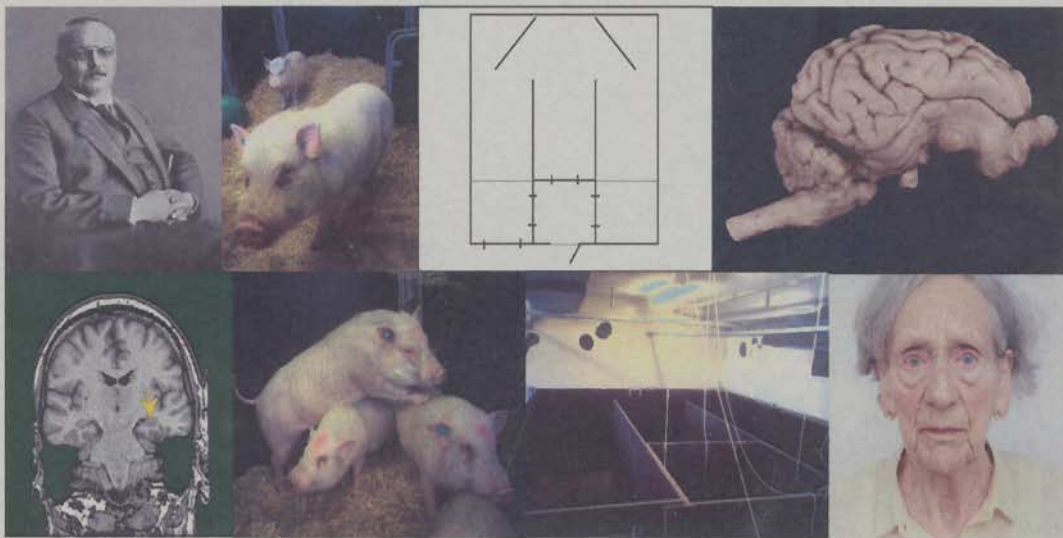


Kognitiv testning af Göttingen minigrisen

Udvikling af en hukommelsestest til Göttingen minigrisen som led i valideringen af en dyremodel for Alzheimers sygdom



Thomas Rune Nielsen

August 2006

NEUROBIOLOGISK FORSKNINGSENHED
KØBENHAVNS UNIVERSITETSHOSPITAL
RIGSHOSPITALET

INSTITUT FOR PSYKOLOGI
DET SAMFUNDSDVIDENSKABELIGE FAKULTET
KØBENHAVNS UNIVERSITET





Specialets omfang: 195614 anslag svarende til 81 ½ normalsider.

Hovedvejledere:

Lektor, mag. art. Anders Gade.
Institut for psykologi, Københavns Universitet.

Professor, dr. med. Gitte Moos Knudsen.
Neurobiologisk Forskningsenhed, Københavns Universitetshospital, Rigshospitalet.

Bivejleder:

Ph.d.-studerende, cand. scient. i humanbiologi Birgitte Rahbek Kornum.
Neurobiologisk Forskningsenhed, Københavns Universitetshospital, Rigshospitalet.

Forord

Dette speciale er udarbejdet på baggrund af et empirisk studie, som blev gennemført på Neurobiologisk Forskningsenhed, Rigshospitalet, hvor jeg var tilknyttet som specialestuderende fra september 2005 til august 2006. Rent praktisk blev det empiriske arbejde med grisene udført på den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole i foråret 2006.

Jeg var tilknyttet Birgitte Rahbek Kornums Ph.d.-projekt, som omhandler en dyremodel for Alzheimers sygdom i Göttingen minigrisen. Mit arbejde bestod i at overføre en velkendt hukommelsestest til grisene, så den senere kunne benyttes til at validere dyremodellen.

Projektet er blevet gennemført med støtte, hjælp og samarbejde med en række personer, som jeg gerne vil takke:

Først og fremmest vil jeg gerne takke mine vejledere Anders Gade og Gitte Moos Knudsen, som primært har vejledt i de teoretiske aspekter i specialet, og ikke mindst Birgitte Rahbek Kornum, som har været en stor hjælp og støtte i både det teoretiske og empiriske arbejde med grisene. Desuden skal der lyde en tak til Anette Moustgaard og Nana Trier Lind, som med deres ekspertise i griseadfærd bidrog med hjælp og vejledning i projektets begyndelse. Tak til Jens Flesher for hans hjælp til konstruktion af mazen til adfærdstestning af grisene og til det øvrige personale på den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole, som har taget sig af de praktiske forhold omkring grisene.

Projektet er støttet med et scholarstipendium fra Københavns Universitets satsningsområde Krop og Bevidsthed.

English summary

This thesis is on cognitive testing of the Göttingen minipig as a part of validating an animal model of Alzheimer's disease. The minipig is increasingly being used as an alternative to the monkey in brain research. The pig brain has a high degree of similarity to the human brain compared to the rodent brain, and the minipig has further the advantage of a relatively large brain compared to its body weight. The minipig has proved to be a valuable animal for the modeling of human brain diseases, and the Alzheimer's disease model may have several advantages to the existing transgenic mouse models. Cognitive testing is, however, a central part of evaluation of animal models of many human brain disorders. Very little is known about the pig's ability to learn the typical tasks used in neuropsychological testing of monkeys and rats. In the present study the pig's ability to learn the delayed non-match to sample task was evaluated. Originally the delayed non-match to sample task was used for testing visual recognition memory in amnesic patients or lesioned monkeys. The task has, however, proved to be sensitive to hippocampal lesions in a variety of species and modalities.

8 Göttingen minipig boars aged 12-14 months were trained on a spatial version of the delayed non-match to sample task in a T-like Maze. Initially the pigs were trained with a 60 second delay. After reaching a defined criterion for learning the task a scopolamine challenge was introduced and tested with three different delays to evaluate the sensitivity of the test to reduced hippocampal function and the effects of longer delay intervals. Scopolamine is an anticholinergic drug that is known to result in memory dysfunction in both humans and animals that is similar to the memory dysfunction associated with early Alzheimer's disease. The pigs had learning curves that are similar to macaque monkeys', and the introduction of scopolamine and longer delay intervals resulted in an expected decrease in the pig's performance on the task.

The introduction of this test is instrumental for the behavioural validation of pig models of brain diseases that target the hippocampal formation, eg. neurodegenerative disorders like Alzheimer's disease. Both the delayed non-match to sample test and the Alzheimer's disease model can prove valuable for screening and validating new anti-dementia drugs.

Forkortelser

A β	Amyloid beta protein
AD	Alzheimers sygdom
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid precursor protein
CA	Cornu ammonis
DMS	Delayed match to sample
DNMS	Delayed non-match to sample
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EPO	Erythropoietin
ERP	Event-related potentials
fMRI	Functional MRI
ICD-10	International Classification of Disease
MCI	Mild cognitive impairment
MTL	Medial temporal lobe
MMSE	Mini Mental State Examination
MRI	Magnetic resonance imaging (imaging)
NINCDS/ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
PET	Positron emission tomography
PFC	Prefrontal cortex
PS-1	Presenilin 1
PS-2	Presenilin 2
SPECT	Single photon emission computed tomography
tg	Transgenic

Indholdsfortegnelse

1. INTRODUKTION	3
1.1. ALZHEIMERS SYGDOM	5
1.1.1. Det kliniske billede	6
1.1.2. Neuropatologi.....	9
1.1.3. Amyloid hypotesen.....	12
1.1.4. Diagnose	15
1.1.5. Opsummering	17
1.2. HIPPOCAMPUS' ROLLE I HUKOMMELSE	18
1.2.1. Deklarativ hukommelse	19
1.2.2. Hippocampus og den mediale temporallap.....	21
1.2.3. Hippocampale funktioner.....	24
1.2.4. Studier af amnestiske cases.....	26
1.2.5. En dyremodel for amnesi	30
1.2.6. Studier med event-relaterede potentialer	34
1.2.7. Studier med funktionel billeddannelse	35
1.2.8. Opsummering	37
1.3. STUDIETS FORMÅL.....	38
 2. METODE	 40
2.1. FORSØGSDYR	40
2.2. APPARATUR	41
2.3. PROCEDURE	42
2.3.1. Habituering til eksperimentator.....	43
2.3.2. Habituering til maze	43
2.3.3. Shaping – første fase.....	43
2.3.4. Shaping – anden fase	43
2.3.5. DNMS procedure.....	44
2.3.6. Test af skopolamins effekt på DNMS opgaven med forskellige delays.....	45
2.4. ADMINISTRATION AF SKOPOLAMIN.....	46
2.5. DATA ANALYSE	47
 3. RESULTATER	 48
3.1. INDLÆRING AF DNMS OPGAVEN	48
3.2. SKOPOLAMINS EFFEKT PÅ DNMS OPGAVEN MED FORSKELLIGE DELAYS.....	51
 4. DISKUSSION.....	 55
4.1. DNMS TESTEN.....	55
4.1.1. Indlæring af DNMS opgaven	55
4.1.2. Test med skopolamin	57

4.1.3. Opsummering	60
4.2. DYREMODELLER FOR AD.....	61
4.2.1. Tidlige dyremodeller.....	61
4.2.2. Non-transgene dyremodeller	62
4.2.3. Transgene dyremodeller.....	62
4.2.4. En dyremodel for AD i Göttingen minigrisen.....	68
4.2.5. Opsummering	73
4.3. DNMS TESTENS EVNER SOM VALIDERINGSREDSKAB	74
4.3.1. Testens reliabilitet.....	74
4.3.2. Testens validitet.....	74
4.3.3. Revurdering af det neurale grundlag for den tidlige amnesi i AD	81
4.3.4. Opsummering	84
5. KONKLUSION.....	86
6. PERSPEKTIVERING	89
6.1. ERYTHROPOIETIN (EPO).....	90
6.2. EPO'S NEURONBESKYTTENDE EGENSKABER.....	91
6.3. EPO'S POTENTIALE SOM ANTIDEMENSPRÆPARAT	93
REFERENCER.....	94
BILAG	121

Kapitel 1

Introduktion

Dette speciale handler om kognitiv testning af Göttingen minigrisen som led i valideringen af en dyremodel for Alzheimers sygdom. Alzheimers sygdom (AD) er en progressiv neurodegenerativ sygdom, der medfører en forstyrrelse af den neurale funktion og en gradvis forværring af kognition, funktion og adfærd (Petrella et al., 2003). AD er den almindeligste årsag til demens og tegner sig for omkring 65% af alle demenstilfælde ved degenerative sygdomme (Kolb & Whishaw, 2003). I Danmark er ca. 30.000-35.000 personer ramt af sygdommen, og på Rigshospitalets neurologiske afdeling har de 2-3 patienter med formodet Alzheimers sygdom til SPECT skanning hver dag (personlig kommunikation). På verdensplan anslås mere end 30 millioner mennesker at være ramt af sygdommen (Nielsen et al., 2000). Alder er en stærk risikofaktor for AD. Sygdommen rammer ca. 8% af mennesker, som er mere end 65 år gamle og mere end 30% af dem, som er over 85. Progressionen af AD er gradvis, og gennemsnitligt overlever patienten 8-10 år efter debutsymptomerne (Kolb & Whishaw, 2003). Med den generelle stigning af gennemsnitslevealderen i I-landenes befolkninger, bliver behandling og pleje af AD patienter derfor også i stigende grad en samfundsøkonomisk problemstilling. Der findes endnu ingen effektiv behandling af AD, og sygdommens ætiologi og patologi er ikke fuldt ud forstået, hvorfor sygdommen repræsenterer en af de største udfordringer for den moderne medicin (Tayebati, 2005).

Det neuropsykologiske område har traditionelt fokuseret på kliniske beskrivelser og psykometriske profiler af forskellige typer af hjerneskade som støtte til diagnosticering. Da konsekvenserne af bestemte typer hjerneskade er bemærkelsesværdigt selektive, har neuropsykologiske studier også bidraget med et grundlag for at lave antagelser om den normale funktion i specifikke hjerneområder. Sideløbende med udviklingen i den neuropsykologiske forskning har den kognitive psykologi også bidraget væsentligt til vores

viden om psykologiske processer. Kognitionspsykologien har undersøgt komponenter i, og organisering af, funktioner - såsom hukommelse – inden for en ramme af informationsprocessering og repræsentationer. Et relateret felt, som til stadighed vinder frem, er den kognitive neurovidenskab. Den kognitive neurovidenskab bygger på udviklinger i det psykologiske felt og på udviklingen af nye teknikker til studiet af informationsprocesser i hjernen. Eksempler herpå er funktionel billeddannelse og metoder til at måle ændringer i enkelte neuroner eller grupper af neuroners fyringsrate. Forskning fra disse neuropsykologiske og kognitive neurovidenskabelige traditioner har bidraget til udviklingen af forskellige dyremodeller for neurale lidelser (Gallagher & Rapp, 1997).

Baggrunden for udviklingen af en dyremodel for AD i Göttingen minigrisen er, at de nuværende dyremodeller ikke på tilfredsstillende vis kan gengive alle de karakteristiske neuropatologiske og kognitive symptomer, som er forbundet med AD (Dodart et al., 2002). Udviklingen af en pålidelig dyremodel for AD vil derfor være af stor værdi i studiet af sygdommens patogenese på det molekulære, cellulære og adfærdsmæssige niveau. Dyremodellen i Göttingen minigrisen kan bidrage med et alternativ til de eksisterende dyremodeller og kan forhåbentlig give større indsigt i sygdommens neuropatologiske kaskade. Ved brugen af Göttingen minigrisen introduceres også et større forsøgsdyr, hvis neuroanatomy er mere lig den humane end mere traditionelle forsøgsdyrs, f.eks. mus og rotter. Dette er væsentligt, da man ikke længere benytter aber som forsøgsdyr i Danmark. Brugen af grise som forsøgsdyr inden for neurovidenskaben er stigende, og grisemodeller for Parkinsons sygdom (Mikkelsen et al., 1999), multipel sklerose (Singer et al., 2000) og apopleksi (Sakoh et al., 2000) er allerede blevet udviklet. Desuden ser det ud til, at grise passer godt til neurovidenskabelige teknikker, såsom positron emissionstomografi (Sakoh et al., 2000), målinger af event-relatede potentialer (Arnfred et al., 2003) og akustisk startle eye-blink (Arnfred et al., 2004). Kognitiv testning er en vigtig del af evalueringen og valideringen af dyremodellerne for humane hjernesygdomme. Der findes dog kun begrænset viden om grisens evne til at lære de opgaver, der typisk benyttes til neuropsykologisk testning af aber og rotter. Indlæring og hukommelse er i mindre grad undersøgt i grise (Klopfer, 1966; Laughlin & Mendl, 2000), men først for nylig (Moustgaard et al., 2002; 2004; 2005; Kornum et al., 2005; Lind et al., 2005) med det formål at undersøge opgaver med mere direkte relevans for neuropsykologisk testning. I dette studie undersøges Göttingen minigrisens evne

til at lære en kognitiv opgave, der har en velkarakteriseret neural basis i mennesker og andre arter, og som er sensitiv over for neurale læsioner, som er karakteristiske for AD.

Før den kognitive test introduceres vil AD's kliniske billede, neuropatologi og diagnose opridses i afsnit 1.1. Herefter vil evidensen for hippocampus' rolle i hukommelse blive gennemgået i afsnit 1.2., da der synes at være en sammenhæng mellem tidlig atrofi i dette område og tidlige amnestiske symptomer i AD. Diskussionen i disse to afsnit vil danne baggrunden for introduktionen af den kognitive test til validering af dyremodellen i afsnit 1.3. og den efterfølgende diskussion i kapitel 4.

1.1. Alzheimers sygdom

AD defineres som en neurodegenerativ demens af kortikal type, karakteriseret af et alvorligt progressivt sygdomsforløb med indgribende forstyrrelser i hukommelsesfunktionen og andre kortikale funktioner som sprog, praksis, m.m. (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Sygdommen er opkaldt efter Alois Alzheimer, en tysk psykiater med ekspertise i neuropatologi, hvis mødepræsentation af patienten Auguste D. i 1906 medvirkede til et større paradigmeskift i, hvordan vi tænker om psykisk sygdom (Alzheimer 1907)¹. Auguste D. var en 51-årig kvinde, som var indlagt på et sindssygehospital for "delirium og rasende jalousi overfor hendes mand". På baggrund af hendes relativt unge alder, blev hun diagnosticeret med det, som vi i dag ville kalde "præsenil demens". Post mortem analysen af Auguste D.'s hjerne afslørede omfattende formationer af senile plaks og neurofibrillære tangler (NFT). Selvom AD associeret neuropatologi allerede var blevet beskrevet i den aldrende hjerne i de to foregående årtier, var det dette studie, som var anledningen til, at Emil Kraepelin i 1910 opkaldte sygdommen efter Alois Alzheimer (Allen, 2001; Tanzi & Bertram, 2005).

AD kan undersøges og beskrives på en række forskellige niveauer: Et *genetisk niveau*, hvor der fokuseres på arvelighed og de forskellige gener, som prædisponerer for sygdommen, et

¹ I sin præsentation af Auguste D. kom Alzheimer med den dristige påstand, at hendes demens var forbundet med de grove neuropatologiske læsioner, som han havde observeret i hendes obducerede hjerne. Dette postulat blev fremført i de tidlige dage af det, som kan opfattes som den "klinikopatologiske æra" for neurologiske og psykiatriske sygdomme, hvor videnskabsmænd forsøgte at korrelere kliniske symptomer med patologiske karakteristika. Den nye antagelse om, at "psykiske" sygdomme, såsom præsenil demens, kunne skyldes "biologiske" årsager, blev ikke vel modtaget på dette tidspunkt, men var senere medvirkende til at ændre forståelsen af psykisk sygdom (Tanzi & Bertram, 2005).

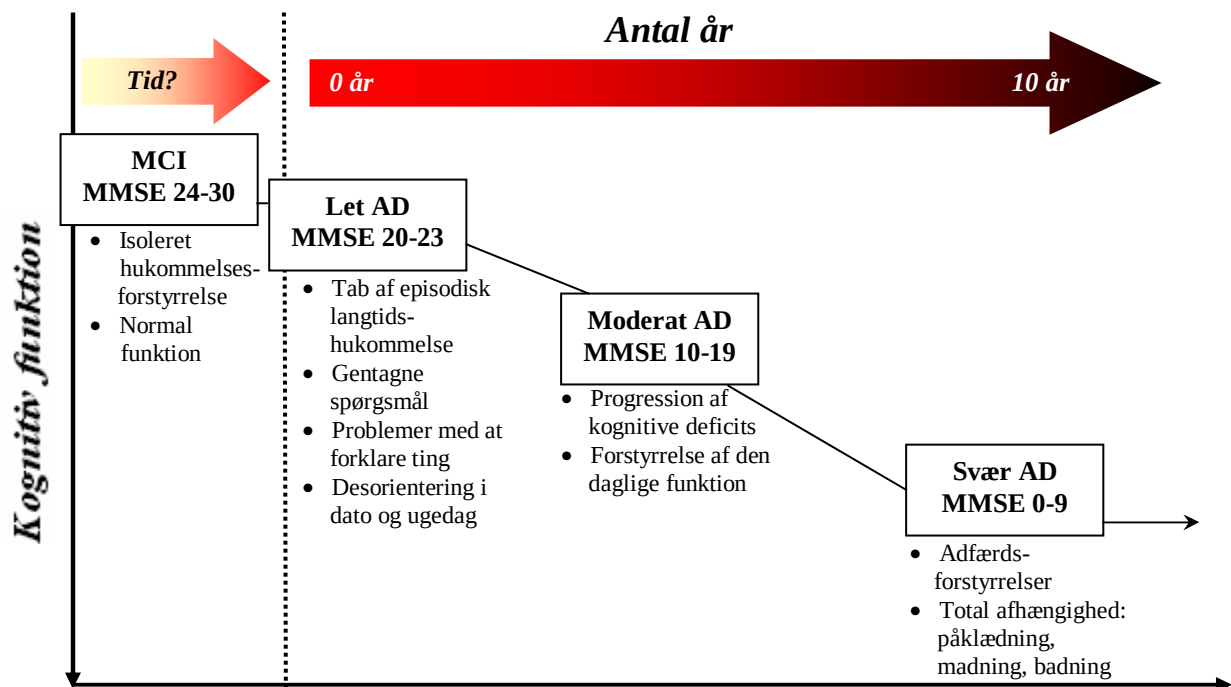
molekylært niveau med fokus på intracellulær neuropatologi, et *cellulært niveau* med fokus på neurotransmittersystemer, et *anatomisk niveau* med fokus på systematisk neuropatologi i neurale strukturer og et *funktionelt niveau* med fokus på adfærd og kognition. I dette studie arbejdes der med kognitiv testning af en dyremodel, hvilket primært placerer studiet på det funktionelle niveau, men også på det cellulære og anatomiske. Den følgende gennemgang af AD vil imidlertid berøre alle de nævnte beskrivelsesniveauer.

Dette afsnit vil starte med en beskrivelse af sygdommens kliniske billede og typiske forløb. Herefter følger en gennemgang af sygdommens neuropatologiske karakteristika og den dominerende teori for sygdommens patologiske kaskade. Til sidst beskrives nogle af de diagnostiske problemstillinger, som er forbundet med AD.

1.1.1. Det kliniske billede

AD er karakteriseret ved en proces, som kan inddeles i en række kliniske stadier. Disse stadier forløber i et kontinuum med almindelige aldringsprocesser, men er kvalitativt forskellige fra disse (jf. *figur 1*) (Reisberg & Franssen, 1999). Problemer med episodisk hukommelse er stort set altid det både første og sværeste symptom – både i den egentlige sygdom og i dennes prækliniske fase. For overskuelighedens skyld kobles de kliniske stadier til patienternes Mini Mental State Examination (MMSE) score² (Folstein et al., 1975). Dette er dog kun et screeningsinstrument, hvorfor denne score ikke kan danne grundlag for egentlig diagnosticering.

² MMSE er et af de mest brugte mental status redskaber. Det er en screeningstest, som kun tager 5-10 minutter at administrere, og den giver et objektivi mål for den globale kognitive funktion (se bilag 1). Testen indeholder 30 elementer, som kan scores, og med en cut-off score på 23/24 bruges testen til at identificere patienter, der mistænkes for at have AD eller anden form for demens (Gregory, 2004).



Figur 1 Gennem Alzheimers sygdoms kliniske udvikling demonstrerer patienterne en progressiv nedsættelse af funktionsevne, som korrelerer med MMSE scoren (Gengivet fra Petrella et al., 2003).

Mild cognitive impairment I den prækliniske fase, som også kaldes mild cognitive impairment (MCI), vil patienter med en MMSE score, som typisk er højere end 23 demonstrere minimal forstyrrelse – generelt let til moderat amnesi – mens de ellers fungerer normalt og uafhængigt (Petrella et al., 2003).

MCI er på flere måder et problematisk begreb, da der endnu ikke er konsensus om, hvad begrebet helt præcist dækker over. Der er stor heterogenitet i den ætiologiske og kliniske forståelse af MCI, men fælles for forståelserne er den øgede risiko for at progredierte til egentlig demens (se Feldman & Jacova, 2005 for en oversigt). Prognosen for patienter med MCI er svær at fastslå, da ikke alle MCI patienter udvikler egentlig AD. Over en årrække på ca. 2-4 år vil størstedelen dog udvikle klare symptomer på demens, hvorefter den egentlige diagnose for AD kan stilles (Reisberg & Franssen, 1999).

Let Alzheimers sygdom I dette stadie bliver symptomerne på demens tydelige. Patienterne har en let grad af svækkelse i både hukommelse og andre kognitive funktioner, men er oftest socialt velfungerende. Personlighedsforstyrrelser og lettere adfærdsforstyrrelser kan også forekomme (Reisberg & Franssen, 1999; Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Begyndelsestidspunktet for let AD svarer til en MMSE score på 20-23, og stadiet har en varighed på 1-3 år. Glemsomhed og gentagne spørgsmål er de primære kendetegn, og den daglige funktion begynder at blive forstyrret (Petrella et al., 2003).

Moderat Alzheimers sygdom I moderat AD (MMSE score på 10-19) sker der en progressiv forværring af kognitive funktioner, som nu også inkluderer sværere amnesi, f.eks. problemer med at genkalde nylige samtaler, at huske aftaler og manglende evne til at huske nylige begivenheder. Desuden begynder patienterne at få sproglige problemer, specielt med at huske de korrekte ord (Petrella et al., 2003; Reisberg & Franssen, 1999). Sekundære symptomer i form af depression og emotionelle forstyrrelser forekommer hyppigt. Patienterne har ofte manglende sygdomsindsigt (anosognosi), men kan fortsat bevare en rimelig social tilpasning (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). Nyere studier har vist, at denne anosognosi også kan opstå langt tidligere i forløbet, idet mange MCI patienter også præsenterer dette symptom (Vogel et al., 2005a). Typisk varer stadiet med moderat Alzheimers sygdom 2-6 år (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Svær Alzheimers sygdom Det svære stadie nås når MMSE scoren falder til mindre end 10. På dette tidspunkt er patienterne svært invaliderede og er ude af stand til at klare deres egen hverdag. Søvn mønstret ændres, og patienterne bliver til sidst fuldstændig afhængige af andres hjælp til påklædning, madning og badning (Petrella et al., 2003). Patienterne bliver tiltagende inkontinente. Desuden er patienterne desorienterede, og der opstår ofte problemer med vandren. Emotionelt er patienterne affladede, men til tider aggressive eller agiterede, og der kan optræde psykotiske symptomer i form af vrangforestillinger og hallucinationer (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). I nogle tilfælde forekommer psykotiske symptomer imidlertid også tidligere i sygdomsforløbet. I slutfasen er patienterne sengeliggende, rullestolsbundne og plejekrævende døgnet rundt. Patienterne er ofte stumme og kontakten med dem forsvinder (Reisberg & Franssen, 1999; Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Den kliniske progression fra begyndelsestidspunktet for let AD til begyndelsestidspunktet for svær AD er varieret, men tager gennemsnitligt omkring 10 år (Petrella et al., 2003). Patienterne dør af grundsygdommen, som oftest på grund af komplikationer som pneumoni (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Det kliniske billede af AD varierer fra patient til patient, men hukommelsessvækkelsen er i alle stadier det primære symptom, selvom andre kognitive forstyrrelser, sprogforstyrrelser og adfærdssændringer kan være dominerende.

1.1.2. Neuropatologi

AD er karakteriseret ved en række neurobiologiske ændringer. Makroskopiske ændringer inkluderer grov atrofi, med udvidede sulci og ventrikler, som hovedsageligt afficerer den parietale region og temporallapperne. Mikroskopiske ændringer inkluderer læsioner i form af amyloide plaks og neurofibrillære tangler, hvilke er sygdommens neuropatologiske kendetegn (Wiegel & Wisniewski, 1999; Morris & Worsley, 2003).

Amyloide plaks Alle patienter med AD udvikler amyloide senile plaks, hvilket er ekstracellulære aggregationer af amyloid protein, som er omgivet af degenererede axoner og dendritter, aktiveret mikroglia og reaktive astrocytter (Esiri, 2001). Aggregationer af amyloid protein, som ikke samtidig har ændrede axoner, dendritter og glia betegnes diffuse plaks og kan findes ved normal aldring, såvel som ved andre degenerative sygdomme end AD (Esiri, 2001). Den primære komponent i plaks er amyloid beta protein ($A\beta$). Dette protein er karakteristisk for AD og er strukturelt forskelligt fra de amyloid-dannende proteiner, som findes i almindelig amyloidose (Wiegel & Wisniewski, 1999; Esiri, 2001).

Frigivelse af $A\beta$ skyldes en abnormal kløvning af amyloid precursor proteinet (APP), et glycoprotein, som findes i høje koncentrationer i cellemembranerne i stort set alle pattedyrs celler, men i specielt høje koncentrationer i neuroners cellemembraner. APP bliver normalt udskilt i ekstracellulærvæsken af både hjerne- og ikke-hjerneceller gennem hele livet. Øget produktion af $A\beta$ fører til udfældning, aggregation og progressiv aflejring i form af plaks. Ophobning af plaks antages at sætte en inflammatorisk og/eller oxidativ respons i gang, hvilket fører til en progressiv forstyrrelse af den neurale funktion, specielt i den hippocampale region og cerebral cortex (Esiri, 2001).

Nyere evidens antyder, at genetiske ændringer, som er baggrund for familiær AD, resulterer i en øget produktion af $A\beta$. Disse gener er involverede i den autosomale dominante form af

tidligt indsættende AD, som udgør mindre end 2 % af alle AD tilfælde (jf. figur 2) (Saunders, 2001).

Kromosom	Genetisk defekt	Alder ved begyndelses-	
		tidspunkt (år)	
21	β APP mutationer	50	Produktion af hele amyloid β peptider eller af amyloid β 42 peptider
19	Apolipoprotein E4 polymorfisme	≥ 60	Koncentration af amyloid β plaks og vaskulære aflejringer
14	PS-1 mutationer	40'erne og 50'erne	Produktion af amyloid β 42 peptider
1	PS-2 mutationer	50'erne	Produktion af amyloid β 42 peptider

Figur 2 Genetiske faktorer som prædisponerer for AD: Forholdet til amyloid β fænotype (Gengivet fra Selkoe, 1997).

Mutationer i genet for APP, som fører til abnormal kløvning, og som er lokaliseret på kromosom 21, er til stede i størstedelen af patienter med den sjældne tidligt startende familiære udgave af sygdommen (Wasco, 2001). Kloning af disse mutationer har medført øget produktion af A β i cellekulturer, og A β niveauet i plasma er øget i nogle bærere af mutationen, selv præsymptomatisk. Mutationer i generne presenilin 1 (PS-1) og presenilin 2 (PS-2), på henholdsvis kromosom 1 og 14, er imidlertid også associerede med den tidligt startende familiære udgave af AD (Citron, 2001; Wasco, 2001). Studier af patienter med trisomi 21 (Downs syndrom) og patienter, som bærer de andre genmutationer, som medfører AD har vist, at ophobning af A β i cortex er en tidlig begivenhed i AD patologi, som nogle gange forekommer årtier før symptomerne opstår (Citron, 2001).

Hovedparten af AD tilfælde er imidlertid sporadisk optrædende. En genetisk risikomarkør, der er beliggende på kromosom 19 og koder for apolipoprotein E (APOE), menes at kunne redegøre for mere end 50 % af den samlede risiko for AD (Saunders, 2001). Bærere af APOE4 allelet har vist sig at have en markant forøget risiko for AD i forhold til bærere af de andre APOE alleler - APOE2 og APOE3 (Saunders, 2001; Wasco, 2001).

På baggrund af ovenstående evidens er den nutidige overbevisning, at AD ikke repræsenterer én sygdom, men snarere en heterogen lidelse, som skyldes forskellige genetiske determinanter, der fører til en ensartet fænotype med amyloid aflejring og neural degeneration i specifikke hjerneområder (Wiegel & Wisniewski, 1999).

Neurofibrillære tangler Neurofibrillære tangler (NFT) består af intracellulære bundter af parrede heliske filamenter, hvilket er en form for trådformede proteinstrukturer, der er associeret med proteinet tau (Wischik et al., 2001). Stort set alle hjerner fra AD patienter indeholder NFT, men i modsætning til genet for APP er der ikke nogen evidens for en defekt i genet, som koder for tau, i patienter med den familiære udgave af AD. Desuden findes der NFT i andre, ætiologisk forskellige, sygdomme, såsom subakut sclerose panencephalitis, Hallervorden-Spatz sygdom, Parkinson-relateret demens og dementia pugilistica, og NFT forekommer også i et begrænset omfang ved almindelig aldring (Esiri, 2001). Mange NFT bærende neuroner kan virke raske, selvom de har undergået forskellige strukturelle ændringer. Men NFT bærende neuroner er neuroner under stress, hvorfor mange af dem dør (Esiri, 2001).

På nuværende tidspunkt er det molekylære og ætiologiske forhold mellem plaks og tangler ikke fuldt ud forstået. Nuværende data antyder imidlertid, at disse to læsioner kan være formet uafhængigt af hinanden. Distributionen og koncentrationen af både diffuse og senile plaks har ikke konsistent vist sig at korrelere med tilstedeværelsen eller graden af demens. Det har den totale koncentration af NFT til gengæld (Wischik et al., 2001; Esiri, 2001). Desuden har nogle ældre uden demens lige så mange plak udfældninger som dem med svær demens (Wishcik et al., 2001). Den senile variant af plaks, som er associeret med degenererede axoner og dendritter, og med reaktive gliaceller, ser imidlertid ud til at være et mere specifikt AD karakteristikum end NFT. Samtidig har resultaterne fra flere *in vitro* og *in vivo* studier vist, at A β er direkte toksisk for neuroner og fører til fosforylering af tau protein, den primære komponent i NFT (Esiri, 2001).

Patologiske stadier Den snigende begyndelse og gradvise progression af symptomerne, som blev beskrevet i afsnit 1.1.1., antages at følge progressionen af AD relateret atrofi i hjernen, fra entorhinal korteks til hippocampus til neokortex (Braak & Braak, 1999).

Der er blevet beskrevet tre stadier i den gradvise udvikling af plak udfældninger (Braak & Braak, 1999). Stadie A er karakteriseret ved udfældninger i det basale neokortex, eller entorhinal korteks. Der er en udvidelse til den hippocampale formation i stadie B, som med tiden medfører udfældninger i stort set alle kortikale områder, herunder de kraftigt myeliniserede primærområder i neokortex i stadie C.

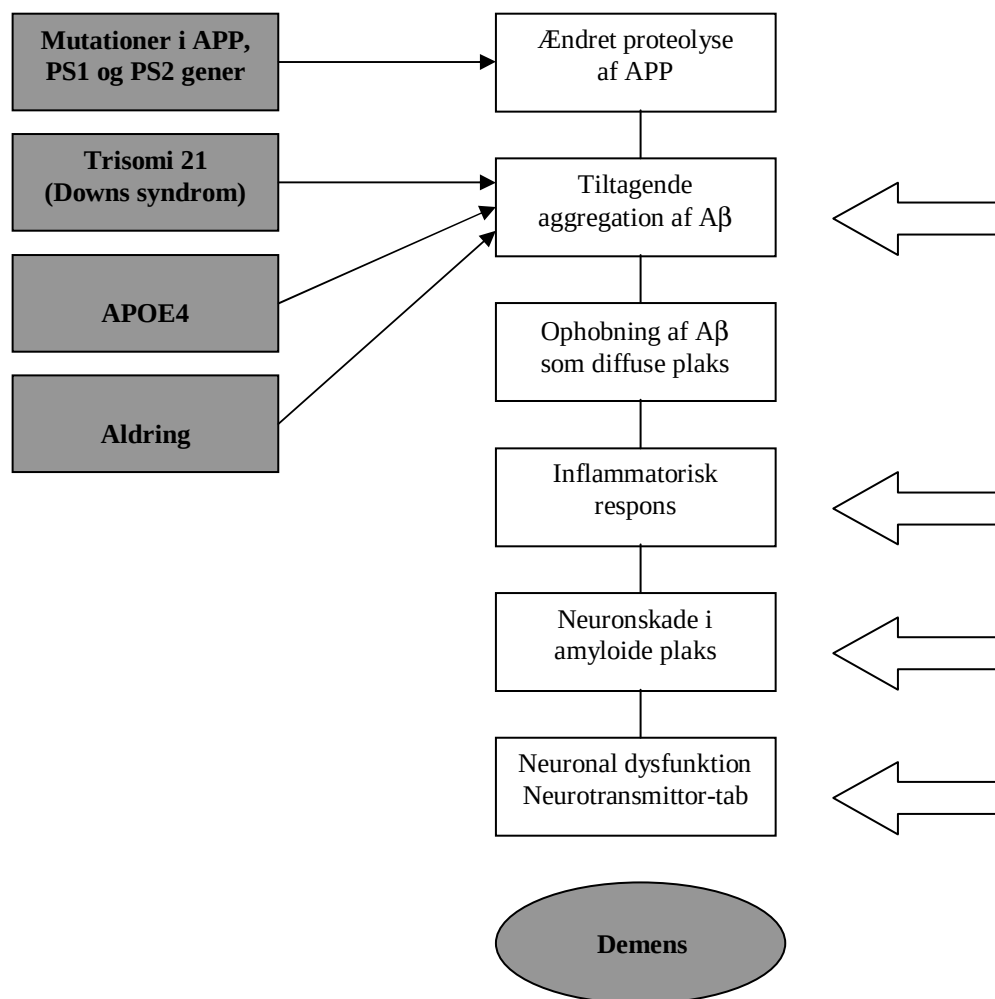
Braak og Braak (1999) har beskrevet seks stadier i udviklingen af NFT, og Delacourte *et al.* (1999) har senere beskrevet ti stadier. Delacourte *et al.*'s teori er en videreudvikling af Braak stadieteorien, men Braak stadieteorien forbliver den dominerende i litteraturen, hvorfor den beskrives her. Stadie I er defineret ved, at neuroner, som indeholder NFT, dukker op i den transentorhinale region, og i stadie II er der en progression til den entorhinale region og den hippocampale formation. Disse stadier repræsenterer sygdommens præsymptomatiske fase. Yderligere progression af NFT fører til stadie III og IV, hvilke er karakteriserede ved en svær involvering af den entorhinale region, amygdala og den hippocampale formation. Dette fører til en forstyrrelse af det limbiske loop, som er ansvarligt for dataoverførsel mellem neokortex og den hippocampale formation. Desuden er der også involvering af mange subkortikale kerner med diffuse projektioner til cortex, herunder den basale forhjernes kolinerge system, inklusive nucleus basalis Meynert (Braak & Braak, 1999). Patienter med sygdommen i disse stadier kan præsentere med symptomer på MCI eller præklinisk AD, men symptomerne kan være skjult af en stor kognitiv reserve-kapacitet. I stadie V er der en udvidelse til stort set alle områder i den cerebrale cortex, fra associationsområderne til primærområderne. I stadie VI er selv de primære sensoriske områder svært afficerede, men de motoriske områder er fortsat relativt upåvirkede (Braak & Braak, 1999). Stadie V og VI er generelt karakteriserede ved svær demens (Esiri, 2001; Petrella *et al.*, 2003).

