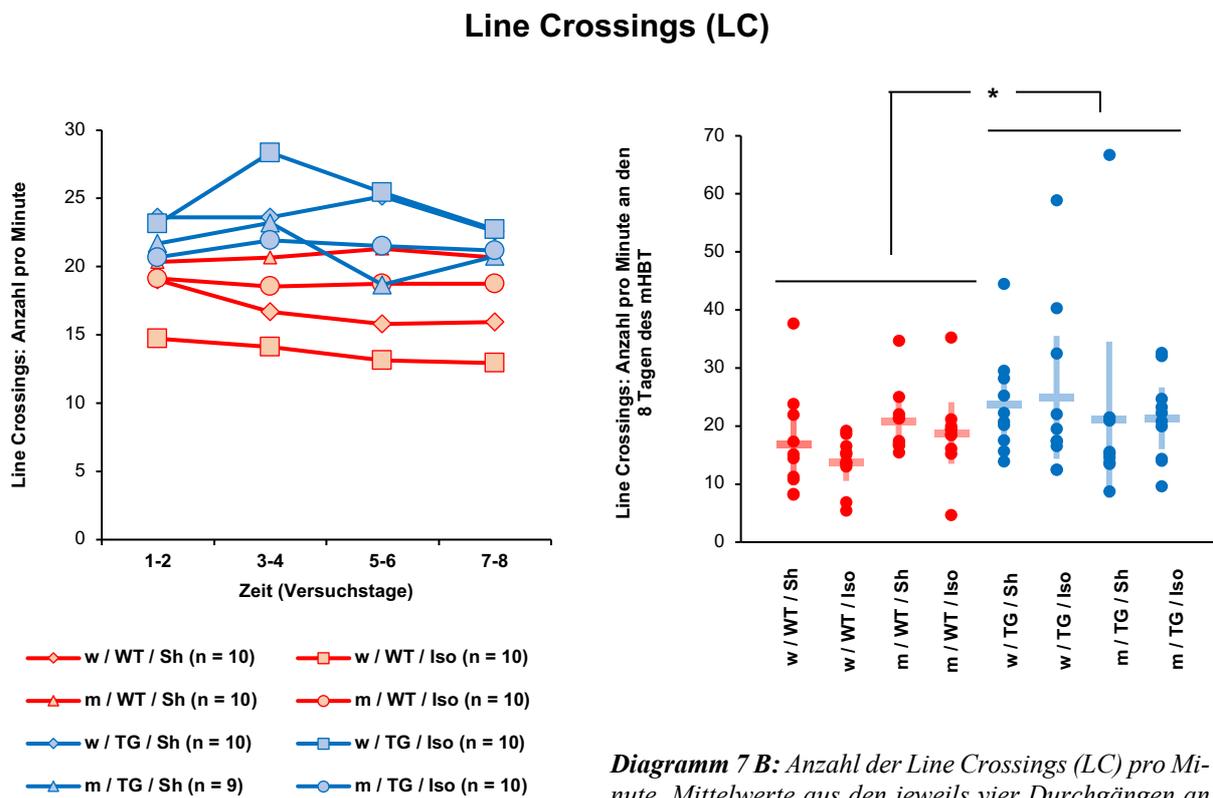


Diagramm 7 A: Anzahl der Line Crossings (LC) pro Minute. Mittelwerte aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Diagramm 7 B: Anzahl der Line Crossings (LC) pro Minute. Mittelwerte aus den jeweils vier Durchläufen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p = 0,025$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

Die Feinmotorik wird durch die Anzahl an Besuchen markierter Zylinder ohne Fressen der Mandel (geseiterte Lochbesuche, **Unsuccessful Hole Visits, UHV**) sowie der Zeit bis zum Verzehr einer gefundenen Mandel (**Time Food Intake, TFI**) gemessen.

Die Mäuse benötigten unterschiedlich lange für die Einnahme einer Mandel (TFI) an den acht Versuchstagen, wobei sich keine Tendenz zu Zu- oder Abnahme der Zeiten feststellen ließ (Zeit: $p = 0,005$). Carrier benötigten signifikant länger als Wildtypen (Genotyp: $p < 0,001$). Dies zeigte sich auch am letzten Tag des mHBT (Genotyp Tag 8: $p = 0,001$) (Diagramm 8).

Time Food Intake (TFI)

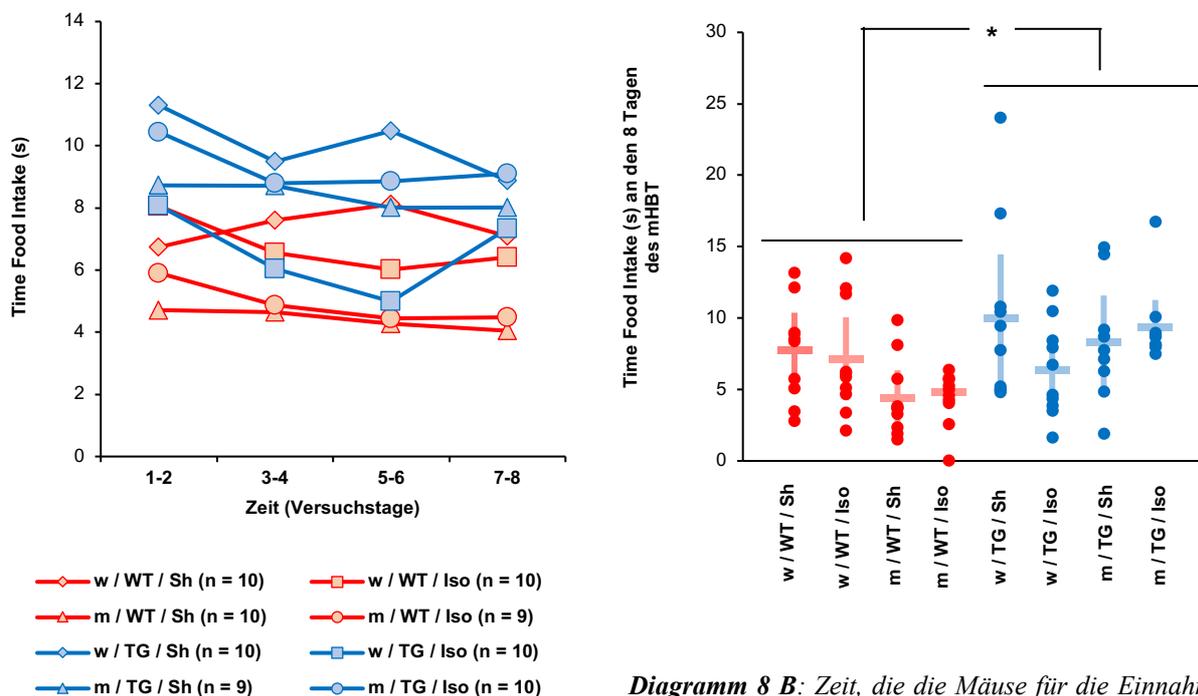


Diagramm 8 A: Zeit, die die Mäuse für die Einnahme einer Mandel benötigen (TFI). Mittelwerte in Sekunden aus den vier Durchläufen an jeweils zwei aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitverlauf des mHBT (Tag 1 – 8).

Diagramm 8 B: Zeit, die die Mäuse für die Einnahme einer Mandel benötigen (TFI) in Sekunden. Mittelwerte aus den jeweils vier Durchgängen an den acht Versuchstagen des mHBT. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 ($* p < 0,001$). Mittelwerte der Gruppen und 95% Konfidenzintervall der Mittelwerte dargestellt.

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

Die UHV nahmen über den Versuchszeitraum hinweg ab (Zeit: $p < 0,001$). Es bestanden keine Unterschiede zwischen Alzheimer-Mäusen und Wildtypen. Die Effekte von Narkose und Geschlecht waren voneinander abhängig (Geschlecht \times Narkose: $p = 0,023$). In der Gruppe der männlichen Versuchstiere zeigten narkotisierte männliche Mäuse signifikant mehr geseiterte Lochbesuche als männliche Tiere der Kontrollgruppe (Isofluran vs. Sham: $p = 0,007$). In der Gruppe der Mäuse mit Allgemeinanästhesie machten Männchen signifikant mehr UHV als Weibchen (männlich vs. weiblich: $p = 0,004$). An Tag 8

fand sich ein Interaktionseffekt zwischen Geschlecht und Narkose (Geschlecht \times Narkose: $p = 0,007$). Es ergaben sich die gleichen signifikanten Gruppeneffekte wie oben beschrieben (Isofluran vs. Sham: $p = 0,004$; männlich vs. weiblich: $p = 0,005$).

Tg2576-Mäuse zeigten eine höhere Bewegungsaktivität als die Wildtypen, bei gleichzeitig beeinträchtigter Feinmotorik.

4.2. Molekularbiologische Analytik

Es wurden jeweils vier bis sieben Mausgehirne aus den acht Versuchsgruppen einer molekularbiologischen Analytik mittels ELISA und Western Blot unterzogen. Die Anzahl der Amyloid-Plaques wurde an jeweils zwei Hirnschnitten der Wildtypen pro Versuchsgruppe und vier Hirnschnitten der Tg2576-Mäuse pro Versuchsgruppe untersucht.

4.2.1. Lösliches Amyloid- β -1-42 (A β -1-42)

Mäuse mit der Tg2576-Mutation wiesen signifikant mehr A β -1-42 in ihrem motorischen präfrontalen Cortex (MPFC) auf als Wildtypen (Genotyp: $p < 0,001$) (Diagramm 11). Eine höhere A β -42-Konzentration in den Gehirnen der narkotisierten Tiere verfehlte die Signifikanz knapp (Narkose: $p = 0,054$). Der Einfluss von Geschlecht und Narkose war voneinander abhängig (Geschlecht \times Narkose $p = 0,012$). In der Kontrollgruppe zeigten weibliche Tiere mehr A β -1-42 im MPFC als deren männliche Wurfgeschwister (männlich vs. weiblich: $p = 0,003$). In der Gruppe der männlichen Tiere wiesen narkotisierte Mäuse signifikant mehr A β -1-42 auf als die männlichen Tiere der Kontrollgruppe (Isofluran vs. Sham: $p = 0,003$).

4.2.2. Amyloid-Plaques (Methoxy-Färbung)

Der Anteil der Amyloid-Plaques (Alzheimer-Plaques) an der Gesamtfläche des Hippocampus (HC) war bei den Carriern signifikant höher als bei den Wildtypen (Genotyp: $p = 0,001$) (Diagramm 10). Es ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts oder zwischen den Interventionsgruppen.

Der Anteil der Alzheimer-Plaques an der Gesamtfläche des Isocortex (IC) war bei transgenen Mäusen signifikant höher als bei Wildtypen (Genotyp: $p < 0,001$) (Diagramm 9). Hinsichtlich Narkose oder Geschlecht ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

4.2.3. Amyloid-Precursor-Protein (APP)

Träger der Tg2576-Mutation zeigten eine signifikant höhere Expression des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) im sensorischen Cortex (SC) ($p < 0,001$) (Diagramm 12) sowie im HC ($p < 0,001$)

(Diagramm 13). Es ergaben sich in beiden Gehirnregionen keine Unterschiede beim Geschlecht oder nach der Durchführung einer Allgemeinanästhesie mit Isofluran.

4.2.4. NMDA-Rezeptor-2B (NR2B)

Bei der Expression des NR2B ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen sowohl im Hippocampus als auch im sensorischen Cortex.

4.2.5. Metabotroper Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5)

Bei der Expression des mGluR5 im Hippocampus war der Einfluss einer Isoflurannarkose vom Genotyp abhängig (Genotyp \times Narkose: $p = 0,035$). Bei den Wildtypen zeigten die narkotisierten Mäuse eine geringere Menge des mGluR5 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Isofluran vs. Sham: $p = 0,017$) (Diagramm 14).

Im sensorischen Cortex ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.2.6. GABA-A-Rezeptor $\alpha 1$ -Untereinheit (GABA-A $\alpha 1$)

Der Einfluss des Genotyps auf die Expression der GABA-A α im Hippocampus war vom Typ der Intervention abhängig (Genotyp \times Narkose: $p = 0,010$). Bei den Wildtypen zeigten die Tiere der Kontrollgruppe signifikant mehr GABA-A $\alpha 1$ als die Mäuse nach einer Allgemeinanästhesie mit Isofluran (Isofluran vs. Sham: $p = 0,012$) (Diagramm 15).

Im sensorischen Cortex konnten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden.

4.2.7. Caspase 3

Die Expression der Caspase 3 im Hippocampus war vom Geschlecht der Versuchstiere abhängig. Männliche Mäuse zeigten signifikant mehr Caspase 3 als ihre weiblichen Wurfgeschwister (Geschlecht: $p = 0,026$) (Diagramm 16).

Im sensorischen Cortex zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

4.2.8. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

Mäuse mit der Tg2576-Mutation exprimierten signifikant mehr TNF- α im Hippocampus als die Wildtypen (Genotyp: $p = 0,013$) (Diagramm 17).

Bei der Expression von TNF- α im sensorischen Cortex konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden.

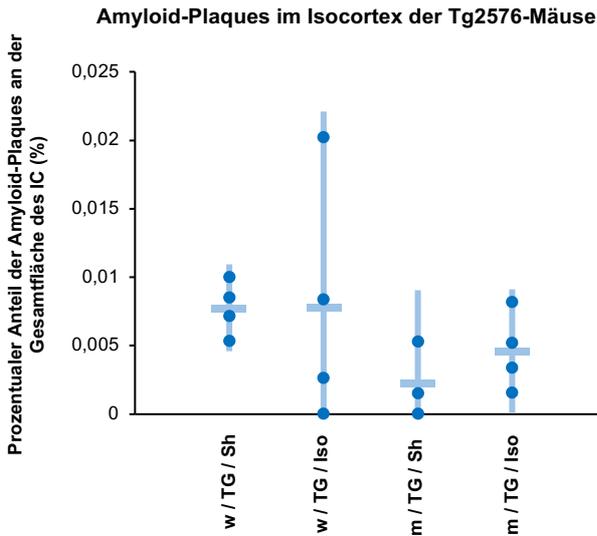


Diagramm 9: Prozentualer Anteil (%) der Amyloid-Plaques an der Gesamtfläche des Isocortex der Tg2576-Mäuse. Wildtypen (keine Belastung mit Amyloid-Plaques) nicht dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

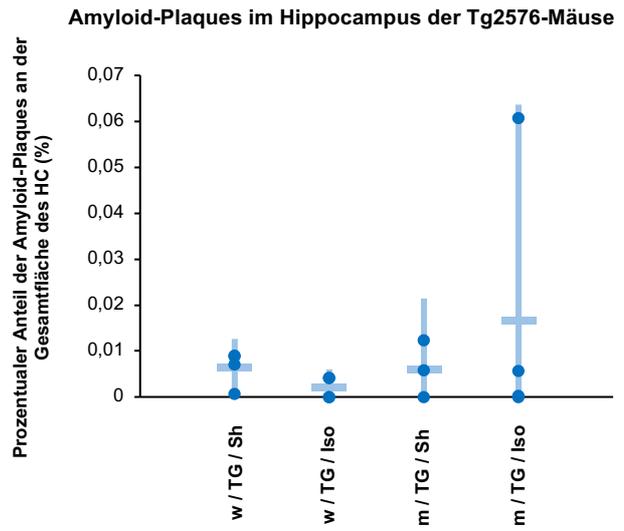


Diagramm 10: Prozentualer Anteil (%) der Amyloid-Plaques an der Gesamtfläche des Hippocampus (HC) der Tg2576-Mäuse. Wildtypen (keine Belastung mit Amyloid-Plaques) nicht dargestellt. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

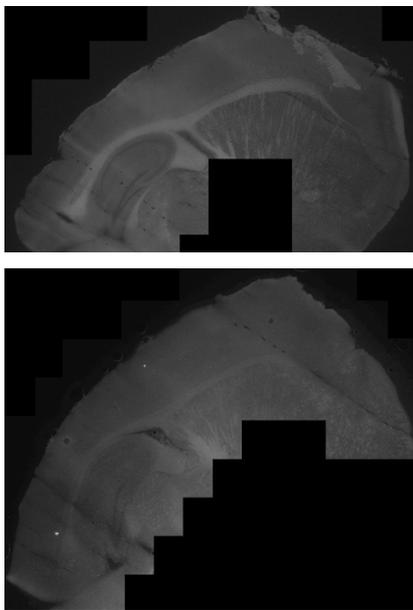


Abbildung 9: Zwei Hirnschnitte von Tg2576-Mäusen (10 Monate) ohne (oben) und mit zwei Plaques (unten). Graustufen-Ansicht während der Auswertung mit Fiji.

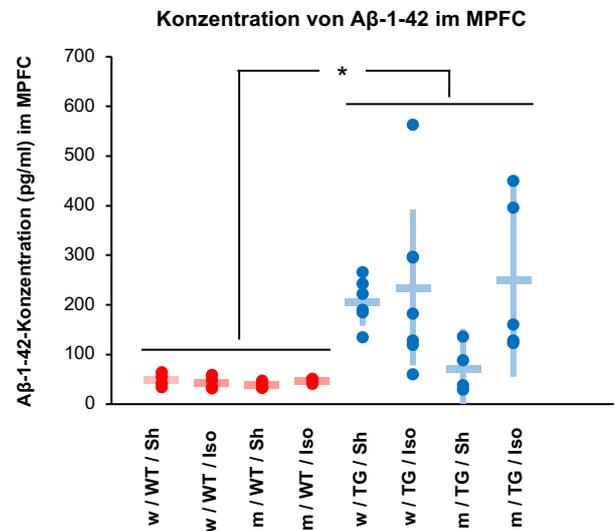


Diagramm 11: A β -1-42-Konzentration (pg/ml) im motorischen präfrontalen Cortex (MPFC) der einzelnen Versuchsgruppen. Signifikante Unterschiede zwischen WT und Tg2576 ($p < 0,001$). Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

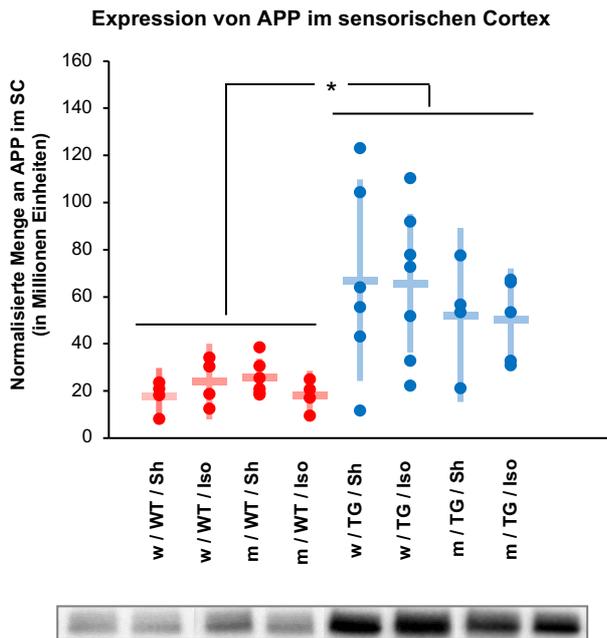


Diagramm 12: Expression von APP im sensorischen Cortex (SC) als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p < 0,001$). Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