Udviklingen af både plaks og tangler synes altså at starte i det entorhinale område, hvorefter de spreder sig til den hippocampale formation og til sidst til neokortex. Denne progression antages at afspejle udviklingen af symptomer og graden af kognitiv forstyrrelse.

1.1.3. Amyloid hypotesen

Amyloid hypotesen blev præsenteret af Glenner og Wong i 1984 og er siden blevet understøttet af evidens fra talrige studier. Antagelsen er, at udfældningen af A β i specifikke områder af cerebrum har en central rolle i initieringen af AD's patogene kaskade (jf. figur 3). Ifølge hypotesen er den neurodegenerative proces, inklusive udviklingen af NFT, en konsekvens af en ubalance mellem genereringen og fjernelsen af A β (Tanzi & Bertram, 2005). Resultatet af denne proces er det klinisk set betydningsfulde tab af synapser og reduktionen i syntesen af diverse neurotransmittere. Der har specielt været fokus på acetylkolin, da stoffet har betydning for mange kognitive processer, herunder hukommelse og

bevidsthed. Desuden synes udfældningen af A β specielt at ramme hjerneområder, hvor kolinerge neuroner findes i stort antal, f.eks. nucleus basalis Meynert (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). Sygdommen er dog mere kompliceret end blot at kunne karakteriseres som en specifik kolinerg lidelse, idet tydelige ændringer også findes i andre neurotransmitter-systemer (Davies, 2001). Noradrenalin, dopamin og serotonin-systemerne er reducerede, og NMDA og AMPA receptorer for glutamat er også reducerede (Eastley et al., 2001; Kolb & Whishaw, 2003).



Figur 3 Skematisk fremstilling af amyloid hypotesen for AD. APP: Amyloid Precursor Protein; PS1: Presenilin-1; PS2: Presenilin-2. De store åbne pile angiver potentielle interventionspunkter for antidemensmidler (Gengivet fra Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000).

Hypotesen er baseret på mange fund fra genetiske, molekylære, biokemiske og neuropatologiske studier. Som tidligere beskrevet har alle AD patienters hjerner mange senile

plaks med amyloid omgivet af degenererede nerveender, og antallet af senile plaks overgår i høj grad dem, som findes i almindelige aldrende hjerner. Desuden korrelerer antallet af senile plaks i specifikke hjerneområder, i et vist omfang, med graden og typen af mental forstyrrelse. Genetiske faktorer, som enten forårsager eller øger risikoen for AD er alle kendt for enten at øge A β udfældningen og/eller A β produktionen (jf. afsnit 1.1.2.). Yderligere kan mennesker, som lider af Downs syndrom (med tre kopier af kromosom 21 og dermed genet som koder for APP) udvise A β aflejringer allerede i 12 års alderen, hvilket er lang tid før de udvikler anden patologi såsom NFT, og de udvikler som regel Alzheimer-lignende demens (Howlett et al., 2001; Esiri, 2001). Hos AD patienter med APOE4 allelet er der en massiv ophobning af A β før symptomerne for AD opstår, og transgene mus, der udviser et muteret menneskeligt APP gen udvikler diffuse, og senere fibrillære, A β udfældninger sammen med neural og mikrogliaskade og abnorm adfærd. Desuden er aggregeret eller fibrillær A β toksisk for kultiverede neuroner og neuronlignende cellelinier, men inhibering af aggregationen afværger toksiciteten (Howlett et al., 2001).

Dermed synes der altså at være overbevisende evidens for en beskrivelse af A β udfældninger som værende den afgørende forårsagende begivenhed i AD. Et problem for hypotesen er imidlertid, at koncentrationen af plaks ikke konsistent har vist sig at korrelere med graden af demens, hvorimod den totale koncentration af NFT har (jf. afsnit 1.2.2.). Det antages derfor, at plaks har noget med sygdommens *årsager* at gøre, hvorimod NFT har noget med sygdommens *manifestation* at gøre.

Behandling Mange nyere forsøg på behandling af AD er inspirerede af amyloid hypotesen. I figur 3 er der markeret fire potentielle interventionspunkter for forskellige behandlingsstrategier: Transmitter-substitution, vækstfaktorer (neuronbeskyttelse), anti-inflammatoriske midler og påvirkning af amyloidomsætningen (jf. figur 3) (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). Den mest succesfulde og dermed mest benyttede strategi er transmitter-substitution i form af kolinesterasehæmmere (Eastley et al., 2001). Denne strategi er imidlertid hovedsageligt inspireret af den kolinerge hypotese, som fokuserer på den kolinerge dysfunktion i forståelsen af AD. Kolinesterasehæmmere har vist signifikant forbedring af den kognitive funktion hos 30-40 % af behandlede AD patienter. Men det er endnu uvist hvor længe denne forbedring vedvarer og dermed hvor længe sygdomsprocessen

udsættes – formentlig 1-2 år (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). Dette har fået Kaduszkiewicz *et al.* (2005) til at stille spørgsmålstejn ved, om det overhovedet kan betale sig at behandle AD patienter med kolinesterasehæmmere: *"Because of flawed methods and small clinical benefits, the scientific basis for recommendations of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease is questionable"* (Kaduszkiewicz *et al.*, 2005, p. 321). Behandling med kolinesterasehæmmere hindrer altså ikke sygdommens progression, hvorfor der er akut brug for nye og bedre antidemensmidler.

1.1.4. Diagnose

Som ved andre typer demens kan en sikker diagnosticering af AD ikke stilles *in vivo*. I stedet bruges et sæt af diagnostiske kriterier, som i forskellig grad bestemmer sandsynligheden for, at en patient har AD (Morris & Worsley, 2003). De typiske differentialdiagnostiske overvejelser ved AD inkluderer "normale aldersrelaterede kognitive ændringer", subkortikal vaskulær demens, demens ved andre degenerative sygdomme og depression (Hemmingsen & Kragh-Sørensen, 2000). En sikker diagnose for AD kan kun stilles ud fra en patologisk undersøgelse af hjernevæv fra en hjernebiopsi (Petrella *et al.*, 2003).

Patologisk diagnose De mest udbredte patologiske kriterier for AD diagnosen er Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD), som er baseret på en semi-kvantitativ vurdering af tætheden af senile plaks i kortex. Tætheden af plaks klassificeres som "sparsom", "moderat" eller "svær" og kombineres med patientens alder for at få en plak score (Esiri, 2001). Plak scoren integreres herefter med den kliniske information for at kunne stille en sikker diagnose for AD (se nedenfor).

Klinisk diagnose De mest udbredte kliniske kriterier for diagnosticeringen af AD bygger på National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS/ADRDA) (McKhann, 1984) kriterier for "sandsynlig" og "mulig" AD (se bilag 2). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) (American Psychiatric Association, 1994) kriterier for demens af Alzheimer type og International Classification of Disease (ICD-10) (WHO, 1992) kriterier for AD anvendes også hyppigt. Diagnosen stilles på baggrund af en grundig klinisk undersøgelse, som omfatter en detaljeret optagelse af anamnesen – enten fra patienten selv og/eller fra en

pårørende - en generel fysisk og mental status undersøgelse og en neurologisk undersøgelse. Desuden har neuropsykologiske undersøgelser en afgørende placering i den kliniske diagnostik, idet de bruges til at bestemme ændringer i kognitive funktioner, såsom orientering, sprog, eksekutive funktioner og ikke mindst hukommelse (Jeffries & Burns, 2001). Alle diagnoseapparaterne kræver som det første dokumentation for demens, f.eks. på baggrund af MMSE og neuropsykologiske undersøgelser (Jeffries & Burns, 2001).

DSM-IV og ICD-10 kræver begge tydelige hukommelsesproblemer i fraværet af delirium og eksklusion af andre sygdomme, som kunne være årsag til demensen. I DSM-IV skal patienten udvise kognitiv forstyrrelse inden for flere kognitive domæner og ikke blot en nedgang i hukommelse og tænkning. Begge diagnoseapparater lægger vægt på, at forstyrrelserne skal påvirke patientens daglige aktiviteter og sociale funktion, men kun ICD-10 kræver en varighed af symptomer på minimum seks måneder (Jeffries & Burns, 2001).

I NINCDS/ADRDA inddeles kriterierne i "mulig", "sandsynlig" og "sikker", hvor den sidstnævnte kræver en patologisk diagnose ved siden af det kliniske billede. Der kræves to eller flere kognitive deficits og en alder på 40-90 år, hvilket afspejler den diagnostiske usikkerhed uden for denne aldersgruppe (Jeffries & Burns, 2001). Fysiske undersøgelser, såsom blodprøver, og Computeriseret Tomografi (CT) anbefales til at udelukke reversible årsager til demensen (Scheltens & Korf, 2000).

I et valideringsstudie fandt Tierney et al. (1988), at disse kriterier for den kliniske diagnose af AD var 81-88% nøjagtige, med en sensitivitet på 64-86 % og en specificitet på 89-91%.

Eksperimentelle forsøg på at forbedre sikkerheden af denne diagnose inkluderer undersøgelse med funktionelle billeddannelsesteknikker (positron emissionstomografi (PET), *single photon emission computed tomography* (SPECT) og funktionel magnetisk resonans-billeddannelse (fMRI)). Funktionel billeddannelse er stadig hovedsageligt et forskningsredskab og er som diagnostisk redskab begrænset til et lille, men stigende antal klinikker (Fox et al., 2001; Scheltens & Korf, 2000). Hvis den kliniske diagnose suppleres med en SPECT skanning, har det vist sig moderat at kunne øge sikkerheden af diagnosen. Hvis en diagnose af "sandsynlig Alzheimers sygdom" f.eks. resulterer i en 84% sandsynlighed for patologisk verificeret AD, vil en negativ SPECT skanning reducere denne sandsynlighed til 70%, hvorimod en positiv

SPECT skanning vil øge denne sandsynlighed til 92% (Jagust, 2004; Jagust et al., 2001; Masdeu et al., 2005)

Selvom der forekommer variationer med atypiske manifestationer af AD, kræver den kliniske diagnose altså hukommelsesforstyrrelse, og desuden at patienten har forstyrrelse i et eller flere andre kognitive domæner.

1.1.5. Opsummering

AD er en progredierende neurodegenerativ sygdom med et karakteristisk forløb. Det tidligste og sværeste kliniske symptom er stort set altid episodisk hukommelsesforstyrrelse. Neuropatologiske ændringer inkluderer ekstracellulære amyloide plaks og intracellulære NFT, som er neurobiologiske markører for AD. Udbredelsen og koncentrationen af disse neuropatologiske ændringer synes at afspejle graden og typen af kognitiv forstyrrelse. En række gener prædisponerer for udviklingen af amyloide plaks, hvorimod der ikke er fundet gener, der prædisponerer for NFT. Dette har været medvirkende til amyloid-hypotesen for AD, som antager at A β har en central rolle i initieringen af AD's patogene kaskade. Amyloid-hypotesen har dannet grundlag for farmakologiske behandlingsforsøg. En sikker diagnose for AD kan kun stilles ud fra en hjernebiopsi, hvorfor kliniske diagnoser dækker over mulig eller sandsynlig AD. Diagnosen kræver amnesi ved siden af forstyrrelser inden for andre kognitive domæner.

På baggrund af denne gennemgang af AD bør en god dyremodel for AD have neuropatologiske ændringer i form af amyloide plaks og/eller NFT, og denne neuropatologi skal forårsage en kognitiv dysfunktion. Tidlige kognitive dysfunktioner, som er forbundet med AD, er bl.a. anosognosi (Vogel et al., 2005a), semantisk hukommelsesforstyrrelse (Vogel et al., 2005b), visuspatiale forstyrrelser (Nebes, 1992) og defekte eksekutive funktioner (Baddeley et al., 1991). Men episodisk hukommelsesforstyrrelse er i stort set alle tilfælde det både tidligste og sværeste symptom i AD, hvorfor det synes oplagt at fokusere på dette aspekt i udviklingen af den kognitive test til validering af AD dyremodellen i Göttingen minigrisen. Det er samtidig en kognitiv dysfunktion, som allerede er blevet undersøgt i andre dyremodeller (jf. afsnit 1.2.5.), hvorfor der findes velvaliderede tests, der kan modificeres, så de passer til grise. Den tidlige forstyrrelse af episodisk hukommelse i AD

hænger, ifølge de patologiske stadieteorier, sammen med den tidlige atrofi den hippocampale region. Denne antagelse bygger på viden fra hukommelsesforskningen, hvor man længe har haft kendskab til den hippocampale regions implikation i amnesi.

1.2. Hippocampus' rolle i hukommelse

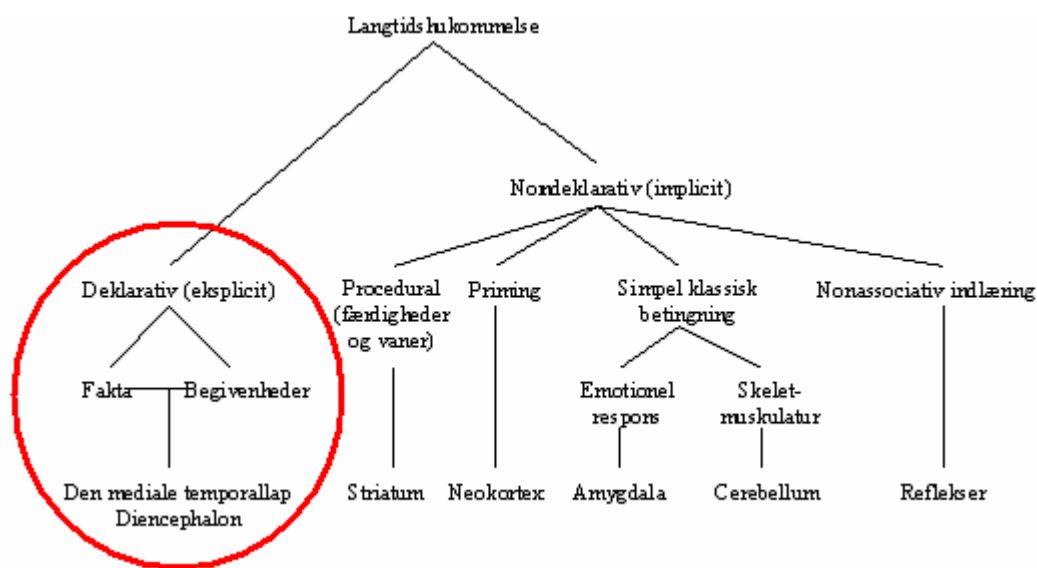
Lige siden den første rapport om svær amnesi efter den bilaterale fjernelse af den mediale temporallap (MTL) på patienten H.M. (Scoville & Milner, 1957), har en stor mængde forskning været rettet mod at karakterisere amnesiens natur og det hippocampale systems funktionelle rolle i hukommelse - både i mennesker og dyr. Denne forskning har gennem årene benyttet de tilgængelige metoder, herunder neuropsykologiske studier af patienter med hjerneskader (jf. afsnit 1.2.2.) eller dyr med eksperimentelle læsioner (jf. afsnit 1.2.3.), og målinger af event-relatede potentialer i mennesker, der udfører forskellige hukommelsesopgaver (jf. afsnit 1.2.4.). Efter udviklingen af funktionelle billeddannelsesteknikker (specielt PET og fMRI) har det også været muligt at studere aktivitet i den hippocampale region på raske mennesker, der udfører forskellige hukommelsestests (jf. afsnit 1.2.5.) (Cohen et al., 1999; Squire, et al., 2004).

Det kendetegnende symptom efter læsioner i MTL er udtalt glemsomhed. Der er tre vigtige aspekter ved denne tilstand. For det første er forstyrrelsen multimodal, dvs. at hukommelsen påvirkes, uanset hvilken sensorisk modalitet information præsenteres i. For det andet er korttidshukommelsen intakt. Eksempelvis har selv patienter med store læsioner i MTL en normal talspændvidde. For det tredje kan amnesien forekomme, selvom perceptuelle og intellektuelle funktioner er intakte. Dette er mest tydeligt i patienter, hvis skade er begrænset til den hippocampale formation (jf. afsnit 1.2.2.) (Squire et al., 2004). Disse amnestiske symptomer er både kendetegnende for patienter, der har amnesi på baggrund af en læsion, og for patienter med AD.

Dette afsnit vil begynde med en præcisering af, hvilken del af langtidshukommelsen, der rammes tidligt i AD, hvorefter hippocampus' struktur og funktioner vil blive beskrevet. Derefter vil de forskellige metodiske tilganges bidrag til forståelsen af hippocampus' rolle i amnesi blive opridset.

1.2.1. Deklarativ hukommelse

I den klassiske opdeling af langtidshukommelsens underliggende hukommelsessystemer differentieres der primært mellem deklarativ (eksplicit) og nondeklarativ (implicit) hukommelse. Deklarativ hukommelse involverer en bevidst genkaldelse af fakta (semantisk hukommelse) og begivenheder (episodisk hukommelse), hvorimod nondeklarativ hukommelse ikke gør det. Nondeklarativ hukommelse er en samling af ikke-bevidste indlæringssegenskaber, f.eks. procedural indlæring, priming, klassisk betingning og nonassociativ indlæring (jf. *figur 4*) (Poldrak & Packard, 2003).



Figur 4 Taksonomi for langtidshukommelsens systemer med de specifikke hjernestrukturer, som er involverede i hvert system (Gengivet fra Sweatt, 2004).

Den røde cirkel i *figur 4* markerer den del af langtidshukommelsen, som der er fokus på i dette studie. Deklarativ hukommelse refererer både til evnen til at huske tidligere personlige oplevelser (episodisk hukommelse) og evnen til at tilegne sig viden om og huske fakta om verden (semantisk hukommelse) (Suzuki & Clayton, 2000). Figuren viser også, hvilke områder i hjernen, der er associeret med de forskellige hukommelsessystemer. Mest interessant for dette studie er, at MTL, mere specifikt hippocampus, antages at være involveret i deklarativ hukommelse.

Selvom den tidlige amnesi i AD hovedsageligt rammer den episodiske hukommelse (jf. afsnit 1.2.1.), benyttes denne bredere klassifikation ofte i litteraturen (Gallagher & Rapp,

1997) og vil også benyttes i store dele af denne opgave. Baggrunden for dette er dels, at det kan være svært specifikt at undersøge episodisk hukommelse i dyr (jf. afsnit 4.3.2.) (Aggleton & Pearce, 2001). Desuden antyder nyere forskning, at også problemer med semantisk hukommelse er en tidlig begivenhed i AD (Vogel et al., 2005b). Det er dog væsentligt at pointere, at den episodiske hukommelsesforstyrrelse, på baggrund af skader i MTL, i langt de fleste tilfælde er mere markant end den semantiske, hvorfor den brede klassifikation kan være problematisk (jf. afsnit 1.2.4.). Derfor følger en beskrivelse af episodisk og semantisk hukommelse.

Episodisk hukommelse Episodisk hukommelse består af enkeltstående begivenheder, som en person genkalder. Denne form for hukommelse refereres også til som autobiografisk hukommelse. Ifølge Tulving (2002) er episodisk hukommelse et unikt neurokognitivt system, som gør mennesker i stand til at huske tidligere personlige oplevelser. Det er hukommelse for livserfaringer, der er centreret omkring personen selv.

Episodisk hukommelse afhænger ifølge Tulving (2002) af tre elementer: (1) en fornemmelse af subjektiv tid; (2) autoetisk bevidsthed, evnen til at være bevidst om subjektiv tid; og (3) et selv, som kan "rejse i subjektiv tid". Han mener, at evnen til at rejse tilbage i subjektiv tid, i kraft af den episodiske hukommelse, er noget unikt menneskeligt. Men dyr har, ligesom mennesker, en evne til at producere deres egen form for hukommelse. Dyr har bevidsthed, de er bevidste om deres omverden, og deres evne til at opbygge færdigheder afhænger af indlæring og hukommelse. Dyr har imidlertid ikke den samme evne til at rejse tilbage i subjektiv tid og igen stifte bekendtskab med tidligere oplevelser, som mennesker har. Dyr besidder derfor ikke episodisk hukommelse. Da episodisk hukommelse kræver en modning af den menneskelige hjerne, besidder babyer og små børn heller ikke denne evne (ibid.). Dette kan forklare fænomenet *infantil amnesi*, hvilket er vores manglende evne til bevidst at genkalde oplevelser fra de første år af vores liv (Kolb & Whishaw, 2003).

Semantisk hukommelse Viden om verden betegnes af Tulving (2002) som semantisk hukommelse. Denne form for hukommelse inkluderer viden om historiske begivenheder, og historiske og litterære personligheder. Den inkluderer også evnen til at genkende

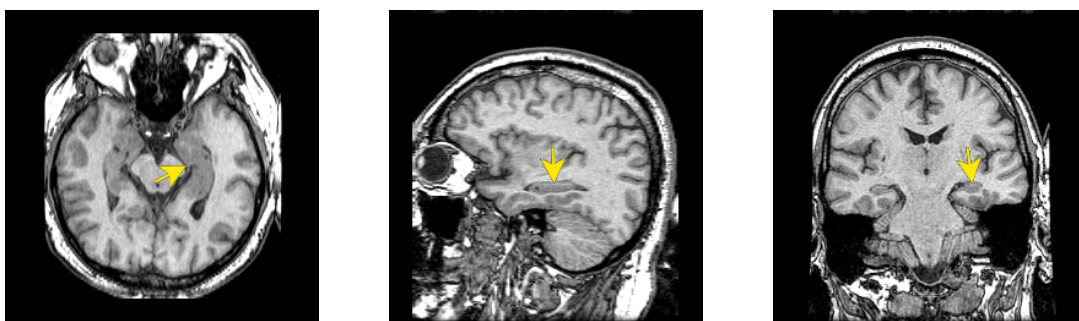
familiemedlemmer, venner og bekendte og information, som er lært i skolen, såsom kendskab til fagsprog til brug i læsning, skrivning og matematik.

At den semantiske hukommelse er bedre end den episodiske i tidlig AD - og amnesi mere generelt - kan hænge sammen med, at den generelle viden, som semantisk hukommelse består af, er baseret på gentagen indlæring og repetition, hvorimod episodisk hukommelse per definition er baseret på en enkeltstående begivenhed (Squire et al., 2004).

Deklarativ hukommelse er altså en del af langtidshukommelsen og kan underopdeles i episodisk og semantisk hukommelse. I det følgende afsnit vil de basale termer og klassifikationer for hippocampus og de tilstødende strukturer i MTL blive beskrevet, da dette danner grundlag for den efterfølgende diskussion af hippocampus' rolle i deklarativ hukommelse.

1.2.2. Hippocampus og den mediale temporallap

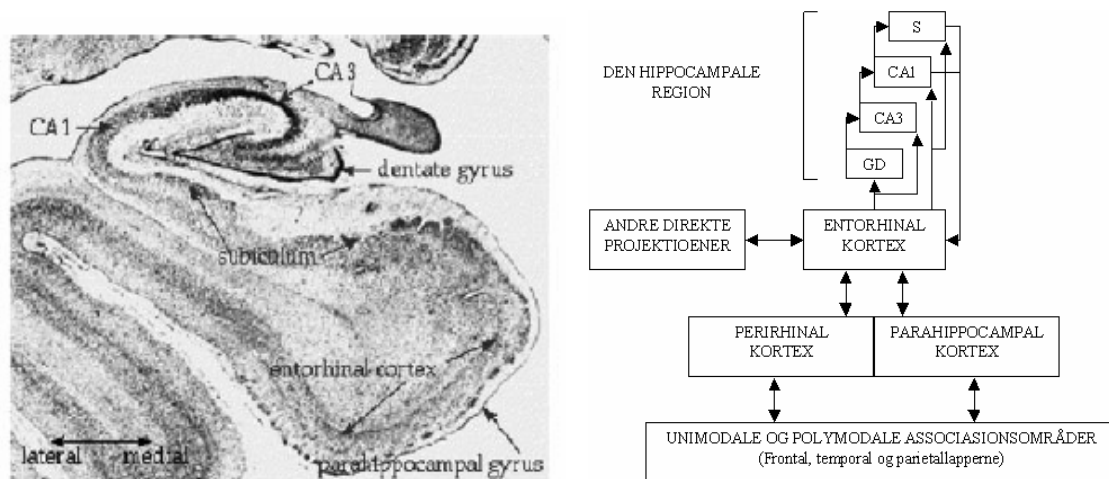
I 1960'erne beskrev anatomen H. Chandler Elliot hippocampus som *"quite archaic and vestigial, possibly concerned with primitive feeding reflexes no longer emergent in man"* (her i Kolb & Whishaw, 2003, p. 461). Selvom denne struktur kan synes uanselig i forhold til andre hjernestrukturer, spiller den i dag en markant rolle i diskussionen af hukommelse.



Figur 5 MR T1-vægtede billeder af en menneskehjerne. De gule pile viser hippocampus' placering i henholdsvis et aksialt (venstre billede), sagittalt (midterste billede) og coronalt (højre billede) snit (Billede fra *The Whole Brain Atlas*: www.med.harvard.edu/AANLIB/home.htm).

Hippocampus er en del af MTL og kan anatomisk opdeles i to gyri: Gyrus hippocampus, der også kaldes cornu ammonis (CA), og den nedenfor liggende gyrus dentatus (Moos & Møller, 2002). Af strukturelle og funktionelle grunde er CA-neuronerne og neuronerne i gyrus dentatus ikke lige sensitive over for anoksi og giftstoffer. Eksempelvis vil let anoksi

hovedsageligt ramme neuronerne i CA1, hvorimod sværere anoksi også vil ramme neuronerne i CA3, og neuronerne i gyrus dentatus vil kun blive ramt i tilfælde af svær anoksi (jf. afsnit 1.2.4.) (Kolb & Whishaw, 2003). CA områderne og gyrus dentatus refereres sammen med subiculum samlet til som den *hippocampale formation* (jf. figur 6) (Moos & Møller, 2002, Sweatt, 2004). Tilstødende kortikale områder – entorhinal, perirhinal og parahippocampal korteks – synes også at spille en væsentlig rolle i hukommelsesprocesser. De refereres samlet til som den *parahippocampale region* (Cohen et al., 1999). En anden væsentlig distinktion findes mellem termen den *hippocampale region* og termen det *hippocampale system*. Termen det hippocampale system referer til hippocampus og anatomisk relaterede strukturer i MTL, hvorimod termen den hippocampale region er en funktionel enhed, som består af det entorhinale område, gyrus dentatus, cornu ammonis og subiculum (ibid.). Sensorisk information fra de forskellige kortikale områder ledes til hippocampus via perirhinal, parahippocampal, og entorhinal korteks, tre kortikale områder, der anatomisk er lokaliseret i hippocampus' umiddelbare omgivelser i temporallappen (jf. figur 6) (Sweatt, 2004; Squire et al., 2004). Output fra perirhinal, parahippocampal og entorhinal korteks projiceres derefter til den hippocampale formation via de perforante fibre (Moos & Møller, 2002, Sweatt, 2004). Perirhinal korteks modtager kraftigere projektioner fra unimodale visuelle områder end parahippocampal korteks, og parahippocampal korteks modtager betydelige projektioner fra den "dorsale strøms" områder. Det tyder derfor på, at visuel hukommelse afhænger mere af perirhinal korteks end parahippocampal korteks, hvorimod spatial hukommelse afhænger mere af parahippocampal korteks (Squire et al., 2004).



Figur 6 Til venstre ses en aftegning af en tværsnit gennem den hippocampale formation, der illustrerer den hippocampale formations vigtigste områder (Billede fra <http://thalamus.wustl.edu/course/limbic.html>). Til højre ses en skematisk fremstilling af de strukturer i MTL, som er vigtige for deklarativ hukommelse. S: subikulare kompleks, GD: gyrus dentatus, CA1, CA3: Cornu Ammonis områderne i hippocampus (Gengivet fra Squire et al., 2004).

Hippocampus kan opdeles i fire anatomiske underområder: CA1, CA2, CA3 og CA4.

Områderne CA1 og CA3 er de største og nemmeste at identificere. De dominerende celler i CA områderne er pyramideceller. De udgør omkring 90% af alle neuroner i den hippocampale formations CA områder. Pyramidecellerne i CA1 udgør hippocampus' output neuroner. Deres axoner er glutaminerge, og det er via disse axoner, at information forlader cornu ammonis. Axonerne fra CA1 projicerer hovedsagelig til andre dele af den hippocampale formation og entorhinal korteks (Sweatt, 2004). Men via nervebundtet fornix har den hippocampale formation også forbindelse til corpora mammillare, nucleus anterior i thalamus og gyrus cingularis. Via nervebundtet cingulum, der løber gennem gyrus cingularis, og gyrus parahippocampalis, er der igen forbindelse tilbage til den hippocampale formation. Disse forbindelser danner den *Papez'ske neuronring* (Moos & Møller, 2002). Dette system antages at være relevant for indprentningen af hukommelsesspor, hvilket er et af de første stadier i lagringen af langtidshukommelse (Markowitsch, 2003).

Hippocampus er altså en struktur i MTL, som er stærkt forbundet med de omkringliggende entorhinale, perirhinale og parahippocampale områder og dermed store dele af korteks og strukturer dybere i hjernen. Derfor kan det også være svært at vurdere, hvorvidt patienters hukommelsesproblemer skyldes en skade i selve hippocampus, en skade i dennes

forbindelser, eller i de tilstødende strukturer (Kolb & Whishaw, 2003). Denne problemstilling danner grundlag for forskellige teorier for den hippocampale funktion i hukommelse.

1.2.3. Hippocampale funktioner

Hippocampus's nøjagtige funktionelle rolle er et kontroversielt emne som fortsat er til debat. Cohen *et al.* (1999) konkluderede, at der nu findes fem forskellige dominerende redegørelser for den hippocampale funktion.

1. *Novelty*
2. *Genkaldelsessucces*
3. *EksPLICIT (vs. Implicit) hukommelse*
4. *Spatiale (kognitive) kort*
5. *Relationelle hukommelsesprocesser (deklarativ (vs. nondeklarativ) hukommelse)*

Novelty Baseret på fund fra et PET studie, hvor der var større aktivering af det (højre) limbiske system ved nye, frem for tidligere præsenterede stimuli, har Tulving *et al.* (1994) foreslået, at det hippocampale system er en del af et *novelty encoding network* i det limbiske system. Ifølge dette synspunkt er det hippocampale systems rolle i hukommelse bl.a. at opdage nye stimuli og indprente information om disse stimuli i hukommelsen.

Genkaldelsessucces På baggrund af korrelationen mellem præstationen på hukommelsestests og hippocampal aktivering i deres PET studie, har Nyberg *et al.* (1996) foreslået, at det hippocampale system er involveret i succesrig genkaldelse af tidligere lagret information, altså i reaktiveringen af lagrede repræsentationer.

EksPLICIT (vs. implicit) hukommelse Graf og Schacters (1985) kendte distinktion mellem eksPLICIT og implicit hukommelse er baseret på dissociationer mellem normale og amnestiske patienters præstationer på hukommelsestests. EksPLICIT hukommelse involverer bevidst genkaldelse af en tidligere indlæringsepisode, hvorimod implicit hukommelse tillader effekten af tidligere indlæring at udfolde sig, uden at dette kræver bevidst adgang til indlæringsepisoden. Det foreslås, at det hippocampale system spiller en afgørende rolle i eksPLICIT hukommelse.

Spatiale (kognitive) kort Oprindeligt baseret på data fra målinger af hippocampale neuroner og adfærdsændringer i rotter med hippocampale læsioner, har O'Keefe og Nadel (1978) fremført det velkendte synspunkt om, at det hippocampale system har en afgørende rolle for spatial hukommelse og er grundlaget for evnen til at danne, opretholde og bruge spatiale kort over omgivelserne.

Relationelle hukommelsesprocesser (deklarativ (vs. nondeklarativ) hukommelse)

Baseret på distinktionen mellem deklarativ og nondeklarativ hukommelse, som blev introduceret af Cohen og Squire (1980) for at kunne gøre rede for mønstret af nedsatte og bevarede hukommelsesfunktioner ved amnesi, foreslås det, at det hippocampale system er kritisk involveret i at sammenbinde hukommelsesspor (relationel hukommelse) (Eichenbaum, 2004). Hippocampus understøtter opbygningen af relationelle repræsentationer mellem multimodale stimuli, hvilket gør det muligt at sammenkoble elementer fra forskellige oplevelser eller begivenheder. Dermed bidrager de individuelle strukturer i MTL til mange aspekter af deklarativ hukommelse, herunder både episodisk og semantisk hukommelse (Cohen et al., 1999, Suzuki & Clayton, 2000).

Disse redegørelser for de hippocampale funktioner behøver ikke at udelukke hinanden (Cohen et al., 1999). Den relationelle teori kan siges at være en overordnet teori for hippocampal funktion, som på fornuftig vis kan rumme alle de beskrevne redegørelser (Eichenbaum, 2004, Suzuki & Clayton, 2000, Cohen et al., 1999). Samtidig er det en teori, som er i god overensstemmelse med fundene fra dyrestudier (Sweatt, 2004, Suzuki & Clayton, 2000) og skanningsstudier (Cohen et al., 1999). Når betegnelsen deklarativ hukommelse bruges i denne opgave, kunne det derfor mere overordnet beskrives som relationel hukommelse.

Evidensen for at MTL, og ikke mindst hippocampus, er et afgørende neuralt substrat for deklarativ hukommelse stammer fra fire forskellige forskningsområder: Casestudier af amnestiske patienter, læsionsstudier i aber, studier med måling af event-relaterede potentialer og funktionelle billeddannelsesstudier. I det følgende afsnit beskrives amnestiske case-studiers bidrag til vores forståelse af hippocampus' rolle i deklarativ hukommelse.

1.2.4. Studier af amnestiske cases

De første kliniske data, der forbinder MTL med hukommelsesfunktionen, blev præsenteret af von Bechterew (1900) for mere end 100 år siden. Denne patient havde skade i den hippocampale formation, amygdala og den omkringliggende kortex. Omkring 50 år senere publicerede Grunthal (1947) og Glees og Griffith (1952) uafhængigt af hinanden case-studier, som forbandt hukommelsesforstyrrelser med MTL. Begge disse cases havde pådraget sig vaskulære skader, som ramte hippocampus og den omkringliggende kortex bilateralt. Den direkte sammenhæng mellem MTL og hukommelsesfunktionen blev imidlertid først solidt bekræftet efter Brenda Milners systematiske dokumentation af effekten af fjernelsen af MTL i den nu kendte case H.M. (Scoville & Milner 1957). I det følgende gennemgås nogle af de vigtigste casestudiers bidrag til vores viden om hippocampus' rolle i amnesi.

Patient H.M. I 1957 beskrev Scoville og Milner patienten H.M. Da H.M. var 27 år gammel fik han fjernet MTL bilateralt for at afhjælpe epileptiske anfald. Dette indgreb førte til svær anterograd og lettere retrograd amnesi. Casen er blevet grundigt studeret gennem de sidste 50 år, og det antages, at mere end hundrede forskere har deltaget i studierne af H.M. (Kolb & Whishaw, 2003). Et nyligt MRI studie har afsløret, at H.M.'s læsion er bilateralt symmetrisk og begrænset til kortex ved MTL, det amygdaloide kompleks, entorhinal kortex og – i modsætning til den oprindelige antagelse – kun halvdelen af den rostrocaudale del af den hippocampale formation (Corkin et al., 1997; Purves et al., 2001). Dermed antyder casen H.M., at MTL er involveret i deklarativ hukommelse. Dette støttes af case studiet af patienten E.P.

Patient E.P. Som 70 årig pådrog E.P. sig herpes simplex encefalitis, hvilket forårsagede bilaterale skader i den mediale temporallap. En MRI skanning af E.P.'s hjerne afslørede, at denne skade inkluderede amygdala, hippocampus, entorhinal kortex, perirhinal kortex og den rostrale parahippocampale kortex bilateralt. Desuden havde E.P. bilaterale skader i den rostrale gyrus fusiformis, og den kortikale volumen af insula, de laterale temporallapper og den venstre parietallap var reducerede. Disse skader førte til svær anterograd og retrograd amnesi. E.P. havde imidlertid bevarede erindringer fra sit tidlige liv (Stefanacci et al., 2000).

Denne case støtter også antagelsen om, at MTL er involveret i deklarativ hukommelse. Men det kan ikke bestemmes om hukommelsesproblemerne skyldes den hippocampale læsion alene, eller om den skyldes en læsion af både hippocampus og de omkringliggende områder. Et tredje amnestisk casestudie giver imidlertid større indsigt i relationen mellem udbredelsen af læsionen i MTL og sværhedsgraden af amnesien

Patient R.B. I 1986 rapporterede Zola-Morgan *et al.* om den amnestiske patient R.B. R.B. udviklede hukommelsesproblemer i 1978, da han som 52 årig var ude for en iskæmisk episode. Iskæmi rammer selektivt hippocampus og specielt neuronerne i CA1 (jf. afsnit 1.1.2.). I de fem år før sin død udviste R.B. moderat anterograd amnesi, med fravær af andre kognitive dysfunktioner. Efter hans død afslørede en histologisk undersøgelse af hans hjerne en velafgrænset bilateral læsion, der var begrænset til den rostrocaudale del af hippocampus' CA1 område. Mindre patologi blev fundet i venstre globus pallidus, højre gyrus postcentralis og venstre capsula interna, men hukommelsesproblemerne kan ikke på fornuftig vis tilskrives dette (Zola-Morgan *et al.*, 1986). På baggrund af fundene fra casen R.B. kan det konkluderes, at hippocampus, i sig selv, er en afgørende struktur i MTL's hukommelsessystem, og at bilaterale læsioner, som er begrænsede til den hippocampale formations område CA1, er nok til at forårsage amnesi. Desuden synes yderligere hippocampale regioner, udover CA1, eller strukturer uden for hippocampus, også at spille en rolle i deklarativ hukommelse, da R.B.'s amnesi ikke var lige så svær som H.M.'s.

Denne konklusion støttes af et nyere studie af Rempel-Clower *et al.* (1996), hvor de beskriver tre amnestiske cases: G.D., L.M. og W.H. Disse patienter har alle læsioner, der omfatter den hippocampale formations CA1 område, og de har mere moderat amnesi end H.M. og E.P.

Patient G.D. Ligesom R.B. havde patienten G.D. en bilateral læsion, som primært var begrænset til hippocampus' CA1 område, hvilket førte til moderat anterograd amnesi og svag retrograd amnesi.

Patient L.M. Patienten L.M. havde en mere udbredt bilateral læsion af den hippocampale formation, hvilket involverede de hippocampale CA områder, gyrus dentatus og et begrænset omfang af celledød i entorhinal cortex. Ligesom R.B. og G.D. havde L.M. moderat

anterograd amnesi. Men han havde sværere og mere vidtrækkende retrograd amnesi, der strakte sig mindst 15 år tilbage. Denne amnesi var temporalt gradueret, således at erindringer tæt på læsionstidspunktet huskedes dårligere end erindringer længere tilbage.

Patient W.H. Patienten W.H. havde en mere distribueret skade i den hippocampale formation, hvilket involverede alle de hippocampale CA områder, gyrus dentatus, subiculum og entorhinal korteks's lag III, V og VI. W.H. havde sværere anterograd amnesi end nogen af de andre patienter, og han havde også lang temporalt gradueret retrograd amnesi strækkende sig mindst 25 år tilbage.

Sammen med de rapporterede fund fra R.B understøtter fundene fra patienterne G.D., L.M. og W.H. altså kraftigt teorien om, at den hippocampale formation er vigtig for deklarativ hukommelse.

På baggrund af disse, og mange andre, cases kan det konkluderes, at bilaterale læsioner begrænset til hippocampus' CA1 område er nok til at forårsage moderat anterograd amnesi, og at bilaterale læsioner i og omkring hippocampus, men stadig begrænset til den hippocampale region, kan forårsage sværere anterograd amnesi. Case studierne viser også, at bilaterale læsioner begrænset til den hippocampale region kan forårsage vidtrækkende temporalt gradueret retrograd amnesi, strækkende sig 15 eller flere år tilbage.

Patienterne H.M., E.P. og R.B. beskrives ofte som havende amnesi for deklarativ hukommelse, hvorfor det antages, at både episodisk og semantisk hukommelse afhænger af den hippocampale region. Denne antagelse er imidlertid problematisk, da fundene fra af en række studier af patienter med *udviklingsamnesi* synes at udgøre en undtagelse fra denne regel (Vargha-Khadem et al., 1997). Disse patienter er blevet undersøgt i deres tidlige voksenliv, men har pådraget sig bilaterale hippocampale skader i det første år af deres liv, som gennemsnitligt ramte ca. 40 % af hippocampus (Vargha-Kadem et al., 2001).

Tilegnelse af viden på trods af svær amnesi I modsætning til de tidligere beskrevne amnestiske patienter, har de udviklingsamnestiske patienter relativt bevaret semantisk hukommelse, og de har tilegnet sig en imponerende mængde viden om verden. De glemmer til gengæld ofte begivenheder fra hverdagen, hvilket antyder en udtalt episodisk

hukommelsesforstyrrelse. Den mest studerede af disse cases er Jon, som har over gennemsnitlig intelligens og præsterer normalt i sproglige og skolastiske tests, selvom han har haft udprægede problemer med at huske begivenheder fra dag til dag siden den tidlige barndom (ibid.). Det er muligt, at årsagen til at Jons evne til semantisk indlæring er markant bedre end hans evne til at huske begivenheder fra dag til dag er, at den tidlige hippocampale skade (i modsætning til den sene skade i de øvrige amnestiske patienter) giver mulighed for funktionel reorganisering i hjernen eller for udviklingen af effektive kompensationsstrategier. En alternativ forklaring er, at mennesker med udviklingsamnesi, med tilstrækkelig indsats og repetition, kan tilegne sig en større mængde semantisk viden. Dog kun set i forhold til, hvad der kan forventes på baggrund af deres episodiske hukommelsesforstyrrelse (Squire et al., 2004).

Hvad der yderligere problematiserer den generelle karakterisering af, at deklarativ hukommelse afhænger af den hippocampale region er, at selv de svært amnestiske patienter E.P. og H.M. også synes at have en bevaret evne til en semantisk indlæring, om end denne evne er meget begrænset. Stark og Squire (2000) har vist, at E.P. kan indlære ordstamme fuldendelses opgaver, og har udelukket at dette skyldes priming, og i et studie af Bayley og Squire (2002) har de vist, at E.P. kan tilegne sig fakta-lignende information i cued-genkaldelse og forced-choice opgaver. H.M. har også vist en begrænset evne til semantisk indlæring, idet han kan tegne gulvplanen over et hus, han er flyttet ind i efter læsionstidspunktet (Kolb & Whishaw, 2003) og han har lært betydningen af nye ord, som ikke var aktuelle før hans operation i 1953. Dette er ord som "transistor", "satellit", "månelanding" og "AIDS" (Andersen, 2005). Dette antyder, sammen med de udviklingsamnestiske cases, at selvom hippocampus er involveret i semantisk hukommelse, er den ikke *nødvendigt* for denne type hukommelse.

Selvom hippocampus' specifikke rolle i deklarativ hukommelse er diskutabel, bidrager case studierne med nogle væsentlige konklusioner. For det første synes de neurale mekanismer, som understøtter anterograd og retrograd amnesi at være, i det mindste delvist, forskellige, idet den anterograde amnesi i alle tilfælde er sværere end den retrograde. For det andet synes hukommelse for autobiografisk materiale at være forskellig fra hukommelse for fakta (episodisk vs. semantisk hukommelse), idet nogle patienter har sværere forstyrrelse i episodisk end semantisk hukommelse. Der findes også evidens for, at hukommelse for tidlige

livsbegivenheder er forskellige fra senere livsbegivenheder, da patienter med retrograd amnesi har bevaret deres tidlige erindringer. Desuden ser semantisk hukommelse ud til at være bevaret i patienter, som har været udsat for tidlige læsioner i forhold til patienter, som har været udsat for læsioner senere i livet. Med træning ser det ud til, at, selv svært amnestiske patienter kan udvise en bevaret evne til semantisk indlæring. De væsentligste fund fra de amnestiske cases er opsummeret i *tabel 1*.

Patient	Anterograd amnesi	Retrograd amnesi	Skade på den hippocampale formation
H.M.	Svær	Svær	amygdaloide kompleks, entorhinal kortex, den hippocampale formation
E.P.	Svær	Svær	amygdala, hippocampus, entorhinal kortex, perirhinal kortex, parahippocampale kortex
R.B.	Moderat	Let	CA1 området
G.D.	Moderat	Let (?)	CA1 området
L.M.	Moderat	Svær	CA1, CA2, CA 3 områderne, gyrus dentatus, entorhinal kortex
W.H.	Svær	Svær	CA1, CA2, CA 3 områderne, gyrus dentatus, subikulum, entorhinal kortex

Tabel 1 Opsummering af neuropsykologiske og patologiske fund fra amnestiske cases med bilaterale skader i MTL.

Fundene fra de amnestiske cases synes i god overensstemmelse med de tidlige amnestiske symptomer i AD, og de støtter de patologiske stadieteoriers antagelse om, at det er den tidlige skade i den hippocampale region, specielt entorhinal kortex, som er ansvarlig for denne amnesi (Braak & Braak, 1995). Da stort set al information til og fra den hippocampale formation går gennem entorhinal kortex (jf. *figur 6*), resulterer denne skade i, at hippocampus mere eller mindre isoleres fra resten af hjernen.

Siden det første studie af H.M. har der været brug for mere systematisk at studere MTL's anatomi og de forskellige strukturers mere specifikke funktion i hukommelse. Dette har ført til etableringen af en eksperimentel dyremodel for amnesi.

1.2.5. En dyremodel for amnesi

I løbet af de sidste to årtier har arbejdet med ikke-menneskelige primater resulteret i etableringen af en dyremodel for amnesi og i identifikationen af det system af strukturer i

MTL, som er essentielle for deklarativ hukommelse (Alvarez-Royo et al., 1992). Udviklingen af denne dyremodel gjorde det muligt systematisk at undersøge hvilke anatomiske strukturer, der er vigtige for hukommelse. Forskningsstrategien var ligefrem: Aber blev påført bilaterale, kontrollerede læsioner, som var begrænset til en bestemt struktur eller bestemte strukturer i MTL. Effekten af fjernelsen af disse strukturer blev herefter bestemt kvantitativt ved at vurdere abernes præstation på opgaver, som er identiske med opgaver, der bruges til at vurdere hukommelsesforstyrrelse i mennesker.

En dyremodel inspireret af H.M. Udviklingen af dyremodellen for amnesi begyndte med, at man lavede bilaterale læsioner af temporallappen, som tilnærmede sig skaden, som den svært amnestiske patient H.M. var udsat for (Mishkin, 1978; Squire & Zola-Morgan, 1988). Disse læsioner blev påført aberne gennem et kirurgisk indgreb gennem den ventrale overflade af temporallappen, og det læderede område inkluderede den hippocampale formation og amygdala. Dette er blevet kaldt en H^+A^+ læsion. 'H' refererer til hippocampus, 'A' refererer til amygdala og '+' til de kortikale områder omkring hippocampus og amygdala (Zola-Morgan et al., 1993). H^+A^+ læsionen i aber reproducerede mange af de væsentlige hukommelsesproblemer som blev observeret hos patienten H.M. og andre amnestiske patienter (jf. afsnit 1.2.4.). Ligesom amnestiske patienter var aberne alvorligt svækkede i en række hukommelsestests, men havde bevaret evne til at tilegne sig og opretholde færdigheder (Zola-Morgan & Squire, 1985, Alvarez-Royo et al., 1992).

Delayed (non)match to sample testning Siden disse første studier har forskere systematisk undersøgt effekten af at lædere forskellige strukturer i MTL. Studierne er baserede på disse læsioners forringelse af abernes præstation i specielt *delayed non-match to sample* (DNMS) og *delayed match to sample* (DMS) testene, hvilket er tests, der bruges til at teste visuel hukommelse i mennesker og dyr (Alvarez et al., 1994). DNMS og DMS opgaver kræver, at forsøgsdyret skal holde et visuelt stimulus i hukommelsen over en delay periode, før det responderer på et valg-stimuli. Efter delay perioden præsenteres forsøgsdyret for to stimuli. Et af dem er det stimulus, som blev præsenteret tidligere (samplet), og det andet er et nyt stimulus (non-matching). I DNMS paradigmet skal forsøgsdyret nu vælge det nye stimulus, og i DMS skal det vælge det tidligere præsenterede stimulus. Disse opgaver klassificeres som visuelle genkendelsesopgaver, da de kræver, at forsøgsdyret kan (1) genkende objekter og (2)

genkende et givent objekt i en given kontekst. Ved DNMS og DMS i aber præsenteres aben først for et objekt, og aben skal flytte dette objekt for at modtage en belønning (mad). Efter et delay præsenteres det samme objekt ved siden af et nyt objekt, og aben skal lære at flytte det nye (DNMS) eller det tidligere præsenterede (DMS) objekt for at modtage endnu en belønning (Kolb & Whishaw, 2003).

I modsætning til Mishkins oprindelige hypotese om, at både amygdala og hippocampus er involverede i, og nødvendige for, at udføre denne type hukommelsestests (Mishkin, 1978), har efterfølgende studier vist, at amygdala-skader ikke *alene* compromitterer abernes evne til at udføre testene (Zola-Morgan et al., 1989b). Skader begrænset til den hippocampale region (H) er nok til at forårsage signifikant forringelse af abernes præstation i testene (Alvarez et al., 1995; Zola-Morgan & Squire, 1986; Beason-Held et al., 1999). Men abernes præstation i testene bliver dårligere jo flere strukturer i MTL's hukommelsessystem, der skades. Eksempelvis hvis den hippocampale region plus den omkringliggende entorhinale og parahippocampale korteks læderes (H^+) (Mishkin, 1978; Zola-Morgan & Squire, 1986; Zola-Morgan et al., 1989a; Alvarez et al., 1994; Alvarez et al., 1995), eller endnu værre, hvis den hippocampale region plus alle de omkringliggende kortikale regioner, altså perirhinal, entorhinal og parahippocampal korteks læderes (H^{++}) (Zola-Morgan et al., 1993).

En dyremodel inspireret af R.B. Inspireret af den amnestiske patient R.B. har Zola-Morgan *et al.* (1992) også udviklet en dyremodel for cerebral iskæmi i aber, for på denne måde mere systematisk at kunne undersøge effekten af iskæmisk hjerneskade på hukommelsesfunktionen. Aberne blev udsat for 15 minutters reversibel iskæmi gennem en non-invasiv teknik, som involverede okklusion af begge carotis-arterier og farmakologisk induceret hypotension. Den iskæmiske læsion (ISC læsion) resulterede i signifikant bilateralt tab af neuroner i hippocampus' CA1 og CA2 områder, men også i tab af neuroner i hilus og gyrus dentatus. Disse abers præstation på DNMS testen var sammenlignelige med aber med H^+ læsioner. Men på to andre hukommelsestests var deres præstation bedre end de H^+ læderede abers. At iskæmiske læsioner resulterer i lettere overordnet hukommelsesforstyrrelse end H^+ læsioner indikerer, at de iskæmiske aber (og i forlængelse af dette patient R.B.) ikke har en mere diffus og omfattende neural dysfunktion, som ikke blev opdaget ved den histologiske undersøgelse. Disse resultater bidrager dermed med yderligere evidens for, at

hippocampus er et centralt område for patologiske ændringer ved cerebral iskæmi, og at skade begrænset til hippocampus er nok til at nedsætte hukommelsen (Zola-Morgan et al., 1992). I tabel 2 er nogle af de vigtigste fund, der har ført til dyremodellen for amnesi opsummeret.

Læsion af	Forkortelse	Referencer
Hippocampus	H læsion / ISC læsion	<i>Zola- Alvarez-Royo, 1991; Alvarez et al., 1995; Morgan & Squire, 1986; Zola-Morgan et al., 1992</i>
Hippocampale formation & parahippocampal kortex	H ⁺ læsion	<i>Mishkin, 1978; Zola-Morgan & Squire, 1986; Zola-Morgan et al., 1989</i>
H ⁺ læsion plus entorhinal & perirhinal kortex	H ⁺⁺ læsion	<i>Zola-Morgan et al., 1993</i>
Hippocampale formation, amygdala, perirhinal & parahippocampal kortex	H ⁺ A ⁺ læsion	<i>Squire & Zola-Morgan, 1988</i>

Tabel 2 Opsummering af nogle af de vigtigste fund, der har ført til dyremodellen for amnestisk syndrom.

Fundene fra disse studier understøtter altså kraftigt hippocampus', og de omkringliggende kortikale strukturers, centrale rolle i deklarativ hukommelse. Der synes god overensstemmelse mellem abestudierne og studierne af amnestiske cases, idet de amnestiske patienter, som har læsioner i både hippocampus og den omkringliggende kortex, ligesom de læderede aber, har en sværere hukommelsesforstyrrelse end dem, som har en læsion, der er begrænset til hippocampus alene. Desuden findes der evidens for at abemodellen, ligesom de amnestiske patienter, kan have temporalt graderet retrograd amnesi (jf. afsnit 1.3.4.) (Squire et al., 2004). På samme måde som de amnestiske cases understøtter dyremodellen for amnesi altså også de patologiske stadieteoriers antagelse om, at den tidlige skade i den hippocampale region er årsagen til de tidlige amnestiske symptomer i AD.

Når man undersøger MTL's bidrag til deklarativ hukommelse, er et afgørende spørgsmål også, hvordan MTL bidrager til mere specifikke hukommelsesprocesser. Deklarativ hukommelsesforstyrrelse kan skyldes en forstyrrelse af MTL's bidrag til indprentning, konsolidering eller genkaldelse af hukommelse, eller en kombination af alle disse hukommelsesprocesser (Cameron et al., 2001). Studier med event-relaterede potentialer og funktionelle billeddannelsesstudier med PET og fMRI gør det muligt separat at måle hjerneaktivitet i hukommelsesprocessens indkodnings- og genkaldelsesstadiet i mennesker, der udfører forskellige hukommelsestests.

1.2.6. Studier med event-relaterede potentialer

Målinger fra patienter med implanterede elektroder i hjernen giver en sjælden mulighed for at observere den humane hippocampus i aktion. Når en gruppe neuroner inden for en passende geografisk afstand aktiveres samtidig, kan de generere et ekstracellulært elektrisk potentiale, som kan måles i event-relaterede potentialer (ERP'er) (Paller & McCarthy, 2002). De undersøgte patienter er epilepsipatienter, som har fået implanteret dybdeelektroder som led i den kliniske evaluering, der skal bestemme, om de skal have foretaget et kirurgisk indgreb for at lindre epilepsien (Cameron et al., 2001).

ERP'er blev først målt i hippocampus på en gruppe patienter, der udførte en kategoriseringsopgave (Halgren et al., 1980; McCarthy et al., 1989). Der blev observeret et mønster af ERP'er i MTL, hvilket angiveligt er genereret af den samtidige aktivering af spatialt grupperede hippocampale pyramideceller. Dette mønster var ens for både tidligere præsenterede begivenheder og mere sjældne begivenheder i et simpelt kategoriseringsparadigme (Halgren et al., 1980; McCarthy et al., 1989). Dette antyder, at hippocampale pyramideceller er involverede i deklarative hukommelsesprocesser, men det siger ikke noget om hvordan. Et senere studie giver større indsigt i, hvordan de hippocampale pyramideceller er involveret i deklarativ hukommelse.

Paller og McCarthy (2002) målte ERP'er i patienter, som udførte en DMS opgave, der svarede til den, som er blevet brugt til at vise deklarativ hukommelsesforstyrrelse i amnestiske patienter og læderede aber (jf. afsnit 1.2.4. og 1.2.5.). De fandt de højeste amplituder 300-500 millisekunder efter præsenteringen af et stimulus, og disse var i alle tilfælde størst ved præsenteringen af indlæringsstimuli frem for præsenteringen af valg-stimuli. Mønstrene af ERP gradienter observeret mellem tilstødende hippocampale elektroder og lokaliseringen af maximale amplituder antyder, at disse potentialer blev produceret i den posteriore del af hippocampus. Disse ERP'er indikerer, at hippocampale pyramideceller har en indprentningsfunktion for begivenheder, som senere skal huskes (Paller & McCarthy, 2002). Disse resultater støtter altså antagelsen om, at grupper af hippocampale pyramideceller er involverede i deklarativ hukommelse, og mere specifikt ser det ud til, at celler i den posteriore del af hippocampus er involveret i indprentningen af deklarativ hukommelse.

Denne antagelse støttes af et studie af Cameron *et al.* (2001), hvor de fandt, at de hippocampale neuroners respons under indprentning af associerede ordpar kunne forudsige, om forsøgspersonerne senere ville huske ordparrene korrekt. De fandt desuden, at neural aktivitet i entorhinal korteks var korreleret med genkaldessucces. Disse data antyder derfor, at hippocampus spiller en afgørende rolle i indprentning af deklarativ hukommelse, hvorimod entorhinal korteks spiller en mere afgørende rolle i genkaldelse.

Disse studier af ERP'er bidrager – helt ned på enkeltcelle-niveau - med evidens for, at MTL er involveret i deklarativ hukommelse, og desuden antyder de, at celler i forskellige strukturer i MTL bidrager forskelligt til indprentning og genkaldelse af denne hukommelse. Dette stemmer i høj grad overens med fundene fra PET og fMRI studier, som har impliceret forskellige strukturer i MTL i indprentning og genkaldelse af episodisk hukommelse.

1.2.7. Studier med funktionel billeddannelse

Der er en øget interesse i at bruge funktionelle billeddannelsesteknikker til at undersøge mere specifikke funktioner i MTL og den mulige opdeling af funktioner i denne region. Mange PET og fMRI studier af MTL's funktioner har fokuseret på opdelingen i indprentning og genkaldelse af hukommelse. Disse studier har bidraget med overbevisende evidens for, at aktiviteten i MTL ændres under indprentning og genkaldelse af hukommelse (Lepage *et al.*, 1998; Schacter & Wagner, 1999; Greicius *et al.*, 2003).

I 1998 udførte Lepage *et al.* en metaanalyse over 52 publicerede PET studier om hippocampus og dens aktivering under indprentning og genkaldelse af hukommelse. De rapporterede at hippocampal aktivering, som var associeret med indprentning af episodisk hukommelse, primært var lokaliseret i den anteriore del af den hippocampale region, hvorimod aktivering associeret med genkaldelse af episodisk hukommelse primært var lokaliseret i den posteriore del. De refererede til dette mønster af anterior indprentningsrelateret og posterior genkaldelsesrelateret PET aktivering, som HIPER modellen (Hippocampal Encoding/Retrieval Model) (Lepage *et al.*, 1998). Modellen antyder en opdeling af hukommelsesfunktioner i den anteriore og posteriore del af den hippocampale formation.

I 1999 udførte Schacter og Wagner imidlertid en anden metaanalyse over MTL's aktivering i indprentning og genkaldelse af episodisk hukommelse. De gennemgik data fra fMRI og PET studier og interessant nok fandt de, i modsætning til Lepage *et al.*, at de fleste fMRI studier viste størst aktivitet i den posteriore del af MTL under indprentning. Dette er i overensstemmelse med fundene fra Paller og McCarthys (2002) ERP studie (jf. afsnit 1.2.6.), men det er i direkte modstrid med Lepage *et al.*'s fund. Efter at have overvejet evidensen fra Lepage *et al.*'s metaanalyse og andre studier, konkluderede de derfor, at PET studier af indprentning afslører *både* anterior og posterior aktivering af MTL, hvilket umiddelbart overvinder de modsatrettede fund (Schacter & Wagner, 1999). fMRI studierne støtter imidlertid konklusionen om, at den posteriore del af MTL er associeret med indprentning af episodisk hukommelse. For få fMRI studier af MTL's aktivering under genkaldelse er rapporteret til at drage faste konklusioner om den præcise lokalisering af denne hukommelsesproces (Schacter & Wagner, 1999).

Selv om der ikke kan drages faste konklusioner på baggrund af disse metaanalyser af PET og fMRI data, ser det altså ud til, at både den anteriore og posteriore del af MTL er involveret i indprentningen og genkaldelsen af episodisk hukommelse, hvilket også er konklusionen i et nyere fMRI studie af Greicius *et al.* (2003). Der findes imidlertid andre fMRI studier, som støtter HIPER modellens opdeling af funktioner i den anteriore og posteriore del af den hippocampale formation (Zeineh *et al.*, 2003; Prince *et al.*, 2005). Baggrunden for de blandede resultater kan være, at lokaliseringen af funktioner i en posterior og anterior region er for grov, og at denne forklaringsmodel dermed er for simpel (Squire *et al.*, 2004).

Yderligere studier, der benytter mere følsomme teknikker, som kan lave en bedre anatomisk opdeling af MTL, synes afgørende for videre forskning. Dette vil også være relevant for forståelsen af den tidlige amnesi i AD, da der findes evidens for, at denne amnesi skyldes indprentningsvanskeligheder (Dick *et al.*, 1989; Greene *et al.*, 1996), mens genkaldelsesdefekter ikke bidrager væsentligt til de amnestiske symptomer (Delis *et al.*, 1991).

Mange billeddannelsesstudier har også fokuseret på den præfrontale cortex's (PFC) rolle i indprentning af deklarativ hukommelse. Selvom fundene fra neuropsykologien ikke oprindeligt har peget på PFC som et grundlag for indprentning af deklarativ hukommelse, har

billeddannelsesstudier gentagne gange impliceret PFC i denne proces (Paller & Wagner, 2002). Dette har medført en lang debat om PFC's rolle i deklarativ hukommelse – specielt set i forhold til den veletablerede viden om MTL's rolle i denne type hukommelse. I et studie af Reber *et al.* (2002) foreslår de imidlertid, at PFC ikke skal forstås som et neuralt grundlag for deklarativ hukommelse, men derimod som havende en modulerende rolle på den indprentning af deklarativ hukommelse, som foregår i MTL. PFC antages at være impliceret i forskellige indprentningsstrategier, som øger den korrekte genkaldelse af hukommelsesstoffet. Dette stemmer umiddelbart bedre overens med fundene fra neuropsykologien og gør antagelsen om PFC's implikation i deklarativ hukommelse mindre kontroversiel.

1.2.8. Opsummering

Hippocampus og de omkringliggende strukturer i MTL spiller en afgørende rolle i deklarativ hukommelse, og en skade i disse strukturer kan medføre amnesi. Denne viden stammer bl.a. fra casestudier af amnestiske patienter. Disse patienter har alle anterograd og forskellige grader af retrograd amnesi for deklarativ hukommelse. En undtagelse er dog udviklingsamnestiske patienter, som tilsyneladende har bevaret semantik hukommelse på trods af udtalt episodisk amnesi. Fundene fra de amnestiske cases støttes af eksperimentelle læsionsstudier i aber, som ligefrem har resulteret i en dyremodel for amnesi. Dyremodellen har gjort det muligt eksperimentelt at undersøge de neurale strukturer og systemer i MTL, som understøtter deklarativ hukommelse. Undersøgelsen af de mere specifikke funktioner i deklarativ hukommelse og deres lokalisering i MTL er blevet foretaget ved hjælp af ERP studier og studier med funktionel billeddannelse. Konklusionerne fra disse studier er endnu uafklarede, men de kobler både indprentning og genkaldelse af deklarativ hukommelse til MTL.

På baggrund af denne gennemgang af evidensen for hippocampus' rolle i amnesi bør den kognitive test til validering af dyremodellen for AD i Göttingen minigrisen være en test, der er sensitiv over for deklarativ hukommelsesforstyrrelse på baggrund af hippocampal skade. Dette er relevant for valideringen af dyremodellen, da den tidlige atrofi i den hippocampale region, ifølge de patologiske stadieteorier, er årsagen til de tidlige amnestiske symptomer i AD.

1.3. Studiets formål

Der findes en række neuropsykologiske tests, som er sensitive over for hippocampale skader i dyr. De fleste af disse tests er imidlertid aldrig blevet benyttet i studier med grise. Så for at kunne bruge en af testene til validering af dyremodellen for AD, må det først undersøges, hvorvidt det er muligt at overføre denne test til Göttingen minigrisen.

I dette speciale forsøges det at overføre en veletableret neuropsykologisk test til Göttingen minigrisen, som er sensitiv over for episodisk hukommelsesforstyrrelse og hippocampale læsioner. DNMS testen er den mest benyttede test inden for den dyreeksperimentelle hukommelsesforskning (Gallagher & Rapp, 1997), hvorfor der arbejdes med en modificeret udgave af denne test, som passer bedre til grisens fysik og præferencer. Testen antages at måle et korrelat for episodisk hukommelse og er hippocampus-afhængig i lang række modaliteter og dyr - herunder mennesker.

Der benyttes en T-lignende maze til DNMS testningen, da Göttingen minigrise i tidligere studier har vist en præference for spatiale opgaver (Moustgaard et al, 2005) og en villighed til at løse maze-baserede opgaver (Mendl et al., 1997; Laughlin et al., 1999; Bolhuis et al., 2004; Hagl et al., 2005). Denne type opgave kan - som i dette studie - karakteriseres som en spatial DNMS opgave (Shaw & Aggleton, 1993), men andre karakteriserer opgaven som en delayed forced alternation opgave (Dudchenko, 2001; 2004). Denne type opgave har vist sig at være meget sensitiv over for hippocampale læsioner i rotter, hvorfor den ligefrem benyttes som "adfærdshistologi" til vurdering af effekten af intenderede hippocampale læsioner (Dudchenko, 2001). Den benyttede maze er en forstørret version af en maze, som Ladieu (1944) tidligere har benyttet i studier med rotter. Forsøgsdyrene var 8 Göttingen minigrise, som alle var udvoksede orner. De skulle alle indlære DNMS opgaven, hvorefter de blev delt op i en testgruppe, som blev injiceret med skopolamin for at skabe en reversibel dysfunktion i hippocampus, og en kontrolgruppe, der blev injiceret med saltvand. De to grupper blev derefter testet med forskellige delays for at undersøge skopolamins effekt på hukommelsesfunktionen (dette beskrives detaljeret i kapitel 2.)

Det forventedes at grisene ville indlære den spatiale DNMS opgave ud fra en indlæringskurve, som ligger på et niveau mellem rotters og abers, at delayets længde ville have en indflydelse på grisenes præstation på opgaven, og at de skopolamin-behandlede grises præstation ville forringes signifikant i forhold til kontrolgruppens.

Kapitel 2

Metode

Den kognitive test til Göttingen minigrisene er baseret på DNMS paradigmet, som blev beskrevet i afsnit 1.2.5. I modsætning til det oprindelige paradigme, som er baseret på den visuelle modalitet, testes grisene i dette studie i den spatiale modalitet.

2.1. Forsøgsdyr

Forsøgsdyrene bestod af 8 eksperimentelt naive Göttingen minigrise (Ellegaard Göttingen minigrise, Dalmose, Danmark), som alle var orner. Ved forsøgets begyndelse var de 12-14 måneder gamle og vejede i gennemsnit 20 kg., med en spredning på 15-27 kg. For at kunne kende forskel på grisene, blev de øremærket med numrene 1-8.



Figur 7 Billeder af Göttingen minigrisen.

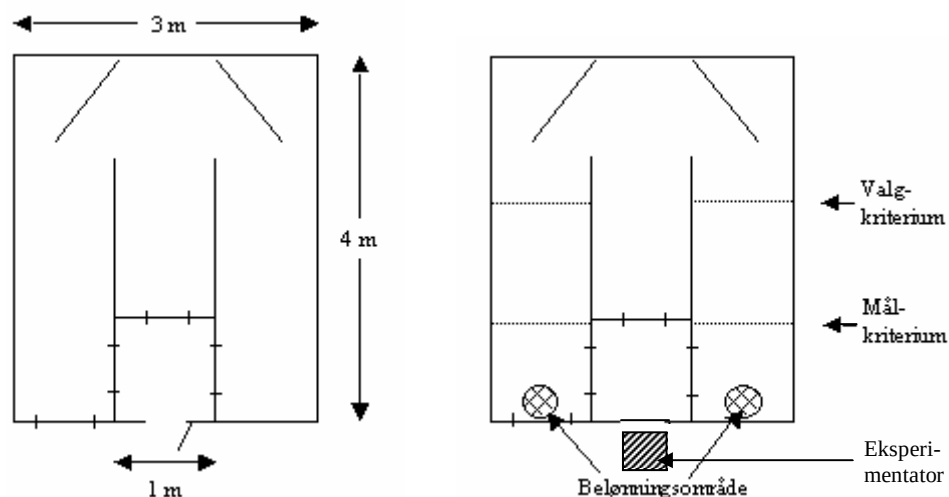
Grisene var opstaldet i to grupper á fire i adskilte båse på 2 m. x 3 m. med et underlag bestående af savsmuld og strå. Båsene var beriget med kognitiv stimulation i form af bolde og nogle gange en tom fodersæk. Stalden var oplyst med elektrisk lys fra kl. 7.00 om morgenen til kl. 15.00 om eftermiddagen, men naturligt lys kunne også komme ind gennem staldens vinduer. Grisene blev foderdepriveret på et 70%-niveau i forhold til den anbefalede daglige mængde foder, hvilket er et normalt depriverings-niveau i studier med fødemotiveret indlæring i grise (Klopfer, 1966; Moustgaard et al., 2004). Ud over deres standard diæt blev

grisene belønnet med foder opblødt i vand, som de modtog i små doser i forbindelse med den daglige træning.