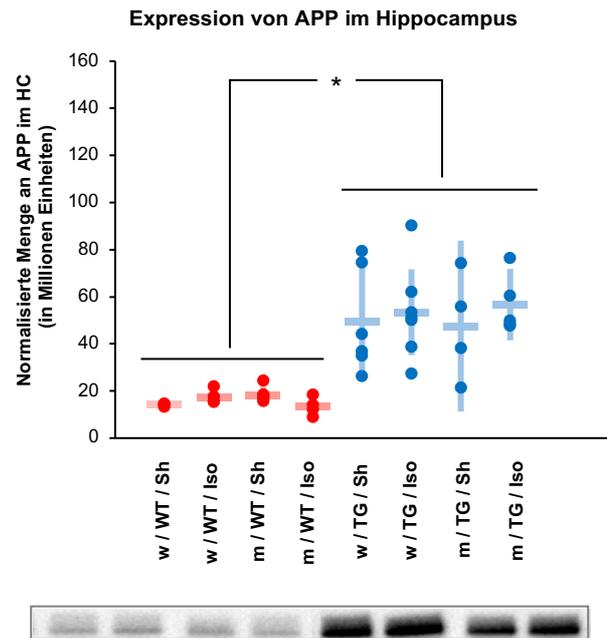


Diagramm 13: Expression von APP im Hippocampus (HC) als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p < 0,001$). Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

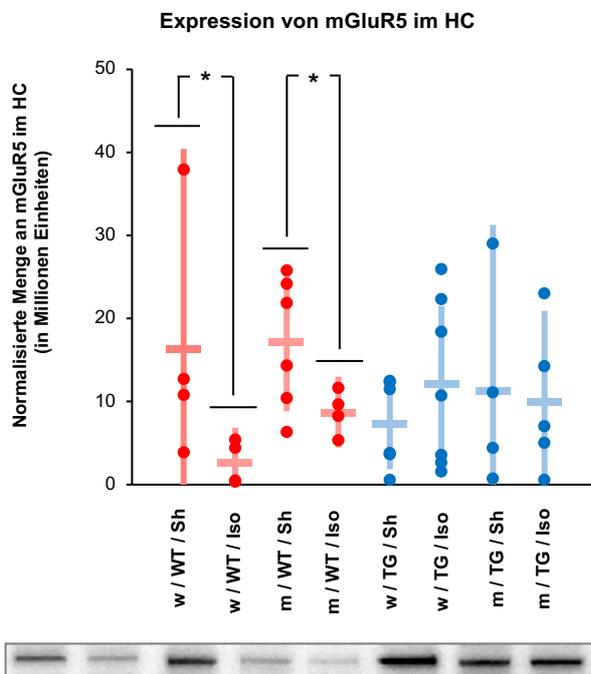


Diagramm 14: Expression von mGluR5 im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen Isofluran und Sham bei den Wildtypen (* $p = 0,017$) Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

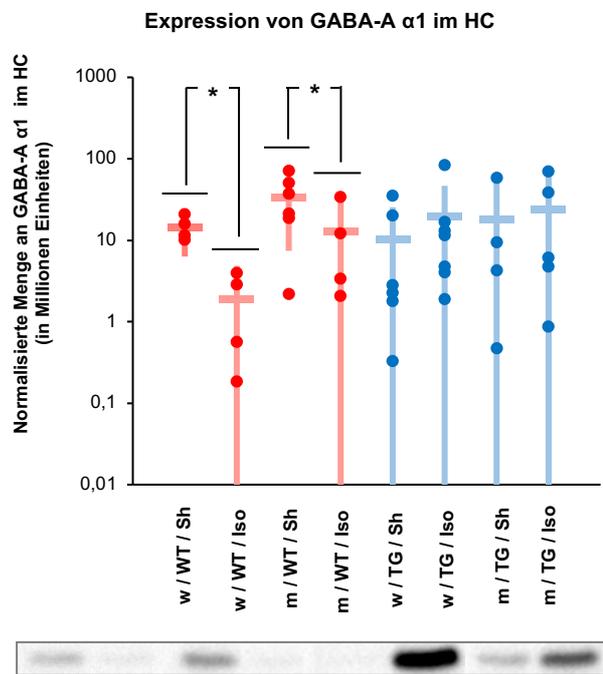


Diagramm 15: Expression von GABA-A $\alpha 1$ im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen Isofluran und Sham bei den Wildtypen (* $p = 0,012$). Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt. Logarithmierte Skala.

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isofluran-narkose (Iso).

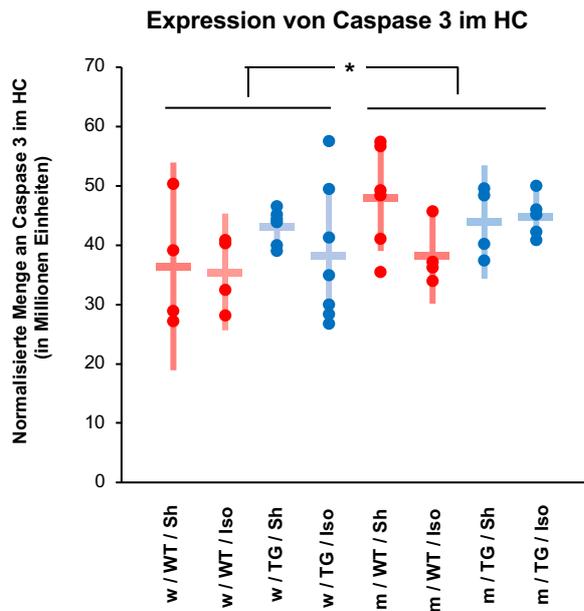


Diagramm 16: Expression von Caspase 3 im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen weiblichen und männlichen Mäusen (* $p = 0,026$) Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

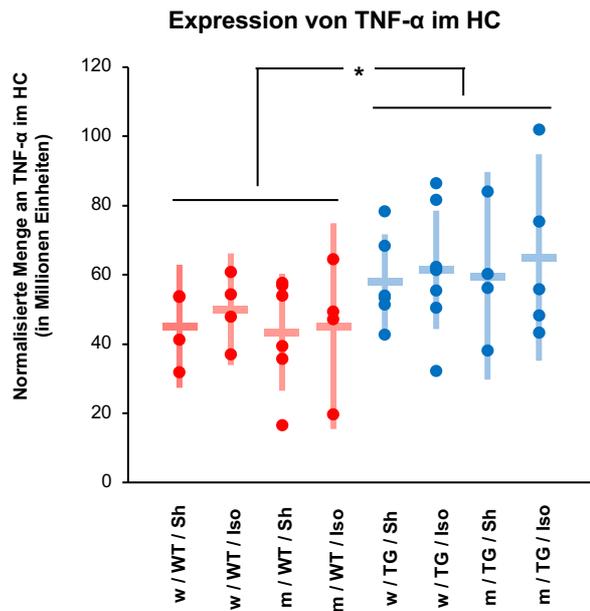


Diagramm 17: Expression von TNF- α im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 10^6 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Tg2576 (* $p = 0,013$) Mittelwert und 95% Konfidenzintervall des Mittelwerts dargestellt.

Versuchsgruppen: Tg2576 (TG, rot), Wildtypen (WT, blau), Männlich (m), Weiblich (w), Kontrollgruppe (Sham, Sh), Isoflurannarkose (Iso).

4.3. Regressionsanalysen mit Parametern des mHBT

Wrong Choices Total (WCT)

Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine Korrelation zwischen der Konzentration an A β -1-42 im MPFC und den WCT im mHBT: Eine höhere Konzentration an A β -1-42 war assoziiert mit einer geringeren Anzahl an WCT ($p = 0,017$). Hierbei war der Einfluss des Geschlechts von der Menge an A β -1-42 im MPFC abhängig: Das männliche Geschlecht verstärkte den Einfluss von A β -1-42 im MPFC auf die Anzahl der WCT im mHBT (Geschlecht \times A β -1-42 im MPFC: $p = 0,005$).

Eine höhere Expression von APP im SC bzw. HC zeigte weniger WCT im mHBT (APP im SC: $p = 0,008$; APP im HC: $p = 0,001$), wobei männliche Tiere weniger WCT aufwiesen (APP im SC, Geschlecht: $p = 0,004$; APP im HC, Geschlecht: $p = 0,001$). Das männliche Geschlecht verstärkte den Einfluss von APP im SC bzw. HC auf die WCT signifikant (Geschlecht \times APP im SC: $p = 0,002$; Geschlecht \times APP im HC: $p = 0,001$) (Diagramm 18).

Höhere prozentuale Anteile der Amyloid-Plaques an der Fläche des HC ($p = 0,028$) waren assoziiert mit einer geringeren Anzahl an WCT im mHBT.

Repeated Choices (RC)

Eine höhere Konzentration an A β -1-42 im MPFC ($p < 0,001$) war assoziiert mit einer höheren Anzahl an RC im mHBT, wobei männliche Tiere signifikant mehr RC aufwiesen als ihre weiblichen Wurfgeschwister (Geschlecht: $p = 0,011$). Der Effekt von A β -42 im MPFC auf die RC wurde durch das männliche Geschlecht verstärkt (Geschlecht \times A β -1-42 im MPFC: $p = 0,002$) (Diagramm 19).

Mehr APP im SC ($p < 0,001$) war verbunden mit einer höheren Anzahl an RC im mHBT. Männliche Mäuse zeigten signifikant mehr RC (Geschlecht: $p = 0,006$), wobei der Effekt von APP im SC durch das männliche Geschlecht verstärkt wurde (Geschlecht \times APP im SC: $p = 0,005$).

Eine höhere Expression von APP im HC ($p < 0,001$) sowie ein größerer Anteil der amyloiden Plaques an der Gesamtfläche des HC ($p = 0,043$) war assoziiert mit einer größeren Anzahl an RC im mHBT.

Rearing (RR)

Eine höhere Konzentration an A β -1-42 im MPFC ($p = 0,012$), ein größerer Anteil der Alzheimer-Plaques an der Fläche des HC ($p = 0,016$) und des IC ($p = 0,018$) war mit einer geringeren Anzahl an Rearings verbunden.

Eine höhere Expression des APP im SC ($p < 0,001$) und HC ($p = 0,001$) war mit weniger Rearings im mHBT assoziiert (Diagramm 21).

Time on Board (TOB)

Mehr A β -1-42 im MPFC ($p = 0,005$) war mit einer längeren Verweildauer der Mäuse auf dem Board assoziiert, wobei der Effekt von A β -1-42 im MPFC durch das männliche Geschlecht verstärkt wurde (Geschlecht \times A β -1-42 im MPFC: $p = 0,047$).

Eine höhere Expression an APP im SC ($p < 0,001$) war mit einer längeren TOB assoziiert, wobei männliche Tiere eine signifikant höhere Verweildauer auf dem Board aufwiesen (Geschlecht: $p < 0,001$). Der Effekt von APP im SC auf TOB wurde durch den Einfluss des männlichen Geschlechts verstärkt (Geschlecht \times APP im SC: $p < 0,001$) (Diagramm 20).

Mehr APP im HC war verbunden mit einer längeren TOB ($p < 0,001$).

Ein größerer Anteil der Alzheimer-Plaques an der Fläche des HC ($p = 0,001$) war mit einer längeren TOB verbunden.

Wichtige Zusammenhänge in der Übersicht:

(A) Analytik	(B) Mittelwerte aller Durchläufe an den 8 Tagen des mHBT			
	WCT	RC	RR	TOB
ELISA MPFC	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt	Kein Effekt des Geschlechts	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt
Plaques HC	Kein Effekt des Geschlechts	Kein Effekt des Geschlechts	Kein Effekt des Geschlechts	Kein Effekt des Geschlechts
Plaques IC	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Kein Effekt des Geschlechts	$p > 0,05$
Westernblot APP SC	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt	Kein Effekt des Geschlechts	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt
Westernblot APP HC	Männliches Geschlecht verstärkt den Effekt	Kein Effekt des Geschlechts	Kein Effekt des Geschlechts	Kein Effekt des Geschlechts

Tabelle 12: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Werte aus ELISA, Plaquesfärbung und WB von APP im SC und HC (A) mit den Mittelwerten aller Durchläufe des mHBT (B). **Grün hinterlegt:** positive Korrelation $p < 0,05$; höhere Werte aus (A) korrelieren mit einem höheren Wert in (B). **Gelb hinterlegt:** negative Korrelation $p < 0,05$; höhere Werte aus (A) korrelieren mit einem kleineren Wert in (B). Bei einem signifikanten Einfluss des Geschlechts ($p < 0,05$) wurde dies in die entsprechende Zelle mit aufgenommen.

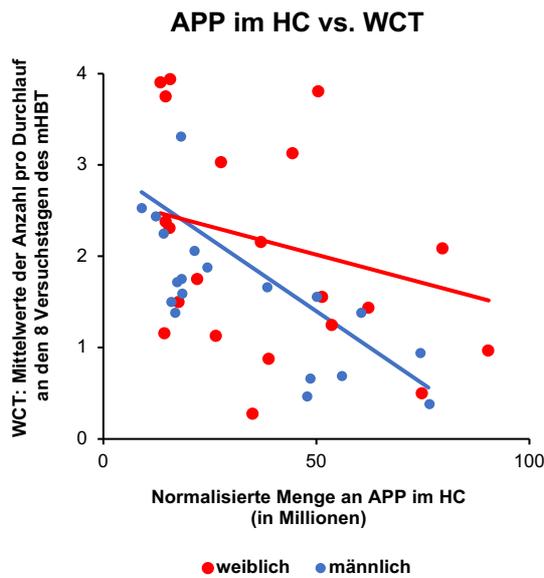


Diagramm 18: Regression zwischen APP im HC und WCT im mHBT. Eine höhere Expression von APP im Hippocampus war assoziiert mit einer geringeren Anzahl an WCT (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p = 0,001$). Männliche Tiere zeigten weniger WCT ($p = 0,001$), wobei der Effekt von APP im HC durch das männliche Geschlecht verstärkt wurde ($p = 0,001$).

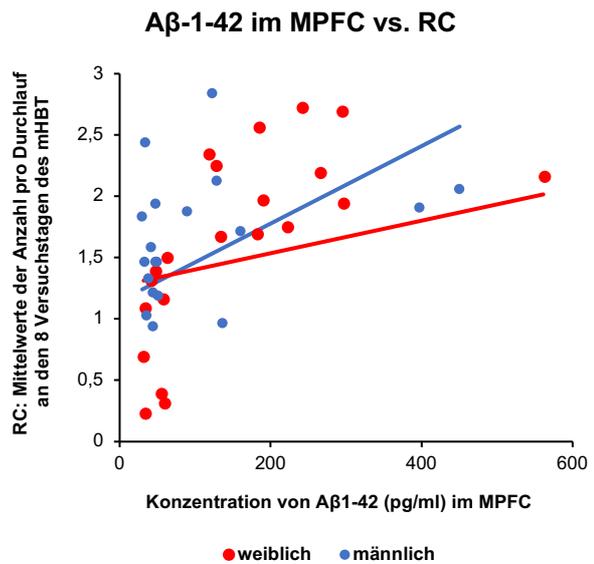


Diagramm 19: Regression zwischen Aβ-1-42 im MPFC und RC im mHBT. Eine höhere Konzentration von Aβ-1-42 im MPFC war assoziiert mit einer höheren Anzahl an RC (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p < 0,001$). Männliche Tiere zeigten mehr RC ($p = 0,011$), wobei der Effekt von Aβ-1-42 im MPFC durch das männliche Geschlecht verstärkt wurde ($p = 0,002$).

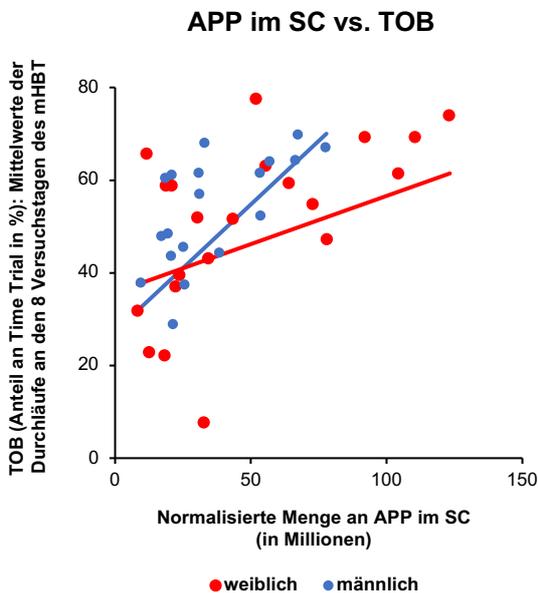


Diagramm 20: Regression zwischen APP im SC und TOB im mHBT. Eine höhere Expression von APP im sensorischen Cortex war assoziiert mit einer höheren TOB (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p < 0,001$). Männliche Tiere zeigten eine höhere TOB ($p < 0,001$), wobei der Effekt von APP im SC durch das männliche Geschlecht verstärkt wurde ($p < 0,001$).

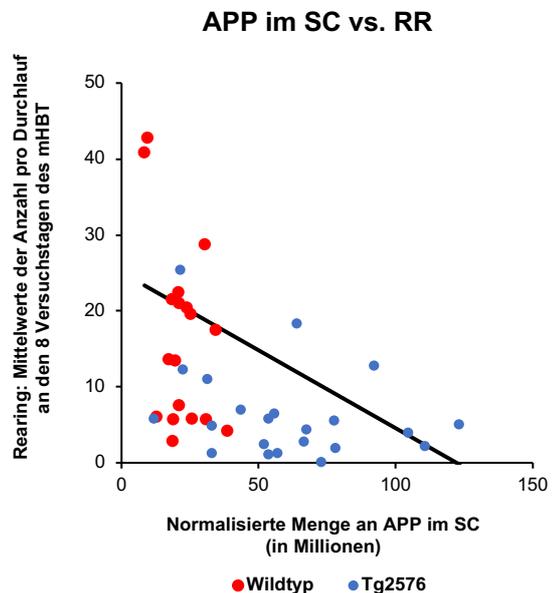


Diagramm 21: Regression zwischen APP im SC und RR im mHBT. Eine höhere Expression von APP im sensorischen Cortex war assoziiert mit weniger Rearings (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p < 0,001$).

Unsuccessful Hole Visits (UHV)

Die Anzahl der Besuche markierter Löcher ohne Einnahme der Mandel, d.h. ein nicht erfolgreicher Lochbesuch, nahm mit steigender Expression des APP im SC ($p = 0,025$) und HC ($p = 0,029$) ab (Diagramm 22).

Line Crossings (LC)

Eine höhere Expression an mGluR5 im HC war mit einer größeren Anzahl an überquerten Linien im mHBT verbunden ($p = 0,044$), wobei Carrier eine signifikant höhere Anzahl an LC erreichten ($p = 0,042$) als die Wildtypen. Der Effekt des mGluR5 im HC auf die LC wurde durch den Einfluss der Alzheimer-Mutation verstärkt (Genotyp \times mGluR5 im HC: $p = 0,014$) (Diagramm 23).

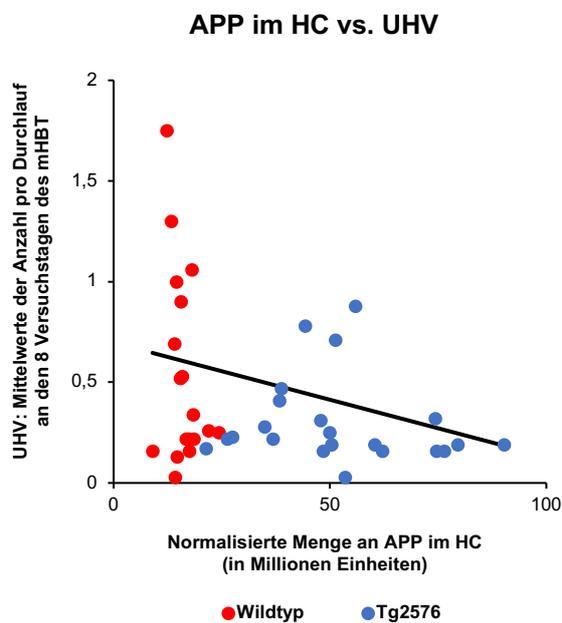


Diagramm 22: Regression zwischen APP im HC und UHV im mHBT. Eine höhere Expression von APP im Hippocampus war assoziiert mit einer geringeren Anzahl an UHV (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p = 0,029$).

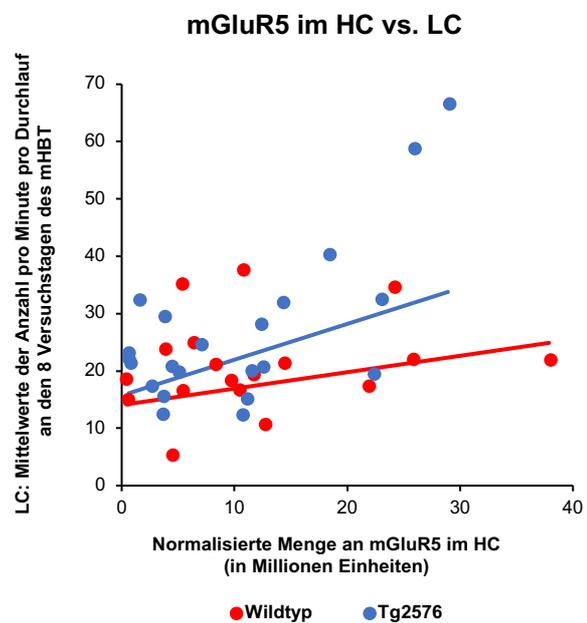


Diagramm 23: Regression zwischen mGluR5 im HC und UHV im mHBT. Eine höhere Expression von mGluR5 im Hippocampus war assoziiert mit einer höheren Anzahl an LC (Mittelwerte aus allen Durchläufen an den 8 Tagen des mHBT) ($p = 0,044$). Tg2576-Mäuse zeigten mehr LC ($p = 0,042$), wobei der Effekt von mGluR5 im HC durch den Tg2576-Genotyp verstärkt wurde ($p = 0,014$).

Weitere signifikante Regressionen

(B) Parameter des mHBT	(A) Zusammenhang mit Ergebnissen der Analytik	
Wrong Choices (WC)	Mehr APP im SC war assoziiert mit weniger WC.	p = 0,043
	Mehr APP im HC war assoziiert mit weniger WC.	p = 0,004
	Mehr Amyloide-Plaques im IC waren assoziiert mit weniger WC	p = 0,024
Time Trial (TT)	Mehr Amyloide-Plaques im HC waren assoziiert mit einer geringeren TT.	p = 0,046
	Mehr APP im SC war assoziiert mit einer geringeren TT.	p = 0,001
	Mehr APP im HC war assoziiert mit einer geringeren TT.	p = 0,045
Grooming (GR)	Mehr Amyloide-Plaques im HC waren assoziiert mit weniger GR.	p = 0,038
	Mehr APP im SC war assoziiert mit weniger GR.	p = 0,023
	Mehr APP im HC war assoziiert mit weniger GR.	p = 0,047
Latency First Board Entry (LFBE)	Mehr Amyloide-Plaques im IC waren assoziiert mit einer längeren LFBE.	p = 0,048
Latency First Hole Visit (LFHV)	Mehr APP im SC war assoziiert mit einer geringeren LFHV.	p = 0,024
	Mehr Caspase 3 im HC war assoziiert mit einer geringeren LFHV.	p = 0,032
Correct Hole Visit (CHV)	Mehr APP im SC war assoziiert mit mehr CHV.	p = 0,037
	Mehr Caspase 3 im HC war assoziiert mit mehr CHV.	p = 0,031
Time Food Intake (TFI)	Mehr APP im HC war assoziiert mit einer längeren TFI.	p = 0,010
Boli	Mehr Amyloide-Plaques im IC waren assoziiert mit mehr Boli.	p = 0,038

Tabelle 13: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Werte aus Plaquetfärbung, WB von APP im SC und HC sowie Caspase 3 im HC (A) mit den Mittelwerten aller Durchläufe des mHBT (B). **Grün hinterlegt:** positive Korrelation $p < 0,05$; höhere Werte aus (A) korrelieren mit höheren Werten in (B). **Gelb hinterlegt:** negative Korrelation $p < 0,05$; höhere Werte aus (A) korrelieren mit kleineren Werten in (B).

5. Diskussion

5.1. Methoden

5.1.1. Tg2576-Mausmodell

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss einer Isofluran-Allgemeinnarkose auf die Neurokognition in einem Mausmodell der Alzheimer Krankheit (engl. Alzheimer's Disease, AD). Ziel war es, die Auswirkungen während einer frühen Form der Erkrankung mit Fokus auf mögliche Geschlechtsunterschiede zu untersuchen. Hierfür wurden sowohl männliche wie auch weibliche Mäuse eingeschlossen. Die AD beim Menschen betrifft die beiden Geschlechter unterschiedlich häufig und mit verschiedener Dynamik. Zudem stellen Alter und Geschlecht die beiden stärksten nicht modifizierbaren Risikofaktoren dar, sodass ein Einblick in die dahinter liegende Pathophysiologie von großem Wert wäre (Podcasy und Epperson 2016). Daher wurde in dieser Studie die Aufmerksamkeit auch auf mögliche Geschlechtsunterschiede gerichtet.

Ein Teil der verwendeten Mäuse in unserer Studie zeigte aufgrund ihrer Tg2576-Genveränderung typische Zeichen eines frühen Stadiums der AD. Bei den Abkömmlingen dieses genveränderten Mausstammes manifestieren sich zwischen acht bis neun Monaten die ersten Anzeichen eines beeinträchtigten Lern- und Gedächtnisvermögens (Hsiao et al. 1996). Zu diesem Zeitpunkt sind sowohl im mHBT bereits messbare Verhaltensauffälligkeiten als auch Veränderungen in der Neurobiologie feststellbar, wobei Geschlechtsunterschiede in der Kognition erst zu einem späteren Zeitpunkt (zwölf Monate) auftreten (Schmid et al. 2019). Zwischen zehn und 21 Monaten nimmt die Belastung der Gehirne mit Alzheimer-Plaques und unlöslichem A β stark zu (Kawarabayashi et al. 2001). Somit kann man bei einer Tg2576-Maus im Alter von zehn Monaten von einer Analogie einer frühen AD beim Menschen sprechen und die Folgen einer Narkoseapplikation zu diesem Zeitpunkt untersuchen.

Das Tg2576-Mausmodell ist das am häufigsten untersuchte transgene Alzheimer-Mausmodell (Elder et al. 2010). Jedoch wird nur ein Teilaspekt der AD repräsentiert, was die Übertragbarkeit des Modells auf die Situation beim Menschen limitiert. Beispielsweise fehlt die Tau-Pathologie, d.h. die intrazelluläre Akkumulation von neurotoxischen Fibrillen, oder der Verlust von Neuronen. Andererseits ist es dadurch möglich, selektiv die Effekte der Amyloid-Kaskade und die Auswirkungen einer Allgemeinanästhesie darauf zu untersuchen. Wie *Elder et al.* ausführen, ist die Modellierung einer menschlichen Krankheit im Tiermodell in jedem Falle von dem bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisstand der Pathophysiologie abhängig. Eine genetische Modifikation mit der folgenden Pathologie kann nur dann implementiert werden, wenn der zugrunde liegende Mechanismus hinreichend bekannt ist und ein genetischer Angriffspunkt identifiziert werden kann. Die AD eignet sich in dieser Hinsicht sehr gut, da die zugrunde liegenden Mechanismen größtenteils klar sind und mit den familiären Alzheimer-Formen mögliche Angriffspunkte im Erbgut der Versuchstiere gegeben sind (Elder et al. 2010). Andere Mausmodelle gehen

in der Modellierung der AD weiter und beinhalten mehrfache genetische Mutationen, welche zusätzlich zur Amyloid-Pathologie auch Tau-Fibrillen ausbilden und somit einen weiteren Aspekt der AD abbilden. Diese enthalten allerdings mehrere Mutationen von unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen, zum Beispiel APP und Presenilin-1 (Morbus Alzheimer) und Tau (Frontotemporale Demenz) in einem dreifach transgenen Mausmodell (Oddo et al. 2003) und entsprechen somit ebenfalls nicht der Realität, da diese Erkrankungen nur selten gemeinsam auftreten und der AD beim Menschen nicht zugrunde liegen (Elder et al. 2010).

Da mit zunehmenden Mutationen aus verschiedenen eigenständigen Erkrankungen auch die Interpretation von möglichen Auswirkungen einer Allgemeinanästhesie darauf schwieriger wird, fiel die Entscheidung bei Überwiegen der Vorteile auf das Tg2576-Mausmodell für die vorliegende Studie.

Durch die Verwendung eines Tiermodells können gezielt die spezifischen Auswirkungen der Allgemeinanästhesie auf oben genannte Aspekte untersucht werden, während in klinischen Studien der Einfluss der Narkose und des operativen Eingriffs stets gemeinsam betrachtet werden müssen. Hierin liegt die offensichtliche Stärke eines Tiermodells. Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine postoperative kognitive Dysfunktion maßgeblich durch eine auf das Operationstrauma folgende Inflammationsreaktion bedingt ist (Cibelli et al. 2010; Terrando et al. 2010). Durch den fehlenden operativen Eingriff in unserer Studie fällt dieser Reiz weg, sodass die alleinigen Auswirkungen der Narkose untersucht werden können. Ein solches Konzept wäre als klinische Studie am Patienten kaum realisierbar, da eine reine Narkosedurchführung angesichts der Risiken ohne eine Operation nicht vertretbar wäre. Ohnehin ist dieses Szenario im klinischen Alltag nicht zu erwarten, da eine Allgemeinanästhesie die Grundlage eines operativen Eingriffs oder einer Intervention ist und ohne diese im Regelfall nicht zustande kommt. Ausgenommen hiervon sind beispielsweise die Kinderanästhesie oder Sedierungsmaßnahmen ohne chirurgische Intervention oder zu diagnostischen Zwecken.

Die Haltung von Mäusen als Versuchstiere ist aufgrund ihrer Größe, des Futtermittelbedarfs und damit des generellen Platzbedarfs relativ einfach. Zudem weisen sie ein hohes Reproduktionsverhalten auf, sodass schnell Nachwuchstiere generiert werden können. Sie haben eine kurze Lebensspanne, die transgene Modifikation ist kostengünstig und die zugrunde liegenden Techniken sind ausgereift. Diese Aspekte machen sie den Ratten oder anderen Säugetieren gegenüber als Versuchstiere überlegen (Elder et al. 2010). Ähnlichkeit zur menschlichen Genetik und Physiologie machen Mäuse zu den beliebtesten Säugetieren für Tierversuche, wobei sie bereits zur Jahrtausendwende 90 % dieser ausmachten – Tendenz steigend (Malakoff 2000).

Ein wesentlicher Kritikpunkt von klinischen Studien, die die Auswirkungen einer Allgemeinanästhesie auf die Neurokognition (in Form der POCD) bzw. AD untersuchen, besteht in der mangelnden Standardisierung der Teilnehmer, unterschiedlichen Arten an chirurgischen Eingriffen und Narkoseverfahren. Auch erfolgt die Erhebung des kognitiven Status in den klinischen Studien vielfach mit unterschiedlichen neuropsychiatrischen Tests ohne klare Standards (Newman et al. 2007). Ansprüche an aussagekräftige Studien sind damit eine standardisierte Vorgehensweise mit vergleichbaren Eingriffen,

vergleichbare neuropsychologischen Tests und definierten Diagnosekriterien für die POCD (Jungwirth et al. 2009). Diese Problematik wird durch den Einsatz eines Tiermodells umgangen, welches ein standardisiertes Vorgehen für Narkose und postinterventionelles Follow-Up gewährleistet. Interindividuelle Unterschiede und Confounder werden durch die Verwendung von weitestgehend identischen Studientieren mit vergleichbarem genetischem Hintergrund sowie gleicher Haltung und Fütterung dieser vermieden. Für das Tg2576-Mausmodell existiert eine Vielzahl an Tests, in welchem kognitive Einschränkungen dieser Mauslinie mit transparenten Versuchsprotokollen nachgewiesen werden konnten, wobei die Sensitivität zwischen ihnen schwankt (Stewart et al. 2011). Obwohl die in einem Tiermodell erhobenen Befunde nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind, können wertvolle Hinweise im Mausmodell gefunden werden, die auf Zusammenhänge beim Menschen hindeuten. Eine Richtung für folgende Versuche am Menschen kann somit gefunden und begründet werden.

In Zusammenschau der positiven Aspekte eines Mausmodells und die weite Verbreitung und Erforschung sowie der Expertise in unserer Abteilung mit dem Tg2576-Mausmodell wurde diese Versuchstiergattung zur Untersuchung möglicher Effekte einer Isoflurannarkose auf die AD ausgewählt.

5.1.2. Narkose mit Isofluran

Die Wahl eines geeigneten Narkosemittels fiel in unserer Studie auf das volatile Anästhetikum Isofluran. Es ist das am weitesten verbreitete inhalative Narkotikum bei Labortieren und ersetzt die früher sehr gebräuchliche Ether- oder Methoxyfluran-Narkose (Richardson und Flecknell 2005). Diese benötigt keine besonderen Hilfsmittel für die Durchführung der Anästhesie, wurde aber wegen ihrer Nachteile (irritative Wirkung auf Schleimhäute, Induktion von Leberenzymen, Entflammbarkeit und Explosivität des Sauerstoff-Gas-Gemisches) durch Isofluran abgelöst und ist kommerziell nicht mehr verfügbar (Flecknell 2009). Allerdings ist für eine Isoflurannarkose bei Nagetieren spezielles Equipment erforderlich, weshalb noch häufiger als die volatilen Narkotika eine Injektionsanästhesie mit bspw. Pentobarbital oder einer Kombination aus Ketamin und Xylazin angewendet wird (Richardson und Flecknell 2005). Nichtsdestotrotz stellt die vergleichsweise einfache Narkoseeinleitung in einer Plexiglasbox mit Isofluran ohne körperliche Manipulation und die Narkoseführung mittels Nasenkammer eine stressfreiere Alternative zur Einleitung der Narkose mit intravenösen oder intraperitonealen Narkotika dar. Wie *Richardson* und *Flecknell* beschreiben, hat Isofluran zudem wenige Nebenwirkungen, da es nur zu einem geringen Teil der Biotransformation unterliegt und zum Großteil wieder abgeatmet wird. Es flutet schnell an und ab und ermöglicht damit eine gute Steuerung der Narkose(-tiefe). Es beeinträchtigt die respiratorische und kardiovaskuläre Leistung moderat. Xylazin, was meist in Kombination mit Ketamin angewendet wird, und Pentobarbital haben hierauf eine stärker depressive Wirkung. Somit ist eine sichere Narkoseführung mit schneller Induktion und Ausleitung mit Isofluran leichter zu erreichen als mit den am häufigsten verwendeten intravenösen Narkotika (Richardson und Flecknell 2005; Flecknell 2009).

Neben ihren Vorteilen bei der Anwendung an Mäusen sind volatile Anästhetika (Sevofluran, Desfluran, Isofluran) heute klinisch weit verbreitet und werden vornehmlich zur Narkoseaufrechterhaltung nach der meist intravenösen Einleitung der Narkose (durch Propofol oder Thiopental) genutzt. Der größte Anteil einer üblichen Allgemeinnarkose wird also durch ein volatiles Narkotikum hergestellt. Durch diese hohe klinische Relevanz und Etablierung bei der Narkose an Mäusen wurde dieses Anästhetikum für unsere Studie ausgewählt.

Die wissenschaftliche Datenlage zum Einfluss von Isofluran bzw. volatilen Anästhetika auf AD und die postoperative kognitive Dysfunktion (POCD) ist nicht eindeutig. Sowohl präklinische als auch klinische Studien finden keinen eindeutigen Kanon. In einigen Artikeln gibt es Hinweise darauf, dass volatile Anästhetika sowohl die Pathologie der AD *in vitro* verstärken (Eckenhoff et al. 2004) als auch zu Defiziten der Neurokognition im Tiermodell (Culley et al. 2003, 2004; Fidalgo et al. 2012) und bei klinischen Probanden führen können (Liu et al. 2013; Qiao et al. 2015; Geng et al. 2017). Andere Studien wiederum zeigen keinen eindeutigen Einfluss (Miller et al. 2018) oder sogar positive Auswirkungen einer Allgemeinanästhesie mit einem volatilen Anästhetikum (Rammes et al. 2009; Schoen et al. 2011; Eckel et al. 2013). Somit ist keine eindeutige Aussage zu einem positiven oder negativen Effekt einer Isofluran- bzw. volatilen Narkose auf die Neurokognition oder die AD möglich, weshalb eine weitere Untersuchung dieses Anästhetikums sinnvoll erscheint. In Kapitel 5.2.3 werden diese Aspekte noch tiefergehender diskutiert.

5.1.3. Der modifizierte Holeboard Test (mHBT) als Verhaltenstest

Zur Analyse des Verhaltens der Mäuse in unserer Studie wurden diese nach einer zweistündigen Narkose bzw. der Sham-Prozedur an den acht darauffolgenden Tagen dem mHBT unterzogen. Wie von *Ohl et al.* und *Gordan et al.* beschrieben wird, erlaubt der mHBT die simultane Untersuchung von Parametern der Neurokognition, des Verhaltens und der Motorik und ist somit geeignet, möglichst viele Veränderungen der AD im Modell abzubilden und unabhängig voneinander zu betrachten. Mögliche Confounder (wie beispielsweise ein hohes Stresslevel, siehe unten), die ebenfalls zu einer veränderten Testperformance führen und einem Einfluss der Narkose oder der Tg2576-Genveränderung nicht zugeordnet werden können, werden dadurch erkannt. Durch die gleichzeitige Untersuchung von mehreren neuropsychiatrischen Teilaspekten verhindert man, wie bei anderen Verhaltenstests auf eine wiederholte Testung der einzelnen Parameter mit jeweils naiven Tieren angewiesen zu sein. Dies würde zu einer erheblichen Erhöhung der Versuchstieranzahl führen. Eine mehrfache Untersuchung der gleichen Tiere würde die Performance in den einzelnen Tests wechselseitig beeinflussen und ist damit abzulehnen (Ohl et al. 2001b, 2003; Gordan et al. 2012). Der Test kann sowohl pharmakologische Einflüsse auf das Verhalten von Ratten (Ohl et al. 2001a) als auch in einer leicht veränderten Form von Mäusen aufdecken (Ohl et al. 2001b; Labots et al. 2015).

Da der mHBT im Haltungsraum der Mäuse stattfindet, erreicht man eine Stressreduktion bei den Versuchstieren: Diese müssen für den Versuchszeitraum nicht aus ihrer gewohnten Umgebung entfernt werden. Wie *de Quervain* beschreibt, beeinflusst ein hohes Stresslevel während des Testens die Gedächtnisleistung der Versuchstiere. Bei Stress wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse aktiviert, die auch bei Nagetieren zur Freisetzung von Glucocorticoiden führt, welche ihre Wirkung auch auf das zentrale Nervensystem ausüben. Diese verbessern die Konsolidierung von Inhalten in das Langzeitgedächtnis, beeinträchtigen allerdings das Abrufen dieser Informationen und das Arbeitsgedächtnis (*de Quervain et al. 2009*). Weil sowohl Gedächtnisprozesse als auch Angstverhalten durch den mHBT erfasst werden, können solche wechselseitigen Einflüsse untersucht werden.