Grisene blev fodret om morgenen og eftermiddagen, og træningssessionerne blev altid udført der imellem. Grisene blev fodret i grupper, og foderet blev spredt ud over båsens gulv. Vand var altid tilgængeligt. Forsøget er godkendt af Dyreforsøgstilsynet under tilladelse 2003/561-745.

2.2. Apparatur

Grisene blev trænet i en T-lignende maze, som var konstrueret af træplader i mørkebrunt finer. Mazen var 1.20 m. høj og havde et gulvareal på 3 m. x 4 m. (jf. figur 8). Gangene var 1 m. brede, og startboksens areal var 1 m. x 1 m. Grisene blev lukket ind i mazen via en dør i startboksens bagende. Startboksen havde tre guillotinedøre, som hver især kunne åbnes ved at trække i et reb. Begge mazens arme kunne aflukkes med en svingdør. I mazens venstre arm var der indsat en dør, så eksperimentator havde adgang til mazen. Der blev taget tid på grisenes test trials med et stopur. Valgkriterier og målkriterier var markeret med streger i gulvet (jf. figur 8), og området omkring valgkriteriet blev overvåget med et videokamera, som var tilsluttet en monitor.

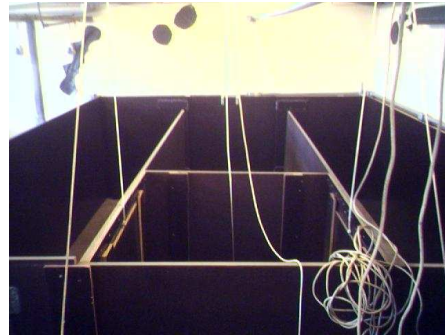


Figur 8 Illustration af mazen til den spatiale DNMS procedure. Til venstre ses en skitse af mazen med mål og døre markeret. Til højre ses en illustration af mazen med markering af valgkriterier, målkriterier, belønningsområder og eksperimentators position bag ved startboksen.

Mazen blev opbevaret i samme stald, som grisene var opstaldet i. Grisenes båse var imidlertid lokaliseret bag mazens bagende, så eventuelle olfaktoriske og/eller auditive cues fra båsene

skulle være udelukket. Mazon var åben, men var dog så høj at den hindrede udsynet til størstedelen af stalden. Grisene havde imidlertid frit udsyn til staldens vægge og loft, hvor der var placeret tydelige ekstra maze cues i form af forskellige mønstre, der var klippet ud af sorte affaldssække (jf. figur 9).

Figur 9 Billede der illustrerer eksperimentators udsyn til den faktiske maze fra hans position bag startboksen. Reb til at hæve startboksens guillotinedøre og ledninger til monitoren ses i forgrunden. I baggrunden kan mazens omgivelser med ekstra maze cues svagt skimtes.



2.3. Procedure

Træningsproceduren er opsummeret i figur 10.

Figur 10 Oversigt over forsøgets træningsfaser.

Oversigt over træningsfaser

1. Habituering til eksperimentator
20 min. pr. session
2. Habituering til mazen
10 min. pr. session
3. Shaping – første fase
Grisene trænes til at gå ned ad mazens arme
10 trials pr. session
4. Shaping – anden fase
Grisene trænes til at gå ind i startboksen
10 trials pr. session
5. DNMS procedure
5 træningstrials pr. dag
Kriterium: 80% korrekte trials
6. Test af skopolamins effekt på DNMS opgaven
med forskellige delays (60 s, 300 s og 900 s)
Opdeling i test og kontrolgruppe
5 træningstrials pr. dag

2.3.1. Habituering til eksperimentator

Grisene blev først habitueret til eksperimentator, ved at eksperimentator opholdt sig i båsene og spredte små doser foder omkring sig, så grisene vænnede sig til eksperimentators tilstedeværelse og forbandt ham med foderbelønning (én daglig session på 20 minutter i 10 dage).

2.3.2. Habituering til maze

Grisene blev herefter habitueret til at gå fra båsen til mazen og ind i startboksen (de blev ledt med foder). Herefter blev de habitueret til at opholde sig i mazen. Foder var spredt ud over mazen som reinforce, og alle mazens guillotinedøre og svingdøre var åbne. Hver gris fik lov til at eksplorere i mazen 10 minutter pr. dag i 2 dage.

2.3.3. Shaping – første fase

Den første shaping-fase bestod af, at grisene blev trænet til at gå ned ad mazens arme. Der udførtes 10 trials pr. dag i 2 dage, hvor grisene blev trænet til at gå ind i den åbne arm (den anden arm var lukket med en svingdør). Hver trial udførtes ved at placere grisen i startboksen og med det samme åbne guillotinedøren. Grisen reforceredes (1 spsk. opblødt foder), når den kom frem til enden af den åbne arm. Derefter blev grisen ledt ind i startboksen og reforceret igen (½ tsk. opblødt foder). Om den venstre eller højre arm var åben, besluttedes ud fra et pseudorandomiseret skema (www.random.org/sform.html).

2.3.4. Shaping – anden fase

I den anden shaping-fase blev grisene trænet til at gå ind i startboksen, når de kom frem til enden af den åbne arm. Proceduren var den samme som i første shaping-fase, men grisene blev nu først reforceret (1 spsk. opblødt foder), når de af sig selv var gået ind i startboksen. Der udførtes 10 trials pr. dag i 2 dage.

2.3.5. DNMS procedure

Hver træningstrial bestod af en samplefase og en testfase. Under disse faser var eksperimentator altid positioneret bag ved startboksen, hvorfra han kunne betjene startboksens guillotinedøre og belønne grisen. Træningsproceduren blev initieret ved at lukke grisen ind i startboksen, åbne den midterste guillotinedør og vente indtil den gik ind i mazen. Under samplefasen blev grisen tvunget til at gå ned ad én af mazens arme ved at lukke svingdøren til den anden arm. Om det var den ene eller den anden arm, der var lukket, varieredes ud fra et pseudorandomiseret skema (se bilag 3) (www.random.org/sform.html). Grisen blev herefter lukket ind i startboksen med guillotinedørene lukket. Under delay-perioden gik eksperimentator ind i mazen og åbnede begge mazens arme. Desuden gik han ned ad begge mazens arme og spulede mazens "T-kryds" med koldt vand for at forhindre eventuelle olfaktoriske cues. Efter delay-perioden åbnedes startboksens midterste guillotinedør, så grisen kunne gå ind i mazen.

Når grisen trådte over en af stregerne for valgkriteriet med begge forben, blev den noteret for at have valgt den pågældende arm, uanset testfasens videre forløb (jf. figur 8). Dette blev overvåget af et videokamera tilsluttet en monitor, så eksperimentator kunne holde opsyn med grisens valg uden at flytte sig fra sin position bag startboksen. Eksperimentator var altid positioneret bag startboksen, i samme afstand fra mazens venstre og højre arm, for at udelukke eventuelle visuelle, auditive og/eller olfaktoriske cues på baggrund af eksperimentators placering. Når grisen trådte over stregen for målkriteriet i den arm, den ikke havde været i under samplefasen, blev den reforceret (1 spsk. opblødt foder) og tiden blev noteret. Denne reforcering blev først præsenteret, når grisen nåede frem til målkriteriet, hvilket yderligere var med til at udelukke olfaktoriske cues fra foderet. Grisen fik højest lov til at opholde sig i mazen i 180 sekunder. Hvis den ikke nåede frem til målkriteriet inden for denne tidsramme, fik den noteret maksimum tid og blev ledt til enden af den rigtige arm og reforceret (jf. Bolhuis et al., 2004). Derefter blev grisen lukket ind i startboksen, hvor den ventede indtil næste trial. Grisene blev altid reforceret når de gik ind i startboksen ($\frac{1}{2}$ tsk. opblødt foder).

Der blev foretaget 5 træningstrials pr. dag ud fra en cyklus med 5 dages træning efterfulgt af 2 dages pause, indtil grisene opnåede kriteriet for indlæring af opgaven (80% korrekte

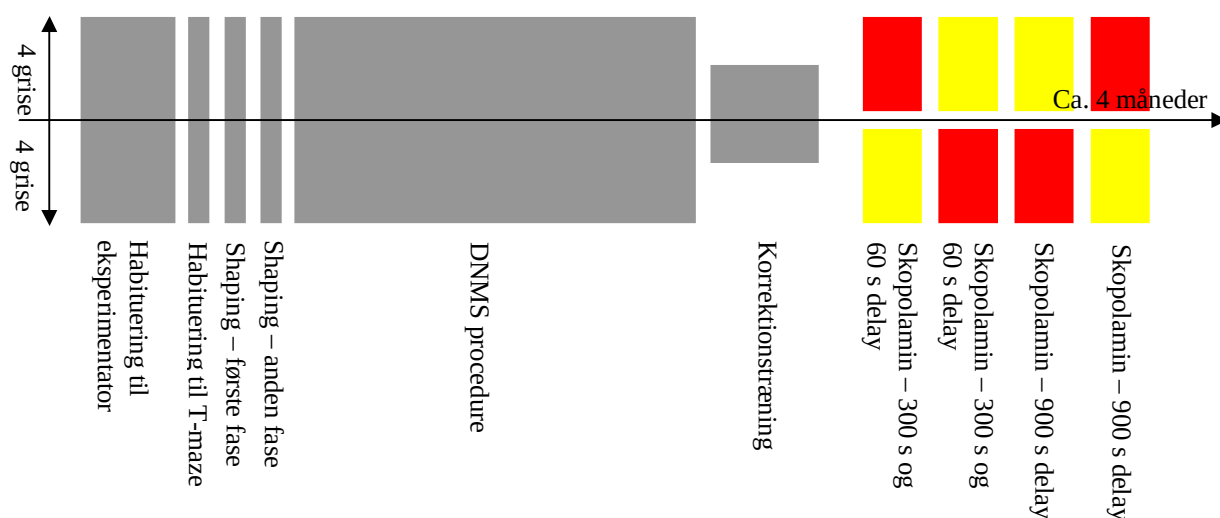
gennemløb på 25 trials) med en 60 sekunders delay-periode indsat mellem sample og testfase. Dette delay blev valgt på baggrund af et studie med rotter som viser, at et delay af denne længde er tilstrækkeligt til at udelukke, at forsøgsdyret benytter en "arbejdshukommelsesstrategi" til at løse opgaven, hvor det blot holder gennemløbet fra samplefasen aktivt i korttidshukommelsen, uden at der foregår nogen egentlig lagring af dette i langtidshukommelsen (Clark et al., 2001). Rækkefølgen for testning af grisene blev varieret, så det ikke var den samme gris, der blev testet først henholdsvis sidst på testdagene. Denne variation blev foretaget ud fra en latin square randomisering. Baseret på et tidligere abestudie (Murray et al., 1989) blev der foretaget korrektionstræning med de grise, som ikke havde opnået kriteriet indenfor 150 trials. Efter et forkert gennemløb fik nu grisen lov til at gentage gennemløbet – både samplefase og testfase - igen og igen, indtil den valgte den korrekte arm. På disse korrektionstrials blev der ikke præsenteret opblødt foder i startboksen under samplefasen eller ved forkerte valg under valgfase. Men den sædvanlige reforcering af opblødt foder blev præsenteret når grisen valgte den korrekte arm. Efter hver enkelt gris havde opnået kriteriet for indlæring af opgaven, blev den stadig trænet regelmæssigt for at opretholde dens præstationsniveau, indtil den skulle testes med skopolamin.

2.3.6. Test af skopolamins effekt på DNMS opgaven med forskellige delays

Efter alle grisene havde opnået kriteriet for indlæring af DNMS opgaven med et 60 sekunders delay indsat mellem sample- og testfasen, blev skopolamins effekt på DNMS opgaven undersøgt med delays på 60 sekunder, 300 sekunder og 900 sekunder. Skopolamin er et stof, som har vist reduceret indlæring og hukommelse i både raske forsøgspersoner og forskellige arter dyr (Ogasawara et al., 1995) (skopolamins effekt på hukommelse beskrives mere detaljeret i afsnit 4.1.2.). Grisene blev tilfældigt opdelt i to grupper med fire grise i hver. Den ene gruppe udgjorde testgruppen, som hver testdag blev injiceret med skopolamin. Den anden gruppe udgjorde en kontrolgruppe, som hver testdag blev injiceret med saltvand.

Eksperimentator havde ikke kendskab til hvilke grise, der tilhørte henholdsvis testgruppen og kontrolgruppen, hvorfor dette studie kan karakteriseres som et dobbeltblindt studie. Først blev de to grupper testet 25 trials med 300 sekunders og 25 trials 60 sekunders delay, hvorefter der blev byttet om på, hvilken gruppe der fik skopolamin og saltvand og testet 25 trials med hver af de to delays igen. Disse to delays blev testet sideløbende, således at der blev testet med 300 sekunders delay om formiddagen og 60 sekunders delay om eftermiddagen. Herefter blev de

to grupper testet 25 trials med 900 sekunders delay, hvorefter der igen blev byttet om på, hvilken gruppe der fik skopolamin og saltvand (jf. *figur 11*). Dermed blev alle grisene testet både med og uden injektion af skopolamin på de tre delays. Dette er afgørende for testens statistiske styrke, da grisene dermed kunne virke som kontrolgruppe for dem selv (jf. afsnit 2.5.). For at sikre en tilstrækkelig udvaskelse af stoffet fik grisene lov til at hvile i to dage, før der blev byttet om på hvilken gruppe, der fik skopolamin (Rosier et al., 1999).



Figur 11 Tidslinie over eksperimentets forskellige faser. ■ : Injiceret med saltvand. ■ : Injiceret med skopolamin. ■ : Træningsprocedurer uden injektion.

2.4. Administration af skopolamin

Under testningen med skopolamin blev grisene løbende vejet, og dosis injiceret skopolamin blev reguleret efter eventuelle vægtændringer (se bilag 4). Hver testdag blev grisene 15-30 minutter før adfærdstestningen begyndte injiceret med 0,05 mg./kg.³ skopolamin (scopolamine hydrobromide, SIGMA) eller saltvand afhængigt af, om de tilhørte testgruppen eller kontrolgruppen. Injektionerne blev givet intramuskulært af personalet på den Kongelige Veterinær- og Landbohøjskole (KVL) og foregik uden eksperimentators tilstedeværelse for at undgå, at grisene u hensigtsmæssigt blev bange for ham. Da der ikke findes farmakokinetiske data for skopolamin i grise, er injektionstidspunktet baseret på humane data, hvor den maksimale serum koncentration findes efter ca. 10 til 30 minutter, og hvor stoffets

³ Dette blev nedreguleret til 0,04 mg./kg. i forsøgets startfase (jf. afsnit 3.2.).

halveringstid er ca. 220 minutter. Der blev derfor injiceret 2-3 gange hver testdag, med intervaller på ca. 120 minutter. Den valgte dosis er ligeledes baseret på humane data, hvor en dosis på mellem 0,04 og 0,08 mg./kg. har resulteret i forstyrrelse af hukommelsesfunktionen (Ebert et al., 1998). Desuden har et studie af Kornum *et al.* (2005) ikke fundet nogen effekt af en 0,03 mg./kg. dosis skopolamin på Göttingen minigrises præstation i en spontan objektgenkendelses opgave, hvorfor denne dosis antages at være for lille. På baggrund af disse data blev det antaget, at en dosis på 0,05 mg./kg. var tilstrækkelig til at bibringe den ønskede kognitive dysfunktion uden samtidig at forårsage u hensigtsmæssige bivirkninger (jf. afsnit 4.1.2.).

2.5. Data analyse

Beregninger i forbindelse med grisenes indlæring af DNMS opgaven blev udført i Microsoft Excell regneark. Tidskurver og indlæringskurver blev illustreret med punktkurvedigrammer, som ligeledes blev udarbejdet i Microsoft Excell.

Statistiske analyser af resultaterne fra skopolaminforsøget blev foretaget i statistikprogrammet SPSS. Da alle grisene var testet både med og uden skopolamin på de tre delays, kunne der udføres statistiske analyser med gentagne målinger (to-vejs ANOVA) for at vurdere parametrene gruppe og delay, og gruppe x delay interaktionen – både med hensyn til, hvor lang tid det tog grisene at komme frem til målet, og hvor mange korrekte trials de havde. Desuden blev der lavet tohalede parrede t-tests, når to gennemsnit skulle sammenlignes. Resultaterne blev illustreret i søjlediagrammer, som blev udarbejdet i Microsoft Excell.

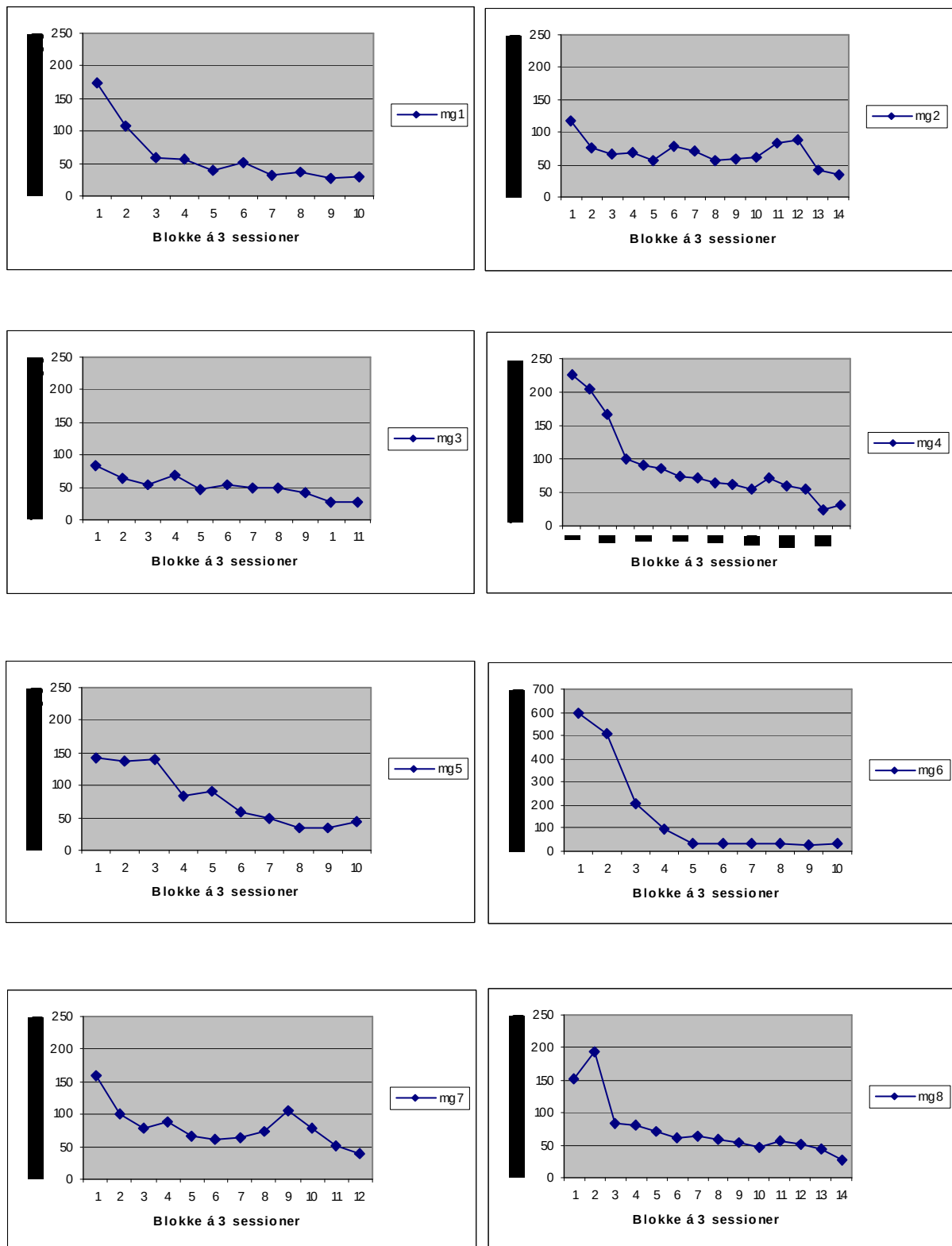
Kapitel 3

Resultater

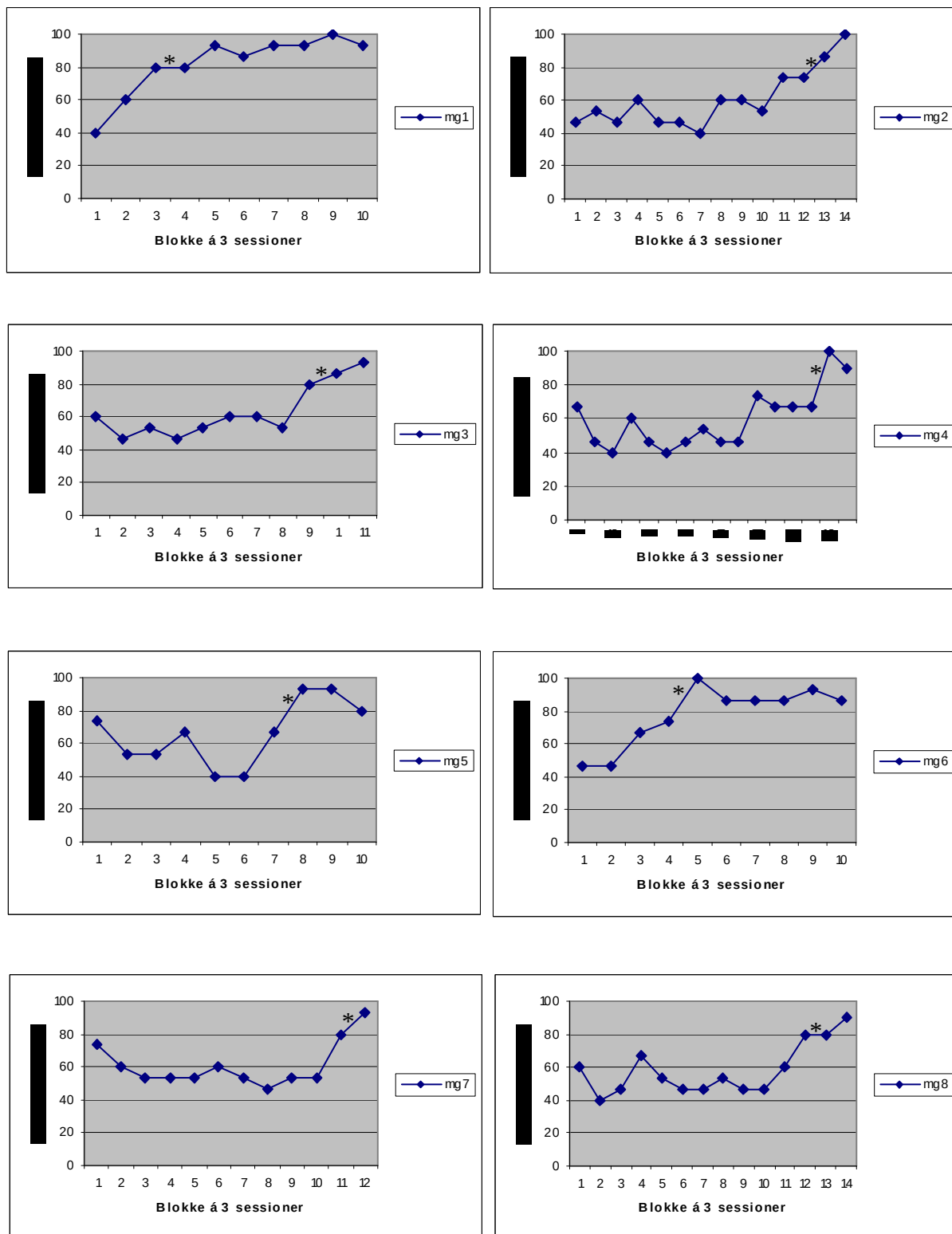
3.1. Indlæring af DNMS opgaven

Stort set alle grisene lærte hurtigt, at opgaven gik ud på at komme frem til målet i den reforcerede arm. En gris (mg6) nægtede imidlertid at gå ned ad mazens venstre arm i de første trials – både i samplefasen og testfasen. Efter session 7 modtog mg6 derfor 5 ekstra shaping trials, hvor den blev shapet til at gå ned ad mazens venstre arm, hvilket løste problemet. Tidskurver for de enkelte grise er illustreret i *figur 12*, og en samlet tidskurve for alle grisene er illustreret i *figur 14*.

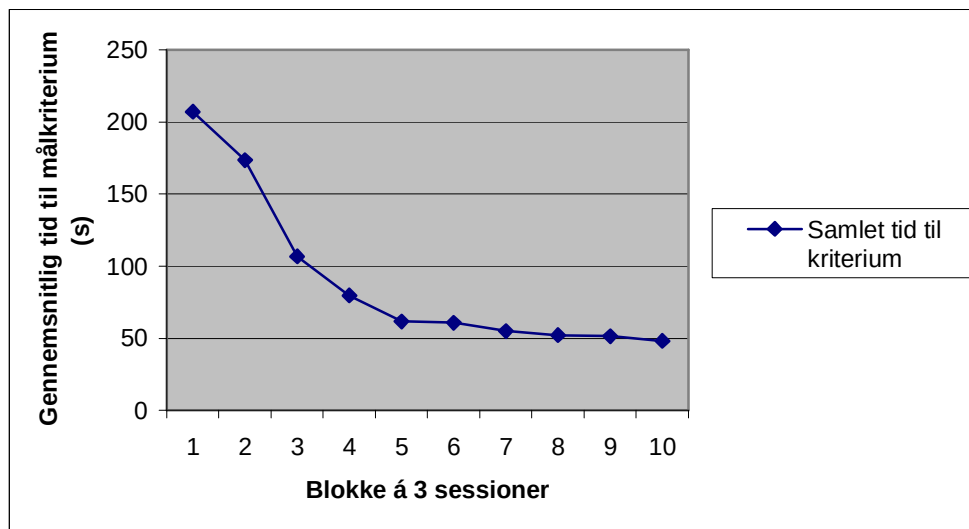
Indlæringskurver for de enkelte grise er illustreret i *figur 13*, og en samlet indlæringskurve for alle grisene er illustreret i *figur 15*. Grisenes præstation var på chance-niveau de første 10 sessioner, hvorefter deres præstation gradvist øgedes. Grisene krævede gennemsnitligt 144 trials (spredning 51-220 trials) og 60 fejl (spredning 19-94 fejl) for at opnå kriteriet. Halvdelen af grisene opnåede kriteriet inden for 150 trials, hvorimod den anden halvdel krævede 175 eller flere trials (jf. *figur 13*). Fire grise (mg2, mg4, mg7 og mg8) modtog korrektionstræning. En gris (mg7) opnåede næsten med det samme kriteriet med den nye procedure, og kun en gris (mg4) krævede mere end 200 trials for at opnå kriteriet. Efter opnåelse af kriteriet præsterede alle grisene på et stabilt niveau. De havde gennemsnitligt 89% korrekte trials i de første 25 trials efter opnåelse kriteriet (spredning 76-96 % korrekte trials).



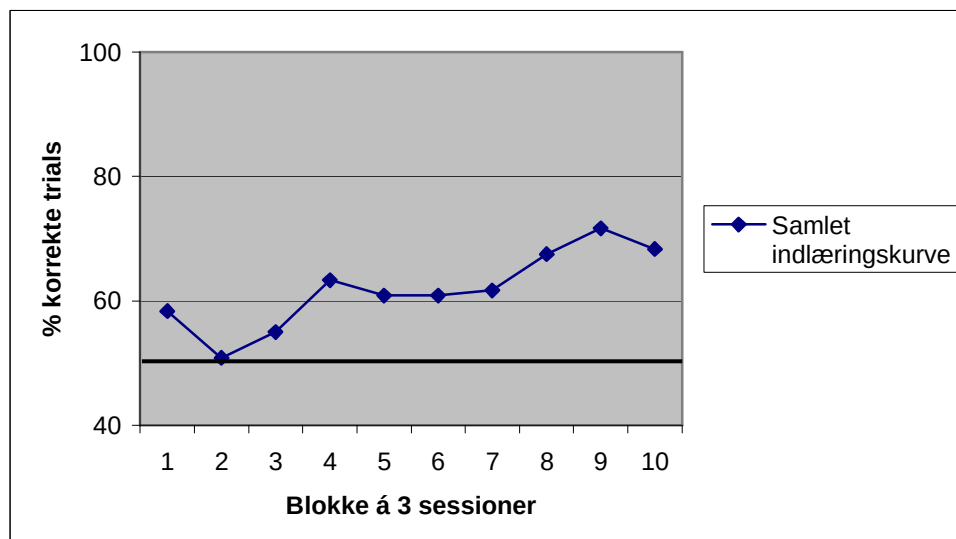
Figur 12 Illustration af hvor lang tid de enkelte grise gennemsnitligt brugte på at komme frem til målkriteriet i hver session. Hver kurve illustrerer tidskurven for de første 150 trials, eller til og med 25 trials efter opnåelse af kriteriet for de grise, som modtog korrektionstræning. Kurven for mg6 har en y-akse, som går op til 700 sekunder frem for 250 sekunder som i de andre kurver. Dette skyldes, at mg6 nægtede at gå ned ad mazens venstre arm i studiets begyndelse. mg: minigris.



Figur 13 Illustration af de enkelte grises indlæringskurver. Hver kurve illustrerer indlæringskurven for de første 150 trials, eller til og med 25 trials efter opnåelse af kriteriet for de grise, som modtog korrektionstræning. mg: minigris; *: opnåelse af kriteriet.



Figur 14 Illustration af den samlede tidskurve for alle grisene.



Figur 15 Illustration af den samlede indlæringskurve for alle grisene. Den fede streg markerer chance-niveau.

3.2. Skopolamins effekt på DNMS opgaven med forskellige delays

Efter der var blevet testet én session med 60 sekunders delay og én session med 300 sekunders delay, blev det tydeligt, at grisene havde for store bivirkninger fra skopolamin. Dosis blev derfor nedreguleret til 0,04 mg./kg. Herefter fik grisene det bedre, og der blev endnu observeret tydelige tegn på skopolamin-påvirkning hos de injicerede grise, idet de smaskede højlydt og havde formindsket interesse i foder som følge af mundtørhed (jf. afsnit 4.1.2). Den reducerede dosis blev derfor benyttet i den resterende del af forsøget.

Grisenes præstation med delays på 60 sekunder, 300 sekunder og 900 sekunder indsat mellem sample- og testfasen er illustreret i *tabel 3*. Kontrolgruppen havde i gennemsnit 64% korrekte trials med de to længere delays, hvorimod de skopolamin-behandlede grise præsterede omkring chance-niveau. En to-vejs ANOVA test afslørede, at der var en signifikant effekt af parametrene gruppe ($F = 77,042_1, P < 0,001$) og delay ($F = 77,948_2, P < 0,001$), og at der var en signifikant gruppe x delay interaktion ($F = 3,581_2, P < 0,05$).

Der var en markant forskel på, hvor lang tid kontrolgruppen og skopolamingruppen brugte på at komme frem til målkriteriet i hver session (jf. *figur 17*). En to-vejs ANOVA test afslørede, at der var en signifikant effekt af parameteren gruppe ($F = 38,167_1, P < 0,001$), hvorimod der ikke var signifikant effekt af hverken parameteren delay ($F = 1,315_2, P = 0,279$) eller gruppe x delay interaktionen ($F = 0,570_2, P = 0,570$). Denne markante forskel på, hvor lang tid kontrolgruppen og skopolamingruppen brugte på at komme frem til målkriteriet kan ikke alene forklares ud fra de to gruppers antal korrekte trials, men må også tilskrives skopolamins bedøvende effekt (jf. afsnit 4.1.2.)

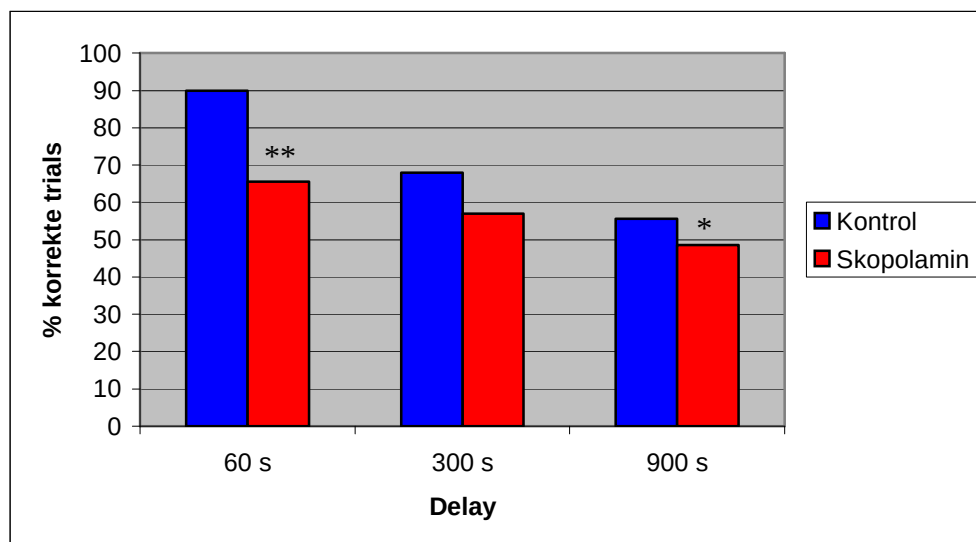
Kontrol

Forsøgsdyr	Korrekte trials			Tid til målkriterium		
	60 s	300 s	900 s	60 s	300 s	900 s
mg1	23 (92 %)	16 (64 %)	15 (60 %)	58	72	62
mg2	23 (92 %)	16 (64 %)	19 (76 %)	175	108	50
mg3	24 (96 %)	16 (64 %)	15 (60 %)	40	152	42
mg4	22 (88 %)	17 (68 %)	12 (48 %)	172	106	73
mg5	21 (84 %)	16 (64 %)	15 (60 %)	76	133	70
mg6	23 (92 %)	21 (84 %)	11 (44 %)	45	59	84
mg7	22 (88 %)	16 (64 %)	12 (48%)	53	97	120
mg8	22 (88 %)	15 (60 %)	13 (52%)	37	107	65

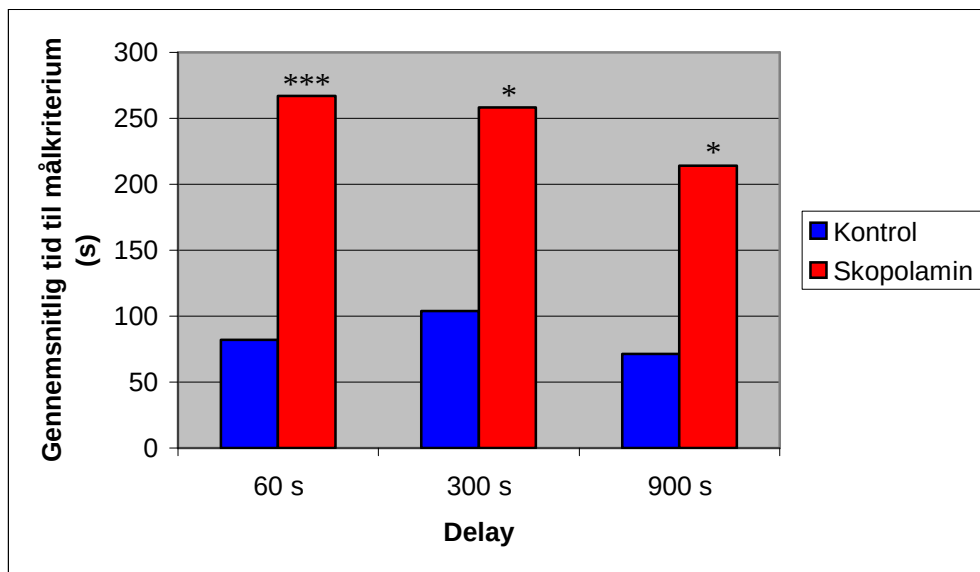
Skopolamin

Forsøgsdyr	Korrekte trials			Tid til målkriterium		
	60 s	300 s	900 s	60 s	300 s	900 s
mg1	18 (72 %)	17 (68 %)	12 (48 %)	161	201	134
mg2	15 (60 %)	14 (56 %)	13 (52 %)	281	256	207
mg3	22 (88 %)	15 (60 %)	12 (48 %)	66	64	109
mg4	12 (48 %)	11 (44 %)	12 (48 %)	366	388	149
mg5	15 (60 %)	12 (48 %)	14 (56 %)	317	298	118
mg6	16 (64 %)	14 (56 %)	12 (48 %)	497	401	470
mg7	14 (56 %)	16 (64 %)	11 (44 %)	332	243	254
mg8	16 (64 %)	15 (60 %)	11 (44 %)	218	211	172

Tabel 3 Oversigt over hvor mange korrekte trials grisene havde, og hvor lang tid de gennemsnitligt brugte på at komme frem til målkriteriet i hver session (afrundet). Der blev foretaget 25 trials med hvert af de tre delays. Øverst er resultaterne fra kontrolgruppen, og nederst er resultaterne fra skopolamingruppen.



Figur 16 Illustration af hvor mange korrekte trials kontrolgruppen og skopolamingruppen havde med delays på 60 sekunder, 300 sekunder og 900 sekunder. **: Signifikant forskel ($P < 0,001$), *: Signifikant forskel ($P < 0,05$). Ved delayet på 300 sekunder tilnærmede forskellen sig signifikant niveau ($P = 0,058$).



Figur 17 Illustration af hvor lang tid det gennemsnitligt tog grisene i kontrolgruppen og skopolamingruppen at komme frem til målkriteriet i hver session med delays på 60 sekunder, 300 sekunder og 900 sekunder. *** : Signifikant forskel ($P < 0,005$), * : Signifikant forskel ($P < 0,05$).

Kapitel 4

Diskussion

Diskussionen i dette kapitel vil primært være baseret på studiets empiriske resultater, men vil også omhandle teoretiske problemstillinger vedrørende dyremodellen og DNMS testen. For at kunne vurdere, om testen overhovedet kan benyttes som valideringsredskab for AD dyremodellen, vil grisenes præstation på DNMS testen først blive diskuteret. Derefter vil fordele og ulemper ved forskellige AD dyremodeller blive gennemgået, og til sidst vil den spatiale DNMS tests evner som valideringsredskab for dyremodellen i Göttingen minigrisen blive vurderet.

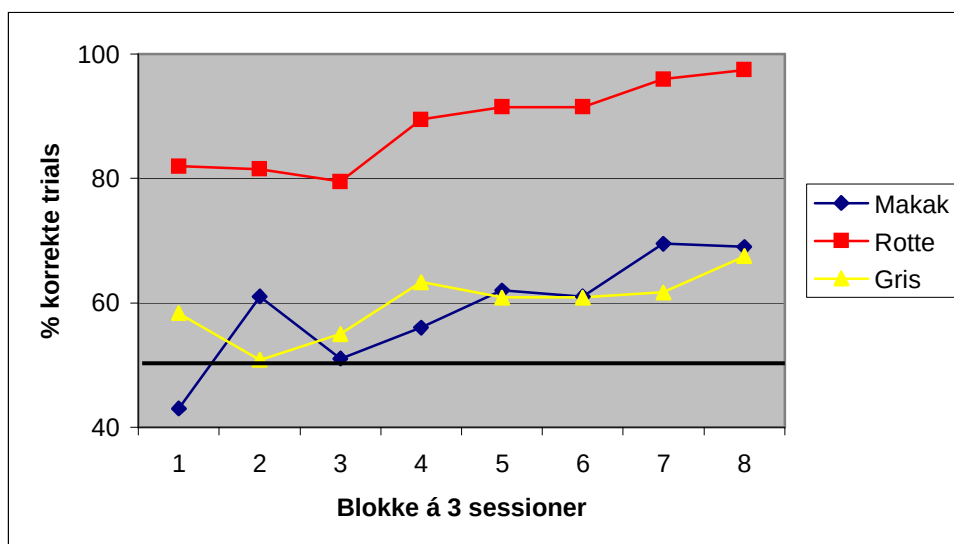
4.1. DNMS testen

Som beskrevet i afsnit 1.3. forventedes det, at grisene ville indlære den spatiale DNMS opgave ud fra en indlæringskurve, som ligger på et niveau mellem rotters og abers, at delayets længde ville have en indflydelse på grisenes præstation på opgaven, og at de skopolamin-behandlede grises præstation ville være signifikant dårligere end kontrolgruppens. Studiets resultater viser imidlertid, at grisenes præstationer ikke i alle tilfælde kunne leve op til disse forventninger.

4.1.1. Indlæring af DNMS opgaven

Det primære mål med dette studie var at vise, at Göttingen minigrise kunne lære at løse en spatial DNMS opgave i en T-lignende maze. Dette blev bekræftet. Det forventedes også, at grisene havde en indlæringskurve, som var på et niveau mellem abers og rotters. Dette viste sig imidlertid ikke at være tilfældet. Alle grisene lærte at løse opgaven i løbet af 220 trials, hvilket svarer nogenlunde til abers præstation på en tilsvarende DNMS opgave i en T-maze (Murray et al., 1989), hvorimod rotters præstation er markant bedre (jf. *figur 18*) (Markowska et al., 1989). Ligesom det var tilfældet med makak-aberne i Murray *et al.*'s studie, var det

også nødvendigt at foretage korrektionstræning med halvdelen af grisene i dette studie, hvorfor grisenes evner på den spatiale DNMS opgave i højere grad minder om makak-abers end rotters.



Figur 18 Indlæringskurver over de første 120 trials for rotter, makak-aber og Göttingen minigrise. Den fede streg markerer chance-niveau. Data for makak-aberne er gengivet fra Murray *et al.* (1989). Data for rotterne er gengivet fra Markowska *et al.* (1989).

Rotter har en naturlig tendens til at alternere i deres valg i spatiale opgaver (Dudchenko, 2001; 2004), og ifølge Markowska *et al.* (1989) er dette sandsynligvis baggrunden for rotternes signifikant bedre indlæringsniveau. Allerede fra trial 1 præsterer rotterne langt over chance-niveau (jf. figur 18). Niveauet for grisenes indlæringskurve var derfor overraskende, da et tidligere studie af Laughlin & Mendl (2000) havde vist, at grise også har en tendens til at alternere i deres valg i spatiale opgaver. Resultaterne fra dette studie indikerer imidlertid, at grisene ikke har denne tendens, idet de ikke udviste spontan alternering i deres valg af arm i mazen i den spatiale DNMS opgave, men skulle indlære denne strategi i løbet af træningen. Da grisene blev reforceret ved korrekt valg af arm i hver trials testfase kan resultaterne dog ikke bruges som et direkte mål for "spontan" alternering. Men det faktum at grisene præsterede på chance-niveau de første 10 trials *med* reforcering af korrekt valg af arm antyder kraftigt, at de også ville have præsteret på chance-niveau *uden* reforcering. Overensstemmelsen mellem grisenes og makak-abers præstation på den spatiale DNMS opgave kan derfor skyldes, at disse arter ikke har en naturlig tendens til at alternere i deres valg, som det er tilfældet med rotter (Murray *et al.*, 1989). Der synes ikke at være evidens for, at grisenes indlæringsniveau skyldes manglende motivation, da de var foderdepriverede (jf.

afsnit 2.1.). Desuden viser tidskurven i *figur 13*, at de blev hurtigere og hurtigere til at komme frem til målet i den reforcerede arm, uanset om deres oprindelige valg af arm var korrekt eller forkert. Dette antyder god motivation for at komme hurtigt frem til foderbelønningen. Tendensen til naturligt at alternere – eller mangel herpå – synes dermed at være årsag til den store forskel på rotters, makak-abers og grises præstation på opgaven. Rotter har imidlertid vist gode evner til at løse spatiale opgaver i mange forskellige eksperimentelle situationer, hvorfor deres præstation på den spatiale DNMS opgave måske afspejler mere generelle spatiale færdigheder (Dudchenko, 2004). Dette støttes af teorien om hippocampus' rolle i spatiale kort, som blev beskrevet i afsnit 1.2.3., da rotter har meget store hippocampi relativt til deres hjernes størrelse. Aber har til gengæld vist sig at være rotter overlegne i mere visuelle opgaver, hvilket ikke er overraskende på baggrund af deres veludviklede visuelle system (Markowska et al., 1989). På baggrund af disse to arters styrker i forskellige modaliteter kunne det være interessant for fremtidige studier at undersøge, om grisene også skulle have en modalitet, som de var *specielt* stærke i. Eksempelvis kunne man teste DNMS i den olfaktoriske modalitet, da grise har højt udviklede olfaktoriske evner. Desuden har et tidligere studie vist, at grise er i stand til at diskriminere mellem lugte i en opgave, hvor de skulle finde frem til en foderbelønning (Croney et al., 2003).

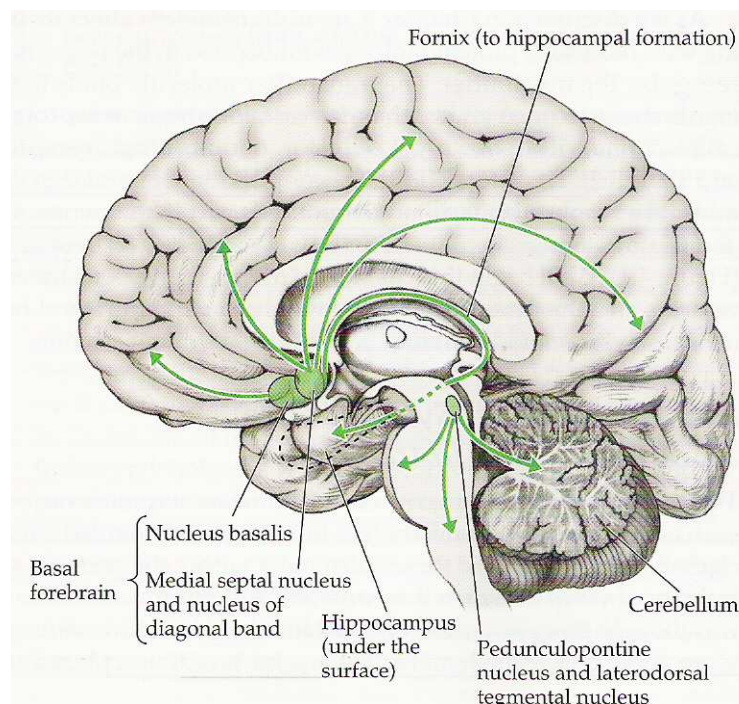
Både rotter og makak-aber benyttes som traditionelle modeller for kognitive funktioner, og der er komplementerende fordele og ulemper ved disse to arter. Aber har hjerner, som minder om menneskers, men de er dyre og sjældne. Rotter er til gengæld relativt billige og tilgængelige, men deres hjerner er mere forskellige fra menneskers, i hvert fald hvad angår udviklingen af neokortex (Markowska et al., 1989). Grisens hjerne minder i højere grad om abens end rottens, og mange af de ulemper, som er forbundet med aber, er ikke i samme grad forbundet med grise (dette vil blive diskuteret yderligere i afsnit 4.2.4.). Da Göttingen minigrise er i stand til at løse den spatiale DNMS opgave, synes de derfor med fordel at kunne benyttes som laboratoriedyr til at undersøge spatial indlæring og hukommelse.

4.1.2. Test med skopolamin

Baggrunden for at vælge skopolamin som psykoaktivt stof var, at det specifikt hæmmer indprentningen af ny information i langtidshukommelsen, mens det efterlader genkaldelsen af

lagret information intakt (Rosier et al., 1999). Dette stemmer overens med den tidlige hukommelsesforstyrrelse i AD (jf. afsnit 1.2.7.). Desuden er det i tidligere studier blevet påvist, at stoffet reducerer præstationen på en lang række hukommelsesopgaver i både dyr og mennesker (Taffe et al., 1999), herunder menneskers og abers præstation på visuelle DNMS opgaver (Schon et al., 2005; Taffe et al., 1999) og rotters og hundes præstation på spatiale DNMS opgaver (Ogasawara, et al., 1995; Araujo et al., 2005).

Skopolamin er et kraftigt antikolinergt stof, som binder til de muskarine receptorer. Inhibition af den kolinerge transmission ved administrationen af antagonist, såsom skopolamin, reducerer præstationen på hukommelsesopgaver, hvorimod acetylkolinesterase-hæmmere øger præstationen på hukommelsesopgaver (Rosier et al., 1999). Den forstyrrende effekt af skopolamin på DNMS opgaven skyldes en af forstyrrelse af forhjernens store kolinerge systemer, der udspringer i nucleus basalis magnocellularis, septum og de diagonale bånd. Systemerne har forbindelser bulbus olfaktorius, korteks, hippocampus og relaterede strukturer i MTL (jf. figur 19) (Mesulam et al., 1983).



Figur 19 Midtsagittalt snit som viser det kolinerge system i menneskehjernen. De nuclei der indeholder grupper af neuroner, som frigiver acetylkolin er vist i grøn, og projektionerne fra disse neuroner er markeret med grønne pile (Gengivet fra Rosenzweig et al., 2002).

Da muskarine receptorer findes udbredt i store dele af neokortex, striatum, hippocampus og amygdala, og da blokering af den kolinerge transmission også vil påvirke andre neurotransmitter-systemer, har administrationen af skopolamin en udbredt effekt i hjernen. Derfor påvirker skopolamin også andre funktioner end langtidshukommelsen. Skopolamin kan inducere en dosis-afhængig bedøvende effekt og kan medføre sløret syn. Desuden er en kendt bivirkning udtørring af munden (Ebert & Kirch, 1998). For at modvirke disse bivirkninger blev der injiceret den lavest mulige dosis, som ville medføre den ønskede reduktion af hukommelsesfunktionen, altså 0,04 mg./kg.

Injektionerne med skopolamin resulterede i en betydelig forringelse af grisenes præstation, hvis omfang var afhængig af delayets længde (jf. *figur 16*). Dette resultat er i overensstemmelse med resultaterne fra tidligere studier i andre arter, som har undersøgt skopolamins forstyrrende effekt på DNMS opgaver (Schon et al., 2005; Taffe et al., 1999; Ogasawara, et al., 1995; Araujo et al., 2005). Kontrolgruppens præstationen forringedes ligeledes gradvist med forøgelsen af delayets længde fra 60 sekunder til 300 sekunder og 900 sekunder. Den tidsafhængige forringelse af præstationen under et delay-interval antages at indikere nedsat hukommelse frem for andre typer af problemer, såsom ændringer i motivation, perception, motoriske færdigheder, etc. (Markowska et al., 1989).

Selvom der var signifikant forskel på, hvor lang tid grisene i testgruppen og kontrolgruppen gennemsnitligt brugte på at komme frem til målet i den rigtige arm i hver trials testfase (jf. *figur 17*), kan testgruppens reducerede præstation ikke umiddelbart tilskrives stoffets bedøvende effekt, da grisene stadig løste opgaven. Dette antyder også, at grisene godt kan huske reglerne i den eksperimentelle situation, men ikke kan huske, hvilken arm de løb ned ad i samplefasen. Selv hvis grisenes syn skulle være sløret, kan dette ikke i sig selv forklare den reducerede præstation, da grisene ikke udelukkende løser opgaven på baggrund af visuelle cues (jf. afsnit 4.3.2.). Den stærkeste evidens for, at den reducerede præstation skyldes en forstyrrelse af hukommelsesfunktionen er imidlertid, at to af grisene (mg1 og mg3) løste opgaven på et niveau omkring indlæringskriteriet med det korte delay på 60 sekunder. Dermed kan forstyrrelser i den visuelle spatiale perception, i motivation eller i motoriske færdigheder ikke umiddelbart gøre rede for den reducerede præstation. Resultaterne må derfor demonstrere en forstyrrelse i hukommelsesfunktionen.

Da blokeringen af de centrale muskarine receptorer i unge raske forsøgspersoner giver hukommelsesforstyrrelser, som ligner hukommelsesproblematikken hos ældre mennesker, og da en af årsagerne til hukommelsesforstyrrelsen hos AD patienter menes at være de svære tab af neuroner i nucleus basalis Meynert (jf. afsnit 1.1.3.), er behandling med skopolamin – inspireret af den kolinerge hypotese - blevet foreslået som en model for AD (Sunderland et al., 1986; Ebert & Kirch, 1998; Gallagher & Rapp, 1997). Dette har ført til etableringen af en skopolamin dyremodel for AD i hunde (Araujo et al., 2005). Dyremodellen i Göttingen minigrisen, som testen er udviklet til, er imidlertid ikke baseret på den kolinerge hypotese, men derimod på amyloid-hypotesen. Studiets resultater kan derfor ikke bruges til direkte at forudsige, hvordan grisemodellen vil klare sig på testen, da patologien i dyremodellen fokuserer på sygdommens amyloide komponent. Ifølge amyloid hypotesen vil det kolinerge system imidlertid også blive påvirket undervejs i sygdommens patogene kaskade (jf. afsnit 1.1.3.), hvorfor forstyrrelsen i det kolinerge system bliver aktuel, hvis modellen udvikler en tilstrækkelig grad af neuropatologi.

4.1.3. Opsummering

På baggrund af studiets resultater synes der at være evidens for, at grise er i stand til at løse en spatial DNMS opgave i den T-lignende maze. Grisene har en indlæringskurve, som i høj grad ligner makak-abers, hvorimod rotter klarer sig markant bedre. Denne markante forskel på indlæringskurver kan skyldes, at grise og makak-aber – i modsætning til rotter – ikke har en naturlig tendens til at alternere i deres valg i spatiale opgaver. Göttingen minigrisenes præstation på den spatiale DNMS opgave minder derfor i højere grad om makak-abers, end det var forventet. Dette kan skyldes den større lighed i disse to arters neuroanatomie. Dette vil blive yderligere beskrevet i næste afsnit.

Skopolamin er et stof, som påvirker hukommelsesfunktionen ved at inhibere den kolinerge transmission fra de store nuclei i forhjernen. Ved administrationen af skopolamin i en dosis på 0,04 mg./kg. blev der fundet en betydelig forringelse af grisenes præstation, hvis omfang var afhængig af delayets længde. Kontrolgruppens præstationen forringedes ligeledes gradvist med forøgelsen af delayets længde, hvilket indikerer en delay-afhængig forringelse af hukommelsesfunktionen. Der var signifikant forskel på, hvor lang tid grisene i testgruppen og kontrolgruppen gennemsnitligt brugte på at komme frem til målet i den rigtige arm i hver trials testfase ved alle delays, hvilket til dels skyldes stoffets bedøvende effekt. Testgruppens

reducerede præstation kan imidlertid ikke tilskrives denne bedøvende effekt, da grisene stadig løste opgaven. Det er dermed blevet påvist, at den spatiale DNMS test er sensitiv over for skopolamin induceret hukommelsesforstyrrelse i Göttingen minigrisen, som er forårsaget af en neurotransmitter-dysfunktion med relation til AD. Dette er væsentligt, da testen skal bruges til at validere dyremodellen for AD, som også forventes at udvikle AD relateret hukommelsesforstyrrelse. Denne AD model vil være emnet for diskussionen i det følgende afsnit.

4.2. Dyremodeller for AD

Selvom AD er en specifik menneskelig sygdom, bruges eksperimentelle dyremodeller til at reproducere udvalgte dele af de neuropatologiske, biokemiske og adfærdsrelaterede ændringer, som er forbundet med sygdommen. Det er ikke muligt at sammenligne data fra dyremodeller for AD direkte med den menneskelige sygdom, men lighederne mellem mennesker og aber, rotter og andre forsøgsdyr er så store, at disse modeller alligevel kan yde vigtige bidrag til forståelsen af AD. Dyremodellerne gør det muligt at følge patogenesen *in vivo* og bidrager med modeller, hvori terapeutiske strategier kan efterprøves (Kolb & Whishaw, 2003). Det er imidlertid ikke lykkedes i nogle af de eksisterende modeller at reproducere hele spektret af patologiske, neurokemiske og adfærdsmæssige ændringer, som er typiske for AD (Tayebati, 2005; Wischik et al., 2001; Dodart, 2002; Duff, 2001). I fraværet af gode dyremodeller stammer vores viden om AD's patogenese derfor hovedsageligt fra studier af menneskeligt hjernevæv, som er indsamlet på obduktionstidspunktet, hvor patologien har udviklet sig gennem mange år eller ligefrem årtier. Denne problemstilling er en af grundene til, at vi endnu ikke har indgående kendskab til sekvensen af de patologiske begivenheder, som forårsager AD (Dodart et al., 2002).

4.2.1. Tidlige dyremodeller

De første dyremodeller for AD var aldrende dyr og læsionsmodeller, som støttede sig til den kolinerge hypotese for AD. Selvom nogle få arter udvikler nogle af AD's neuropatologiske karakteristika ved aldring, har studier af aldrende dyr vist sig ikke at være realistiske modeller til brug i mere udbredt forskning, da de fleste af disse dyremodeller har brug for at ældes gennem mange år (Duff, 2001).

Læsionsmodellerne er blevet brugt til at undersøge effekten af kolinerg forstyrrelse på den kognitive funktion og dennes genoprettelse ved farmakoterapi. Uheldigvis har mange af de undersøgte stoffer, som genopretter forstyrrelser i læderede dyr ikke vist sig at have den samme effekt på AD patienters kognitive funktion. Selv om mange af disse dyremodeller ikke har været brugbare i udviklingen af antidemens medicin, har de imidlertid været værdifulde for neurokemiske studier (Duff, 2001; Tayebati, 2005).

4.2.2. Non-transgene dyremodeller

Baseret på amyloid-hypotesen har adskillige forskergrupper undersøgt effekterne af intracerebral eller intraventrikulær injektion af syntetiske A β peptider i almindelige gnave. Disse studier udsprang fra en idé om, at skabelsen af et øget niveau af A β i gnaverens hjerne ville føre til patologiske begivenheder og neurodegeneration i det limbiske område og dermed føre til adfærdsforstyrrelser, som er relateret til AD. De første studier fandt imidlertid modsatrettede histologiske og biokemiske data i forhold til den neurotoksicitet som induceres af peptidet. Selvom nogle studier rapporterede et typisk mønster af neurodegeneration omkring injektionsområderne, kunne ingen af disse studier skabe A β aflejringer på afstand af injektionsstedet (Stéphan & Phillips, 2005). Selv om modellerne ikke reproducerer hele kompleksiteten af den humane patologi, har mange studier rapporteret om neurodegeneration og udbredt mikrogliia aktivering tæt på A β aflejringer i hjernen. Rationalet bag fokuseringen på den specifikke effekt af amyloid er, at man ved at isolere denne neuropatologiske begivenhed gennem de successive strukturelle og biokemiske ændringer i AD kan identificere de begivenheder, som fører til neural og adfærdsmæssig dysfunktion (ibid.). Siden identifikationen af patogene mutationer i forskellige gener (jf. afsnit 1.1.2.) har de dominerende modeller for AD imidlertid været de transgene dyremodeller (Duff, 2001).

4.2.3. Transgene dyremodeller

Kapløbet om at udvikle en transgen (tg) dyremodel for AD begyndte i 1991, da den første APP mutation blev opdaget. Siden da er mange forskellige tilgange blevet forsøgt til at producere en tg model med AD's kendetegn. Selv om der nu er udviklet mange tg modeller, er det endnu ikke lykkedes at skabe en model, som har alle fænotypens egenskaber, herunder ophobning af amyloid, tangel-formation, neurontab og kognitiv forstyrrelse. Der er primært udviklet tg dyremodeller i gnave - specielt mus – som udgør en praktisk model, da de er

hurtige at lave og billige at opretholde (Duff, 2001). Andre tg tiltag foretages bl.a. på Institut for Molekylær Genetik på Århus Universitet, hvor der i øjeblikket arbejdes på at udvikle en tg model for AD i Göttingen minigrisen. Det skulle være muligt at få succes med denne model, da den første tg minigris allerede er blevet lanceret til biomedicinsk forskning i Huntingtons sygdom (Uchida et al., 2001).

APP transgene mus Hovedparten af tg modellerne bygger på amyloid-hypotesen (jf. afsnit 1.2.3.). De første tg modeller udviklede amyloid plak-patologi og blev skabt ved at udtrykke humant APP indeholdende mutationer, som er associeret med familiær AD. Games *et al.* (1995) lancerede den første tg mus (PDAPP), som udvikler amyloid plak-patologi. PDAPP mus udvikler robust amyloid plak-patologi i kortex og hippocampus efter 6-9 måneder. Hsiao *et al.* (1996) lancerede lidt senere Tg2576 musemodellen, som udvikler lignende amyloid plak-patologi. Denne er desuden alders-afhængig og korrelerer med reduceret hukommelsesfunktion i kognitive tests (Duff, 2001; McGowan et al., 2006). Der er senere hen blevet lanceret adskillige muselinier, som udtrykker muteret humant APP. Disse muselinier udvikler lignende amyloid patologi og kognitiv forstyrrelse (jf. tabel 4).

PS transgene mus Presenilin mutationer er, som beskrevet i afsnit 1.1.2., også implicerede i den tidligt indsættende familiære udgave af AD. Der er blevet påvist et øget A β niveau i hjernerne på tg mus, som overudtrykker muterede PS-1 eller PS-2 gener (Duff, 2001; Tayebati, 2005). På trods af det højere niveau af A β i disse mus' hjerner udvikler de imidlertid ikke signifikant AD-lignende patologi (Dodart et al., 2002). Hvis APP tg mus derimod krydses med PS-1 tg mus (PSAPP) accelererer dette amyloid-aflejringer markant (Holcomb et al., 1998). Patologien i APP og PSAPP tg mus inkluderer diffus amyloid aflejring og plaks, som ligner de senile plaks ved menneskelig AD. Disse plaks er omgivet af dystrofe neuritter og er associeret med øget gliose. På trods af den robuste amyloid aflejring, som kan observeres i APP og PSAPP tg mus, udvikler ingen af disse modeller imidlertid et udbredt neurontab. Tau patologi i form af NFT og parrede heliske filamenter er også fraværende i disse mus, selvom fosforyleret tau ophobes i de dystrofe neuritter, som omgiver de amyloide plaks (McGowan et al., 2006).

Tau transgene mus Selv om tau mutationer ikke er direkte knyttet til AD (jf. afsnit 1.1.2.), kan tau dysfunktion alligevel spille en væsentlig rolle i sygdommen – ikke i forhold til sygdommens årsager men nok snarere i forhold til dens manifestationer (Duff, 2001). For at undersøge tau's rolle i AD og andre tau-lidelser er der derfor blevet udviklet musemodeller, som udtrykker muteret tau eller wild-type transgener. Disse mus kan reproducere størstedelen af den menneskelige neurofibrillære patologi (NFT og parrede heliske filamenter). Tg muselinier der udvikler robust neurofibrillær patologi, som reproducerer både de strukturelle og biokemiske egenskaber ved menneskelige NFT, udviser også et signifikant neurontab i de afficerede hjerneregioner (McGowan et al., 2006). Et vigtigt nyere eksempel på dette er rTg4510 modellen, som udtrykker tau med FTDP-17 mutationer (en tau mutation som er forbundet med frontotemporal demens) (Santa-Cruz et al., 2005). Denne tg mus udvikler massiv neurodegeneration i AD-relevante kortikale og limbiske strukturer i en grad, hvor der kan observeres global atrofi i forhjern, og hjernens vægt er signifikant reduceret. Desuden er progressionen af neurofibrillær patologi korreleret med nedsat hukommelsesfunktion i kognitive tests. Denne og andre tau tg musemodeller (jf. tabel 4) bidrager derfor med evidens for, at udviklingen af NFT og neurodegeneration er tæt forbundet. Resultaterne fra tau musene er også i overensstemmelse med den veletablerede korrelation mellem NFT patologi og progressionen af kognitiv forstyrrelse i den menneskelige sygdom (jf. afsnit 1.2.2.) (McGowan et al., 2006).

Dobbelt og trippel transgene mus Selvom APP og PS-1 forårsager AD med udbredt NFT forekomst i den menneskelige sygdom (jf. afsnit 1.2.2.) er det endnu ikke lykkedes at udvikle muterede APP og PS1 transgene mus, som udvikler denne NFT patologi. Dette kan skyldes, at faktorer som er nødvendige for tau fibrillisering eller fosforylering er enten fraværende eller begrænsede i musehjern (Phinney et al., 2003).

For at forstå hvordan, og i hvilket omfang, Aβ og tau patologierne interagerer under udviklingen af AD, er der derfor påbegyndt eksperimentelle tilgange, som involverer krydsninger af mus med muteret APP, PS-1 og tau. Disse modeller kan bruges til at undersøge denne interaktion. Lewis *et al.* (2001) har krydset muterede APP og tau mus og har derved skabt en dobbelt tg TAPP mus, som udvikler øget limbisk neurofibrillær patologi sammenlignet med enkelt tg mus fra samme kuld. Desuden er den øgede NFT patologi i TAPP musene også associeret med neurontab i entorhinal korteks. I nyere studier som

involverer lignende kryds af APP og tau tg mus er der fremkommet en lignende forøget tau patologi (jf. *tabel 4*). Ligeledes har Götz *et al.* (2001) fundet, at intrakraniell administration af A β i muterede tau mus resulterer i udvikling af NFT i amygdala. Resultaterne fra disse studier antyder kraftigt, at ophobning af A β accelererer udviklingen af neurofibrillære læsioner, selvom den præcise mekanisme i denne interaktion endnu er ukendt (McGowan *et al.*, 2006).

Oddo *et al.* (2003) har udvidet de ovenstående studier ved at skabe en trippel tg musemodel (3xTg-AD), der indeholder PS-1, APP og tau transgener. I denne model ophobes der intracellulært A β , som efterfølgende danner alders-afhængige amyloide plaks og tau læsioner. Niveauet og udbredelsen af tau patologien er endnu ikke blevet fuldstændig kortlagt i denne model. Det er derimod klart, at ophobning af ekstracellulært A β forekommer adskillige måneder forud for tau patologien, hvilket antyder, at et øget A β niveau forstærker udviklingen af tau patologi i denne model. 3xTg-AD musen udvikler også alders-afhængig synaptisk dysfunktion og hukommelsesforstyrrelse, som korrelerer med ophobningen af intracellulært A β . Der er endnu ikke blevet foretaget en vurdering af neurontab i disse mus (McGowan *et al.*, 2006).

Tabel 4 Oversigt over de væsentligste fund fra transgene dyremodeller for AD. Oversigten er ment som værende illustrerende frem for udtømmende, da transgene AD modeller er et forskningsområde, som er i konstant udvikling. Ir: Ikke rapporteret; F-tau: fosforyleret tau (Gengivet i revideret udgave fra Spire & Hyman (2005) og McGowan et al. (2006)).

Navn	Overudtrykte gen(er)	Neuropatologiske plaks	F-tau	NFT	Neurontab	Hukommelsesforstyrrelse	Alder ved debut af patologi	Primære reference
PDAPP mus	APP	Ja	Ja	Nej	Nej	Ja	6-8 måneder	Games et al., 1995
Tg2576 mus	APP	Ja	Ja	Nej	Nej	Ja	9-11 måneder	Hsiao et al., 1996
APP23 mus	APP	Ja	Ja	Nej	Ja (CA1)	Ja	6 måneder	Sturchler-Pierrat et al., 1997
TgCRND8 mus	APP	Ja	ir	Nej	ir	ir	3 måneder	Dudal et al., 2004
APPSwe TgC3-3 mus	APP	Ja	Ja	ir	ir	ir	18 måneder	Borchelt et al., 1997
PSAPP mus	Tg2576 og PS1	Ja	Ja	ir	Lidt	Ja	6 måneder	Holcomb et al.,1998
Tg478/1116/11587 rotte	APP og PS1	Ja	ir	ir	ir	ir	9 måneder	Flood et al., 2003
ALZ7 mus	tau	Nej	Ja	Nej	Nej	ir	-	Götz et al., 1995
ALZ17 mus	tau	Nej	Ja	Nej	Nej	ir	-	Probst et al., 2000
7TauTg mus	tau	Nej	Ja	Ja	ir	ir	18-20 måneder	Ishihara et al., 2001
JNPL3 mus	tau	Nej	Ja	Ja	Ja	Ja	5 måneder	Lewis et al., 2000
pR5 mus	tau	Nej	Ja	Ja	Ja	ir	8 måneder	Götz et al., 2001
rTg4510	tau	Nej	Ja	Ja	Kraftigt	Ja	1 måned	Santa-Cruz et al., 2005
TAPP mus	Tg2576 og JNPL3	Ja	Ja	Ja	ir	ir	6 måneder	Lewis et al., 2001
3xTg-AD mus	APP, PS1 og Tau	Ja	Ja	Ja	ir	ir	3 måneder	Oddo et al., 2003

Begrænsninger ved de transgene modeller Udviklingen af tg mus, der overudtrykker et eller flere gener, som forårsager den tidligt indsættende familiære udgave af AD, har været - og er til stadighed - yderst værdifulde i studiet af sygdommens patogenese på det molekylære, cellulære og adfærdsmæssige niveau (Tayabati, 2005). Som det kan uddrages af det ovenstående har tg tilgange til at udvikle dyremodeller for AD udviklet sig markant i løbet af de sidste år, og de kan nu pålideligt benyttes til at skabe mus, som udvikler mange af de fænotypiske egenskaber ved AD. Man må imidlertid huske på, at APP og PS generne er forbundne med den tidligt indsættende familiære udgave af AD, som kun udgør ca. 2% af alle tilfælde. De resterende AD tilfælde er primært af den sporadiske udgave (Phinney et al., 2003). Det største genetiske bidrag til sent indsættende familiær- og sporadisk AD kommer fra APOE4 allelet, som er til stede i mere end 50% af alle AD tilfælde (jf. afsnit 1.2.2.). Til gengæld ser APOE2 allelet ud til at være beskyttende, da der er en reduceret forekomst af dette allel hos AD patienter (Spires & Hyman, 2005). Nogle få studier har undersøgt, hvordan APP tg mus interagerer med APOE. Disse studier har vist, at krydsninger med APOE knockout mus medfører reduceret amyloid aflejring, mens krydsninger med mus der udtrykker APOE4 medfører et øget antal plaks (ibid.).