Die initiale Beschreibung des Tg2576-Mausmodells wurde mit dem Morris Water Maze-Test (MWM) durchgeführt (*Hsiao et al. 1996*). Ursprünglich wurde dieser als Test des räumlichen Lernens von Ratten entwickelt (*Morris 1984*). Er stellt eine häufig angewendete Standarduntersuchung bei Mäusen mit der Tg2576-Mutation dar, weist jedoch nur eine vergleichsweise geringe Sensitivität beim Erkennen von kognitiven Defiziten bei Tg2576-Mäusen auf, sodass seine häufige Anwendung durchaus kritisch gesehen werden kann (*Stewart et al. 2011*). Er erwies sich auch bei der Detektion von ischämischen Hirnschädigungen bei Ratten und den folgenden kognitiven Einschränkungen im Vergleich zum mHBT als unterlegen (*Gordan et al. 2012*). Für Mäuse ist er nur bedingt geeignet, da sie im Gegensatz zu Ratten weniger gute Schwimmer sind, gehäuft Probleme beim Erklimmen der Plattform des MWM zeigen und durch das Bad im Versuchsbecken zur Hypothermie neigen (*Tanila 2012*). Beim MWM werden die Mäuse einer Stresssituation ausgesetzt, wohingegen die Erkundung der Versuchsumgebung im mHBT und die Einnahme der Mandel als Belohnung ohne aversiven Reiz erfolgen kann.

Für Tierversuche gilt es, sich bei der Planung möglichst an die sogenannten „3Rs“ zu halten: *Replacement* (Ersatz durch andere Versuche ohne Tiere), *Reduction* (möglichst wenige Tiere pro Studie) und *Refinement* (weniger Belastung für die Tiere) (<https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>, online abgerufen am 21.09.2020, 11:36 Uhr). Der mHBT ist durch eine stressfreie Versuchsumgebung und ohne multiple konsekutive Tests durch die zahlreichen gleichzeitig erfassten Parameter (*Refinement*) sowie einer Verringerung der benötigten Versuchstiere durch nur einen angewendeten Test (*Reduction*) als positiv zu bewerten. Würden mehrere Tests pro Versuchstier durchgeführt, wäre die Belastung der Tiere größer, nähme man für jeden zusätzlichen Versuch neue Tiere, wäre die Zahl der benötigten Mäuse deutlich höher. Somit fällt aufgrund der offensichtlichen Defizite des MWM oder anderer Verhaltenstests und der Vorteile des mHBT die Wahl für unsere Studie auf Letzteren.

5.1.4. Analytische Methoden

Ziel der Studie war es, nicht nur die Auswirkungen einer Isoflurannarkose auf das Verhalten und die Kognition der Mäuse zu erforschen, sondern auch die molekularbiologischen Veränderungen in deren Gehirnen näher zu betrachten. Daher wurden die Mausgehirne nach Abschluss des mHBT einer

laborchemischen Analytik zugeführt. Der phänotypischen Ausprägung der Alzheimer-Merkmale wurde dabei besondere Aufmerksamkeit im Sinne einer dreifachen Analytik mit verschiedenen Verfahren gewidmet. Diese dient der möglichst genauen Abbildung der Amyloid-Beta-Kaskade durch die Analyse des Amyloid-Precursor-Protein (APP), A β -1-42 und den senilen (amyloiden) Plaques. Damit wird die phänotypische Ausprägung der der APP_{695SWE}-Mutation im Tg2576-Mausmodell in einem Alter von zehn Monaten untersucht und den Wildtypen gegenübergestellt.

Es wurden Proben aus dem Hippocampus (HC) und sensorischen Cortex (SC) untersucht, um die Ausprägung an zwei verschiedenen Gehirnregionen zu untersuchen, die zum Erlernen und Ausführen des mHBT notwendig sind: Der HC als Sitz des deklarativen Gedächtnisses und der SC als Ort der Integration der sensorischen Eindrücke und Ursprung direkter motorischer Antworten auf Umweltreize (Squire and Dede 2015; Karadimas et al. 2020). Hierfür wurde das Western Blot Verfahren (WB) genutzt. Mittels WB wurde die Expression im HC und SC von APP, TNF- α , Caspase 3, GABA-A α 1, NR2B und mGluR5 ermittelt. Der WB stellt ein Verfahren zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung eines exprimierten Proteins aus einem lysierten Gewebeteilstück dar. Es sind keine genauen Aussagen zu Eiweißkonzentrationen möglich (wie etwa beim ELISA), sondern nur eine relative Angabe der Expression im Vergleich zu den anderen Proben (Gavini und Parameshwaran 2020). Für unsere Fragestellung war es nicht notwendig, die genaue Konzentration zu wissen, vielmehr waren relative Unterschiede in der Proteinexpression wichtig, die mit dem WB optimal erfasst werden können. Innerhalb des Verfahrens finden an mehreren Stellen intrinsische Kontrollen der einzelnen Schritte statt: Die Aktivierung des Gels dient dazu, das Laufverhalten und somit die korrekte Trennung der Proteine durch ein funktionierendes (blasenfreies) Gel festzustellen. Bei der Ablichtung der Membran vor der Inkubation mit dem Antikörper können etwaige Übertragungsfehler festgestellt werden. Das „Blocken“ der Membran mit BSA verhindert, dass sich der Antikörper an der gesamten Membran festhält, da diese eine hohe Affinität für Proteine im Allgemeinen aufweist (Gavini und Parameshwaran 2020). Zahlreiche Waschvorgänge sind notwendig, um Hintergrundrauschen zu vermeiden. Insgesamt stellt der WB eine sensitivere Analysemethode als der ELISA dar (Gavini und Parameshwaran 2020). Aus diesem Grund wurde bei einer großen Menge an analysierten Antigenen (siehe Tabelle 10) der WB gewählt, da durch nur einen Durchgang zahlreiche Proben aufgetrennt und mit mehreren Antikörpern markiert werden können. Er stellt zwar ein aufwändiges Verfahren mit vielen Zwischenschritten dar, jedoch wird das obige Protokoll in unserer Arbeitsgruppe seit langem angewendet und ist daher auf mögliche Fehlerquellen hin optimiert. Alle Durchgänge wurden durch dieselbe Person durchgeführt, sodass interindividuelle Unterschiede durch wechselnde Experimentatoren vermieden wurden. In jedem Durchgang wurde ein zweifacher Standard aufgetragen, der über alle durchgeführten WB identisch war und den gesuchten Antikörper enthielt. Dieser Standard ist für die korrekte elektronische Auswertung als Referenzkonzentration obligatorisch.

Die Belastung der Versuchstiere mit A β -1-42 wurde im motorischen präfrontalen Cortex (MPFC) mittels ELISA bestimmt. Neben HC und SC wird somit ein weiterer Teil des Mausgehirns auf die

Ausprägung der Alzheimer-Krankheit untersucht. Der motorische Kortex übernimmt nicht nur eine wichtige Rolle in der Bewegungskontrolle, sondern auch beim motorischen Lernen (Peters et al. 2017). Auch diese Lernprozesse können durch die Akkumulation von A β und senilen Plaques beeinträchtigt werden. Der ELISA stellt eine gleichsam sensitive und spezifische Analytik dar, da er auf einer Antigen-Antikörper-Interaktion beruht. Durch die zweifache Antigen-Antikörper-Reaktion ist der von uns verwendete Sandwich-ELISA ca. zwei bis fünf Mal sensitiver als alle anderen entwickelten ELISA-Varianten (Aydin 2015). Er stellt ein schnelles und einfaches Verfahren im Gegensatz zum Western Blot dar und liefert quantitative Ergebnisse (Konzentrationen). Es ist möglich, mit nur einem einzigen Durchgang eine Vielzahl an Gehirnproben zu analysieren mit jedoch nur einem Antikörper. Das fertig zu erwerbende Testkit enthält nahezu alle notwendigen Chemikalien und Materialien, sodass die Anzahl der nötigen Versuchsschritte sehr geringgehalten wird und eine standardisierte Durchführung gewährleistet ist. All diese Vorteile des ELISAs gehen mit einem Nachteil im Gegensatz zum WB einher: Man ist auf eine einzige Antigen-Antikörper-Reaktion beim ELISA limitiert, während man beim WB nahezu beliebig viele Antigene (semiquantitativ) detektieren kann. Vor Durchführung werden die Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Für korrekte Ergebnisse ist die optimale Verdünnung der Proben essentiell. Da die Menge an untersuchten Gehirnen sehr groß war, wurde eine Zweifachmessung vorgenommen, d.h. zwei Wells mit dem gleichen Proteinhomogenisat beladen. Hier wurde zugunsten eines geringeren Materialverbrauchs auf eine sichere Dreifachbestimmung, wie beim Bradford-Test (siehe Kapitel 3.8.3), verzichtet. Somit kann man bei stark voneinander abweichenden Ergebnissen nicht auf den wahren Wert schließen, wie dies bei einer dreifachen Bestimmung möglich ist.

Die Ausprägung der Amyloiden-Plaques im Hippocampus (HC) und Isocortex wurde mithilfe der Methoxy-X04-Färbung und einer mikroskopischen, computerunterstützten Zählung bestimmt. Um eine zuverlässige elektronische Auswertung zu erreichen, ist ein möglichst hoher Kontrast zwischen den angefärbten Alzheimer-Plaques und dem umgebenden Gewebe notwendig. Dieser wird durch die spezifische Bindung des Methoxy-X04-Farbstoffes an die Amyloid-Plaques gewährleistet. Hintergrundrauschen wird somit vermieden. Die hohe Affinität des Farbstoffes zu den Alzheimer-Plaques wird dadurch verdeutlicht, dass sogar eine *in vivo* Detektion der Plaques ermöglicht wird. Durch intravenöse oder intraperitoneale Anwendung kommt es zu einer Anreicherung in den Gehirnen der Mäuse, da der Farbstoff die Blut-Hirn-Schranke gut passieren kann (Klunk et al. 2002). Dass die angewandte Methodik gute Ergebnisse liefert, welche mit dem Alter der Mäuse und den neurokognitiven Defiziten korreliert, konnte in einer vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Schmid et al. 2019). Dasselbe Prinzip wurde auch bei unseren Untersuchungen angewendet. Jeder Hirnschnitt wird vor der automatischen Ablichtung durch das Mikroskop manuell betrachtet und die optimale Schärfe über die gesamte Region of Interest (ROI) eingestellt. Somit wird sichergestellt, dass keine Plaques durch eine unpassende Z-Achseinstellung des Mikroskops übersehen werden. Auch die digitale Zählung unterliegt einer ständigen Kontrolle durch den Untersucher, da die Empfindlichkeit, ab wann eine Plaque als

solche erkannt wird, für jede Abbildung manuell festgelegt und Artefakte der Mikroskopie entfernt werden müssen.

5.2. Ergebnisse des Modifizierten Holeboard Test (mHBT)

5.2.1. Verhalten und Motorik

Im mHBT können durch die spezielle Versuchsarchitektur Aspekte des Verhaltens, der Neurokognition und der Motorik der getesteten Mäuse untersucht werden. Objektiv messbare Aktionen können dabei spezifischen neurologischen Funktionen zugeordnet werden.

Über die acht Tage des mHBT zeigten alle Mäuse eine verstärkte zielgerichtete und abnehmende ungerichtete Exploration. Die Mäuse suchten im Verlauf schneller die Zylinder auf, um die Aufgabe des mHBT zu lösen. Eine Abnahme der Immobilitätsphasen und des Kotabsatzes über die acht Tage spricht für ein verringertes Angstempfinden und reduzierte Erregung der Tiere in der Versuchsumgebung. Ebenso nimmt das Vermeidungsverhalten (als Manifestation der Angst) im Verlauf des mHBT ab, da die Tiere länger auf dem Board verweilen. Dies ist durch eine Habituation an die Versuchssituation und das Erlernen des Versuchsprinzips zu erklären, was ebenso bei mehrmaligem Testen mittels mHBT beobachtet werden konnte (Ohl et al. 2003). Wildtypen meiden den Aufenthalt auf dem Board in größerem Maße als Tg2576-Mäuse.

Mäuse mit der Alzheimer-Mutation zeigen ein über alle acht Tage stärker ausgeprägtes Erkundungsverhalten, da der mHBT bei ihnen generell mit weniger Stress verbunden zu sein scheint. Dies zeigt sich auch daran, dass bei Wildtypen die Putzphasen länger und die Anzahl der abgesetzten Kothaufen höher waren. Das Erkundungsverhalten der Mäuse wird durch Angstempfinden und Erregung offensichtlich negativ beeinflusst, was sich in einer geringeren zielgerichteten Exploration zeigt. Die ungerichtete Exploration, d.h. das Aufstellen auf die Hinterbeine (Rearing) scheint in gegensätzlicher Weise mit der emotionalen Belastung der Mäuse verbunden zu sein. Hier zeigt sich bei den Wildtypen vermehrt ungerichtetes Erkundungsverhalten im Vergleich zu den Alzheimer-Mäusen. Die Tg2576-Mäuse im Alter von zehn Monaten zeigen als Manifestation der AD in einem frühen Stadium ein weniger ängstliches und enthemmtes Verhalten im Vergleich zu den Wildtypen. Diese Ergebnisse decken sich mit vorhergehenden Untersuchungen, die den Tg2676-Mäusen hemmungslose Verhaltensmuster attestieren aufgrund einer geringeren cholinergen Verhaltensinhibition (Ognibene et al. 2005). Das eingeschränkte Angstempfinden der Tg2576-Mäuse wurde bereits im mHBT beschrieben (Schmid et al. 2019) und im Zusammenhang mit einer verringerten Angstkonditionierung durch aversive Reize (Elektroschocks an den Füßen) im Alter von 16 Monaten geschildert (Barnes und Good 2005). Anders als beim vorliegenden Mausmodell zeigen sich beim Menschen Beeinträchtigungen der affektiven Funktion eher in fortgeschrittenen Stadien der AD, früher manifestieren sich die mnestischen Defizite. Es zeigt sich dann vielfach enthemmtes, unangemessenes Verhalten aber auch verstärkt Ängstlichkeit und Passivität und

Alzheimer-Patienten neigen gleichermaßen zu aggressivem und paranoidem Verhalten, Abwehrreaktionen und Depressionen (Reiman und Caselli 1999; Chung und Cummings 2000).

Mäuse mit der Alzheimer-Mutation weisen eine erhöhte Bewegungsaktivität im Vergleich zu ihren Wildtyp-Wurfgeschwistern auf, was sich über alle acht Versuchstage gleichermaßen zeigt. Die motorische Aktivität der Mäuse ist also im Gegensatz zur Exploration nicht abhängig von der Expositionsdauer des mHBT. In Zusammenschau mit der verstärkten direkten Exploration der Tg2576-Mäuse zeigen diese im Vergleich zu den Wildtypen ein disinhibitorisches Verhalten, welches auch bei Patienten mit der AD beobachtet werden kann (Lalonde et al. 2003).

Die feinmotorischen Fähigkeiten der Tg2576-Mäuse nehmen mit zunehmendem Fortschreiten der AD ab. Diese lassen sich darüber bemessen, wie lange eine Maus für den Verzehr einer Mandel benötigt. Um das gefundene Mandelstück einzunehmen, ist eine komplexe Abfolge an motorischen Operationen auszuführen, die bei Trägern der Alzheimer-Mutation längere Zeit in Anspruch nehmen. Auch die Anzahl der gescheiterten Lochbesuche ist ein Indikator für motorische Defizite, wobei hier keine Unterschiede zwischen Tg2576-Mäusen und Wildtypen gefunden werden konnten. Beide Gruppen zeigten über die acht Tage weniger gescheiterte Besuche, was analog zu den Kognitionsparametern als Erlernen des mHBT zu werten ist. Beobachtungen an Alzheimer-Patienten zeigen ebenfalls motorische Einbußen, die sich in pyramidalen und extrapyramidalen bzw. parkinsonoiden Störungen niederschlagen. Diese treten bereits zu einem frühen Stadium der AD auf oder möglicherweise bereits Jahre bevor sich die ersten kognitiven Einschränkungen manifestieren (Albers et al. 2015).

5.2.2. Neurokognition

Im mHBT können verschiedene Teilbereiche des Gedächtnisses, wie sie auch beim Menschen vorkommen, untersucht werden. Falsche Lochbesuche (WC), ausgelassene Besuche eines markierten Zylinders (OE) und die Summe daraus (WCT) geben Ausschluss über die Funktion des deklarativen Gedächtnisses. Dieses ist beim Menschen für das bewusste Erinnern an Fakten und Ereignisse zuständig und im medialen Temporallappen lokalisiert, weshalb sich die Untersuchung des deklarativen Gedächtnisses eignet, um eine Schädigung des Hippocampus zu detektieren (Squire und Dede 2015). Im mHBT benötigen die Mäuse das deklarative Gedächtnis, um das Versuchsprinzip zu erlernen und sich daran während den acht Versuchstagen zu erinnern. Ebenfalls wird es benötigt, um sich die richtigen Löcher eines Durchgangs zu merken, da zwischen den vier Durchläufen an einem Tag eine Pause stattfindet (Ohl et al. 2003).

Wiederholte Besuche geleerter markierter Zylinder (RC) sind ein Indikator für ein eingeschränktes Arbeitsgedächtnis der Versuchstiere, da sich die Mäuse an einen erst kürzlich erfolgten korrekten Lochbesuch erinnern müssen (Ohl und Fuchs 1999). Als Sitz des Arbeitsgedächtnisses wurde im Tiermodell zunächst der Hippocampus beschrieben, was sich später zu Gunsten des präfrontalen Kortex wandelte und damit mit der Vorstellung beim Menschen übereinstimmt (Funahashi 2017).

Das Arbeitsgedächtnis der Mäuse unterlag keiner Verbesserung über die acht Versuchstage während des mHBT. Im Vergleich zeigte sich allerdings eine erhöhte Anzahl an RC bei den Tg2576-Mäusen, was für ein gestörtes Arbeitsgedächtnis durch die frühe Form der AD bei diesen Mäusen spricht. Das impulsivere Verhalten Tg2576-Mäuse mit längeren Aufenthalten auf dem Board und schnell aufeinanderfolgenden, teilweise unsystematischen Lochbesuchen kann auch eine Erklärung für den Befund bei verbessertem deklarativem Gedächtnis (siehe unten) liefern.

Bereits in frühen Stadien der AD werden Beeinträchtigungen des Arbeitsgedächtnisses klinisch auffällig und äußern sich durch eine weniger effiziente Speicherung von vergleichsweise wichtigen Erinnerungen (Castel et al. 2009). Als Risikofaktor für die AD gilt eine milde kognitive Beeinträchtigung (engl. mild cognitive impairment, MCI), bei welcher ebenfalls bereits das Arbeitsgedächtnis und die Aufmerksamkeitsspanne betroffen sind. Eine Früherkennung und etwaige Modifizierung dieser Störungen könnten den Fortgang der AD positiv beeinflussen, weshalb es sich lohnt, Auswirkungen auf diesen Teil des Gedächtnisses näher zu betrachten (Saunders und Summers 2011; Kirova et al. 2015).