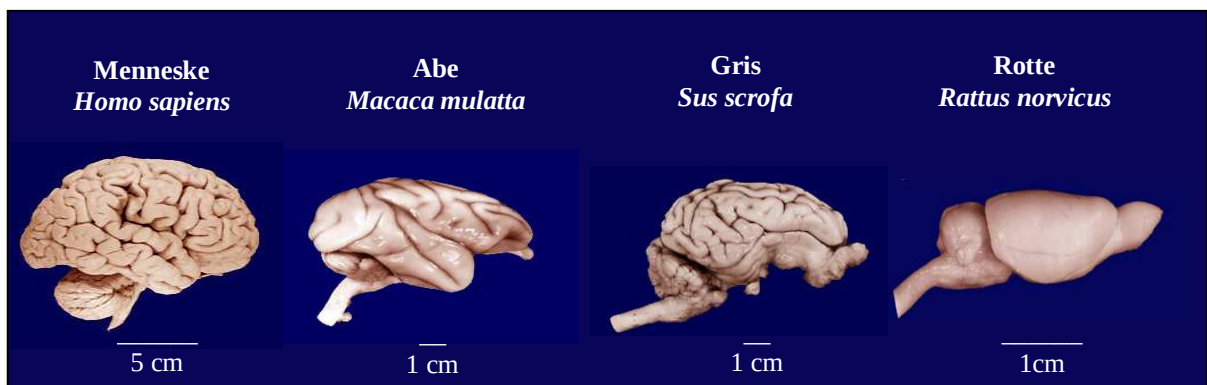
Selv om der er skabt et stort antal tg musmodeller for AD, er det endnu uklart hvilken - om nogen - af disse modeller, der bedst reproducerer AD patologi og adfærd. Afhængigt af hvilke metoder der er benyttet til at skabe tg mus, kan de resulterende mus adskille sig kraftigt fra hinanden - både med hensyn til neuropatologi og adfærd (jf. *tabel 4*) (Dodart et al., 2002). På trods af denne problemstilling afspejler tg mus mange neuropatologiske karakteristika, som er informative om AD. Disse tg mus har resulteret i den første *in vivo* demonstration af, at mutationer i APP genet kan medføre ændringer i A β syntese, aflejring og amyloidose på en måde, som stemmer overens med den, som kan observeres i AD. Som konsekvens heraf har disse mus bidraget med vigtige indsigter i, hvordan diffus A β og amyloid aflejringer formes *in vivo* (ibid.). Det ser imidlertid ikke ud til, at disse amyloid aflejringer er særligt neurotoksiske i musehjernen. Dette demonstreres af det meget begrænsede neurontab, på trods af en substantiel amyloidbyrde, i flere tg muselinier. Det er dog muligt, at den amyloid som formes i musene er kvalitativt forskellig (måske er den mere opløselig) fra den, som er til stede i AD hjerner. Denne forskel kan være årsagen til den markante mangel på neurodegeneration, som kan observeres i de fleste tg muselinier (Stéphan & Phillips, 2005;

Dodart et al., 2002). På baggrund af forskelle i mus' og menneskers immunsystemer er mulighederne for at benytte tg mus til at studere de inflammatoriske ændringer, som forekommer i AD hjerner, ligeledes begrænsede (Stéphan & Phillips, 2005). En anden kendetegnende egenskab ved alle APP tg mus, som er skabt og karakteriseret til dato, er, at de ikke udvikler NFT på trods af, at fosforyleret tau er til stede i hjernerne på de fleste af disse modeller. Den manglende dannelse af parrede heliske filamenter i hjernen på disse mus kan skyldes, at muse-tau, i modsætning til humant tau, ikke har evnen til at samles i fibriller. Dette støttes af, at NFT kan findes i hjernerne på JNPL3 tg mus, som udtrykker en muteret udgave af *humant* tau (Stéphan & Phillips, 2005; Dodart et al., 2002). En stor del af tg musenes problemer skyldes altså, at musehjernen er meget forskellig fra menneskehjernen. Mange af disse problemer vil derfor muligvis kunne overvindes ved at benytte et større forsøgsdyr, hvis neuroanatomie er mere lig den humane.

4.2.4. En dyremodel for AD i Göttingen minigrisen

En dyremodel for amyloid patologi (og eventuelt tau patologi) *in vivo* med udgangspunkt i grisen præsenteres som en komplementerende alternativ model til de eksisterende tg musemodeller. Den vil kunne bruges til at studere de cellulære og molekulære processer, som induceres af amyloid, der med tiden kan blive en forårsagende faktor for kognitionsforstyrrelse (Stéphan & Phillips, 2005). Grisen er valgt som forsøgsdyr af flere grunde. Men primært da der kræves en relativt stor hjerne, hvis man vil benytte *in vivo* studier med PET til at følge udbredelsen af neuropatologi og til at undersøge forholdet mellem forskellige neurotransmittere og AD relaterede adfærdsændringer. Abestudier opfylder kravet om en stor hjerne, men har de ulemper, at aber er svære at håndtere og opstalde, og at de er dyre at købe og opretholde. Grisen har en lang historie inden for biomedicinsk forskning og er ikke forbundet med mange af de ulemper som abestudierne er forbundet med. Grisehjernen er relativt stor (ca. 100 g) og har større strukturel lighed med primaters neuroanatomie end gnaveres hjerner (se nedenfor). Desuden er graden af genetisk lighed mellem grises og menneskers genomer større end mellem mus og menneskers (Johansson et al., 1995). Göttingen minigrisen er valgt til fordel for grise, der avles til kødproduktion, da Göttingen minigrise avles formålsspecifikt til at være forsøgsgrise med nøje kontrolleret helbredsstatus, lav voksen kropsvægt og en lille daglig vægtforøgelse (Lind, 2005).

Göttingen minigrisens neuroanatomi Minigrisen benyttes i stigende grad som et alternativ til aben i hjerneforskning, og grisemodeller for Parkinsons sygdom (Mikkelsen et al., 1999), multipel sklerose (Singer et al., 2000) og apopleksi (Sakoh et al., 2000) er allerede blevet udviklet. Grisen er et rimeligt intelligent dyr og har vist en villighed til at arbejde med en lang række forskellige kognitive opgaver (Croney, 1999). Grisehjernen har en stor lighed med menneskehjernen i forhold til gnavehjernen, og grisen har yderligere den fordel, at den har en relativt stor hjerne i forhold til dens kropsvægt. Lige som mennesker har grise gyrificerede hjerner (Hofman, 1985). Grisehjernens overordnede morfologi er derfor mere lig menneskehjernens end den glatte rottehjerne (jf. *figur 20*) (Hofman, 1985).



Figur 20 Sammenlignende neuroanatomi mellem mennesker, aber, grise og rotter. Figuren illustrerer tydelige forskelle i størrelsen på de forskellige arters hjerner og i graden af hjernernes gyrificering. Graden af gyrificering antages generelt at være et udtryk for kognitiv kapacitet (Zilles, 2005). Mange af de strukturelle forskelle på hjernerne (f.eks. mønstret af kortikale gyri og sulci) har imidlertid kun en begrænset betydning hjernernes organisering. Selvom anatomiske analyser har afsløret nogle basale artsforskelle, synes der at være stigende evidens for, at hjernerne i et bredt spektrum af arter har en fælles "bauplan" (Mogensén, 2003) (Billeder fra *Brain Biodiversity Bank*: www.msu.edu/~brains/).

Den striatale del af grisehjernen har, lige som menneskehjernen, adskilte caudatus og putamen strukturer, som er opdelt af capsula interna (Félix et al., 1999). Caudatus-putamen regionen i rottehjerner anses derimod for at være én overordnet struktur, der repræsenterer det "sensomotoriske striatum". Adskillige cytoarkitektoniske beskrivelser af grisehjernens neo- og allokortikale områder er tilgængelige (Lind, 2005). Disse kortikale opdelinger er delvist blevet understøttet af elektrofysiologiske studier (Woolsey & Fairman, 1946; Palmieri et al., 1987). Desuden er den primære motoriske korteks agranulær i grise (Stephan, 1951) og primater, hvorimod den er granulær i gnave (Uylings et al., 2003), og der er cytoarkitektoniske ligheder mellem grise og mennesker i diencephale kerner (nucleus subthalamicus) (Larsen et al., 2004), dopaminerge kerner i den ventrale mesencephalon

(Ostergaard et al., 1992) og - hvad der er væsentligt for dette studie - i hippocampus (Dilberovic et al., 1986; Holm, 1995). Hippocampus ser ud til at være en evolutionært konservativ region i pattedyrhjernen. Dens principielle regioner Cornu Ammonis (CA1-4) og gyrus dentatus (jf. afsnit 1.3.2.) udviser den samme cytoarkitektur og de samme principielle celletyper i alle arter. Der findes dog forskelle i regional laminær fordeling og i vigtige signalmolekyler, hvorfor minigrisens hippocampus ikke er en perfekt model af den humane hippocampus (Zilles, 2005).

Grisehjernen er blevet beskrevet i adskillige histologiske anatomiske atlas (Sisson & Grossman, 1965; Yoshikawa, 1967; Félix et al., 1999) og for nylig også i et MRI-baseret statistisk atlas over Göttingen minigrisehjernen (Watanabe et al., 2001).

På baggrund af ligheder i den overordnede udformning, i gyrificeringsmønster og i fordelingen af gråt og hvidt hjernevæv er grisehjernen udbredt blevet benyttet til at modellere den humane hjernes udvikling (Pond et al., 2000) og føtal hjerneskade (Lyng et al., 2006). Grisehjernen udvikling ligner menneskehjernen og finder hovedsageligt sted i det sene prænatale liv til det tidlige postnatale liv (Dickerson & Dobbing, 1966; Pond et al., 2000), hvorimod neurogenesen i gnavere hovedsageligt finder sted i den postnatale periode (Davidson & Dobbing, 1968; Dobbing & Sands, 1979). Et nyere studie af Jelsing *et al.* (2006) antyder, at dette i højere grad gør sig gældende for almindelige slagtesvin frem for Göttingen minigrise, hvorfor slagtesvin umiddelbart udgør en bedre model for den humane hjernes udvikling. Begge racers hjerner modnes imidlertid på en menneskelignende måde med hensyn til myelinisering, biokemisk sammensætning (Dickerson & Dobbing, 1966; Flynn, 1984; Mayhew et al., 1996; Thibault & Margulies, 1998) og elektrisk aktivitet (Pampiglione, 1971). Desuden er den cerebrale blodgennemstrømning og autoregulering som følge af hypoksi i overensstemmelse med den, som kan observeres i spædbørn (Buckley, 1986).

Selvom karakteriseringen af grisehjernen endnu ikke er komplet, ser det ud til at grisehjernen afspejler primathjernen med hensyn til morfologi, histologi og hjerneudvikling. På baggrund af disse ligheder er der grund til at tro, at det vil være fordelagtigt at benytte Göttingen minigrise - frem for gnavere - i studiet af menneskelige hjernesygdomme, og at minigrise udgør en passende art til at udvikle en alternativ model for AD i.

En alternativ AD model Den sygdomsmodel i Göttingen minigrisen, der præsenteres her, benytter sig af både non-transgene og transgene principper. Som i de non-transgene modeller vil AD patologi blive forsøgt induceret i normale forsøgsdyr ved hjælp af intracerebrale injektioner. Hvor de non-transgene modeller baserer sig på injektioner af peptider, vil denne model derimod benytte virale vektorer, der vil være i stand til at transfektere neuroner, med gener bærende humane AD mutationer. På denne måde vil man som i de transgene modeller få et permanent udtryk af et specifikt gen, her er det blot i et mindre område af hjernen. Den virale vektor som benyttes er den adeno-associerede virus type 5 (AAV5). Denne virale vektor inficerer pyramideceller med høj affinitet (Davidson et al., 2000; Tenenbaum et al., 2004). Vektoren vil blive injiceret enten uni- eller bilateralt i entorhinal korteks eller hippocampus, da disse strukturer afficeres som nogle af de første i sygdomsforløbet (jf. afsnit 1.2.2.). Injektionerne vil blive foretaget ved hjælp af stereotaktiske koordinater for Göttingen minigrisehjernen, som for nyligt er blevet udarbejdet af Andersen *et al.* (2005). Den unilaterale injektion har den fordel, at det vil være muligt at undersøge kontralaterale effekter, men for at skabe adfærdsmæssige effekter kan det blive nødvendigt at foretage bilaterale injektioner.

Denne model for AD vil blive evalueret ved hjælp af PET, som er et værdifuldt redskab i *in vivo* billeddannelsesstudier, og som specielt er velegnet til longitudinelle studier med gentagne skanningssessioner. For nylig er adskillige radioaktive sporstoffer, som er selektive over for senile amyloide plaks, blevet evalueret (Bacskai et al., 2002) og et af disse sporstoffer (^{11}C -PIB) er blevet efterprøvet i humane studier. Dette stof ophobes i hjerneregioner, hvor der er amyloide plaks i AD patienter, hvorimod der ikke finder nogen kortikal binding sted i raske ældre forsøgspersoner. Dette sporstof vil blive benyttet til *in vivo* monitoreringen af sygdommens udvikling i minigrise-modellen for AD. Yderligere vil der blive foretaget kvantitative analyser med det MRI-baserede atlas over Göttingen minigrisehjernen (Watanabe et al., 2001), og immunohistokemi vil blive benyttet til evalueringen af neuropatologiske ændringer.

For at undersøge om udtryk af muteret APP påvirker grisenes adfærd, vil DNMS testen blive benyttet sammen med en spontan objektgenkendelses test. Denne test er oprindeligt udviklet af Ennaceur og Delacour (1988) til rotter, men er - ligesom det er tilfældet med DNMS testen

i det herværende studie - blevet overført til Göttingen minigrise (Moustgaard et al., 2002; Kornum et al., 2005). Den spontane objektgenkendelses test måler ligesom DNMS testen et korrelat for episodisk hukommelse, men er i modsætning til DNMS testen en test af hukommelsesstof, som ikke er indlært. Evidens fra abestudier antyder, at disse to opgaver ikke kan sidestilles, da aktivt indprentet stimuli i en DNMS opgave kræver neurale strukturer, som er forskellige fra dem, som kræves til den passive indprentning af stimuli i en spontan objektgenkendelses opgave (Dudchenko, 2004).

I den spatiale DNMS opgave vil det være mest hensigtsmæssigt at teste dyremodellen med et 60 sekunders delay indsat mellem samplefasen og testfasen, da det var ved dette delay, at skopolamin havde størst effekt på præstationen (jf. *figur 16*). Det forventes derfor, at det samme vil gøre sig gældende ved den hippocampale læsion i dyremodellen. Det korte delay er samtidig det mest praktiske, da det er det mindst tidskrævende. Dette er ikke uvæsentligt.

Det primære problem ved tg musemodellerne for AD er, som tidligere beskrevet, at de APP og/eller PS tg modeller ikke udvikler NFT, som det er tilfældet i den humane sygdom. Dette problem kan muligvis overvindes i AD modellen i Göttingen minigrisen, da grisevarianten af A β - i modsætning til gnavervarianten - er identisk med den humane peptid (Johnstone et al., 1991). Desuden er det blevet vist, at ophobning af A β og tau finder sted efter diffus hjerneskade i grise (Smith et al., 1999), hvilket er i overensstemmelse med den humane reaktion på diffus hjerneskade.

Hvis modellen viser sig ikke at reproducere hele spektret af neuropatologi er det ikke nødvendigvis et problem. Partielle modeller som kun fokuserer på et enkelt aspekt af den humane sygdom, har vist sig at være værdifulde for den gradvise opbygning af en bedre forståelse af sygdommen og dens mekanismer. Sådanne modeller kan ligefrem være et bedre grundlag for nye opdagelser end de modeller, der på samme tid prøver at reproducere alle sygdommens aspekter. Desuden er komplette modeller normalt kun mulige i bedre forståede sygdomme (Mogensen, 2003).

Nogle væsentlige fordele ved den her beskrevne tilgang er, at man kan administrere de virale vektorer til specifikke neurale strukturer og derfra følge den amyloide patologis udbredelse i hjernen. Hvis modellen udvikler en vis grad af neuropatologi vil den også kunne udgøre en

god model, hvori antidepresanter kan afprøves og evalueres. Dette vil være en væsentlig forbedring i forhold til de tg musemodeller, som benyttes i øjeblikket, da grisen er et større dyr, som evolutionært ligger tættere på mennesket.

Den intracerebrale injektion af virale vektorer har imidlertid også visse begrænsninger som model for amyloid induceret patologi. Injektionstilgangen involverer uundgåeligt læsioner, der er forbundet med den invasive procedure, som er nødvendig for at kunne indføre vektorerne i hjernen. Dette problem vil søges minimeret ved at justere injektionsraten, injektionens størrelse og hviletiden før undersøgelsen af grisene.

4.2.5. Opsummering

Mange forskellige modeller for AD er blevet afprøvet i løbet af de sidste 15 år, men tg modeller er klart de dominerende modeller i øjeblikket. Tg modellerne har været yderst værdifulde for forståelsen af AD's patogenese og for etableringen af amyloid hypotesen. Et problem for alle tg modellerne er imidlertid, at mutationerne i APP og PS generne ikke fører til udbredt NFT formation, som det er tilfældet i den menneskelige sygdom. Forskelle i mus og menneskers hjerner synes at være en afgørende faktor for mange af tg musenes begrænsninger som model for AD. Der er grund til at tro, at grisehjernen ligner den menneskelige hjerne bedre end gnavehjernen, hvorfor der synes at være store perspektiver i at prøve at indføre AD-relaterede mutationer i grisehjernen. Desuden er grisehjernen relativt stor, hvilket gør den velegnet til PET studier. Det forventes, at man fra en AD model i grisen kan lære mere om, hvordan sygdommen udvikler sig hos mennesket. Hvis modellen udvikler en vis grad af neuropatologi, vil den også udgøre en markant bedre model til evalueringen af farmakologisk behandling af AD end de nuværende tg musemodeller. PET studier vil sammen med immunohistokemi blive benyttet til den neuropatologiske evaluering af modellen, mens DNMS testen vil udgøre det primære redskab i evalueringen af patologi-relaterede adfærdssændringer. Selvom grisene har vist sig i stand til at løse DNMS opgaven, og testen er følsom overfor hukommelsesforstyrrelse på baggrund af skopolamin-injektioner, er der alligevel forbundet forskellige metodiske og teoretiske problemstillinger med testen. Disse problemstillinger er afgørende for testens evner som valideringsredskab, hvilket er emnet for diskussionen i det følgende afsnit.

4.3. DNMS testens evner som valideringsredskab

DNMS testen bliver almindeligvis omtalt som en test, der er sensitiv over for episodisk hukommelsesforstyrrelse og over for hippocampal dysfunktion (jf. afsnit 1.3.). Dette gør umiddelbart testen ideel som valideringsredskab for AD modellen. Denne forståelse af testens egenskaber kan imidlertid være problematisk. Så for at bedømme testens evner som valideringsredskab for dyremodellen, vil jeg vurdere testens reliabilitet og validitet og revurdere det neurale grundlag for den tidlige episodiske amnesi i AD.

4.3.1. Testens reliabilitet

Reliabilitet refererer til testens evne til at være konsistent i sine målinger og forstås bedst som et kontinuum fra minimal konsistens i måleresultaterne til næsten perfekt gentagelighed af resultaterne (Gregory, 2004). Der er ikke foretaget studier, som direkte undersøger DNMS testens reliabilitet, men resultaterne for det samme forsøgsdyr har vist sig at være konsistente over tid i aber (test-retest reliabilitet) (Murray et al., 1989), og det samme gælder for grisene i dette studie, idet de alle præsterede på et stabilt niveau på testen efter opnåelse af kriteriet (jf. afsnit 3.2.). Dette er væsentligt, da den acceptable grad af reliabilitet er mere end blot en akademisk problemstilling. Det ville være både problematisk og uetisk at basere den adfærdsmæssige validering af AD dyremodellen på testresultater, der ikke kan gentages eller eftervises (Gregory, 2004). Det ser altså ud til, at DNMS testens resultater er reliable. Men er testresultaterne et udtryk for den hippocampale funktion og for episodisk hukommelse? Dette synes afgørende for testens validitet.

4.3.2. Testens validitet

Validitet refererer til, hvad en testscore betyder. Validitetsbegrebet udvikler sig stadig, hvorfor det er noget mere kontroversielt end det veletablerede reliabilitetsbegreb. En simpel definition af validitet er, i hvilken grad en test måler, hvad den hævder at måle (Gregory, 2004). For at vurdere DNMS testens validitet må man altså overveje, om testresultaterne faktisk er udtryk for det, som vi antager. Der findes stærk empirisk evidens for DNMS testens validitet som en test af den hippocampale funktion.

Hippocampal dysfunktion DNMS testen er blevet benyttet i en lang række arter og modaliteter, og har konsistent vist sig at være sensitiv overfor hippocampal dysfunktion på baggrund af en række forskellige neuropsykologiske problemstillinger (jf. *tabel 5*). Afhængig af hvilken modalitet der testes i, er der naturligvis forskel på hvilke neurale strukturer, som er involveret i løsningen af DNMS opgaven. Eksempelvis findes der evidens for, at de neurale strukturer, som primært er involveret i visuel DNMS, er perirhinal cortex, præfrontal cortex og nucleus dorsalis medialis i thalamus, hvorimod de strukturer, som primært er involveret i spatial DNMS er hippocampus, corpus mamillare, nucleus anterior i thalamus og prælimbiske frontale områder. Selvom der er uenighed om graden af involvering, synes DNMS testning i forskellige modaliteter dog altid at have den hippocampale formation som et fælles neuralt grundlag (Aggleton & Pearce, 2001). Dette støttes af de læsionsstudier og patientstudier, som er opsummeret i *tabel 5*, og desuden af studier med funktionel billeddannelse (Monk et al., 2002) og studier med ERP (Hampson et al., 2002; Deadwyler et al., 1996). Det er dog den spatiale version, som er mest hippocampus-afhængig. Dette kan skyldes, at spatiale hukommelsesopgaver har noget til fælles med fri genkaldelsesopgaver. At etablere en repræsentation som kan understøtte fri genkaldelse, kan være mere krævende for det hippocampale system end at etablere en repræsentation, der er tilstrækkelig til at understøtte genkendelse af objekter (Squire et al., 2004).

Art	Problematik/ læsion af	Modalitet	Referencer
Rotte	Fornix & den mediale præfrontallap	Spatial / visuel	<i>Shaw & Aggleton, 1993</i>
	Amygdala & fornix	Visuel / spatial	<i>Aggleton et al., 1990</i>
	Hippocampus & anterior thalamus	Spatial (position)	<i>Aggleton et al., 1991</i>
	Hippocampus & amygdala	Spatial / visuel / visuo-spatial	<i>Painado-Manzano, 1990; Aggleton et al., 1989</i>
	Hippocampus & fornix	Spatial (position)	<i>Aggleton et al., 1992</i>
	Hippocampus	Visuel	<i>Clark et al., 2001; Aggleton et al., 1986</i>
	Demensmodel med specifik entorhinal synaptisk læsion	Spatial	<i>Ando, et al., 2002</i>
	Fornix & den cingulate kortex	Spatial	<i>Markowska et al., 1989</i>
Hund	Rhinal kortex & hippocampus	Auditiv	<i>Kowalska et al., 2001</i>
Abe*	Hippocampus & amygdala	Visuel / spatial	<i>Murray & Mishkin, 1998</i>
	Hippocampale formation	Visuel / spatial	<i>Alvarado et al., 2002; Beason-Held et al., 2001; Bachevalier et al., 1999</i>
	Fornix og den cingulate kortex	Spatial	<i>Murray et al., 1989</i>
Menneske	Parkinson patienter	Visuel	<i>Blanchet et al., 2000</i>
	Downs syndrom	Spatial / visuel	<i>Nelsen et al., 2005</i>
	Amnestiske patienter	Visuel	<i>Squire et al., 1988</i>
	Korsakoff patienter	Visuel / auditiv	<i>Oscar-Berman et al., 1992</i>
	Alzheimer patienter	Visuel	<i>Irle et al., 1987</i>

Tabel 5 Oversigt over nogle af de arter der er testet med DNMS, hvilke neurale problematikker eller læsioner der er testet med DNMS og hvilke modaliteter DNMS er testet i. Ved rotter testes der hovedsageligt i T-maze i den spatiale udgave af paradigmet og i operant kammer i den visuelle udgave. Ved aber og mennesker testes både den visuelle og spatiale udgave hovedsageligt med en modificeret udgave af Wisconsin General Testing Apparatus (WGTA). * Se også referencerne i *tabel 2* for testning i den visuelle modalitet.

I dyrestudier er det primært forskellige typer læsioner af den hippocampale region, der er blevet evalueret med DNMS testen (jf. afsnit 1.2.5.), og i patientstudier er det primært forskellige neurale lidelser, der rammer den episodiske hukommelse. Da testen konsistent har vist sig sensitiv over for hukommelsesforstyrrelse i disse studier, bidrager de i høj grad med empirisk evidens for testens validitet som en test af den hippocampale funktion. Det er imidlertid mere problematisk at vurdere testens validitet som en test af episodisk hukommelse. Som tidligere beskrevet er DNMS testen ikke et direkte mål for episodisk hukommelse, men derimod en test af genkendelseshukommelse (jf. afsnit 1.2.5.), som anses for at være et *korrelat* for episodisk hukommelse.

Genkendelseshukommelse Det er ikke muligt direkte at teste genkaldelse af episodisk hukommelse i dyr, da dette kræver en sproglig komponent i kommunikationen af det

genkaldte hukommelsesstof. I stedet testes ofte genkendelseshukommelse, hvilket dækker over evnen til at identificere et stimulus, som man tidligere er stødt på (objekter, lokalisationer, idéer, personer, situationer, m.fl.) (Squire et al., 2004). Denne type hukommelse sidestilles ofte med episodisk hukommelse, og i overensstemmelse med dette udviser amnestiske patienter stort set altid en dysfunktion i genkendelseshukommelse (jf. tabel 5). Derfor ser man også ofte klinisk undersøgt dysfunktion i genkendelseshukommelse beskrevet som en episodisk hukommelsesforstyrrelse (Aggleton & Pearce, 2001).

Før genkendelseshukommelse i dyr diskuteres, er det værdifuldt at overveje genkendelse i mennesker. Hvis forsøgspersoner mentalt "rejser tilbage i tid" på en bevidst eller aktiv måde for at genkende noget, som tidligere er blevet præsenteret, så kan tests af genkendelseshukommelse antages at være tests af episodisk hukommelse (jf. afsnit 1.2.2.). Den humane genkendelseshukommelses natur er imidlertid et kontroversielt emne. Det primære tema i debatten er, hvorvidt genkendelseshukommelse består af en enkelt proces, som er direkte koblet til andre former for episodisk genkaldelse, eller om den er en todelt proces, hvori genkendelse kan stamme fra to (eller flere) uafhængige processer. Den ene af disse processer ser ud til at være episodisk, da den involverer en bevidst genkaldelse (recollection) af den tidligere begivenhed, hvorimod den anden blot involverer oplevelsen af bekendthed (familiarity) (Squire et al., 2004; Aggleton & Pearce, 2001). Genkaldelse af et stimulus antages at afhænge af hippocampus, hvorimod oplevelsen af bekendthed antages at afhænge af den omkringliggende cortex (Suzuki & Clayton, 2000). Denne dikotomi hjælper til at belyse et fundamentalt problem for testning af genkaldelseshukommelse i dyr. Distinktionen mellem genkaldelse og bekendthed er svær - hvis ikke umulig - at overføre til forsøgsdyr, da der ikke findes metoder til at undersøge dyrenes evne til at "rejse" i mental tid, hvilket er centralt for den episodiske genkaldelse (Squire et al., 2004). I den spatiale DNMS opgave reforceres grisen for at vælge at gå ned ad den arm, den ikke var i under sample fasen. Grisen skal derfor træffe et valg baseret på tidligere tilegnet information. Selv om dette umiddelbart ligner en test af genkaldelse, kræver opgaven imidlertid ikke, at grisen bevidst genkalder episoden, hvor den blev tvunget til at gå ned ad mazes ene arm. Selv om amnestiske patienter typisk er hæmmede på opgaver, der er sammenlignelige med DNMS opgaven i dyr, betyder dette ikke nødvendigvis, at DNMS opgaven undersøger episodisk hukommelse. Hvis valg baseret på den relative bekendthed (familiarity) med et stimulus effektivt kan løse DNMS problematikken, så demonstrerer dyrenes præstation på denne

opgave ikke nødvendigvis episodisk hukommelse (Aggleton & Pearce, 2001). Denne problematik gælder imidlertid ikke i samme grad den spatiale udgave af DNMS testen som den visuelle udgave, hvor der præsenteres nye objekter i hver trial. I den spatiale DNMS opgave i den T-lignende maze er det de samme stimuli, som er til stede i hver trial (mazens højre og venstre arm), hvilket udelukker valg baseret på det relative bekendtskab, idet begge stimuli er lige bekendte. Desuden kan grisene ikke løse opgaven ud fra en fast association mellem en belønning og en enkelt respons eller lokalisation, da den reforcerede arm skifter fra trial til trial. Derfor må grisene huske, hvad der skete i samplefasen for at kunne vælge rigtigt i testfasen (Dudchenko, 2001).

Et fundamentalt problem for den spatiale DNMS tests evner som valideringsredskab er imidlertid, om det overhovedet er muligt at undersøge episodisk hukommelse i grisene. Hukommelse for en given episode kræver genkaldelse af information om hvad der skete, hvornår det skete og hvor det skete. At undersøge alle disse facetter ved hukommelse i en enkelt adfærdstest har vist sig at være meget problematisk. Selv hvis det skulle lykkes at frembringe en sådan test, vil den alligevel ikke kunne demonstrere episodisk hukommelse i grisene, da den ikke kan påvise en bevidst eller aktiv genkaldelse, som er associeret med en mental "tidsrejse" tilbage til begivenheden, der skal genkaldes (jf. Tulvings definition af episodisk hukommelse i afsnit 1.2.1.) (Aggleton & Pearce, 2001). Ifølge Tulving (2002) er tilstedeværelsen eller fraværet af episodisk hukommelse imidlertid ikke et spørgsmål om alt eller intet, og dette gælder såvel spørgsmålet om episodisk hukommelse i forskellige arter som i det enkelte forsøgsdyr. Det synes derfor muligt at bryde episodisk hukommelse op i nogle simple komponenter og undersøge dem separat. Da en begivenhed i episodisk hukommelse kan ses som et "mentalt snapshot", der indeholder information angående *hvad?* *hvornår?* og *hvor?*, er disse komponenter oplagte mål for dyrestudier (Suzuki & Clayton, 2000; Aggleton & Pearce, 2001). I den spatiale DNMS test fokuseres der på spørgsmålet om *hvor?* Denne komponent har ikke blot vist sig at være en af de letteste at undersøge i dyr, men der findes også teoretisk baggrund for at mene, at nogle former for spatial hukommelse er specielt egnede til at studere episodisk-lignende hukommelse (Aggleton & Pearce, 2001).

Allocentrisk hukommelse Allocentrisk hukommelse refererer til brugen af fjerne cues' relative positioner som støtte til spatial lokalisation og navigation. Antagelsen om at episodisk hukommelse for en begivenhed kan ses som et "mentalt snapshot" understreger vigtigheden af

at sammenkoble eller binde forskellige elementer i hukommelsen. For at skabe et "snapshot" er det ikke tilstrækkeligt blot at indprente de enkelte komponenter. Det er også nødvendigt at arrangere dem i en unik spatial ramme. På en lignende måde skal de cues, som bruges til allocentriske spatiale processer kombineres på en måde, som ikke blot identificerer de forskellige cues, men også deres positioner i forhold til hinanden. Ud fra dette synspunkt består episodisk hukommelse ikke blot af en optegnelse over begivenheder eller stimuli, men også af hvordan disse er sammenkoblet eller bundet sammen (Aggleton & Pearce, 2001). Dette er i overensstemmelse med den relationelle teori for den hippocampale funktion, som blev beskrevet i afsnit 1.2.3. På baggrund af dette synes det derfor afgørende for testens validitet, at grisene benytter en allocentrisk strategi til at løse den spatiale DNMS opgave. Når grisene løser opgaven kan de imidlertid gøre dette baseret på hukommelse for en række forskellige typer information. Typisk antages det, at dyr som løser DNMS i en T-maze gør dette ved at huske lokaliseringen af den sidst besøgte arm baseret på dennes spatiale forhold til cues uden for mazen (ekstramaze cues). Dette er en allocentrisk spatial strategi. Grisene kan imidlertid også træffe deres valg baseret på en egocentrisk spatial strategi, hvor de navigerer ud fra deres krops position i mazen. Grisene træffer dermed deres valg af arm baseret på en indre fornemmelse af retning (Dudchenko, 2004; Aggleton & Pearce, 2001). Alternativt kan grisene benytte en respons-strategi, hvor de husker, hvilken vej de gik og drejer den modsatte vej i efterfølgende trial, eller de kan benytte en strategi, hvor de benytter svingdørens lokalisation under samplefasen til at guide deres valg i testfasen (Dudchenko, 2001). Endelig kan grisen opdage, hvilken arm den sidst har været i ved hjælp af olfaktoriske cues, som er efterladt på mazens arme (Dudchenko, 2004). Denne strategi skulle imidlertid være udelukket, da mazens "T-kryds" blev spulet med koldt vand før hver testfase (jf. afsnit 2.3.5.). Yderligere kan grisenes adfærd under delay-perioden også have indflydelse på deres valg af arm i testfasen. Det kan ikke udelukkes, at grisene benytter medierende strategier under delay-perioden, som bedre gør dem i stand til at vælge den rigtige arm i testfasen. Eksempelvis kan de orientere deres hoveder imod det kommende korrekte valg eller positionere sig i startboksen på en måde, som gør dem i stand til at vælge den rigtige arm. Denne form for adfærd er blevet observeret hos rotter, der løser en spatial DNMS opgave i et operant kammer (ibid.).

Minigrises adfærd i en T-maze er ikke blevet undersøgt, men studier med rotter antyder, at rotter bruger det spatiale forhold mellem mazens arme og tydelige ekstramaze cues til at løse spatiale DNMS opgaver, når sådanne pejlemærker er tilgængelige. Rotterne præsterer imidlertid også på et niveau bedre end chance, hvis det spatiale forhold mellem mazen og ekstramaze cues manipuleres, hvilket antyder, at de ikke benytter allocentrisk information alene til at guide deres valg. Ikke-kontrollerede intramaze cues ser ikke ud til at blive benyttet af rotter. Det ser derfor ud til, at rotter under almindelige forhold vil benytte både ekstramaze cues (når de er tilgængelige) og indre repræsentationer af deres sidste valg til at løse spatiale DNMS opgaver (Dudchenko, 2001). Som beskrevet i afsnit 2.2. udgør forskellige mønstre, som er klippet ud af sorte affaldssække, tydelige ekstramaze cues for grisene. Dette skulle, baseret på rotters adfærd i T-mazen, tilskynde en allocentrisk løsningsstrategi. Dermed tilskyndes grisene til at benytte en løsningsstrategi, som har teoretisk betinget validitet som et udtryk for episodisk-lignende hukommelse. Samtidig er denne løsningsstrategi i overensstemmelse med den relationelle teori for den hippocampale funktion, hvorfor testresultaterne også har teoretisk validitet som et udtryk for den hippocampale funktion.

På trods af de åbenlyse problemer ved at måle episodisk hukommelse i grisene synes det altså muligt at undersøge *hvor?* aspektet af episodisk hukommelse med den spatiale DNMS test. Hvis grisene enten bevidst genkalder, hvilken arm de gik ned ad under samplefasen, eller hvis de benytter en allocentrisk løsningsstrategi, findes der teoretisk baggrund for at benytte testresultaterne som et validt korrelat for episodisk hukommelse. Dette støttes af klinisk evidens for, at hippocampale skade i mennesker ikke alene kan resultere i amnesi, men også i et selektivt tab af spatial allocentrisk hukommelse (Aggleton & Pearce, 2001). Mere generelt kan testens validitet vurderes ved at overveje de sygdomme og læsioner, som er ansvarlige for episodisk amnesi i mennesker - herunder AD (jf. *tabel 5*). Dette viser tydeligt, at der er en klar overensstemmelse mellem de områder i hjernen, som er ansvarlige for episodisk amnesi, og dem, som er kritiske for tests af spatial hukommelse i dyr (*ibid.*). Testen synes dermed at have validitet som en test af episodisk-lignende hukommelse og som en test, der er sensitiv over for hippocampale skader. Dette gør umiddelbart testen til et fordelagtigt valideringsredskab for dyremodellen for AD, idet dyremodellen forventes at udvikle AD relaterede hippocampale læsioner, som resulterer i amnestiske symptomer (jf. afsnit 4.2.3.). Et studie af Irle *et al.* (1987) støtter yderligere testens evner som valideringsredskab for dyremodellen, idet det blev

vist, at en gruppe AD patienter præsterede på chance-niveau på en visuel DNMS opgave og tilsvarende var hæmmet på en opgave, hvor de skulle huske lokaliseringen af de objekter, som var blevet præsenteret i DNMS opgaven. Så selvom der er metodiske og teoretiske problemer med testens validitet som et mål for episodisk hukommelse, synes grisenes præstation på DNMS testen alligevel at være et mål for en type hukommelse, som er direkte relevant for AD. Specielt da skopolamin er et stof, som inducerer en hukommelsesforstyrrelse, som kan relateres til AD's patogene kaskade (jf. afsnit 4.1.2.). Hvis AD grisemodellen udviser en reduceret præstation på den spatiale DNMS test, synes testresultaterne derfor at være et validt mål for en AD-relateret hukommelsesforstyrrelse. Nye fund fra AD forskningen udgør imidlertid et potentielt problem for dyremodellen og for testens evner som valideringsredskab, idet de antyder, at det ikke er den isolerede skade i hippocampus eller MTL, der forårsager den tidlige amnesi, som er forbundet med AD.