Interessanterweise zeigten die Träger der Alzheimer-Mutation im Alter von zehn Monaten eine bessere Funktion des deklarativen Gedächtnisses, welche sich mit von Versuchstag zu Versuchstag weiter steigerte. Diese Ergebnisse stellen eine plausible Konsequenz des enthemmten Verhaltens (verstärkte direkte Exploration) bei gleichzeitig erhaltener allgemeiner Gedächtnisfunktion dar. Diese führte bei den Alzheimer-Tieren zu einer besseren Testperformance, wohingegen Wildtypen durch ängstlicheres Verhalten schlechter abschnitten. Dies widerspricht den Befunden vorhergehender Untersuchungen, welche den Tg2576-Mäusen im Alter von zehn Monaten eine erhöhte Anzahl an WC im Vergleich zu den Wildtypen zuschreiben und damit eine schlechtere Funktion des deklarativen Gedächtnisses (Fendl 2013; Schmid et al. 2019) wobei auch Studien existieren, die keine kognitiven Beeinträchtigungen der Tg2576-Mauslinie bis ins Alter von 19 Monaten beschreiben (King und Arendash 2002). Zu beachten ist hierbei allerdings, dass die Tiere der vorliegenden Studie zusätzlich teilweise einer Narkose ausgesetzt waren. Die Beeinträchtigung des deklarativen Gedächtnisses stellt offenbar keine zwingende Eigenschaft der Alzheimer-Mäuse im Alter von zehn Monaten dar. In Kontrast zu unserer These stehen Berichte, wonach ängstlichere Mäuse im mHBT besser abschneiden, was allerdings mit einer zielgerichteteren und verbesserten Performance erklärt wird. Diese ängstlichen Mäuse zeigten eine verstärkte direkte Exploration, welche zu einer erfolgreichereren Suchstrategie im mHBT führte – genau wie bei den Tg2576-Mäusen in unseren Untersuchungen (Ohl et al. 2003).

Wie *Jahn* beschreibt, äußert sich die AD beim Menschen beginnend mit Einschränkungen des deklarativen Gedächtnisses, was sich unter anderem darin äußert, dass die Alzheimer-Patienten nicht mehr in der Lage sind, sich flüssig verbal zu artikulieren und Objekte namentlich zu bezeichnen. Neue Gedächtnisinhalte können durch die Zerstörung des Hippocampus in Form einer anterograden Amnesie nicht mehr abgespeichert werden (Jahn 2013). Der Alzheimer-Patient ist sich seiner Erkrankung nicht bewusst, was als Anosognosie bezeichnet wird und ihn von Menschen unterscheidet, die eine milde

Gedächtniseinschränkung des normalen Alterns als sehr beunruhigend empfinden (Reiman und Caselli 1999).

Die Lernleistung und Motivation der Tiere, dargestellt durch eine Verkürzung der Dauer bis zum Abschluss eines Durchgangs, verbesserte sich über die acht Tage des mHBT. Ähnlich wie in Bezug auf die Funktion des deklarativen Gedächtnisses zeigten sich die Tg2576-Mäuse mit der frühen Ausprägung der AD mit besseren Werten im Vergleich zu den Wildtypen, was am ehesten auf die emotionalen Unterschiede durch den Genotyp der Versuchstiere zurückzuführen ist. Zu diesem Zeitpunkt der AD entwickelte sich die erhöhte Impulsivität und verminderte Ängstlichkeit der Alzheimer-Tiere zu deren Vorteil im mHBT. Eine Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses konnte durch eine dynamischere Testperformance bei gleichzeitig sogar verbessertem deklarativem Gedächtnis ausgeglichen werden und führte zu besseren Ergebnissen bei den Tg2576-Tieren. Tiere aus beiden Experimentalgruppen sind in der Lage, den mHBT zu erlernen, was sich in einer abnehmenden Anzahl an ausgelassenen Löchern und verkürzter Dauer der Durchläufe zeigt (Eckel et al. 2013).

5.2.3. Einfluss der Narkose

Die Studienlage zur postoperativen kognitiven Dysfunktion (engl. postoperative cognitive dysfunction, POCD) und dem Einfluss verschiedener Anästhesieformen, der Art des chirurgischen Eingriffs und der perioperativen Komplikationen ist zahlreich und lässt einen roten Faden vermissen. Exemplarisch sei für nicht-kardiochirurgische Eingriffe die *International Study of Postoperative Cognitive Dysfunction* (ISPOCD 1) an Patienten mit einem Alter von über 60 Jahren genannt. Diese findet nach einer Woche in ca. einem Viertel der Patienten und nach drei Monaten noch bei ca. zehn Prozent POCD im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 3,4 % und 2,8 % (Moller et al. 1998). Weitere Studien beschreiben kognitive Einschränkungen nach einer Operation unter Allgemeinanästhesie (Bratzke et al. 2018) oder eine verstärkte Dynamik des kognitiven Verfalls bei bereits beeinträchtigten Individuen, in diesem Falle auch unter Regionalanästhesie (Patel et al. 2016). Bei kardiochirurgischen Eingriffen, wie der koronaren Bypasschirurgie wird die POCD ebenfalls häufig beschrieben (van Dijk et al. 2000; Selnes et al. 2001). Die Inzidenz der POCD in älteren Individuen wird durch vorbestehende kognitive Defizite und die Alzheimer-Erkrankung verstärkt (Patel et al. 2016). Andererseits wird POCD als Prodromalstadium bzw. Risikofaktor für die Ausprägung einer Demenz diskutiert. Während die POCD in der Regel bis ein Jahr nach dem Eingriff wieder reversibel ist, werden nach Eingriffen zur Anlage eines koronaren Bypasses drei bis fünf Jahre nach der Operation verzögerte kognitive Einbußen beschrieben (Vanderweyde et al. 2010). Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von kognitiven Defiziten nach einer Narkose und der AD erscheint somit als wahrscheinlich.

Die Auswirkungen einer Allgemeinanästhesie auf die AD und der zu Grunde liegenden Mechanismus sind bisher unklar. Es finden sich Studien, die keinen Einfluss beschreiben (Bohnen et al. 1994; Sprung et al. 2013) oder der Narkose einen verstärkenden Effekt zuschreiben (Chen et al. 2014a, b), wobei auch

hier ein wissenschaftlicher Konsens fehlt. Ebenso wird berichtet, dass herzchirurgische Eingriffe die Inzidenz der AD verstärken können, wobei vorbestehende kardiovaskuläre Erkrankungen als eigenständige Risikofaktoren mitbeachtet werden müssen (Lee et al. 2005; Evered et al. 2016). Im Mausmodell werden positive Auswirkungen einer Isoflurannarkose beschrieben, die durch eine verbesserte kognitive Funktion durch gesteigerte Langzeitpotenzierung im Hippocampus erreicht wird (Rammes et al. 2009). Die Ergebnisse bei den Alzheimer-Mausmodellen zeigen ebenfalls in beide Richtungen: Es finden sich positive Einflüsse auf die Neurokognition durch Isofluran, sowohl bei Wildtypen als auch bei transgenen (APP23) Versuchstieren (Eckel et al. 2013). Auf der anderen Seite werden auch negative Folgen einer Narkose mit Isofluran im Tg2576-Mausmodell beschrieben, die sich sowohl in kognitiven Beeinträchtigungen als auch in neurophysiologischen Defiziten, wie vermehrten pro-apoptischen Proteinen und A β -Aggregaten, und einer erhöhten Mortalität zeigen (Perucho et al. 2010). Eine andere Studie mit dem gleichen Modell und (weiblichen) Tieren im Alter von zwölf Monaten findet lediglich eine eingeschränkte Neurokognition bei den Wildtypen; Veränderungen bei den transgenen Mäusen können nur in Form einer verstärkten Amyloidopathie nach einer Narkose mit Halothan festgestellt werden (Bianchi et al. 2008).

In unseren Untersuchungen zeigte sich kein alleiniger Einfluss einer Allgemeinanästhesie mit Isofluran auf die im mHBT erhobenen Parameter. Um die Realität möglichst genau abzubilden wurden für die Dauer der Narkose zwei Stunden gewählt. Ob die Dauer dabei zu kurz für einen Einfluss gewählt wurde, bleibt fraglich. Studien, die einen negativen Einfluss im Mausmodell finden, applizieren die Narkose zwei Stunden an fünf Tagen, d.h. insgesamt zehn Stunden (Bianchi et al. 2008) oder 30 bzw. 20 Minuten zweimal pro Woche innerhalb von drei Monaten (Perucho et al. 2010). Da Erstere nur einen Einfluss bei den Wildtypen findet und Zweitere in allen Versuchsgruppen, begünstigt eine chronische Narkoseexposition möglicherweise den neurotoxischen Effekt der Allgemeinanästhesie. Selbstverständlich sind die Studien in den Rahmenbedingungen nicht übereinstimmend, jedoch kann man den Eindruck gewinnen, der nachteilige Effekt einer Anästhesie wäre von der Dauer abhängig. Diese These wird dadurch untermauert, dass Arbeiten, die positive Effekte beschreiben, eine wesentlich kürzere Narkosedauer anwenden, zum Beispiel wie in unserer Studie eine Einmalanwendung von zwei Stunden (Rammes et al. 2009; Eckel et al. 2013). In zukünftigen Studien sollten daher unterschiedliche Längen einer Narkose untersucht werden, um eine mögliche Schwellendauer bzw. zeitabhängige positive oder negative Wirkung von Isofluran ausfindig zu machen. In jedem Fall muss bedacht werden, dass eine repetitive Allgemeinanästhesie mit Isofluran eine stärkere Belastung für Mäuse, insbesondere für weibliche Tiere, darstellt (Hohlbaum et al. 2017).

Eine weitere Schwierigkeit stellt der Zeitpunkt der Verhaltenstestung dar. Hier ist es wichtig, diesen nicht zu früh und nicht zu spät zu wählen. Eine Verzerrung durch unmittelbare Nachwirkungen der Narkose, welche potentiell reversibel sind, wie z.B. prolongierte Aufwachreaktionen, ist zu vermeiden. Aus diesem Grund beginnt der mHBT erst am folgenden Tag nach der Anästhesie.

Unterschiede im mHBT zwischen Wildtypen und Tg2576-Mäusen treten ab einem Alter von acht Monaten in Erscheinung (Schmid et al. 2019). Somit ist der Test prinzipiell in der Lage, bereits zu einem frühen Zeitpunkt der AD bei den Tg2576-Mäusen Veränderungen zu detektieren und müsste folglich auch in der Lage sein, subtile Veränderungen durch eine Allgemeinanästhesie aufzudecken. Das Vorhandensein von alzheimerartigen pathologischen Veränderungen bei den Mäusen scheint hingegen keinen Einfluss auf die Vulnerabilität der Gehirne gegenüber einer Allgemeinanästhesie zu haben. Bereits nach zwei Stunden Narkose mit Isofluran bei Wildtyp-Mäusen können erhöhte Konzentrationen an Caspase 3 und A β (Xie et al. 2008) beobachtet werden. In der vorliegenden Studie und bei Untersuchungen mit zwölf Monate alten Tg2576-Mäusen (Bianchi et al. 2008) können dagegen keine Auswirkungen festgestellt werden. Letztere verwendete allerdings nur weibliche Tiere, sodass die Aussagekraft für männliche Tiere eingeschränkt ist.

In Anbetracht der heterogenen Datenlage muss bedacht werden, dass die vorliegende Studie keinen Anspruch auf eine allumfassende Klärung des Sachverhalts Narkose und AD stellt, sondern lediglich einzelne Punkte dieses komplexen Feldes näher zu beleuchten versucht. Hierüber können wertvolle grundlegende Erkenntnisse für nachfolgende (prä-)klinische Studien gefunden werden.

5.2.4. Einfluss des Geschlechts

Klinische Untersuchungen legen nahe, dass weibliche Patientinnen ein höheres Risiko für eine Alzheimer-Erkrankung haben als Männer (Fratiglioni et al. 1997; Gao et al. 1998). Mögliche Gründe liegen in einer Abnahme der Östrogenkonzentration nach der Menopause, da dem weiblichen Sexualhormon neuroprotektive Einflüsse zugeschrieben werden. Darüber hinaus sind niedrigere Östrogenspiegel mit einer höheren Konzentration an A β assoziiert (Schönknecht et al. 2001; Barron und Pike 2012). Weiter wird berichtet, dass ein geringeres Risiko der Entwicklung einer AD bei Frauen besteht, welche eine Hormonersatztherapie erhalten, wobei die Dauer und der Zeitpunkt maßgeblichen Einfluss auf die Risikoreduktion haben (Zandi et al. 2002).

Ebenso finden sich in tierexperimentellen Untersuchungen Hinweise auf eine erhöhte Vulnerabilität von weiblichen Versuchstieren. Eine stärkere Ausprägung der alzheimerartigen neuropathologischen Veränderungen (im APP_{SWE}-Presenelin-1-Mausmodell) finden sich dabei entweder in allen Altersklassen der Mäuse (Wang et al. 2003) oder erst ab einem bestimmten Alter. So gibt es Hinweise, dass weibliche Tg2576-Mäuse erst ab einem Alter von zwölf Monaten mit Gipfeln in einem Alter von 15 und 19 Monaten mehr A β exprimieren als die Männchen (Callahan et al. 2001). Erste Geschlechtsunterschiede bei ethologischen Untersuchungen im Tg2576-Mausmodell zeigen sich ab einem Alter von zwölf Monaten, wobei hier bei einer vergleichbaren Belastung mit Amyloid- β eine schlechtere Funktion des Referenzgedächtnisses im mHBT beobachtet werden kann. Unterschiede in der Belastung der Mäuse nach Geschlecht mit A β oder amyloiden Plaques finden sich hier jedoch in keiner Altersklasse (Schmid et al. 2019). Weibliche Tiere reagieren also möglicherweise sensitiver auf eine Belastung mit Amyloid- β als

ihre männlichen Artgenossen. Unterschiede im Abschneiden der zehn Monate alten Tg2576-Mäuse im mHBT, die alleine durch das Geschlecht zu erklären wären, finden sich in unserer Studie im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe (Schmid et al. 2019) nicht. Bekannte Defizite im Sinne einer beginnenden Alzheimer-Erkrankung der Mäuse werden in unserer Studie hingegen bestätigt.

Die These, dass Östrogenentzug mit einer stärkeren Ausprägung der AD assoziiert ist wird auch in Tierexperimenten verfolgt. Eine Östrogendeprivation wird dabei durch eine Ovariectomie der Versuchstiere erreicht und führt zu einer stärkeren Belastung der transgenen Mauslinien mit A β , wobei auch eine erhöhte Mortalität bei diesen Tieren auffällig ist (Levin-Allerhand und Smith 2002). Ähnlich zur Hormonersatztherapie beim Menschen können die Effekte eines Östrogenentzugs durch eine Substitutionstherapie am Versuchstier geschmälert werden (Zheng et al. 2002). Eine Aussage hierzu ist durch unsere Daten nicht möglich, da auf die Bestimmung der Serumöstrogenkonzentration verzichtet wurde.

In klinischen Untersuchungen finden sich vergleichbare Raten an POCD beim Vergleich von Männern und Frauen (Newman et al. 2001; Hogue et al. 2003). Findet allerdings eine Trennung nach dem ApoE4-Status (Apolipoprotein E, ϵ 4 Isoform) der Probanden statt, so demaskieren sich geschlechtsspezifische Unterschiede. ApoE4-positive Männer zeigen eine höhere Rate an POCD im Vergleich zu ApoE4-positiven Frauen (Schenning et al. 2019). Auch bei der AD spielt ApoE4 eine Rolle: Weibliche Patienten mit einem positiven ApoE4-Genotyp haben ein höheres Risiko die Alzheimer-Krankheit oder eine milde kognitive Beeinträchtigung (engl. mild cognitive impairment, MCI) auszubilden (Altmann et al. 2014). Die Entwicklung der POCD scheint also vom Trägerstatus des ApoE4-Allels abhängig zu sein, wohingegen ein postoperatives Delir (POD) unabhängig von ApoE4 bei Männern häufiger anzutreffen ist und eine vorbestehende demenzielle Entwicklung ebenfalls als Risikofaktor für ein POD anzusehen ist (Lee et al. 2011).

In unserer Studie war der Einfluss des Geschlechts auf die Ergebnisse im mHBT von der Durchführung einer Narkose und teilweise vom Genotyp abhängig. Eine alleinige Beeinflussung durch die Faktoren weiblich oder männlich ergab sich nicht. Am letzten Tag des mHBT zeigten die Männchen in der Gruppe der narkotisierten Tiere im Vergleich zu den Weibchen eine verstärkte ungerichtete Exploration. Diese zeigte sich durch mehr Rearings, was auch bei den männlichen Tieren mit Isoflurannarkose im Vergleich zu den Sham-Männchen beobachtet werden konnte. In der Gruppe der männlichen Wildtypen mit einer Allgemeinanästhesie zeigten sich mehr unbesuchte markierte Löcher (OE) am achten Tag des mHBT als bei den korrespondierenden Tieren der Sham-Gruppe, was für ein stärker beeinträchtigtes deklaratives Gedächtnis nach Durchlaufen des mHBT spricht. Gescheiterte Lochbesuche (UHV) als Zeichen einer motorischen Beeinträchtigung waren bei den männlichen narkotisierten Tieren ausgeprägter als bei den männlichen Mäusen aus der Kontrollgruppe. Bei den Mäusen, die einer Isoflurannarkose unterzogen wurden, war dieser Effekt bei den männlichen Tieren im Vergleich zu den Weiblichen stärker ausgeprägt. Gleiche Effekte fanden sich am letzten Tag des mHBT für die UHV. Verstärkte ungerichtete Exploration und mehr OE fanden sich auch bei den Wildtypen im Vergleich zu den Tg2576-Mäusen,

sodass eine Narkose mit Isofluran die Leistung der Männchen im mHBT in gegensätzlicher Weise zu beeinflussen scheint, wie die Alzheimer-Mutation. Bei den UHV fanden sich keine Unterschiede zwischen Wildtypen und Carriern, sodass man hier lediglich einen hemmenden Einfluss von Isofluran auf die Motorik der männlichen Tiere folgern kann. Eine Narkose mit Isofluran führt bei den männlichen Tieren zu einer schlechteren Funktion des deklarativen Gedächtnisses und zu einer verstärkten ungerichteten Exploration. Dies unterstützen Studien, die eine erhöhte Inzidenz von POD und POCD bei männlichen Patienten postulieren (Lee et al. 2011; Schenning et al. 2019). In die gleiche Richtung deuten Unterschiede in den UHV, welche eine stärker beeinträchtigte Motorik bei den männlichen narkotisierten Tieren zeigt. Nichtsdestotrotz sind dies nur diskrete Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Möglicherweise sind diese Unterschiede in einem weiter fortgeschrittenen Alter oder nach einer längeren Isofluran-Exposition deutlicher festzustellen.

5.3. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

5.3.1. Alzheimer-Korrelate

Amyloid Precursor Protein (APP)

Sowohl im Hippocampus als auch im sensorischen Cortex der zehn Monate alten Tg2576-Mäuse findet sich eine erhöhte Expression des APP gemäß ihres genetischen Hintergrunds im Vergleich zu den Wildtypen (siehe Diagramm 12, Diagramm 13). Eine zweistündige Narkose mit Isofluran hat auf die Belastung der beiden Hirnregionen mit APP keinen Einfluss. Die steigende Belastung mit A β und Plaques scheint nicht von einer höheren Expression an APP mit steigendem Alter abhängig zu sein, da diese über die Lebensmonate konstant bleibt (Hsiao et al. 1996). Vermehrtes APP in den Gehirnen von weiblichen transgenen (5XFAD) Mäusen wird mit einem östrogenempfindlichen Element in deren Erbgut in Verbindung gebracht. Dieses ist Bestandteil eines murinen transgenen Promotors und somit nicht auf den Menschen übertragbar (Sadleir et al. 2015). In unseren Untersuchungen finden sich keine Hinweise auf eine verstärkte Expression des APP in den weiblichen Tg2576-Tieren, sodass es für die Existenz eines östrogenempfindlichen Elements in diesem Modell keinen Anhalt gibt. Die Art der genetischen Veränderung des Mausstammes spielt eine wesentliche Rolle bei geschlechtsspezifischen Unterschieden. Dies wird in einer weiteren Studie betont, die im verwendeten Modell eine höhere Vulnerabilität der weiblichen Mäuse für das APP bzw. A β im Vergleich zu ihren männlichen Artgenossen beschreibt, wobei ebenfalls keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Expression des APP berichtet werden. Die weiblichen Tiere zeigen hier eine verstärkte Atrophie des Gyrus dentatus und früher einsetzende Verhaltensauffälligkeiten (Melnikova et al. 2016).