4.3.3. Revurdering af det neurale grundlag for den tidlige amnesi i AD

Som beskrevet i afsnit 1.1.2. antages det, at det neurale grundlag for den tidlige amnesi i AD er den tidlige atrofi i MTL og specielt i entorhinal korteks. Denne struktur er derfor også udgangspunktet for induktionen af den AD relaterede patologi i dyremodellen (jf. afsnit 4.2.3.). Samtidig er lokaliseringen af denne tidlige patologi baggrunden for at vælge DNMS testen som valideringsredskab. Nye fund fra AD forskningen problematiserer imidlertid antagelsen. Nestor *et al.* (2005) fandt i et strukturelt billeddannelsesstudie med PET og volumetrisk MRI, at den tidlige atrofi og hypometabolisme i MTL ikke kunne gøre rede for den tidlige episodiske hukommelsesforstyrrelse i AD. Denne konklusion blev baseret på, at graden af atrofi og hypometabolisme i MTL i en gruppe AD patienter – som alle havde klinisk dokumenteret episodisk hukommelsesforstyrrelse - ikke adskilte sig fra en kontrolgruppes, som bestod af semantisk demente patienter uden episodisk hukommelsesforstyrrelse. At atrofi og hypometabolisme i MTL ikke nødvendigvis medfører en episodisk hukommelsesforstyrrelse kan umiddelbart synes i modstrid med den tidligere beskrevne evidens for hippocampus' rolle i amnesi (jf. afsnit 1.2.). Men man må huske, at neurodegeneration ikke er det samme som en læsion. Læsioner medfører normalt et totalt neurontab, hvorimod neurodegeneration resulterer i et mere gradvist neurontab over tid, hvilket ikke nødvendigvis medfører en kognitiv forstyrrelse i de tidlige stadier (ibid.). Dette afspejles i de patologiske stadieteorier, hvor de første stadier er såkaldt "klinisk tavse", hvilket

vil sige, at de er mere eller mindre symptomfri (jf. afsnit 1.1.2.). Gruppen af Alzheimer patienter adskilte sig til gengæld fra gruppen af semantisk demente ved en hypometabolisme i MTL's limbisk-diencephale forbindelser – specielt omkring den posteriore del af gyrus cingularis (det retrospleniale område), hvilket er et område, som rammes tidligt i AD sygdomsforløbet - nogle gange flere år før de første symptomer opstår (ibid.).

På baggrund af deres fund foreslår Nestor *et al.* (2005), at den tidlige skade i MTL ikke isoleret set kan forklare den episodiske hukommelsesforstyrrelse, som er karakteristisk for tidlig AD. Dette støttes af dyrestudier, som har fundet, at kognitionsforstyrrelse i aldrende rotter og aber ikke er forbundet med celletab i den hippocampale formation (Gallagher & Rapp, 1997; Shamy *et al.*, 2005). Nestor *et al.*'s data antyder derimod, at den episodiske hukommelsesforstyrrelse først opstår, når adskillige skader rammer et funktionelt integreret netværk bestående af MTL og dens limbisk-diencephale forbindelser – den Papez'ske neuronring som blev beskrevet i afsnit 1.2.2. - og disse når op over en grænseværdi. At der skulle findes en sådan grænseværdi støttes af, at de første stadier i de patologiske stadieteorier er klinisk tavse stadier, hvor graden af atrofi ikke er nok til at medføre funktionsnedsættelse. Desuden har Vargha-Khadem *et al.* (2001) i deres arbejde med udviklingsamnesi fundet, at det kræver 25-30% atrofi i hippocampus, før der opstår episodisk amnesi i disse patienter. At skader på den Papez'ske neuronring kan føre til amnesi er veletableret, idet der er dokumenteret amnesi i patienter efter bilaterale skader i MTL (jf. afsnit 1.2.4.), diencephalon (Parkin, 2001), retrosplenium (Valenstein *et al.*, 1987) og fornix (Gaffan & Gaffan, 1991), og der er ikke umiddelbart nogen kvalitativ forskel på denne amnesi, idet alle patienterne har forskellig grad af anterograd og retrograd amnesi for episodisk hukommelse. Der er ligeledes dokumenteret hukommelsesforstyrrelser i rotter med eksperimentelle læsioner i de Papez'ske strukturer og forbindelserne imellem dem (Aggleton & Pearce, 2001).

Disse fund er altså i modstrid med de patologiske stadieteoriers antagelse om, at den tidlige amnesi, som er forbundet med AD, alene skyldes den tidlige atrofi i entorhinal korteks. Metoden i Nestor *et al.*'s studie kan imidlertid siges at være stærkere end metoden i de patologiske stadieteorier. Kognitiv funktion afhænger sandsynligvis af, hvordan de underliggende strukturer fungerer, hvorfor hypometabolisme kan siges at være et mere direkte korrelat for dysfunktion end atrofi, der er et mere indirekte mål for den nedsatte funktion.

Hypometabolisme afspejler nedsat synaptisk aktivitet, hvilket både kan skyldes neural læsion og synaptisk dysfunktion, hvorimod atrofi alene afspejler strukturelle ændringer (Chételat et al., 2003).

På baggrund af Nestor *et al.*'s fund ser det altså ud til, at de patologiske stadieteorier for AD ikke har ret i deres antagelse om, at den tidlige amnesi, som er forbundet med AD, skyldes den tidlige atrofi i entorhinal cortex. Da atrofien i den hippocampale region ikke i sig selv kan gøre rede for amnesien, må man i stedet se på den samlede funktionsnedsættelse i det neurale netværk, som hippocampus er en del af – altså den Papez'ske neuronring⁴. Dette kan muligvis være en mere generel betragtning, som ikke kun gælder den tidlige episodiske hukommelsesforstyrrelse, som er forbundet med AD. Amnesi forårsaget af akut hypoksi er nemlig også forbundet med både atrofi i MTL og bilateral hypometabolisme i retrosplenium og thalamus (Reed et al., 1999), og yderligere er amnesi på baggrund af herpes encephalitis associeret med hypometabolisme i retrosplenium og MTL (Reed et al., 2005). Dette stemmer godt overens med, at den Papez'ske neuronring er impliceret i indprentningen af hukommelsesspor (jf. afsnit 1.2.2.), og at indprentningsvanskeligheder er den primære årsag til den tidlige amnesi i AD (jf. afsnit 1.2.7.).

At det er den samlede funktionsnedsættelse i den Papez'ske neuronring, som er ansvarlig for den tidlige episodiske hukommelsesforstyrrelse i AD udgør et potentielt problem for DNMS testens evner som valideringsredskab for dyremodellen. For hvis ikke testen er sensitiv over

⁴ At der ikke tidligere har været fokus på dette neurale netværk i AD forskningen afspejler en klassisk problemstilling inden for kognitiv neurovidenskab – er kognitive funktioner lokaliserede i bestemte neurale strukturer eller er de distribuerede i neurale netværk? Kognitive processer afspejler generelt aktivitet i neurale netværk frem for specifikke regioner isoleret (Devenand et al., 2005). Men forskere bliver ofte forført af korrelationer mellem nedsat kognitiv funktion og nedsat aktivitet i en neural struktur. I hukommelsesforskningen har dette ligefrem ført til en bias, idet fokus i høj grad er på den hippocampale region. Denne bias har været med til rette AD forskningen i samme retning, da de patologiske stadieteorier i høj grad har været styrende for, hvilke neurale strukturer der har været fokus på i undersøgelsen af de tidlige stadier af AD. Denne bias afspejles også i, at søhesten er et yndet logo for hukommelsesklinikker og AD konferencer. Årsagerne til denne bias er mange: F.eks. er H.M. den første beskrevne amnestiske patient, man møder flest amnestiske patienter med læsioner i MTL i klinikken, og "Californiens skolen" omkring Larry Squire har været dominerende i hukommelseslitteraturen.

for skader i hele dette system, men blot over for hippocampale skader, kan den vise sig at være for specifik. Der findes imidlertid en klar overensstemmelse mellem de områder i hjernen, som er ansvarlige for anterograd episodisk amnesi i forskellige patientgrupper og dem, som er kritiske for tests af spatial hukommelse i dyr, idet begge typer hukommelse netop afhænger af strukturerne i den Papez'ske neuronring (Aggleton & Pearce, 2001). Så selv efter revurderingen af det neurale grundlag for den tidlige amnesi i AD, synes den spatiale DNMS test stadig at være et anvendeligt valideringsredskab for dyremodellen.

4.3.4. Opsummering

DNMS testen har en rimelig god reliabilitet, og testresultaterne har vist sig at være konsistente over tid i både aber og grise. Testens validitet som en test, der er sensitiv over for hippocampal dysfunktion er veletableret, idet der findes empirisk evidens for, at testen er sensitiv over for hippocampale problemstillinger i en lang række arter og modaliteter. Der er imidlertid en række metodiske og teoretiske problemer ved at benytte DNMS testen som en test af episodisk hukommelse. Eksempelvis er det ikke muligt direkte at teste episodisk hukommelse i dyr. DNMS testen er derfor heller ikke et direkte mål for episodisk hukommelse men derimod for genkendelseshukommelse, som er et korrelat for episodisk hukommelse. Denne type hukommelse er imidlertid kun et validt korrelat for episodisk hukommelse, hvis grisene bevidst genkalder hændelsen i samplefasen til at løse opgaven. I kraft af den spatiale modalitet, hvor grisene tilskyndes at benytte en allocentrisk løsningsstrategi til at løse opgaven, har testen imidlertid teoretisk validitet som en test af *hvor?* aspektet af episodisk hukommelse. Samtidig er denne løsningsstrategi i overensstemmelse med den relationelle teori for den hippocampale funktion, hvorfor testresultaterne også har teoretisk validitet som et mål for den hippocampale funktion. På trods af de metodiske og teoretiske problemer ved at bruge DNMS testen som en test af episodisk hukommelse synes testen at have gode egenskaber som valideringsredskab for dyremodellen, idet det er blevet vist, at AD patienter præsterer på chance-niveau på en DNMS opgave.

Et nyere skanningsstudie udgør imidlertid et problem for dyremodellen og DNMS testens evner som valideringsredskab, idet der findes evidens for, at det ikke er den tidlige atrofi i entorhinal korteks og MTL, som er det eneste grundlag for den tidlige episodiske amnesi i AD. Det er derimod den samlede funktionsnedsættelse i den Papez'ske neuronring,

som er baggrunden for amnesien. I kraft af at der testes i den spatiale modalitet, udgør dette imidlertid ikke et større problem for testens valideringsevner, da spatiale tests har vist sig sensitive over for læsioner i alle den Papez'ske neuronrings strukturer og forbindelserne imellem dem.

Kapitel 5

Konklusion

Dette speciale handlede om kognitiv testning af Göttingen minigrisen som led i valideringen af en dyremodel for AD. Da det både første og sværeste symptom ved AD som regel er problemer med episodisk hukommelse, fokuserede udviklingen af den kognitive test på dette aspekt af sygdommens symptomologi. Episodisk hukommelse kan imidlertid ikke testes direkte i dyr, da kommunikationen af denne type hukommelse kræver en sproglig komponent. DNMS testen er en veletableret kognitiv test, som måler genkendelseshukommelse - et korrelat for episodisk hukommelse. Denne test blev overført til Göttingen minigrisen, så den passer til grisens fysik og præferencer. Grisene blev testet i den spatiale modalitet i en T-lignende maze, hvor der var tydelige ekstramaze cues tilgængelige. Dette er afgørende for testens teoretiske validitet som en test af episodisk-lignende hukommelse.

Alle grisene lærte den spatiale DNMS opgave inden for 220 trials med et 60 sekunders delay indsat mellem samplefasen og testfasen, hvilket svarer nogenlunde til makak-abers indlæringsniveau på en tilsvarende DNMS opgave. Grisene klarede sig imidlertid markant dårligere end rotter på opgaven, hvilket kan skyldes, at grise – i modsætning til rotter – ikke har en naturlig tendens til at alternere i deres valg på spatiale opgaver.

Efter alle grisene havde opnået kriteriet for indlæring af opgaven, blev de testet med forskellige delays. Skopolamin er et stof, som har en veletableret effekt på hukommelsen, der minder om den dysfunktion, som ses ved tidlig AD. Introduktionen af de længere delays resulterede i en forventet tidsafhængig reduktion i grisenes præstation, og der var en signifikant effekt af en 0,04 mg./kg. dosis skopolamin ved delays på 60 sekunder og 900 sekunder, hvorimod effekten ved det 300 sekunders delay tilnærmede sig signifikant niveau. Da der var signifikant effekt af skopolamin med et 60 sekunders delay, vil det være mest hensigtsmæssigt at teste AD dyremodellen med dette korte delay, da det er det mest praktiske med hensyn til, hvor lang tid det vil tage at teste dyremodellen.

AD modellen i Göttingen minigrisen introduceres som et supplement til eksisterende tg musemodeller. Musemodellerne har været yderst værdifulde for vores forståelse af de neuropatologiske, biokemiske og adfærdsrelaterede ændringer i AD. De er imidlertid stødt på en del problemer på grund af forskelle i mus og menneskers hjerner – specielt har musemodellerne ikke været i stand til at udvikle NFT. AD modellen i Göttingen minigrisen udvikles ved at benytte både transgene og non-transgene principper, hvor gener med humane AD mutationer, som er koblet til virale vektorer, injiceres i hippocampus. Håbet er, at man ved at benytte et større forsøgsdyr, hvis neuroanatomi minder mere om den humane, vil få en AD dyremodel, som kan lære os mere om AD's neuropatologiske processer, og som eventuelt vil kunne udvikle NFT. Et væsentligt aspekt ved valideringen af AD dyremodellen i Göttingen minigrisen er at vise, at de inducerede neuropatologiske ændringer resulterer i den forventede kognitive dysfunktion. I den henseende udgør DNMS testen et værdifuldt valideringsredskab for AD dyremodellen, idet testen er sensitiv over for både hippocampale læsioner og episodisk hukommelsesforstyrrelse.

DNMS testen har altså vist sig at være en velegnet kognitiv test til Göttingen minigrisen, og den udgør et værdifuldt redskab til valideringen af AD dyremodellen. Testen vil imidlertid også kunne benyttes til at validere andre grisemodeller med hippocampal problematik. Eksempelvis har en forskergruppe omkring en tg AD model i Göttingen minigrisen, på Institut for Molekylær Genetik på Århus Universitet (jf. afsnit 4.2.3.), vist interesse for vores ekspertise på hukommelsestestning af minigrisen. Hvis en af – eller begge – grisemodellerne viser sig at være en god model for AD, vil både modellen og DNMS testen kunne udgøre værdifulde redskaber til valideringen af antidemens medicin, da grisehjernen minder mere om menneskehjernen end de eksisterende gnavermodellers.

DNMS testen kan også benyttes til yderligere at undersøge Göttingen minigrisens kognitive egenskaber. Ligesom tidligere kognitive studier af Göttingen minigrise (Moustgaard et al., 2002; Moustgaard et al., 2004; Moustgaard et al., 2005; Kornum et al., 2005) har dette studie ikke afsløret problemer med den kognitive træning af grisene set i forhold til andre arter. Dette studies formål har imidlertid ikke været at vise, at grise er i stand til at indlære DNMS opgaven med flere tilgængelige valgstimuli end f.eks. rotter. Der blev kun benyttet to valgmuligheder i den spatiale DNMS opgave, hvilket også er en almindelig procedure ved

testning af rotter. I andre versioner af DNMS paradigmet, som er beregnet til testning af mennesker og aber, benyttes ofte et større antal valgstimuli. Det ville derfor være interessant for fremtidige studier at undersøge, om grise er i stand til at lære DNMS opgaven med et antal tilgængelige valgstimuli, der tilnærmer sig denne sværhedsgrad. Man kunne f.eks. teste minigrisene på en spatial DNMS opgave i en radial 8-arm maze. Tilsvarende kunne det være interessant at teste grisene i andre modaliteter end den spatiale for at undersøge, om der er en modalitet, som de er specielt stærke i – eksempelvis den olfaktoriske, da grise har højt udviklede olfaktoriske evner. Hvis der kan demonstreres kognitive egenskaber i grisen, som er bedre end rotters, i neuropsykologisk relevante typer opgaver, kan dette sikkert øge interessen for at benytte grise som dyremodeller af humane hjernelidelser. Baggrunden for valget af art i en hvilken som helst neurovidenskabelig dyremodel afhænger imidlertid af mange forskellige faktorer, herunder neurobiologiske ligheder med mennesker, praktiske/tekniske forhold og etiske overvejelser. Eksempelvis gør grisens relativt store hjerne denne art meget mere velegnet til PET end rotter, og mange mennesker anser brugen af grise som forsøgsdyr som værende mere etisk acceptabelt end brugen af primater. Økonomiske faktorer er også vigtige. Opstaldningen af selv en lille gruppe aber til eksperimentel brug er u hensigtsmæssigt dyr efter ny europæisk lovgivning for opstaldning af primater (Moustgaard et al., 2005). Denne udvikling kan gøre brugen af grise i neurovidenskabelige dyremodeller mere almindelig. Dette forhold gør sig specielt gældende i Danmark, hvor vi mangler et større forsøgsdyr, efter vi helt er stoppet med at benytte aber indenfor neurovidenskabelig forskning.

Kapitel 6

Perspektivering

Som beskrevet i afsnit 1.1.3. er de nuværende behandlingsmuligheder over for AD yderst begrænsede. Den mest benyttede farmakoterapi er behandling med kolinesterasehæmmere, som maksimalt kan udsætte sygdomsprocessen 1-2 år. Der er derfor stor interesse for at finde alternative farmakologiske behandlinger, som, selv hvis de blot kan forbedre det kliniske enderesultat en lille smule, vil være af stor værdi for de pågældende patienterne og deres pårørende. Traditionelt er alternative antidemenspræparater blevet testet i de tilgængelige transgene (tg) musemodeller, hvilket er hensigtsmæssigt ved den første afprøvning af præparatet, men er mere problematisk ved en senere evaluering af præparatets potentiale som egentlig demensbehandling. Her er det mere hensigtsmæssigt at benytte et større forsøgsdyr, hvis hjerne minder mere om menneskets - eksempelvis Göttingen minigrisen, som jeg har argumenteret for i afsnit 4.2.4.

Der er en øget interesse i hormonet Erythropoietins (EPO) potentiale som et stof, der kan forbedre det kliniske enderesultat efter hjerneskade. Der findes et stigende antal studier, som har vist, at centralt og systemisk administreret EPO kan reducere konsekvenserne af vaskulær såvel som neurokemisk og mekanisk påført hjerneskade, når denne evalueres ud fra biokemiske, histologiske og kognitive/adfærdsmæssige parametre (Malá & Mogensen, 2006). Samtidig er der en række artikler, som antyder, at behandling med EPO kan vise sig effektivt over for neurodegenerative sygdomme såsom AD (Jelkmann, 2005; Chong et al., 2005a 2005b; Genc et al., 2004; Ehrenreich et al., 2004; Hasselblatt et al., 2006), hvorfor EPO kan udgøre et muligt alternativ eller supplement til de eksisterende kolinesterasehæmmere. Lige som den eksisterende AD behandling vil EPO heller ikke kunne stoppe sygdommens progression, men vil snarere virke som ”skadesreduktion”, da stoffet virker neuronbeskyttende, men ikke påvirker de forårsagende faktorer bag neuropatologien (Ehrenreich et al., 2004). Der findes kun et enkelt studie, som har undersøgt EPO’s potentiale

som AD behandling *in vitro* (Chong et al., 2005a), og der er endnu ikke publiceret studier, der undersøger EPO's potentiale som AD behandling *in vivo*. Det vil derfor være både interessant og relevant for fremtidige studier at evaluere EPO's effekt på en AD dyremodel. Her vil den spatiale DNMS test og AD modellen i Göttingen minigrisen være oplagte redskaber til at undersøge, om der er forbundet et kognitivt udbytte ved at behandle AD neuropatologi med EPO. Umiddelbart vil det nok være mest hensigtsmæssigt at starte en sådan forskning med at lave et pilotprojekt i en af de veletablerede tg musemodeller, før man påbegynder det dyrere og mere tidskrævende studie med minigrisene. Sådanne studier må imidlertid antages allerede er påbegyndt i laboratorier, hvor de har større ekspertise inden for arbejdet med tg musemodeller. Et næste skridt for studier med Göttingen minigrise kunne derfor være at replikere fund fra rottestudier, som viser en signifikant genopretningseffekt af EPO efter mekanisk læsion på (fimbrio-)fornix, når denne evalueres med kognitive tests (Mogensen et al., 2004; Malá et al., 2005). I det følgende vil jeg først introducere EPO, hvorefter jeg vil skitsere mulige mekanismer bag EPO's neuronbeskyttende egenskaber, og til sidst vil jeg argumentere for EPO's potentiale som et muligt antidemenspræparat.

6.1. Erythropoietin (EPO)

EPO er et hormon, der oprindeligt blev beskrevet som værende produceret i nyrerne og virkede som en hematopoietisk vækstfaktor. Man har længe kendt til EPO's rolle i dannelsen af røde blodceller, og hormonet er nok mest kendt fra sportsverdenen, hvor det (mis)bruges som et præstationsfremmende dopingmiddel. EPO øger imidlertid også præstationen i sportsgrene, hvor optagelsen af oxygen ikke er den primære determinant for en god præstation. Det er derfor blevet foreslået, at dopingeffekten af EPO også inkluderer en påvirkning af hjernen (Noakes, 2004). Dette støttes af et rottestudie af Mogensen *et al.* (2004) som fandt, at en sham-opereret kontrolgruppe behandlet med EPO benyttede en anderledes løsningsstrategi i en watermaze-opgave end ikke-behandlede rotter. På baggrund af disse fund har jeg sammen med to medstuderende lavet et pilotprojekt, hvor vi testede denne hypotese på 16 unge raske mandlige forsøgspersoner⁵. Forsøgspersonerne blev vurderet på et neuropsykologisk testbatteri - både før og efter de fik administreret EPO - så vi kunne vurdere

⁵ Forsøgspersonerne var rekrutteret til et fysiologisk Ph.d.-studie på idræt, som undersøgte EPO's effekt på iltoptaget ved maksimal belastning.

stoffets eventuelle påvirkning af kognitionen. Det er endnu for tidligt at udtale sig om studiets resultater, da data endnu ikke er færdigbehandlede.

EPO er længe blevet benyttet som et effektivt middel til at behandle anæmi som følge af nyresvigt, kræft, for tidlig fødsel, kronisk inflammatorisk sygdom og HIV infektion (Hasselblatt et al, 2006; Genc et al., 2004). Det er imidlertid først for nylig, at man er begyndt at lære mere om EPO's funktion i hjernen. Der er fundet flest EPO receptorer i hippocampus, capsula interna, cortex og områder i midthjernen (Genc et al., 2004). Selv om EPO og dens receptorer kun udtrykkes svagt i den almindelige voksne hjerne, bliver de dramatisk opreguleret som reaktion på hypoksi eller metabolisk forstyrrelse af neuroner. Det cerebrale EPO system er tilsyneladende et ontogenetisk tidligt beskyttende system, som spiller en afgørende rolle i embryogenesen og hjernens udvikling fra det embryoniske stadie til den tidlige postnatale periode (Genc et al., 2004; Ehrenreich et al., 2004). Hos voksne er systemet nedreguleret til at forblive stille, indtil en metabolisk forstyrrelse af neuroner udløser dets opregulering. Dette kan tolkes som et endogent system, der beskytter neuroner mod neurodegeneration (Ehrenreich et al., 2004). Denne vækstfaktors egenskaber gør den til en ideel kandidat for farmakoterapeutisk neuronbeskyttelse, hvilket kan defineres som en tilgang til bedst muligt at opretholde/bevare den cellulære interaktion i hjernen, som resulterer i en maksimal beskyttelse af den neurale funktion. Denne fysiologiske definition af neuronbeskyttelse kan dermed ses som udtryk for det gamle mantra "use it or lose it" (Ehrenreich & Sirén, 2001).

6.2. EPO's neuronbeskyttende egenskaber

Eksisterende farmakoterapeutiske tilgange til neuronbeskyttelse er hidtil mislykkedes over for mange hjernesygdomme. Eksempelvis er glutamat-antagonister og vækstfaktorer blevet testet som neuronbeskyttende stoffer ved slagtilfælde og AD. Disse tilgange var baseret på strålende resultater fra den prækliniske forskning. Årsagerne til at disse tilgange mislykkedes er forskelligartede og strækker sig fra problemer med at overføre dyrestudier til humane studier (artsforskelle, dosis og administration, timing, type af dyremodel), toksicitet og intolerance-reaktioner, til en alt for høj heterogenitet i den humane population i studier, der rekrutterer svagt definerede patientgrupper (Ehrenreich et al., 2004). Problemerne med at overføre dyrestudier til humane studier vil sandsynligvis være mindre, hvis der benyttes et større

forsøgsdyr, som evolutionært ligger tættere på mennesket, f.eks. Göttingen minigrisen (jf. afsnit 4.2.4.).

I løbet af de sidste 10 år er der blevet publiceret mange studier, som dokumenterer, at EPO har effektive neuronbeskyttende egenskaber i en række forskellige dyremodeller. Disse modeller strækker sig fra iskæmi/hypoksi, traumatisk hjerneskade og rygmærksskader, skader på retina/nervus opticus, til inflammatorisk/autoimmunologisk sygdom, epilepsi og Parkinsons sygdom (Ehrenreich et al., 2004). Desuden øger EPO overlevelsen i de septale kolinerge neuroner i rotter ved overskæring af fimbria-fornix (Konishi et al., 1993). Det er imidlertid kun nogle få af disse studier, som har undersøgt det kognitive og adfærdsmæssige udbytte af EPO (Mogensen & Malá, 2006). Et studie som undersøger det kognitive udbytte af EPO i en AD dyremodel vil derfor ikke blot være det første *in vivo* studie af EPO's effekt på AD neuropatologi, men vil også bidrage med mere viden om graden af det kognitive udbytte ved EPO's neuronbeskyttende effekt.

På baggrund af resultaterne fra cellekulturer og dyrestudier startede Ehrenreich *et al.* i 1997 det første kliniske studie, som undersøgte EPO's neuronbeskyttende effekt på mennesker (Ehrenreich et al., 2002). I dette "proof-of-concept" studie blev EPO's neuronbeskyttende effekt undersøgt i 40 patienter med slagtilfælde i arterie cerebialis media. Studiet er nu kendt som "The Göttingen EPO-Stroke Trial" (Ehrenreich et al., 2004). Studiet viste, at de patienter som var behandlet med EPO havde et signifikant bedre klinisk udbytte end placebo-behandlede kontrolpersoner: (1) De havde signifikant mindre udtalte neurologiske forstyrrelser allerede tidligt efter slagtilfældet; (2) De havde en bedre restitution af hjernefunktioner, hvilket blev bestemt ud fra udbytte-skalaer (outcome scales) (jf. Barthel indekset i figur 21); (3) Udviklingen af læsionens størrelse i de EPO-behandlede patienter var signifikant mindre i forhold til kontrolpersonernes; (4) Blodniveauer af den såkaldte gliaskade markør S-100B var signifikant lavere i EPO-gruppen end i kontrolgruppen, og der var en hurtigere tilbagevenden til normalniveauet (Ehrenreich et al., 2002).

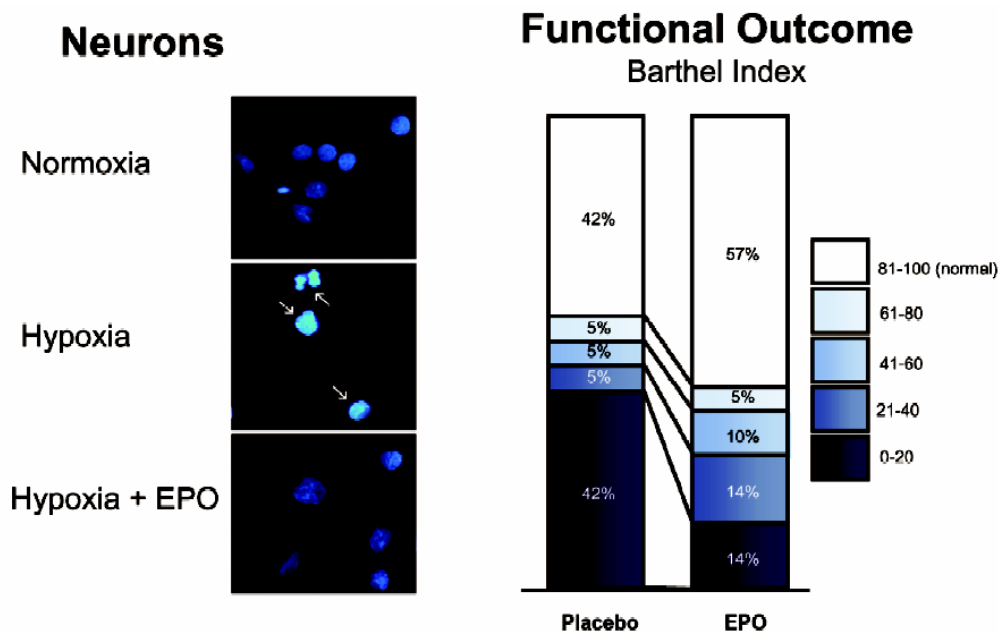


Figure 21 EPO's neuronbeskyttende effekt: Fra celle til menneske. Hypoksi-induceret neural apoptose i hippocampale neuronkulturer afværges af EPO. EPO behandling ved akut slagtilfælde i mennesker øger det funktionelle enderesultat 30 dage efter slagtilfældet (Gengivet fra Ehrenreich et al., 2004).

På baggrund af disse resultater foreslår Ehrenreich *et al.* (2002), at EPO kan benyttes som et supplement til den eksisterende farmakologiske behandling ved slagtilfælde. Da EPO kan krydse blod-hjerne barrieren (Brines et al., 2000) og har et terapeutisk vindue på mindst 6 timer (Brines et al., 2000; Mogensen et al, submitted), kan stoffet muligvis allerede injiceres i ambulancen, mens patienten er på vej til hospitalet, hvilket kan være med til at reducere den neurale skade som følge af en række neurologiske tilstande (Hasselblatt et al., 2006; Ehrenreich et al., 2004). I øjeblikket gennemføres der et stort projekt i Tyskland, som prøver at eftervise "proof-of-concept" studiets resultater i en population bestående af mere end 500 patienter (Ehrenreich et al., 2004). EPO's neuronbeskyttende effekt ser imidlertid ikke ud til at være begrænset til akutte neurologiske skader, men ser også ud til at kunne benyttes til at behandle kroniske neurodegenerative sygdomme (Hasselblatt et al., 2006).

6.3. EPO's potentiale som antidemenspræparat

For at forstå hvordan EPO kan virke neuronbeskyttende ved AD, må man først forstå de bagved liggende mekanismer, som fører til neurodegenerationen. De underliggende sygdomsmekanismer inkluderer (1) apoptose (programmeret celledød), (2) øget frigivelse af eksitotoksiske aminosyrer (specielt glutamat), som resulterer i mindsket energi, reduceret

funktion i de cellebevarende ion-pumper og intracellulær ophobning af kalcium, (3) oxidativ skade fra radikale oxygenformer i en situation, hvor hjernen har en reduceret antioxidant evne, (4) inflammatoriske reaktioner med invasion og migration af hvide blodceller, og (5) global metabolisk forstyrrelse i de påvirkede hjerneområder (Ehrenreich et al., 2004).

På baggrund af dette er EPO derfor en oplagt kandidat til en neuronbeskyttende behandling af AD, da EPO virker på en antiapoptotisk, anti-anflammatorisk, glutamat-inhiberende, neurotropisk og angiogenetisk måde. Desuden er det blevet vist, at EPO markant påvirker stamcelle-differentiering (Ehrenreich et al., 2004; Genc et al., 2004; Chong et al., 2005). Yderligere har et nyere studie af Chong *et al.* (2005a) vist, at EPO yder en robust neuronbeskyttelse mod A β toksicitet i hippocampale neuroner *in vitro*, hvilket sammen med EPO's andre neuronbeskyttende egenskaber gør stoffet til et potentielt antidemenspræparat.

Som beskrevet i afsnit 4.2.3. kan de eksisterende dyremodeller for AD kun reproducere nogle aspekter af den menneskelige sygdom. Nye behandlingsformer over for AD bør derfor hurtigst muligt overføres til kliniske pilotstudier – specielt hvis den pågældende behandling ikke er forbundet med alvorligere bivirkninger. Som tidligere beskrevet benyttes EPO allerede over for anæmi, og stoffet har en god sikkerhedsprofil (Hasselblatt et al., 2006), hvorfor der ikke umiddelbart er problemer med at udføre et pilotprojekt med en gruppe AD patienter. Et potentielt problem ved kronisk behandling af AD med EPO er imidlertid uønskede bivirkninger fra stoffet, da hormonet har en udbredt virkning i kroppen – både i og uden for hjernen. Dette har ført til udviklingen af EPO derivater, som ikke binder til EPO-receptorer, men bevarer den neuronbeskyttende effekt (Genc et al., 2004; Hasselblatt et al., 2006). Carbamyleret EPO (CEPO) er et sådant EPO derivat. Stoffet er udviklet af Lundbeck A/S og har en lige så effektiv neuronbeskyttende effekt som almindeligt EPO (Leist et al., 2004). Stoffet repræsenterer derfor en mulighed for at udnytte EPO's neuronbeskyttende potentiale over for kroniske neurodegenerative sygdomme, uden at dette medfører uønskede bivirkninger.

Fra succesrige studier med mennesker skulle det stadig være muligt at bevæge sig tilbage til dyrestudier, da det bliver nødvendigt yderligere at forklare mekanismerne bag stoffets virkning. Desuden kan dyrestudier være med til at bestemme dosis-effekter, og dyrestudier kan bruges til at undersøge forskellige måder at administrere stoffet på og effekten af at ændre intervallerne mellem administrationstidspunkterne (Ehrenreich et al., 2004).

EPO er altså et hormon, som udtrykkes i hjernen. Hormonets effekt kan induceres af hypoksi, og det yder neuronbeskyttelse i en række forskellige dyremodeller for neurologiske sygdomme. EPO-medieret neuronbeskyttelse påvirker mange mekanismer og involverer neurale-, glia- og endotheliale celfunktioner. EPO har et fordelagtigt terapeutisk vindue ved iskæmiske slagtilfælde og fordelagtige farmakokinetiske egenskaber. Resultaterne fra det første kliniske studie i mennesker synes lovende, og de valideres i øjeblikket i en større patient-population. EPO-derivater som CEPO, der stadig udvikles og forbedres, udgør en lovende alternativ farmakoterapi for AD. Stoffet har den samme neuronbeskyttende effekt som almindeligt EPO, men er ikke forbundet med de bivirkninger, som almindeligt EPO forårsager ved kronisk behandling. Denne farmakoterapi synes derfor lovende og har en fordel frem for andre farmakologiske tiltag over for AD, idet terapien påvirker et endogent beskyttende system i hjernen (Grasso et al., 2004). AD modellen i Göttingen minigrisen og den spatiale DNMS test kan yde væsentlige bidrag i evalueringen af (C)EPO's potentiale som AD behandling.