In unserer Studie finden sich zwischen der Expression des APP (sowohl im Hippocampus als auch im sensorischen Cortex) und den Ergebnissen des mHBT an zahlreichen Stellen Zusammenhänge. So ist eine vermehrte Expression an APP mit weniger WCT, mehr RC, weniger Rearings und einer längeren

TOB assoziiert. Mehr APP korrelierte also mit einer stärkeren Ausprägung von alzheimerartigen Verhaltensweisen der Mäuse, d.h. ein verbessertes deklaratives-, ein verschlechtertes Arbeitsgedächtnis, geringere indirekte Exploration und ein geringeres Angstverhalten. Das männliche Geschlecht verstärkte den Effekt des APP, sodass bei einigen Parametern eine gleiche Expression von APP bei männlichen Tieren zu einer größeren Korrelation mit Parametern des mHBT gegenüber den weiblichen Mäusen führte (siehe Tabelle 12). Diese Befunde stellen die These, dass weibliche Tiere empfindlicher auf eine Belastung mit APP bzw. A β reagieren (Melnikova et al. 2016; Schmid et al. 2019), infrage. In unserer Studie zeigten männliche Tg2576-Mäuse bei gleicher Expression von APP eine stärkere alzheimerartige Beeinflussung ihres Verhaltens als Weibchen.

Amyloid-Plaques

Im Tg2576-Mausmodell zeigt sich eine 14-fache Erhöhung von A β -1-42/43 bei Tieren im Alter von elf bis 13 Monaten im Vergleich zu Mäusen im Alter von zwei bis acht Monaten. Diese neuropathologischen Veränderungen sind mit einer Verschlechterung der Lern- und Gedächtnisleistung assoziiert (Hsiao et al. 1996). Eine andere Studie richtet einen differenzierteren Blick auf die Neuropathologie im Tg2576-Mausmodell. Sie unterscheidet zwischen in SDS löslichem und unlöslichem (d.h. nur mittels Ameisensäure löslichem) A β sowie senilen Plaques. Konzentrationen des löslichen A β steigen demnach ab einem Alter von sechs bis acht Monaten leicht und stärker ab zehn Monaten. Zwischen sechs und neun Monaten tritt unlösliches A β erstmalig auf. Solide amyloide Plaques finden sich zum ersten Mal vereinzelt aber zunehmend zwischen sieben und zehn Monaten, wobei sie sich ab zwölf bis 15 Monaten diffus in den Gehirnen ablagern. Zwischen zehn und 21 Monaten nimmt die Belastung mit allen drei Komponenten rapide zu (Kawarabayashi et al. 2001). Dies konnte durch unsere Versuche bestätigt werden, da sich im Hippocampus und Isocortex der Carrier vereinzelt Alzheimer-Plaques nachweisen ließen (siehe Diagramm 9, Diagramm 10); Geschlecht und Narkose konnten die Ausprägung dieser nicht beeinflussen. Die Wildtypen zeigten in allen untersuchten Gehirnen keine Plaquebelastung.

Amyloid- β -1-42 (A- β -1-42)

Eine Studie von *Westermann et al.*, die sich mit der Rolle des unlöslichen A β im Tg2576-Modell befasst, kommt zu dem Schluss, dass unlösliches A β gemeinsam mit dem löslichen A β als Surrogatparameter für die Belastung der Gehirne mit kleinen A β -Agglomeraten (nicht zu verwechseln mit senilen Plaques als aggregiertem unlöslichem A β) genutzt werden kann. Diese kleinen A β -Agglomerate bedingen letztlich die demenzielle Entwicklung. Als angepasste Alzheimer-Kaskade wurde sie von den Autoren postuliert, da sich in ihrer Studie das lösliche A β als ungeeigneter Wert für die Korrelation mit kognitiven Defiziten herausstellte (Westerman et al. 2002). Demgegenüber wird eine gute Korrelation zwischen einer Beeinträchtigung des Referenzgedächtnisses und der Belastung mit löslichem A β -1-42 im MPFC und dem Auftreten von amyloiden Plaques der Tg2576-Mäuse im Alter von acht bis 16 Monaten beschrieben. Das Geschlecht führt zu keiner unterschiedlichen Belastung mit senilen Plaques oder A β (Schmid et al. 2019).

In unserer Studie wurde nicht zwischen löslichem und unlöslichen Amyloid-beta unterschieden. Der ELISA detektierte im MPFC der Carrier im Alter von zehn Monaten eine höhere Konzentration an A β -1-42 im Vergleich zu den Wildtypen (siehe Diagramm 11). Ein alleiniger Einfluss des Geschlechts fand sich nicht. Der Einfluss des Geschlechts und einer Narkose mit Isofluran war voneinander abhängig: Bei den männlichen Tieren konnte nach einer Allgemeinanästhesie mehr A β -1-42 im MPFC nachgewiesen werden als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Dies steht im Gegensatz zu oben diskutierten Ergebnissen des mHBT, wonach für eine Narkose bei männlichen Tieren eher eine protektive Wirkung beschrieben wurde. Generell zeigte sich in der Kontrollgruppe eine erhöhte Konzentration an A β -1-42 bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu den männlichen.

In unseren Versuchen wurde A β -1-42 bestimmt, da es zwar einen geringeren Anteil als A β -1-40 an der Gesamtmenge an sezerniertem A β einnimmt, sich aber früher zu senilen Plaques zusammenlagert und diese überwiegend aufbaut (Kawarabayashi et al. 2001). Bei *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Lösung aus A β -1-42 zu sofortiger Aggregation führte, während es bei A β -1-39 und A β -1-40 mehrere Tage dauerte (Jarrett et al. 1993). In Fällen von sporadischer AD und insbesondere familiärer AD zeigte sich, dass A β -1-42 die häufigste A β -Spezies darstellt und A β -1-40 positive Plaques erst mit Fortschreiten der Krankheit auftreten (Iwatsubo et al. 1994). A β -1-42 ist damit ein geeigneterer Marker, um die Ausprägung der AD in einem frühen Stadium zu untersuchen.

Die Konzentration an A β -1-42 im MPFC sowie die Belastung des HC mit amyloiden Plaques korrelierten mit Parametern des mHBT. So zeigte sich auch in unserer Studie eine schlechtere Funktion des deklarativen Gedächtnisses (mehr WCT) von weiblichen Tieren bei gleichen Konzentrationen von A β -1-42 wie von Schmid et al. beschrieben, wobei der grundsätzliche Zusammenhang zwischen A β und Gedächtnisfunktion gegensätzlich war: In unserer Studie führte eine höhere Konzentration an A β -1-42 zu weniger WCT, also einer gesteigerten Funktion des deklarativen Gedächtnisses. Dies steht entgegen den Ergebnissen, die für eine erhöhte Belastung mit A β -1-42 eine schlechtere Funktion des deklarativen Gedächtnisses beschreiben (Schmid et al. 2019). Ebenso korrelierten mehr Plaques im HC mit weniger WCT, wobei das Geschlecht hier keinen Einfluss hatte. Mehr A β -1-42 im MPFC bzw. mehr Plaques im HC korrelierten mit einer größeren Beeinträchtigung des Arbeitsgedächtnisses (RC) und der auf dem Board verbrachten Zeit sowie negativ mit ungerichteter Exploration (Rearings). Wie beim APP fand sich damit auch bei einer erhöhten Ausprägung von A β und amyloiden Plaques im HC eine verstärkte Alzheimersymptomatik der Mäuse. Übereinstimmend zeigte sich hier wieder das männliche Geschlecht als Verstärker. Die senilen Plaques im Isocortex korrelierten hingegen nur mit den Rearings in negativer Weise, sodass dieser Wert weniger Voraussagekraft besitzt als die amyloiden Plaques im HC und die Konzentration an A β im MPFC (siehe Tabelle 12).

Die pathologischen Befunde der Alzheimer-Krankheit (APP, A β -1-42, amyloide Plaques) bei den Mäusen unserer Studie zeigten einen Zusammenhang zwischen der Stärke der phänotypischen Ausprägung der AD und der Leistung im mHBT. Sie korrelierten mit Parameter des deklarativen- und Arbeitsgedächtnisses, der ungerichteten Exploration, des Angstverhaltens und der Motorik. Je stärker die AD bei

den Mäusen ausgeprägt war, desto deutlicher zeigten sie Verhaltensweisen, die für Tg2576-Mäuse in diesem Alter typisch sind (siehe Tabelle 12, Tabelle 13). Das männliche Geschlecht scheint im Alter von zehn Monaten als Verstärker dieser Zusammenhänge zu fungieren.

In unseren Versuchen konnte kein alleiniger Einfluss einer zweistündigen Isoflurannarkose auf die Belastung der Gehirne mit APP, A β -1-42 oder senilen Plaques gezeigt werden. Jedoch werden in der Literatur nach einer Isoflurannarkose zweimal pro Woche für drei Monate an Tg2576-Mäusen vergleichbaren Alters zahlreiche negative Effekte auf die Neurophysiologie und Neurokognition beschrieben, wie z.B. eine verstärkte Belastung mit A β -Aggregaten. Allerdings wurde in dieser Studie eine höhere Konzentration an Isofluran und repetitive Narkosen innerhalb eines kurzen Zeitraumes vorgenommen, was üblicherweise nicht der klinischen Praxis entspricht (Perucho et al. 2010). Eine andere Untersuchung an Wildtyp-Mäusen zeigte bereits nach zwei Stunden Narkose mit Isofluran erhöhte Werte für A β , wobei diese erst nach 24 Stunden zu detektieren waren. Eine ebenfalls erhöhte Aktivierung der Caspase 3 war zu diesem Zeitpunkt bereits wieder abgeklungen (Xie et al. 2008). *In vitro* Experimente zu klinischen Konzentrationen von Isofluran und Halothan im Vergleich zu Propofol zeigen eine verstärkte Oligomerisation von A β bei Applikation der volatilen Anästhetika (Eckenhoff et al. 2004). Dies wird neben Isofluran auch für Desfluran beschrieben und beruht auf der Interaktion der Anästhetika mit kritischen Aminosäureresten des A β -Peptides (Mandal und Pettegrew 2008; Mandal und Fodale 2009). Nichtsdestotrotz konnte ein solcher Effekt des Isoflurans auf die Alzheimer-Pathologie in unseren Versuchen *in vivo* nicht bestätigt werden.

5.3.2. Neuroinflammation, Apoptose

TNF- α wird als Schlüsselfaktor für die Regulation einer Entzündungsantwort angesehen, da er nach Bindung an seine spezifischen Rezeptoren unter Anderem zur Transkription des NF κ B und der Aktivierung von Caspasen (siehe unten) führt (Bradley 2008).

Bis dato ist noch nicht abschließend geklärt, ob es sich bei den postoperativen kognitiven Beeinträchtigungen um Auswirkungen der Narkose alleine, des Operationstraumas oder einer Kombination aus beidem handelt. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass der chirurgische Reiz zu einer Inflamationsreaktion und der Freisetzung von IL-1 β führt, welches mit kognitiven Beeinträchtigungen assoziiert ist. Mäuse, die dagegen nur der Narkose (ohne Operation) ausgesetzt waren, zeigten weder erhöhte IL-1 β -Spiegel noch postoperative kognitive Beeinträchtigungen. Auch konnten diese bei Mäusen mit fehlendem IL-1beta-Rezeptoren nicht nachgewiesen werden (Cibelli et al. 2010). Somit scheint IL-1 β wesentlichen Anteil an der Ausbildung der POCD zu haben. Dieses entsteht im Rahmen einer Zytokinkaskade welche nach einem (Operations-) Trauma durch TNF- α initiiert wird. Eine Blockade von TNF- α konnte im Mausmodell die IL-1 Produktion reduzieren und somit einer Beeinträchtigung der postoperativen kognitiven Funktion entgegenwirken (Terrando et al. 2010). Untersuchungen am Menschen zeigen, dass eine Narkose mit Sevofluran im Vergleich zu Propofol zu erhöhten Werten an

TNF- α und einer schlechteren kognitiven Funktion nach der Operation führt. Eine präoperative Gabe von Methylprednisolon konnte die Expression des TNF- α und der folgenden Inflammationsreaktion unterdrücken (Qiao et al. 2015). Um den oben genannten Aspekten Rechnung zu tragen, wurde auf einen Eingriff an den narkotisierten Versuchstieren verzichtet. Somit konnte die alleinige Auswirkung einer Narkose auf die Expression des TNF- α als Korrelat der Neuroinflammation untersucht werden.

Carrier der Alzheimer-Mutation zeigten eine verstärkte Neuroinflammation im Hippocampus mit einer höheren Expression von TNF- α . Da diese Ergebnisse unabhängig von der Narkose auftreten, sind diese am ehesten im Rahmen der AD der Mäuse zu werten. Vorhergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass in Individuen mit einer erhöhten Produktion von TNF- α im Blut das Risiko erhöht ist, an der AD zu erkranken (Tan et al. 2007). Weiter fanden sich erhöhte Konzentrationen an TNF- α in älteren Individuen, die sowohl mit der AD als auch generalisierter Arteriosklerose assoziiert war (Bruunsgaard et al. 1999). Unsere Untersuchungen unterstreichen diese Befunde in klinischen Studien.

Caspasen bilden eine Familie von Proteasen, die eine essentielle Rolle in der Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose spielen. Die untersuchte **Caspase 3** ist dabei Teil einer Signalkaskade, an deren Beginn beispielsweise die Aktivierung des membranständigen TNF-Rezeptors (siehe oben) steht (Fan et al. 2005). *In vitro* Untersuchungen zeigen, dass auf eine Störung des Zytoskeletts durch A β eine Aktivierung von Caspase 3 und 9 folgt, welche schließlich zum neuronalen Zelltod führt (Spone et al. 2003). Ebenfalls *in vitro* greift Isofluran über eine verstärkte Aktivierung von Caspase 3 in diese Kaskade ein. Es wird berichtet, dass dieser Einfluss unabhängig von einer erhöhten APP-Prozessierung oder A β -Produktion geschieht. Auf der anderen Seite ist die verstärkte A β -Akkumulation einerseits von einer erhöhten Caspase-3-Aktivierung durch das volatile Anästhetikum abhängig, kann andererseits auch direkt durch Isofluran induziert werden. Diese Akkumulation führt selber wiederum zu einer verstärkten Caspase-Aktivierung und damit zu einem Teufelskreis (Xie et al. 2007). Befunde, wonach die Expression von Caspase 3 im Hippocampus im Tg2576-Mausmodell ab einem Alter von drei Monaten erhöht ist und zu einer synaptischen Dysfunktion führt, konnten in unseren Untersuchungen nicht verifiziert werden (D'Amelio et al. 2011).

Die Expression von Caspase 3 im Hippocampus, war bei den männlichen Mäusen unabhängig vom Genotyp oder Intervention stärker ausgeprägt als bei den weiblichen Tieren. Im sensorischen Cortex zeigte sich dieser Effekt nicht. Dieser Aspekt unterstützt die These, dass männliche Mäuse in einem Alter von zehn Monaten vulnerabler für neuronalen Schaden bzw. die Ausprägung der AD sind, wie auch in Kapitel 5.2.4 und 5.3.1 ausgeführt. Die verstärkte Aktivierung der Caspase 3 scheint eine Eigenschaft männlicher Mäuse unabhängig von deren Genotyp zu sein. Eine verstärkte Expression durch die Applikation von Isofluran konnte in unserer Studie nicht gezeigt werden.

5.3.3. Rezeptoren

Bei der Pathophysiologie der AD spielen nicht nur amyloide Veränderungen und die Neuroinflammation eine Rolle, sondern auch Auswirkungen auf die Rezeptoren der neuronalen Zellen. Aus diesem Grund wurden der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor 2B (NR2B), der metabotrope-Glutamat-Rezeptor 5 (mGluR5) und die $\alpha 1$ Untereinheit des GABA-A-Rezeptors (GABA-A $\alpha 1$) näher betrachtet.

Hinsichtlich der Expression des **NR2B** ergaben sich keinerlei Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Auch konnte ein Zusammenhang mit den WCT im mHBT nicht gezeigt werden. *Schmid et al.* fanden demgegenüber eine Korrelation zwischen der Expression des NR2B im sensorischen Cortex der Mäuse und den WCT. Eine erhöhte Menge an NR2B war also mit einer schlechteren Funktion des deklarativen Gedächtnisses im mHBT verbunden (*Schmid et al. 2019*). Dies wird auf Neurotoxizität des NR2B zurückgeführt, welche durch eine erhöhte Exzitotoxizität und neuronaler Apoptose zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Leistung führt; NR2A wird demgegenüber eine protektive Wirkung hinsichtlich des neuronalen Zelltodes bescheinigt (*Liu et al. 2007*). Demgegenüber konnte ein komplettes Knockout des NR2B eine Beeinträchtigung der LTP zeigen, sodass über die Rolle des NR2B bei der Gedächtnisfunktion keine einheitliche Lehrmeinung existiert (*Rammes et al. 2011*).

Amyloid- β führt zu einer Endozytose des synaptischen NMDAR und hierüber vermutlich zu Einschränkungen des Gedächtnisses (*Snyder et al. 2005*). Da in unseren Analysen nicht zwischen extrazellulärem und intrazellulärem NR2B unterschieden wird, widersprechen unsere Befunde diesen Erkenntnissen nicht. Isofluran im Mausmodell führt zu einer vorübergehend verstärkten Expression des NR2B, was mit einer verbesserten LTP im Hippocampus und verbesserter kognitiver Leistung assoziiert ist. Eine selektive Blockade des NR2B verhindert diese Effekte (*Rammes et al. 2009*). Ähnliche kognitive Effekte konnten bei Sevofluran festgestellt werden, ausgenommen einer verbesserten LTP, wobei 24 Stunden nach der Narkose wurde eine erhöhte Konzentration an NR2B und NR1 im Hippocampus gefunden (*Haseneder et al. 2013*). Beide Studien wurden ausschließlich an Wildtypen durchgeführt. In unseren Untersuchungen zeigte der Genotyp oder die Applikation einer Allgemeinanästhesie keinerlei Veränderungen der Expression des NR2B über alle Gruppen hinweg, sodass diese Befunde weder bestätigt noch widerlegt werden können.

Der **mGluR5** war bei Wildtypen, die einer Narkose ausgesetzt wurden, im Hippocampus geringer nachzuweisen als bei Wildtypen der Sham-Gruppe. Positive Auswirkungen des mGluR5 auf die Gedächtnisleistungen werden beschrieben. So führt im Rattenmodell eine induzierte LTP im Gyrus dentatus zur Hochregulation des mGluR5 im Hippocampus. Dies scheint dabei nicht nur ein Nebeneffekt der LTP, sondern vielmehr auch für diese notwendig zu sein (*Manahan-Vaughan et al. 2003*). Bei mGluR5 Knockout-Mäusen ist die LTP in der CA1-Region des Hippocampus beeinträchtigt, wobei sie in dieser Region vom NMDAR abhängig ist. In der CA3-Region, wo die LTP unabhängig vom NMDAR stattfindet, wurden keine Beeinträchtigungen gefunden (*Lu et al. 1997*). Somit ist die Funktion des NMDAR von der Anwesenheit des mGluR5 abhängig, da eine NMDAR-unabhängige LTP auch ohne mGluR5

stattfinden kann. Es wird beschrieben, dass lösliche A β Oligomere Cluster auf der Plasmamembran von Synapsen in Abhängigkeit des mGluR5 formen, was schließlich zu einer Umverteilung der mGluR5, erhöhter intrazellulärer Kalziumkonzentration und synaptischem Verfall führt (Renner et al. 2010).

Zieht man diese Erkenntnisse in Betracht, so kann man in der vorliegenden Studie eine negative Wirkung der Narkose auf die Expression des mGluR5 und konsekutiv der LTP im Hippocampus der Wildtypen folgern, welche allerdings im Alter von zehn Monaten (noch) keine Auswirkungen auf die Neurokognition hat. Dies ist allerdings reine Spekulation, da die LTP nicht untersucht wurde. Der Tg2576-Genotyp schein ebenfalls (noch) keine Auswirkungen auf die Menge an mGluR5 zu haben. Wie stark dieser Effekt im höheren Alter der Tg2576-Mäuse wird und die Relevanz dessen muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Die Expression des mGluR5 im Hippocampus korreliert positiv mit der Anzahl an überquerten Linien (LC) im mHBT, also mit einer höheren motorischen Aktivität der Mäuse. Der Einfluss des mGluR5 auf die Bewegungsaktivität wurde durch den Tg2576-Genstatus verstärkt, sodass die Carrier bei einer ähnlichen Menge an mGluR5 im Hippocampus mehr LC ausführten als die Wildtypen. Somit kann man eine verstärkte motorische Aktivität bei einer erhöhten Expression des mGluR5 in den Mäusen erkennen. Dies steht im Kontrast zu Untersuchungen, die mehr motorische Aktivität bei Mäusen beschreiben, deren mGluR5 pharmakologisch antagonisiert wurde (Ribeiro et al. 2014).

Im Alzheimer-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Inhibition der LTP durch **GABA-A**-Rezeptoren zu einer Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung von älteren Wildtypen und transgenen (APP/PS1) Mäusen führt. Da der Einsatz eines GABA-A Antagonisten in diesen Gruppen zu einer verbesserten LTP führte, wurde eine beeinträchtigende Wirkung dieses Rezeptors auf die mnestiche Funktion der Mäuse postuliert (Yoshiike et al. 2008). Den verschiedenen Untereinheiten können unterschiedliche Rollen in der Vermittlung der Effekte einer Narkose mit Isofluran zugeordnet werden. In Mäusen, bei welchen die $\alpha 1$ Untereinheit gegenüber Isofluran unempfindlich gemacht wurde, zeigte sich ein späterer Verlust der Stellreflexe im Vergleich zu den Wildtypen, wobei sich keine Veränderungen bei den amnestischen Effekten bei diesen Mäusen zeigten (Sonner et al. 2007). Knockout-Mäuse mit einem Verlust der $\alpha 4$ Untereinheit zeigten hingegen eine fehlende Induktion der Amnesie durch Isofluran (Rau et al. 2009).

Bei den Wildtypen mit vorangehender Narkose – ebenso wie beim mGluR5 – fand sich eine geringere Expression der GABA-A $\alpha 1$ im Hippocampus im Vergleich zu den Wildtypen der Kontrollgruppe. Bei den Tg2576-Tieren fanden sich keine Unterschiede durch eine Allgemeinanästhesie zwischen den Gruppen.

Somit scheint eine Narkose zur geringeren Expression der beiden Rezeptoren mGluR5 und GABA-A $\alpha 1$ im Hippocampus der Wildtypen zu führen. Der Tg2576-Trägerstatus verhindert möglicherweise die Wirkung des Isoflurans auf mGluR5 und GABA-A $\alpha 1$.

5.4. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Studienlage zur Wirkung einer Narkose auf die postoperative Neurokognition und die Alzheimer-Krankheit ist sehr heterogen. Klinische Untersuchungen finden gegensätzliche Hinweise, sodass eine allgemeine Handlungsempfehlung für den klinischen Alltag bisher nicht ausgesprochen werden kann. Trotzdem wird aufgrund einer zunehmenden Anzahl von Narkosen im hohen und höchsten Lebensalter und der steigenden Prävalenz der AD eine Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen immer wichtiger. Starke und gleichzeitig einfach anzuwendende Screening-Instrumente für eine breit angelegte klinische Studie zu den postoperativen Veränderungen im Verhalten und der Neurokognition von älteren Individuen sind daher wünschenswert.

Auch die präklinische Forschung liefert zwar molekularbiologische Erklärungsversuche, findet aber bei *in vivo* Untersuchungen keinen einheitlichen Konsens durch eindeutige und wegweisende Ergebnisse. Hierbei kann die vorliegende Studie leider auch keine Ausnahme machen. Nichtsdestotrotz sind präklinische Untersuchungen durch Tierversuche wichtig. Sie ermöglichen die Beleuchtung zahlreicher Aspekte, welche bei klinischen Studien nicht betrachtet werden können und zeigen damit neue Wege für folgende (klinische) Untersuchungen auf.

Der Effekt einer Narkose auf die vorliegenden Versuchstiere war vergleichsweise gering. Dies liegt möglicherweise an der noch gering ausgeprägten AD und der im Vergleich zu anderen Studien eher kurzen Narkosedauer. In diese Richtung gilt es, zukünftige Tierversuche anzupassen und vielfältiger zu machen. Dies gelingt durch Tiere verschiedenen Alters mit unterschiedlich starker Ausprägung der AD und unterschiedlicher Dauer der Allgemeinanästhesie.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie werden die Auswirkungen einer zweistündigen Isoflurannarkose auf die Neurokognition, das Verhalten sowie die Motorik im Tg2576-Mausmodell der Alzheimer-Krankheit (AD) mit Hilfe des modifizierten Holeboard Test (mHBT) an acht aufeinanderfolgenden Tagen untersucht. Molekularbiologische Analysen der Gehirne (APP, A β -1-42, Amyloid-Plaques, TNF- α , Caspase 3, NR2B, mGluR5, GABA-A α 1) werden im Anschluss durchgeführt. Es wurden männliche und weibliche Tiere eingeschlossen, sodass Geschlechtsunterschiede betrachtet werden konnten, da die AD bei weiblichen Patientinnen häufiger anzutreffen ist als bei männlichen.

Im mHBT zeigten zehn Monate alte Tg2576-Tiere altersgemäß eine frühe Form der AD in Verhalten, Neurokognition und Motorik. Sie zeigten weniger Vermeidungs- und Angstverhalten und mehr zielgerichtete Exploration, aber weniger ungerichtetes Erkundungsverhalten. Die Alzheimer-Mäuse zeigten eine bessere Funktion des deklarativen Gedächtnisses bei beeinträchtigtem Arbeitsgedächtnis. Die Tg2576-Mutation führte zu höherer Bewegungsaktivität und schlechteren feinmotorischen Fähigkeiten. Impulsiveres Verhalten und verminderte Ängstlichkeit führte zusammen mit dem verbesserten deklarativen Gedächtnis zu besseren Testleistungen der Alzheimer-Mäuse im mHBT. Die Applikation einer Allgemeinanästhesie beeinflussten die Ergebnisse des mHBT nicht. Es zeigte sich eine beeinträchtigte Testleistung der männlichen Versuchstiere, die eine Narkose erhalten hatten, mit akzentuiertem Angstverhalten, beeinträchtigtem deklarativen Gedächtnis und schlechterer motorischer Leistung. Dies war im Falle des deklarativen Gedächtnisses auf die Wildtypen beschränkt. Eine Narkose beeinflusste bei den männlichen Tieren das Verhalten im mHBT in gegensätzlicher Weise wie die Tg2576-Mutation.

Die Tg2576-Tiere zeigten eine höhere Expression des Amyloid-Precursor-Proteins (APP), eine höhere Konzentration von A β 1-42 und mehr amyloide Plaques im Vergleich zu den Wildtypen. Die Neuropathologie der AD korrelierte positiv mit der Ausprägung der für die Tg2576-Mäuse typischen Ergebnisse des mHBT. Das männliche Geschlecht verstärkte diesen Zusammenhang. Eine zweistündige Narkose mit Isofluran hatte keinen Einfluss auf die neuropathologischen Veränderungen. Eine höhere Expression von TNF- α fand sich im Hippocampus der Tg2576-Tiere ohne Einfluss einer Narkose. Caspase 3 war im Hippocampus der männlichen Mäuse unabhängig vom Genotyp oder der Narkose stärker ausgeprägt. Männliche Versuchstiere zeigen also verstärkten neuronalen Schaden und reagieren auf die neuropathologischen Korrelate der AD mit stärkeren Verhaltensänderungen als ihre weiblichen Artgenossen. Der mGluR5 und GABA-A α 1 konnte bei Wildtypen nach einer Narkose mit Isofluran mit einer geringeren Expression nachgewiesen werden als bei der Kontrollgruppe, Auswirkungen auf das Gedächtnis oder Geschlechtsunterschiede fanden sich nicht. Je höher die Dichte an mGluR5 im Gehirn der Versuchstiere war, desto höher war auch deren motorische Aktivität.

7. Literaturverzeichnis

- Albers MW, Gilmore GC, Kaye J, et al (2015) At the interface of sensory and motor dysfunctions and Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 11:70–98. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2014.04.514>
- Altmann A, Tian L, Henderson VW, et al (2014) Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Ann Neurol* 75:563–573. <https://doi.org/10.1002/ana.24135>
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Für Psychiatr Psych-Gerichtl Med*
- Alzheimer's Association (2020) 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc*. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- Aydin S (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* 72:4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Barnes P, Good M (2005) Impaired Pavlovian cued fear conditioning in Tg2576 mice expressing a human mutant amyloid precursor protein gene. *Behav Brain Res* 157:107–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.014>
- Barron AM, Pike CJ (2012) Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front Biosci Elite Ed* 4:976–997
- Bianchi SL, Tran T, Liu C, et al (2008) Brain and behavior changes in 12-month-old Tg2576 and nontransgenic mice exposed to anesthetics. *Neurobiol Aging* 29:1002–1010. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.02.009>
- Bohnen NI, Warner MA, Kokmen E, et al (1994) Alzheimer's disease and cumulative exposure to anesthesia: a case-control study. *J Am Geriatr Soc* 42:198–201. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1994.tb04952.x>
- Bonin RP, Orser BA (2008) GABA(A) receptor subtypes underlying general anesthesia. *Pharmacol Biochem Behav* 90:105–112. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.12.011>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Bradley JR (2008) TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 214:149–160. <https://doi.org/10.1002/path.2287>
- Bratzke LC, Kosciak RL, Schenning KJ, et al (2018) Cognitive decline in the middle-aged after surgery and anaesthesia: results from the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention cohort. *Anaesthesia* 73:549–555. <https://doi.org/10.1111/anae.14216>
- Brunnsgaard H, Andersen-Ranberg K, Jeune B, et al (1999) A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54:M357-364. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.7.m357>
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Calabrese P, Markowitsch HJ (2003) [Memory and brain--neurobiological correlates of memory disturbances]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 71:211–219. <https://doi.org/10.1055/s-2003-38506>
- Caligioni CS (2009) Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci Appendix 4:Appendix 4I*. <https://doi.org/10.1002/0471142301.nsa04is48>
- Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, et al (2001) Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 158:1173–1177. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64064-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64064-3)
- Castel AD, Balota DA, McCabe DP (2009) Memory efficiency and the strategic control of attention at encoding:

- impairments of value-directed remembering in Alzheimer's disease. *Neuropsychology* 23:297–306. <https://doi.org/10.1037/a0014888>
- Chen C-W, Lin C-C, Chen K-B, et al (2014a) Increased risk of dementia in people with previous exposure to general anesthesia: a nationwide population-based case-control study. *Alzheimers Dement J Alzheimers Assoc* 10:196–204. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.05.1766>
- Chen P-L, Yang C-W, Tseng Y-K, et al (2014b) Risk of dementia after anaesthesia and surgery. *Br J Psychiatry J Ment Sci* 204:188–193. <https://doi.org/10.1192/bjp.bp.112.119610>
- Chung JA, Cummings JL (2000) Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin* 18:829–846. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(05\)70228-0](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(05)70228-0)
- Cibelli M, Fidalgo AR, Terrando N, et al (2010) Role of interleukin-1beta in postoperative cognitive dysfunction. *Ann Neurol* 68:360–368. <https://doi.org/10.1002/ana.22082>
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:205–237. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205>
- Culley DJ, Baxter M, Yukhananov R, Crosby G (2003) The memory effects of general anesthesia persist for weeks in young and aged rats. *Anesth Analg* 96:1004–1009, table of contents. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000052712.67573.12>
- Culley DJ, Baxter MG, Yukhananov R, Crosby G (2004) Long-term impairment of acquisition of a spatial memory task following isoflurane-nitrous oxide anesthesia in rats. *Anesthesiology* 100:309–314. <https://doi.org/10.1097/00000542-200402000-00020>
- D'Amelio M, Cavallucci V, Middei S, et al (2011) Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 14:69–76. <https://doi.org/10.1038/nn.2709>
- de Quervain DJ-F, Aerni A, Schelling G, Roozendaal B (2009) Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358–370. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.03.002>
- Eckel B, Ohl F, Starker L, et al (2013) Effects of isoflurane-induced anaesthesia on cognitive performance in a mouse model of Alzheimer's disease: A randomised trial in transgenic APP23 mice. *Eur J Anaesthesiol* 30:605–611. <https://doi.org/10.1097/EJA.0b013e32835b824b>
- Eckenhoff RG, Johansson JS, Wei H, et al (2004) Inhaled anesthetic enhancement of amyloid-beta oligomerization and cytotoxicity. *Anesthesiology* 101:703–709. <https://doi.org/10.1097/00000542-200409000-00019>
- Elder GA, Gama Sosa MA, De Gasperi R (2010) Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med N Y* 77:69–81. <https://doi.org/10.1002/msj.20159>
- Eratne D, Loi SM, Farrand S, et al (2018) Alzheimer's disease: clinical update on epidemiology, pathophysiology and diagnosis. *Australas Psychiatry Bull R Aust N Z Coll Psychiatr* 26:347–357. <https://doi.org/10.1177/1039856218762308>
- Evered LA, Silbert BS, Scott DA, et al (2016) Prevalence of Dementia 7.5 Years after Coronary Artery Bypass Graft Surgery. *Anesthesiology* 125:62–71. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000001143>
- Fan T-J, Han L-H, Cong R-S, Liang J (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 37:719–727. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00108.x>
- Fendl D (2013) Phänotypische Charakterisierung eines transgenen Mausmodells der Alzheimer-Krankheit unter Bezug auf Alter und Geschlecht. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, Tierärztliche Fakultät
- Fidalgo AR, Cibelli M, White JPM, et al (2012) Isoflurane causes neocortical but not hippocampal-dependent memory impairment in mice. *Acta Anaesthesiol Scand* 56:1052–1057. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.2012.02691.x>
- Flecknell PA (2009) *Laboratory Animal Anaesthesia*, 3rd edn. Elsevier

- Fratiglioni L, Viitanen M, von Strauss E, et al (1997) Very old women at highest risk of dementia and Alzheimer's disease: incidence data from the Kungsholmen Project, Stockholm. *Neurology* 48:132–138. <https://doi.org/10.1212/wnl.48.1.132>
- Funahashi S (2017) Working Memory in the Prefrontal Cortex. *Brain Sci* 7:. <https://doi.org/10.3390/brain-sci7050049>
- Gao S, Hendrie HC, Hall KS, Hui S (1998) The relationships between age, sex, and the incidence of dementia and Alzheimer disease: a meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry* 55:809–815. <https://doi.org/10.1001/arch-psyc.55.9.809>
- Gavini K, Parameshwaran K (2020) Western Blot (Protein Immunoblot). In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL)
- Geng Y-J, Wu Q-H, Zhang R-Q (2017) Effect of propofol, sevoflurane, and isoflurane on postoperative cognitive dysfunction following laparoscopic cholecystectomy in elderly patients: A randomized controlled trial. *J Clin Anesth* 38:165–171. <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2017.02.007>
- Gordan ML, Jungwirth B, Ohl F, et al (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. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.07.027>
- Grabher BJ (2018) Effects of Alzheimer Disease on Patients and Their Family. *J Nucl Med Technol* 46:335–340. <https://doi.org/10.2967/jnmt.118.218057>
- Haseneder R, Starker L, Berkmann J, et al (2013) Sevoflurane anesthesia improves cognitive performance in mice, but does not influence in vitro long-term potentiation in hippocampus CA1 stratum radiatum. *PloS One* 8:e64732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064732>
- Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA (2013) Alzheimer disease in the United States (2010–2050) estimated using the 2010 census. *Neurology* 80:1778–1783. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31828726f5>
- Herrup K (2010) Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:16755–16762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4521-10.2010>
- Hogue CW, Lillie R, Hershey T, et al (2003) Gender influence on cognitive function after cardiac operation. *Ann Thorac Surg* 76:1119–1125. [https://doi.org/10.1016/s0003-4975\(03\)00817-8](https://doi.org/10.1016/s0003-4975(03)00817-8)
- Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, et al (2017) Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress. *PloS One* 12:e0179588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588>
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, et al (1996) Correlative Memory Deficits, AP3 Elevation, and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. 274:5
- Inouye SK (2006) Delirium in older persons. *N Engl J Med* 354:1157–1165. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052321>
- Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, et al (1994) Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron* 13:45–53. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90458-8)
- Jacobs GH (1993) The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 68:413–471. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1993.tb00738.x>
- Jahn H (2013) Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 15:445–454
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 32:4693–4697. <https://doi.org/10.1021/bi00069a001>

- Jungwirth B, Zieglgänsberger W, Kochs E, Rammes G (2009) Anesthesia and postoperative cognitive dysfunction (POCD). *Mini Rev Med Chem* 9:1568–1579. <https://doi.org/10.2174/138955709791012229>
- Kapasi A, DeCarli C, Schneider JA (2017) Impact of multiple pathologies on the threshold for clinically overt dementia. *Acta Neuropathol (Berl)* 134:171–186. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1717-7>
- Karadimas SK, Satkunendrarajah K, Laliberte AM, et al (2020) Sensory cortical control of movement. *Nat Neurosci* 23:75–84. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0536-7>
- Kato K, Hamaguchi Y, Okawa S, et al (1977) Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay. *J Biochem (Tokyo)* 82:261–266. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131678>
- Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, et al (2001) Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 21:372–381
- Kelley AS, McGarry K, Gorges R, Skinner JS (2015) The burden of health care costs for patients with dementia in the last 5 years of life. *Ann Intern Med* 163:729–736. <https://doi.org/10.7326/M15-0381>
- King DL, Arendash GW (2002) Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. *Physiol Behav* 75:627–642. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00639-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00639-x)
- Kirova A-M, Bays RB, Lagalwar S (2015) Working memory and executive function decline across normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *BioMed Res Int* 2015:748212. <https://doi.org/10.1155/2015/748212>
- Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, et al (2002) Imaging A β Plaques in Living Transgenic Mice with Multiphoton Microscopy and Methoxy-X04, a Systemically Administered Congo Red Derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:9
- Klunk WE, Debnath ML, Pettegrew JW (1995) Chrysamine-G binding to Alzheimer and control brain: autopsy study of a new amyloid probe. *Neurobiol Aging* 16:541–548. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00058-m](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00058-m)
- Kontis V, Bennett JE, Mathers CD, et al (2017) Future life expectancy in 35 industrialised countries: projections with a Bayesian model ensemble. *Lancet Lond Engl* 389:1323–1335. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32381-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32381-9)
- Labots M, Van Lith HA, Ohl F, Arndt SS (2015) The Modified Hole Board - Measuring Behavior, Cognition and Social Interaction in Mice and Rats. *J Vis Exp JoVE*. <https://doi.org/10.3791/52529>
- Lalonde R, Lewis TL, Strazielle C, et al (2003) Transgenic mice expressing the betaAPP695SWE mutation: effects on exploratory activity, anxiety, and motor coordination. *Brain Res* 977:38–45. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(03\)02694-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(03)02694-5)
- Lee HB, Mears SC, Rosenberg PB, et al (2011) Predisposing factors for postoperative delirium after hip fracture repair in individuals with and without dementia. *J Am Geriatr Soc* 59:2306–2313. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2011.03725.x>
- Lee TA, Wolozin B, Weiss KB, Bednar MM (2005) Assessment of the emergence of Alzheimer's disease following coronary artery bypass graft surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Alzheimers Dis JAD* 7:319–324. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7408>
- Levin-Allerhand JA, Smith JD (2002) Ovariectomy of young mutant amyloid precursor protein transgenic mice leads to increased mortality. *J Mol Neurosci MN* 19:163–166. <https://doi.org/10.1007/s12031-002-0027-1>
- Liu Y, Pan N, Ma Y, et al (2013) Inhaled sevoflurane may promote progression of amnesic mild cognitive impairment: a prospective, randomized parallel-group study. *Am J Med Sci* 345:355–360. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e31825a674d>
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic

- neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:2846–2857.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007>
- Lu YM, Jia Z, Janus C, et al (1997) Mice lacking metabotropic glutamate receptor 5 show impaired learning and reduced CA1 long-term potentiation (LTP) but normal CA3 LTP. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:5196–5205
- Malakoff D (2000) The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science* 288:248–253.
<https://doi.org/10.1126/science.288.5464.248>
- Manahan-Vaughan D, Ngomba RT, Storto M, et al (2003) An increased expression of the mGlu5 receptor protein following LTP induction at the perforant path-dentate gyrus synapse in freely moving rats. *Neuropharmacology* 44:17–25. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00342-8](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00342-8)
- Mandal PK, Fodale V (2009) Isoflurane and desflurane at clinically relevant concentrations induce amyloid beta-peptide oligomerization: an NMR study. *Biochem Biophys Res Commun* 379:716–720.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.12.092>
- Mandal PK, Pettegrew JW (2008) Abeta peptide interactions with isoflurane, propofol, thiopental and combined thiopental with halothane: a NMR study. *Biochim Biophys Acta* 1778:2633–2639.
<https://doi.org/10.1016/j.bbammem.2008.07.002>
- Melnikova T, Park D, Becker L, et al (2016) Sex-related dimorphism in dentate gyrus atrophy and behavioral phenotypes in an inducible tTa:APPsi transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 96:171–185.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.08.009>
- Miller D, Lewis SR, Pritchard MW, et al (2018) Intravenous versus inhalational maintenance of anaesthesia for postoperative cognitive outcomes in elderly people undergoing non-cardiac surgery. *Cochrane Database Syst Rev* 8:CD012317. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012317.pub2>
- Moller JT, Cluitmans P, Rasmussen LS, et al (1998) Long-term postoperative cognitive dysfunction in the elderly ISPOCD1 study. ISPOCD investigators. International Study of Post-Operative Cognitive Dysfunction. *Lancet Lond Engl* 351:857–861. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(97\)07382-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(97)07382-0)
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0165-0270(84)90007-4)
- Mullan M, Crawford F, Axelman K, et al (1992) A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1:345–347. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>
- Müller U, Winter P, Graeber MB (2013) A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 12:129–130. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70307-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70307-1)
- Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B, et al (2001) Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 344:395–402.
<https://doi.org/10.1056/NEJM200102083440601>
- Newman S, Stygall J, Hirani S, et al (2007) Postoperative cognitive dysfunction after noncardiac surgery: a systematic review. *Anesthesiology* 106:572–590. <https://doi.org/10.1097/00000542-200703000-00023>
- Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I (2017) Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurol Barc Spain* 32:523–532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, et al (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3)
- Ognibene E, Middei S, Daniele S, et al (2005) Aspects of spatial memory and behavioral disinhibition in Tg2576 transgenic mice as a model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 156:225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.028>
- Ohl F, Fuchs E (1999) Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res*

Cogn Brain Res 7:379–387. [https://doi.org/10.1016/s0926-6410\(98\)00042-1](https://doi.org/10.1016/s0926-6410(98)00042-1)

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

Ohl F, Roedel A, Binder E, Holsboer F (2003) Impact of high and low anxiety on cognitive performance in a modified hole board test in C57BL/6 and DBA/2 mice: Impact of anxiety on cognitive performance in mice. *Eur J Neurosci* 17:128–136. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02436.x>

Ohl F, Sillaber I, Binder E, et al (2001b) Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test. *J Psychiatr Res* 35:147–154. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(01\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(01)00017-6)

Patel D, Lunn AD, Smith AD, et al (2016) Cognitive decline in the elderly after surgery and anaesthesia: results from the Oxford Project to Investigate Memory and Ageing (OPTIMA) cohort. *Anaesthesia* 71:1144–1152. <https://doi.org/10.1111/anae.13571>

Perucho J, Rubio I, Casarejos MJ, et al (2010) Anesthesia with isoflurane increases amyloid pathology in mice models of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 19:1245–1257. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1318>

Peters AJ, Liu H, Komiyama T (2017) Learning in the Rodent Motor Cortex. *Annu Rev Neurosci* 40:77–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031407>

Podcasy JL, Epperson CN (2016) Considering sex and gender in Alzheimer disease and other dementias. *Dialogues Clin Neurosci* 18:437–446

Qiao Y, Feng H, Zhao T, et al (2015) Postoperative cognitive dysfunction after inhalational anesthesia in elderly patients undergoing major surgery: the influence of anesthetic technique, cerebral injury and systemic inflammation. *BMC Anesthesiol* 15:154. <https://doi.org/10.1186/s12871-015-0130-9>

Rammes G, Hasenjäger A, Sroka-Saidi K, et al (2011) Therapeutic significance of NR2B-containing NMDA receptors and mGluR5 metabotropic glutamate receptors in mediating the synaptotoxic effects of β -amyloid oligomers on long-term potentiation (LTP) in murine hippocampal slices. *Neuropharmacology* 60:982–990. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.051>

Rammes G, Starker LK, Haseneder R, et al (2009) Isoflurane anaesthesia reversibly improves cognitive function and long-term potentiation (LTP) via an up-regulation in NMDA receptor 2B subunit expression. *Neuropharmacology* 56:626–636. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.11.002>

Rau V, Iyer SV, Oh I, et al (2009) Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 4 subunit knockout mice are resistant to the amnestic effect of isoflurane. *Anesth Analg* 109:1816–1822. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3181bf6ae6>

Reiman EM, Caselli RJ (1999) Alzheimer's disease. *Maturitas* 31:185–200. [https://doi.org/10.1016/s0378-5122\(98\)00110-8](https://doi.org/10.1016/s0378-5122(98)00110-8)

Renner M, Lacor PN, Velasco PT, et al (2010) Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron* 66:739–754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.029>

Repovs G, Baddeley A (2006) The multi-component model of working memory: explorations in experimental cognitive psychology. *Neuroscience* 139:5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.12.061>

Ribeiro FM, Devries RA, Hamilton A, et al (2014) Metabotropic glutamate receptor 5 knockout promotes motor and biochemical alterations in a mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 23:2030–2042. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt598>

Richardson CA, Flecknell PA (2005) Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern Lab Anim ATLA* 33:119–127. <https://doi.org/10.1177/026119290503300207>

Rupp C, Beyreuther K, Maurer K, Kins S (2014) A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease:

- Framingham Study. *Neurology* 68:1902–1908. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000263217.36439.da>
- Tanila H (2012) Wading pools, fading memories—place navigation in transgenic mouse models of Alzheimer’s disease. *Front Aging Neurosci* 4:11. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00011>
- Terrando N, Monaco C, Ma D, et al (2010) Tumor necrosis factor- α triggers a cytokine cascade yielding postoperative cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:20518–20522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014557107>
- van Dijk D, Keizer AM, Diephuis JC, et al (2000) Neurocognitive dysfunction after coronary artery bypass surgery: a systematic review. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120:632–639. <https://doi.org/10.1067/mtc.2000.108901>
- Vanderweyde T, Bednar MM, Forman SA, Wolozin B (2010) Iatrogenic risk factors for Alzheimer’s disease: surgery and anesthesia. *J Alzheimers Dis JAD* 22 Suppl 3:91–104. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100843>
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, et al (2014) Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol Res* 63:S191-203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>
- Wang J, Tanila H, Puoliväli J, et al (2003) Gender differences in the amount and deposition of amyloid β in APP^{Swe} and PS1 double transgenic mice. *Neurobiol Dis* 14:318–327. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.08.009>
- Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, et al (2002) The Relationship between A β and Memory in the Tg2576 Mouse Model of Alzheimer’s Disease. *J Neurosci* 22:1858–1867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-05-01858.2002>
- Wilhelm W (2018) *Praxis der Anästhesiologie*, 1st edn. Springer, Berlin
- Wolf A, Bauer B, Abner EL, et al (2016) A Comprehensive Behavioral Test Battery to Assess Learning and Memory in 129S6/Tg2576 Mice. *PloS One* 11:e0147733. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147733>
- Xie Z, Culley DJ, Dong Y, et al (2008) The common inhalation anesthetic isoflurane induces caspase activation and increases amyloid beta-protein level in vivo. *Ann Neurol* 64:618–627. <https://doi.org/10.1002/ana.21548>
- Xie Z, Dong Y, Maeda U, et al (2007) The inhalation anesthetic isoflurane induces a vicious cycle of apoptosis and amyloid beta-protein accumulation. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 27:1247–1254. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5320-06.2007>
- Yoshiike Y, Kimura T, Yamashita S, et al (2008) GABA(A) receptor-mediated acceleration of aging-associated memory decline in APP/PS1 mice and its pharmacological treatment by picrotoxin. *PloS One* 3:e3029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003029>
- Zandi PP, Carlson MC, Plassman BL, et al (2002) Hormone replacement therapy and incidence of Alzheimer disease in older women: the Cache County Study. *JAMA* 288:2123–2129. <https://doi.org/10.1001/jama.288.17.2123>
- Zheng H, Xu H, Uljon SN, et al (2002) Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *J Neurochem* 80:191–196. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00690.x>

Verzeichnis der Internetquellen

Allen Institute, Allen Mouse Brain Atlas, <https://mouse.brain-map.org/static/atlas>, abgerufen am 08.10.2020, 15.30 Uhr

International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, ICD-10-GM Version 2021, Kapitel V Psychische und Verhaltensstörungen (F00-F99), <https://www.dimdi.de/static/de/klassifikationen/icd/icd-10-gm/kode-suche/htmlgm2021/block-f00-f09.htm#F00>, abgerufen am 12.10.2020, 16.42 Uhr

National Centre for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research, The 3 Rs, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>, abgerufen am 21.09.2020, 11.36 Uhr

Softwareverzeichnis

Image Lab 6.0, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

ImageLab 6.0.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA

Carl Zeiss Microscopy GmbH, ZEN 2.3 pro, Jena, Deutschland

Excel 2010, Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA

IBM SPSS Statistics 25, IBM, Armonk, New York, USA

ImageJ 1.52h, <https://imagej.net/ImageJ>, abgerufen am 31.10.2019, 16.17 Uhr

Noldus Information Technology BV, The Observer® 5.0, Wageningen, Niederlande

Tecan Group, Sunrise™, Maennedorf, Schweiz

Tecan Group, Magellan™, Maennedorf, Schweiz

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Strukturformeln von Isofluran und Desfluran.

Abbildung 2: Schema und zeitliche Planung der Studie.

Abbildung 3: Versuchsarena in der Draufsicht.

Abbildung 4: Darstellung der sieben ausgewählten Hirnschnitte (jeweils drei à 50 µm) im koronaren Hirnschnitt einer Maus.

Abbildung 5: Digitales Abbild in der Sagittalebene eines Hirnschnitts (Tg2576, 10 Monate) mit wenigen Alzheimer-Plaques.

Abbildung 6: Grobe Auswahl der ROI und Einteilung in Kacheln.

Abbildung 7: Schematische Darstellung der komplett bestückten Blotting-Spange und schematische Darstellung des SDS-PAGE-Gels mit 15 Geltaschen.

Abbildung 8: Auswertung des Western Blot mittels ImageLab 6.0.1.

Abbildung 9: Zwei Hirnschnitte von Tg2576-Mäusen (10 Monate) ohne und mit zwei Plaques.

Diagramm 1: Latenz bis zum ersten Besuch eines Lochs in Sekunden (LFHV).

Diagramm 2: Anzahl der Rearings (RR) pro Durchlauf.

Diagramm 3: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse auf dem Board verbringen, in Prozent (TOB).

Diagramm 4: Anteil an der Zeit eines Durchlaufs (Time Trial), den die Mäuse mit Putzphasen verbringen, in Prozent (Grooming).

Diagramm 5: Anzahl der Repeated Choices (RC).

Diagramm 6: Anzahl der Wrong Choices Total (WCT).

Diagramm 7: Anzahl der Line Crossings (LC) pro Minute.

Diagramm 8: Zeit, die die Mäuse für die Einnahme einer Mandel benötigen (TFI).

Diagramm 9: Prozentualer Anteil (%) der Amyloid-Plaques an der Gesamtfläche des Isocortex der Tg2576-Mäuse.

Diagramm 10: Prozentualer Anteil (%) der Amyloid-Plaques an der Gesamtfläche des Hippocampus (HC) der Tg2576-Mäuse.

Diagramm 11: Aβ-1-42-Konzentration (pg/ml) im motorischen präfrontalen Cortex (MPFC) der einzelnen Versuchsgruppen.

Diagramm 12: Expression von APP im sensorischen Cortex (SC) als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 13: Expression von APP im Hippocampus (HC) als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 14: Expression von mGluR5 im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 15: Expression von GABA-A α1 im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 16: Expression von Caspase 3 im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 17: Expression von TNF- α im Hippocampus als Normalisierte Menge (in 106 Einheiten) und darunter entsprechende WB-Banden.

Diagramm 18: Regression zwischen APP im HC und WCT im mHBT.

Diagramm 19: Regression zwischen A β -1-42 im MPFC und RC im mHBT.

Diagramm 20: Regression zwischen APP im SC und TOB im mHBT.

Diagramm 21: Regression zwischen APP im SC und RR im mHBT.

Diagramm 22: Regression zwischen APP im HC und UHV im mHBT.

Diagramm 23: Regression zwischen mGluR5 im HC und UHV im mHBT.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterteilung des menschlichen Gedächtnisses in Arbeits- und Langzeitgedächtnis.

Tabelle 2: Versuchsgruppendesign.

Tabelle 3: Konfiguration der markierten Zylinder je Versuchstag.

Tabelle 4: Parameter des mHBT der Kategorien Neurokognition, Verhalten und Motorik mit Erklärung.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Extraktionslösungen für den ELISA. Konzentration (c), Massenanteil (w), Massenkonzentration (β).

Tabelle 6: Bestandteile der Methoxy-X04-Stammlösung.

Tabelle 7: Bestandteile des Sammel- und Trenngels.

Tabelle 8: Bestandteile des Extraktionspuffers zur Vorbereitung für die Gelelektrophorese.

Tabelle 9: Verwendete Pufferlösungen für den Western Blot.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper mit Zielantigen im Western Blot.

Tabelle 11: Inhalt des Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL-Reagenz).

Tabelle 12: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Werte aus ELISA, Plauefärbung und WB von APP im SC und HC mit den Mittelwerten aller Durchläufe des mHBT.

Tabelle 13: Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse der Werte aus Plauefärbung, WB von APP im SC und HC sowie Caspase 3 im HC mit den Mittelwerten aller Durchläufe des mHBT.

10. Danksagung

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Bettina Jungwirth, Direktorin der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Ulm, die die Betreuung dieser Dissertation übernommen hat und mir in unkomplizierter und effektiver Weise dieses Promotionsvorhaben ermöglicht hat.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Gerhard Schneider, Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, möchte ich mich für die Möglichkeit, die Dissertation an seiner Klinik anzufertigen, bedanken.

Ein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. med. Laura Borgstedt, Ärztin an der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Klinikums rechts der Isar, die mir als hervorragende Mentorin von Anfang bis Ende stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Sie übernahm meine Einarbeitung in den mHBT, führte die Narkosen der Mäuse und überwiegend die Gehirnentnahmen durch. Auch stand sie bei allen folgenden Schritten der Promotion tatkräftig an meiner Seite und hatte stets ein offenes Ohr für all meine Fragen.

Auch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Schmid, Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Ulm, möchte ich besonders für Tipps zur Versuchsdurchführung, dem statistischen Rat sowie die Vorbereitung und den Beistand auf einem internationalen Kongress großen Dank aussprechen.

Ich danke allen Mitarbeitern und Doktoranden der experimentellen Anästhesie am Klinikum rechts der Isar, die mir stets große Unterstützung und Hilfsbereitschaft entgegengebracht und den Laboralltag sehr angenehm gestaltet haben. Insbesondere Herrn Andreas Blaschke, der seine große Erfahrung mit mir teilte und mir die Techniken des Western Blots, der Methoxy-Färbung, des ELISAs sowie die folgende Auswertung näherbrachte. Frau Dr. med. vet. Claudia Kopp und Frau Nina Bayer danke ich für die Anfertigung der Hirnschnitte und Hilfe im Laboralltag. Bei Herrn Sebastian Bratke bedanke ich mich für die Einarbeitung in die Technik des ELISAs und bei Herrn Maximilian Musiol für Tipps zur Auswertung der Methoxy-Färbung. Frau Tanja Neumüller danke ich für die Einarbeitung in die Gehirnentnahme.

Großer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium der Medizin nicht möglich gewesen wäre und meiner lieben Freundin Ines, die mein Leben jeden Tag um ein Vielfaches bereichert.

11. Lebenslauf

Christoph Pötzl

geboren am 30.08.1995 in Zwiesel

Schulische Bildung

2002 - 2006 Grundschule Zwiesel

2006 - 2014 Gymnasium Zwiesel

06 / 2014: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Medizin

10 / 2014 - 10 / 2016 vorklinischer Teil: Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) und Technische Universität München (TUM)

10 / 2016: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

10 / 2016 - 12 / 2020 klinischer Teil: Technische Universität München

10 / 2019: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

11 / 2019 – 03 / 2020: Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Regensburg

03 – 06 / 2020: Innere Medizin, Klinikum St. Elisabeth Straubing

06 – 10 / 2020: Chirurgie, Donau-Isar-Klinikum Deggendorf

12 / 2020: 3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

01 / 2021: Erteilung der Approbation als Arzt

Ärztliche Ausbildung

seit 01 / 2021: Assistenzarzt der II. Medizinischen Klinik des Klinikums St. Elisabeth Straubing

Wissenschaftliche Beiträge

Poetzl C, Preis L, Schmid S, Blobner M, Schneider G, Jungwirth B, “Correlation Between Cognitive Deficits and Amyloid-load Independent of Sex or Anesthesia in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease” International Anesthesia Research Society (IARS) Annual Meeting 2019, Montréal, Canada

Preis L, Schmid S, Pötzl C, Blobner M, Schneider G, Rammes G, Jungwirth B, „Alzheimer und Allgemeinanästhesie – Untersuchungen von Neurokognition und Verhalten im Mausmodell Tg2576“, 20. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Berlin, Deutschland

Preis L, Schmid S, Poetzl C, Blobner M, Schneider G, Rammes G, Jungwirth B, “Isoflurane anesthesia has no impact on neurocognitive function of mice with Alzheimer’s disease: no effect of gender”, Society for Neuroscience in Anesthesiology and Critical Care (SNACC) 46th Annual Meeting 2018, San Francisco, USA