Referencer

Aggleton, J. P.; Blint, H. S. & Rawlins, J. N. (1989) Effects of amygdaloid and amygdaloid-hippocampal lesions on object recognition and spatial working memory in rats. *Behavioral Neuroscience*, 103, 962-974.

Aggleton, J.P.; Hunt, P. R. & Rawlins, J. N. (1986) The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial tests of working memory. *Behavioral Brain Research*, 19(2), 133-146.

Aggleton, J. P.; Hunt, P. R. & Shaw, C (1990) The effects of mamillary body and combined amygdalar-fornix lesions on tests of delayed non-matching-to-sample in the rat. *Behavioral Brain Research*, 40, 145-157.

Aggleton, J. P.; Keith, A. B. & Saghal, A. (1991) Both fornix and anterior thalamic, but not mamillary, lesions disrupt delayed non-matching-to-position memory in rats. *Behavioral Brain Research*, 44(2), 151-161.

Aggleton, J. P.; Keith, A. B.; Rawlins, J. N.; Hunt, P. R. & Saghal, A. (1992) Removal of the hippocampus and transection of the fornix produce comparable deficits on delayed non-matching-to-position by rats. *Behavioral Brain Research*, 52(1), 61-71.

Aggleton, J. P. & Pearce, J. M. (2001) Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Philosophical Trans. of the Royal Society of London*, 356, 1467-1482.

Allen, S. J. (2001) Alzheimer's disease: past, present, and future themes: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Alvarado, M. C.; Wright, A. A. & Bachevalier, J. (2002) Object and spatial relational memory in adult rhesus monkeys is impaired by neonatal lesions of the hippocampal formation but not the amygdaloid complex. *Hippocampus*, 12(4), 421-433.

Alvarez-Royo, P.; Zola-Morgan, S. & Squire, L. R. (1992) Impairment of long-term memory and sparing of short-term memory in monkeys with medial temporal lobe lesions: a response to Ringo. *Behavioral Brain Research*, 52(1), 1-5.

Alvarez, P.; Zola-Morgan, S. & Squire, L. (1994) The animal model of human amnesia: long-term memory impaired and short-term memory intact. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 91, 5637-5641.

Alvarez, P.; Zola-Morgan, S. & Squire, L. (1995) Damage Limited to the Hippocampal Region Produces Long-Lasting Memory Impairment in Monkeys. *Journal of Neuroscience*, 15, 3796-3807.

Alzheimer, A. (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg. Zeitschr. Psychiatr. Psychiatr.-Gerichtl. Med.*, 109, 646-652.

American Psychiatric Association (1994) *Diagnostic and statistical manuals of mental disorders*, 4. udgave. Washington DC.

Anderson, P. (2005) Personlig kommunikation med H.M., *Neurodag 2005*.

Andersen, F.; Watanabe, H.; Bjarkman, C.; Danielsen, E.; The DaNeX Study Group & Cumming, P.. (2005) Pig brain stereotaxic standard space: Mapping of cerebral blood flow normative values and effect of MPTP-lesioning. *Brain Research Bulletin*, 66, 17-29.

Ando, S.; Kobayashi, S.; Waki, H.; Kon, K.; Fukui, F.; Tadenuma, T.; Iwamoto, M.; Takeda, Y.; Izumiyama, N.; Watanabe, K. & Nakamura, H. (2002) Animal model of dementia induced by entorhinal synaptic damage and partial restoration of cognitive deficits by BDNF and carnitine. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 519-527.

Araujo, J. A.; Studzinski, C. M. & Milgram, N. W. (2005) Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29, 411-422.

Arnfred, S. M.; Lind, N. M.; Moustgaard, A.; Hansen, A. K. & Gjedde, A. (2003) Minipig negative slow wave demonstrates target/nontarget differences in a P300 paradigm. *Neuroimage*, 20, 587-590.

Arnfred, S. M.; Lind, N. M.; Hansen, A. K. & Hemmingsen, R. (2004) Pre-pulse inhibition of the acoustic startle eye-blink in the Göttingen minipig. *Behavioral Brain Research*, 151, 295-301.

Bachevalier, J.; Beauregard, M. & Alvarado, M. C. (1999) Long-term effects of neonatal damage to the hippocampal formation and amygdaloid complex on object discrimination and object recognition in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Behavioral Neuroscience*, 113(6), 1127-1151.

Baddeley, A. D.; Bressi, S.; Della Sala, S. & Spinnler, H. (1991) The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. *Brain*, 114, 2521-2542.

Bayley, P. J. & Squire, L. R. (2002) The anatomy of remote autobiographical memory. *Society for Neuroscience*, 514, 15.

Beason-Held, L. L.; Rosene, D. L.; Killiany R. J. & Moss, M. B. (1999) Hippocampal formation lesions produce memory impairment in the rhesus monkey. *Hippocampus*, 9(5), 562-574.

Blanchet, S.; Marie, R. M.; Dauvillier, F.; Landeau, B.; Benali, K.; Eustache, F. & Chavoix, C. (2000) Cognitive processes involved in delayed non-matching-to-sample performance in Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, 7(5), 473-483.

Bolhuis, E. J.; Schouten, W. G. P.; de Leeuw, J. A.; Schrama, J. W. & Wiegant, V. M. (2004) Individual characteristics, rearing conditions and behavioural flexibility in pigs. *Behavioural Brain Research*, 152, 351-260.

Borchelt, D. R.; Ratovitski, T.; van Lare, J.; Lee, M. K.; Gonzales, V.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Price, D. L. & Sisodia, S. S. (1997) Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19, 939-945.

Braak, H. & Braak, E. (1995) Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes. *Neurobiology of Aging*, 16(3), 271-284.

Braak, H. & Braak, E. (1999) Neuropathological stages in Alzheimer's disease: I: de Leon, M. J. (Ed.) *An Atlas of Alzheimer's Disease*. Parthenon.

Brines, M. L.; Ghezzi, P.; Keenan, S.; Agnello, D.; de Lanerolle, N. C.; Cerami, C.; Itri, L. M. & Cerami, A. (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97, 10526-10531.

Buckley, N. (1986) Maturation of circulatory system in three mammalian models of human development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83A, 1-7.

Cameron, K. A.; Yashar, S.; Wilson, C. L. & Fried, I. (2001) Human Hippocampal Neurons Predict How Well Word Pairs Will Be Remembered. *Neuron*, 30, 289-298.

Chételat, G.; Desgranges, B.; de la Sayette, V.; Viader, F.; Berkouk, K.; Landeau, B.; Lalevée, A.; Le Doze, F.; Dupuy, B.; Hannequin, D.; Baron, L.-C. & Eustache, F. (2003) Dissociating atrophy and hypometabolism impact on episodic memory in mild cognitive impairment. *Brain*, 126, 1955-1967.

Chong, Z. Z.; Li, F. & Maiese, K. (2005a) Erythropoietin Requires NF- κ B and its Nuclear Translocation to Prevent Early and Late Neuronal Injury During β -Amyloid Toxicity. *Current Neurovascular Research*, 2, 387-399.

Chong, Z. Z.; Li, F. & Maiese, K. (2005b) Stress in the brain: novel cellular mechanisms of injury linked to Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 49, 1-21.

Citron, M. (2001) The presenilins: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Clark, R. E.; West, A. N.; Zola-Morgan, S. M. & Squire, L. R. (2001) Rats with lesions of the hippocampus are impaired on the delayed nonmatching to sample task. *Hippocampus*, 11, 176-186.

Cohen, N. J.; Ryan, J.; Hunt, C.; Romine, L.; Wszalek, T. & Nash, Courtney (1999) Hippocampal System and Declarative (Relational) Memory: Summarizing the Data From Funktional Neuroimaging Studies. *Hippocampus*, 9, 83-98.

Cohen, N. J. & Squire, L. R. (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210, 207-210.

Corkin, S.; Amaral, D. G.; Gonzalez, R. G.; Johnson, K. A. & Bradley, H. T. (1997) H.M.'s Medial Temporal Lobe Lesion: Findings from Magnetic Resonance Imaging. *Journal of Neuroscience*, 17(10), 3964-3979.

Croney, C. C. (1999) *Cognitive abilities of domestic pigs (Sus scrofa)*. Phd.-afhandling, Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.

Croney, C. C.; Adams, K. M.; Washington, C. G. & Stricklin, W. R. (2003) A note on visual, olfactory and spatial cue use in foraging behavior in pigs: indirectly assessing cognitive abilities. *Applied Animal Behavior Science*, 83, 303-308.

Davidson, A. & Dobbing, J. (1968) The developing brain: I: Davidson, A. & Dobbing, J. (Eds.) *Applied neurochemistry*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Davidson, B. L.; Stein, C. S.; Heth, J. A.; Martins, I.; Ketin, R. M.; Derkson, T. A.; Zabner, J.; Ghodsi, A. & Chiorini, J. A. (2000) Recombinant adeno-associated virus 2, 4 and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97(7), 3428-3432.

Davies, P. (2001) Reflections on Alzheimer's disease as a specific neurotransmitter disease: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Deadwyler, S. A.; Bunn, T. & Hampson, R. E. (1996) Hippocampal ensemble activity during delayed-nonmatch-to-sample performance in rats. *Journal of Neuroscience*, 16(1), 354-372.

Delacourte, A.; David, J. P.; Sergeant, N.; Buée, L.; Wattez, A.; Vermersch, P.; Ghazali, F.; Fallet-Bianco, C.; Pasquier, F.; Lebert, F.; Petit, H. & Di Menza, C. (1999) The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease. *Neurology*, 52, 248-253.

Delis, D. C.; Massman, P. J.; Butters, N. & Salmon, D. P. (1991) Profiles of Demented and Amnesic Patients on the California Verbal Learning Test: Implications for the Assessment of Memory Disorders. *Psychological Assessment: A Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 3(1), 19-26.

Devenand, D. P.; Habeck, C. G.; Tabert, M. H.; Scarmeas, N.; Pelton, G. H.; Moeller, J. R.; Mensh, B. D.; Tarabula, T.; Van Heertum, R. L. & Stern, Y. (2005) PET Network Abnormalities and Cognitive Decline in Patients with Mild Cognitive Impairment. *Neuropsychopharmacology*, 1-8.

Dick, M. B.; Kean, M. L. & Sands, D. (1989) Memory for internally generated words in Alzheimer-type dementia: breakdown in encoding and semantic memory. *Brain and Cognition*, 9, 88-108.

- Dickerson, J. & Dobbing, J. (1966) Prenatal and postnatal growth and development of the central nervous system of the pigs. *Proceedings of the Royal Society of London*, 166, 384-395.
- Dilberovic, F.; Secerov, D. & Tomic, V. (1986) Morphological characteristics of the gyrus dentatus in some animal species and man. *Anatomischer Anzeiger*, 161, 231-238.
- Dobbing, J. & Sands, J. (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3, 79-83.
- Dodart, J.-C.; Mathis, C.; Bales, K. R. & Paul, S. M. (2002) Does my mouse have Alzheimer's disease? *Genes, Brain and Behavior*, 1, 142-155.
- Dudal, S.; Krzywkowski, P.; Paquette, J.; Morissette, C.; Lacombe, D.; Tremblay, P. & Gervais, F. (2004) Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiology of Aging*, 25, 861-871.
- Dudchenko, P. A. (2001) How Do Animals Actually Solve the T-maze? *Behavioral Neuroscience*, 115(4), 850-860.
- Dudchenko, P. A. (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 28, 699-709.
- Duff, K. (2001) Transgenic models of Alzheimer's disease neuropathology: I: Dawbarn, D & Allen, S. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimer's disease*, 2. udgave. Oxford University Press.
- Eastley, R.; Wilcock, G. & Dawbarn, D. (2001) Current phamacological approaches to treating Alzheimer's disease: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.
- Ebert, U. & Kirch, W. (1998) Scopolamine model of dementia: eletcroencephalogram findings and cognitive performance. *European Journal of Clinical Investigation*, 28, 944-949.

- Ebert, U.; Siepmann, M.; Oertel, R.; Wesnes, K. A & Kirch, W. (1998) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Scopolamine after Subcutaneous Administration. *Journal of Clinical Pharmacology*, 38, 720-726.
- Ehrenreich, H. & Sirén, A.-L. (2001) Special issue-editorial: Neuroprotection – what does it mean? – what means do we have? *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 251, 149-151.
- Ehrenreich, H.; Hasselblatt, M.; Dembowski, C.; Cepek, L.; Lewczuk, P.; Stiefel, M.; Rustenbeck, H.-H.; Breiter, N.; Jacob, S.; Knerlich, F.; Bohm, M.; Poser, W.; Rüther, E.; Kochen, M.; Gefeller, O.; Gleiter, C.; Wessel, T. C.; De Ryck, M.; Itri, L.; Prange, H.; Cerami, A.; Brines, M. & Sirén, A.-L. (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine*, 8, 495-505.
- Ehrenreich, H.; Aust, C.; Krampe, H.; Jahn, H.; Jacob, S.; Herrmann, M. & Sirén, A.-L. (2004) Erythropoietin: Novel Approaches to Neuroprotection in Human Brain Disease. *Metabolic Brain Disease*, 19(3/4), 195-206.
- Eichenbaum, H. (2004) Hippocampus: Cognitive Processes and Neural Representations that Underlie Declarative Memory. *Neuron*, 44, 109-120.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, 31, 47-59.
- Esiri, M. M. (2001) The neuropathology of Alzheimer's disease: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.
- Feldman, H. & Jacova, C. (2005) Mild Cognitive Impairment. *American Journal of Geriatric Psychiatry*, 13(8): 645- 655.
- Félix, B.; Léger, M.-E.; Albe-Fessard, D.; Marcilloux, J. C.; Rampin, O. & Leplacé, J. P. (1999) Stereotaxic atlas of the pig brain. *Brain Research Bulletin*, 49, 1-137.

Flood, D. G.; Howland, D. S.; Lin, Y.-G.; Cialla, J. R.; Trusko, S. P.; Scott, R. W. & Savage, M. S. (2003) A β deposition in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Poster 842.22 præsenteret ved Society for Neuroscience møde*, New Orleans, LA.

Flynn, T. (1984) Developmental changes of myelin-related lipids in brain of miniature swine. *Neurochemical Research*, 9, 945-945.

Folstein, M; Folstein, S. & McHugh, P. (1975) Mini-mental state. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric Research*, 12, 189-198.

Fox, N.; Scahill, R.; Høgh, P. & Rossor, M. N. (2001) Alzheimer's disease and neuroimaging: I: Dawbarn, D. & Allen, S. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimer's Disease*. Oxford University Press.

Gaffan, D. & Gaffan, E. (1991) Amnesia in man following transection of the fornix: A review. *Brain*, 114, 2611-2618.

Gallagher, M. & Rapp, P. R. (1997) The use of animal models to study the effects of aging. *Annual Review of Psychology*, 48, 339-370.

Games, D.; Adams, D.; Alessandrini, R.; Barbour, R.; Berthelette, P.; Blackwell, C.; Little, S.; Masliah, E.; McConlogue, L.; Montaya-Zavala, M.; Mucke, L.; Paganini, L.; Power, E.; Schenk, D.; Seubert, P.; Snyder, B.; Soriano, F. G.; Tan, H.; Vitale, J.; Wadsworth, S. Wolozin, B. & Zhao, J. (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F β -amyloid precursor protein. *Nature*, 373, 523-527.

Genc, S.; Koroglu, T. F. & Genc, K. (2004) Erythropoietin and the nervous system. *Brain Research 1000*, 19-31.

Glees, P. & Griffith, H. B. (1952) Bilateral destruction of the hippocampus (cornu ammonis) in a case of dementia. *Psychiatr. Neurol. Med. Psychol. (Leipz.)*, 123, 193-204.

Glenner, G. G. & Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1131-1135.

Graf, P. & Schacter, D. L. (1985) Implicit and explicit memory for new associations in normal and amnesic patients. *Journal for Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 11, 501-518.

Grasso, G.; Sfacteria, A.; Cerami, A. & Brines, M. (2004) Erythropoietin as a Tissue-Protective Cytokine in Brain Injury: What Do We Know and Where Do We Go? *The Neuroscientist*, 10(2), 93-98.

Greene, J. D.; Baddeley, A. D. & Hodges, J. R. (1996) Analysis of the episodic memory deficit in early Alzheimer's disease: evidence from the doors and people test. *Neuropsychologia*, 34, 537-551.

Gregory, R. J. (2004) *Psychological Testing. History, Principles, and Application*. Pearson.

Greicius, M. D.; Krasnow, B.; Boyett-Anderson, J. M.; Eliez, S.; Schatzberg, A. F.; Reiss, A. L. & Menon, V. (2003) Regional analysis of hippocampal activation during memory encoding and retrieval: fMRI study. *Hippocampus*, 13(1), 164-174.

Grunthal, E. (1947) Über das klinische Bild nach umschriebenem beiderseitigem Ausfall der Ammonshirnrinde. *Monatsschr. Psychiat. Neurol*, 113, 1-16.

Götz, J.; Probst, A.; Spillantini, M. G.; Schafer, T.; Jakes, R.; Burki, K. & Goedert, M. (1995) Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform. *EMBO Journal*, 14, 1304-1313.

Hagl, C.; Weisz, D. J.; Khaladj, N.; Griep, M. M.; Spiegel, D.; Yang, B.-Y.; de Asla, R. A.; Bodian, C. A. & Griep, R. B. (2005) Use of Maze to Detect Cognitive Dysfunction in a Porcine Model of Hypothermic Arrest. *The Society of Thoracic Surgeons*, 79, 1307-1315.

Halgren, E.; Squires, N. K.; Wilson, C. L. Rohrbaugh, J. W.; Babb, T. L. & Crandall, P. H. (1980) Endogenous potentials generated in the human hippocampal formation and amygdala by infrequent events. *Science*, 210, 803-805

Hampson, R. E.; Simeral, J. D. & Deadwyler, S. A. (2002) "Keeping on track": firing of hippocampal neurons during delayed-nonmatch-to-sample performance. *Journal of Neuroscience*, 22(2), RC198.

Hasselblatt, M.; Ehrenreich, H. & Sirén, A.-L. (2006) The Brain Erythropoietin System and its Potential for Therapeutic Exploitation in Brain Disease. *Journal of Anesthesiology*, 18(2), 132-138.

Hemmingsen, R. & Kragh-Sørensen, P. (2000) Organiske psykiatriske lidelser: I: Hemmingsen, R.; Parnas, J.; Gjerris, A.; Kragh-Sørensen, P. & Reisby, N. (Eds.) *Klinisk Psykiatri*, 2. udgave. Munksgaard.

Hofmann, A. (1985) Size and shape of the cerebral cortex in mammals. 1. The cortical surface. *Brain, Behavior and Evolution*, 27, 28-40.

Holcomb, L.; Gordon, M. N.; McGowan, E.; Yu, X.; Benkovic, S.; Jantzen, P.; Wright, K.; Saad, I.; Mueller, R.; Morgan, D.; Sanders, S.; Zehr, C.; O'Campo, K.; Hardy, J.; Prada, C. M.; Eckman, C.; Younkin, S.; Hsiao, K. & Duff, K. (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nature Medicine*, 4, 97-100.

Holm, I. E. (1995) *The hippocampal region of the domestic pig*. Phd.-afhandling. Aarhus University Press.

Howlett, D. R.; Allsop, D. & Karran, E. H. (2001) The biology and molecular neuropathology of β -amyloid protein: I: Dawbarn, David & Shelley, Allen J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Hsiao, K. K.; Chapman, P.; Nilsen, S.; Eckman, C.; Harigaya, Y.; Younkin, S.; Yang, F. &

Cole, G. (1996) Correlative memory deficits, A β elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274, 99-102.

<http://thalamus.wustl.edu/course/limbic.html>

Ishihara, T.; Zhang, B.; Higuchi, M.; Yoshiyama, Y.; Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. (2001) Age-dependant induction of congophilic neurofibrillary tau inclusions in tau transgenic mice. *American Journal of Pathology*, 158, 555-562.

Irle, E.; Kessler, J; Markowitsch, H. J. & Hofmann, W. (1987) Primate Learning Tasks Reveal Strong Impairments in Patients with Presenile or Senile Dementia of the Alzheimer Type. *Brain And Cognition*, 6, 429-449.

Jagust, W.; Thisted, R.; Devous, M. D.; Van Heertum, R.; Mayberg, H.; Jobst, K.; Smith, A. D. & Borys, N. (2001) SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease. A clinical-pathologic study. *Neurology*, 56: 950-6.

Jagust, W. (2004) Molecular Neuroimaging in Alzheimers Disease. *NeuroRX: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1, 206-212.

Jeffries, S. & Burns A. (2001) Clinical assesment of Alzheimer's disease: I: Dawbarn, David & Shelley, Allen J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Jelkmann, W. (2005) Effects of erythropoietin on brain function. *Current Pharmacological Biotechnology*, 6(1), 65-79.

Jelsing, J.; Nielsen, R.; Olsen, A. K.; Grand, N.; Hemmingsen, R. & Pakkenberg, B. (2006) The postnatal development of neocortical neurons and glia cells in the Göttingen minipig and domestic pig brain. *Journal of experimental Biology*, 209(Pt. 8), 1454-1462.

Johansson, M.; Ellegren, H. & Anderson, L. L. (1995) Comparative mapping reveals extensive linkage conservation – but with gene order rearrangements – between the pig and

human genomes. *Genomics*, 25, 682-690.

Johnstone, M.; Chaney, M.O.; Norris, F.H.; Pascual, R. & Little, S.P. (1991) Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. *Brain Research and Molecular Brain Research*, 10, 299-305.

Kaduszkiewicz, H.; Zimmermann, T.; Beck-Bornholdt, H.-P. & van den Bussche, H. (2005) Cholinesterase inhibitors for patients with Alzheimer's disease: systematic review of randomized clinical trials. *British Medical Journal*, 331, 321-327.

Klopfer, F. D. (1966) Visual learning in swine: I: Bustad, L. K. & McClelland, R. O. (Eds.) *Swine in Biochemical Research*, Batelle Memorial Institute, Washington.

Kolb, B. & Whishaw, I. Q. (2003) Psychiatric and Related Disorders. *Fundamentals of Human Neuropsychology*. Fifth edition. Worth Publishers.

Konishi, Y.; Chui, D.-H.; Hirose, H.; Kunishita, T. & Tabira, T. (1993) Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Research*, 609, 29-35.

Kornum, B. R.; Thygesen, K.; Nielsen, T. R.; Knudsen, G. M. & Lind, N. M. (2005) Spontaneous Object Recognition in the Göttingen Minipig. *Poster presented at Neuroscience2005*, Washington DC, 12-16 of november.

Kowalska, D. M.; Kusmieriek, P.; Kosmal, A. & Mishkin, M. (2001) Neither perirhinal/entorhinal nor hippocampal lesions impair short-term auditory recognition memory in dogs. *Neuroscience*, 104(4), 965-978.

Ladieu, G. (1944) The effect of length of delay interval upon delayed alternation in the albino rat. *Journal of Comparative Psychology*, 37, 273-286.

Larsen, M.; Bjarkman, C. R.; Østergaard, K.; West, M. J. & Sørensen, J. C. (2004) The

anatomy of the porcine subthalamic nucleus evaluated with immunohistochemistry and design-based stereology. *Anatomical Embryology*, 208, 239-247.

Laughlin, K.; Huck, M. & Mendl, M. (1999) Disturbance effects of environmental stimuli on pig spatial memory. *Applied Animal Behaviour Science*, 64, 169-180.

Laughlin, K. & Mendl, M. (2000) Pigs shift too: foraging strategies and spatial memory in the domestic pig. *Animal Behaviour*, 60(3), 403-410.

Leist, M.; Ghezzi, P.; Grasso, G.; Bianchi, R.; Villa, P.; Fratelli, M.; Savino, C.; Bianchi, M.; Nielsen, J.; Gerwien, J.; Kallunki, P.; Larsen, A. K.; Helboe, L.; Christensen, S.; Pedersen, L. O.; Nielsen, M.; Torup, L.; Sager, T.; Sfacteria, A.; Erbayraktar, S.; Erbayraktar, Z.; Gokmen, N.; Yilmaz, O.; Cerami-Hand, C.; Xie, Q.-w.; Coleman, T.; Cerami, A. & Brines, M. (2004) Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective But Not Erythropoietic. *Science*, 305, 239-242.

Lepage, M., Habib, R., & Tulving, E. (1998). Hippocampal PET activations of memory encoding and retrieval: The HIPER model. *Hippocampus*, 8, 313-322.

Lewis, J.; McGowan, E.; Rockwood, J.; Melrose, H.; Nacharaju, P.; Van Slegtenhorst, M.; Gwinn-Hardy, K.; Paul Murphy, M.; Baker, M.; Yu, X.; Duff, K.; Hardy, J.; Corral, A.; Lin, W. L.; Yen, S. H.; Dickson, D. W.; Davies, P. & Hutton, M. (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nature Genetics*, 25, 402-405.

Lewis, J.; Dickerson, D. W.; Lin, W. L.; Chisholm, L.; Corral, A.; Jones, G.; Yen, S. H.; Sahara, N.; Skipper, L.; Yager, D.; Eckman, C.; Hardy, J.; Hutton, M. & McGowan, E. (2001) Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science*, 293, 1487-1491.

Lind, N. M. (2005) *Brain Dopamine Function in Pigs: Behavioural Aspects*. Phd. afhandling. Sundhedsvidenskabeligt Fakultet, Københavns Universitet.

- Lind, N. M.; Arnfred, S. M.; Hemmingsen, R. P.; Hansen, A. K. & Jensen, K. H. (2005) Open Field Behaviour and Novelty in Göttingen Minipigs: Effects of Amphetamine and Haloperidol. *Scandinavian Journal of Animal Science*, 2(32), 103-114.
- Lyng, K.; Munkeby, B. H.; Scheie, D.; Mallard, C.; Hagberg, H.; Stray-Pedersen, B.; Saugstad, O. D. & Froen, J. F. (2006) Fetal brain injury in experimental intrauterine asphyxia and inflammation in Göttingen minipigs. *Journal of Perinatal Medicine*, 34(2), 226-234.
- Malá, H.; Alsina, C. G.; Madsen, K. S.; Sibbesen, E. C.; Stick, H. & Mogensen, J. (2005) Erythropoietin improves place learning in an 8-arm radial maze in fimbria-fornix transected rats. *Neural Plasticity*, 12(4), 329-340.
- Malá, H. & Mogensen, J. (2006) Basis research in pharmacologically supported brain injury rehabilitation after mechanical brain injury – the use of erythropoietin (EPO) and a 5 HT_{1A} agonist, 8-OH-DPAT. Præsentation ved det første *ReCBIR symposium* d. 4. maj, Rigshospitalet, København.
- Markowitsch, H. J. (2003) Functional neuroanatomy of learning and memory: I: Halligan, P. W.; Kischka, U. & Marshall, J. C. (Eds.). *Handbook of Clinical Neuropsychology*. Oxford University Press.
- Masdeu, J. C.; Zubieta, J. L. & Arbizu, J. (2005) Neuroimaging as a marker of the onset and progression of Alzheimer's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 236: 55-64.
- Mayhew, T.; Mwamengele, G.; Dantzer, V. & Williams, S. (1996) The gyrification of mammalian cerebral cortex: quantitative evidence of anisomorphic surface expansion during phylogenetic and ontogenetic development. *Journal of Anatomy*, 188, 53-58.
- McCarthy, G.; Wood, C. C.; Williamson, P. D. & Spencer, D. D. (1989) Task-dependant field potentials in human hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 9, 4253-4268.
- McGowan, E.; Eriksen, J. & Hutton, M. (2006) A decade of modelling Alzheimer's disease in

transgenic mice. *TRENDS in Genetics*, xxx, xxx-xxx.

McKhann, G.; Drachman, E. & Folstein, M. (1984) Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ADRDA workgroup under the auspices of Department of Health and Human Services task force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 34, 939-944.

Mendl, M.; Erhard, H. W.; Haskell, M.; Wemelsfelder, F. & Lawrence, A. B. (1997) Experience in substrate-enriched and substrate-impoverished environments affects behaviour of pigs in a T-maze. *Behaviour*, 134, 643-659.

Mesulam, M.-M.; Mufson, E. J.; Levey, A. I. & Wainer, B. H. (1983) Cholinergic Innervation of Cortex by the Basal Forebrain: Cytochemistry and Cortical Connections of the Septal Area, Diagonal Band Nuclei, Nucleus Basalis (Substantia Innominata), and Hypothalamus in the Rhesus Monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 214, 170-197.

Mikkelsen, M.; Møller, A.; Jensen, L. H.; Pedersen, A.; Harajehi, J. B. & Pakkenberg, H. (1999) MPTP-induced Parkinsonism in minipigs: a behavioral, biochemical and histological study. *Neurotoxicology and Teratology*, 21, 169-175.

Mishkin, M. (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature*, 273, 297-298.

Mogensen, J. (2003) Animal Models in Neuroscience: I: Hau, J. & Van Hoosier Jr., G. L. (Eds.) *Handbook of Laboratory Animal Science*, 2. udgave, vol. 2, Animal Models. CRC Press.

Mogensen, J.; Miskowiak, K.; Sørensen, T. A.; Lind, C. T.; Olsen, N. V.; Springborg, J. B. & Malá, H. (2004) Erythropoietin improves place learning in fimbria-fornix-transected rats and modifies the search pattern of normal rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 77, 381-390,

Monk, C. S.; Zhuang, J.; Curtis, W. J.; Ofenloch, I. T.; Tottenham, N.; Nelson, C. A. & Hu, X. (2002) Human hippocampal activation in the delayed matching- and nonmatching-to-sample memory tasks: an event-related functional MRI approach. *Behavioral Neuroscience*, 116(4), 716-721.

Moos, T. & Møller, M. (2002) Telencephalon: I: *Basal neuroanatomy*. FADL.

Morris, R. G. & Worsley, C. L. (2003) Neuropsychological presentation of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders: I: Halligan, P. W.; Kischka, U. & Marshall, J. C. (Eds.) *Handbook of Clinical Neuropsychology*. Oxford University Press.

Moustgaard, A.; Lind, N. M.; Hemmingsen, R. & Hansen A. K. (2002) Spontaneous object recognition in the Göttingen minipig. *Neural Plasticity*, 9, 255-259.

Moustgaard, A.; Arnfred, S. M.; Lind, N. M.; Hansen, A. K. & Hemmingsen, R. (2004) Discriminations, reversals, and extra-dimensional shifts in the Göttingen minipig. *Behavioral Processes*, 67, 27-37.

Moustgaard, A.; Arnfred, S. M.; Lind, N. M.; Hemmingsen, R. & Hansen, A. K. (2005) Acquisition of visually guided conditional tasks in Göttingen minipigs. *Behavioral Processes*, 68(1), 97-102.

Murray, E. A.; Davidson, M.; Gaffan, D.; Olton, D. S. & Suomi, S. (1989) Effects of fornix transection and cingulate cortical ablation on spatial memory in rhesus monkeys. *Experimental Brain Research*, 74, 173-186.

Murray, E. A. & Mishkin, M. (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 18(16), 6568-6582

- Nebes, R. D. (1992) Cognitive Dysfunction in Alzheimer's Disease: I: Craik, F. I. & Salthouse, T. A. (Eds.) *The Handbook of Aging and Cognition*. Hillsdale Lawrence Erlbaum Associates, Publishers.
- Nelson, L.; Johnson, J. K.; Freedman, M.; Lott, I.; Groot, J.; Chang, M.; Milgram, N. M. & Head, E. (2005) Learning and memory as a function of age in Downs syndrome: A study using animal-based tasks. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29, 443-453.
- Nestor, P.; Fryer, T. & Hodges, J. R. (2005) Declarative memory impairments in Alzheimer's disease and semantic dementia. *NeuroImage*, xx, xxx-xxx.
- Nielsen, B. K.; Pedersen, S.; Sloth, H. & Andersen, E. W. (Eds.) (2000) *Psykiatri*. Gerontopsykiatri. Gads Forlag.
- Noakes, T. D. (2004) Tainted Glory – doping and athletic performance. *New England Journal of Medicine*, 351, 847-849.
- Nyberg, L.; McIntosh, A.; Houle, S.; Nilsson, L.-G. & Tulving, E. (1996) Activation of medial temporal structures during episodic memory retrieval. *Nature*, 380. 715-717.
- Oddo, S.; Caccamo, A.; Sheperd, J. D.; Murphy, M. P.; Golde, T. E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M. P.; Akbari, Y. & LaFerla, F. M. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39, 409-421.
- Ogasawara, T.; Nakagawa, Y.; Ukai, Y.; Tamura, M. & Kimura, K. (1995) NS-3(CG3703), a TRH analog, Ameliorates Scopolamine-Induced Memory Disruption in Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 51(4), 929-934.
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. London. Oxford.

- Oscar-Berman, M.; Hutner, N. & Bonner, R. T. (1992) Visual and auditory spatial and non-spatial delayed-response performance by Korsakoff and non-Korsakoff alcoholic and aging individuals. *Behavioral Neuroscience*, 106(4), 613-622.
- Paller, K. A. & McCarthy, G. (2002) Field Potentials in the Human Hippocampus During the Encoding and Recognition of Visual Stimuli. *Hippocampus*, 12, 415-420.
- Paller, K. A. & Wagner, A. D. (2002) Observing the transformation of experience into memory. *TRENDS in Cognitive Sciences*, 6(2), 93-102.
- Palmieri, G.; Farina, V.; Panu, R.; Asole, A.; Sanna, L.; de Riu, P. L. & Gabbi, C. (1987) Course and termination of the pyramidal tract in the pig. *Archives of Anatomical Microscopy*, 75, 167-176.
- Pampiglione, G. (1971) Some aspects of development of cerebral function. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 64, 429-435.
- Parkin, A. J. (2001) The Structure and Mechanisms of Memory: I: Rapp, B. (Ed.) *The Handbook of Cognitive Neuropsychology. What Deficits Reveal About the Human Mind*. Psychology Press.
- Peinado-Manzano, M. A. (1990) The role of the amygdala and the hippocampus in working memory for spatial and non-spatial information. *Behavioral Neuroscience*, 38(2), 117-134.
- Petrella, J R.; Coleman, R. E. & Doraiswamy, P. M. (2003) Neuroimaging and Early Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Look to the Future. *Radiology*, 226: 315-336.
- Phinney, A. L.; Horne, P.; Yang, J.; Janus, C.; Bergeron, C. & Westaway, D. (2003) Mouse models of Alzheimer's disease: The long and filamentous road. *Neurological Research*, 25, 590-600.

Poldrak, R. A. & Packard, M. G. (2003) Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia*, 41, 245-251.

Pond, W. G.; Boleman, S. L.; Fioretti, M. L.; Ho, H.; Knabe, D. A.; Mersmann, H. J.; Savell, J. W. & Su, D. R. (2000) Perinatal ontogeny of brain growth in the domestic pig. *PSEBM* 2000, 223, 102-108.

Prince, S. E.; Daselaar, S. M. & Cabeza, R. (2005) Neural Correlates of Relational Memory: Successful Encoding and Retrieval of Semantic and Perceptual Associations. *The Journal of Neuroscience*, 25(5), 1203-1210.

Probst, A.; Götz, J.; Wiederhold, K. H.; Tolnay, M.; Mistl, C.; Jaton, A. L.; Hong, M.; Ishihara, T.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Crowther, R. A.; Spillantini, M. G.; Burki, K. & Goedert, M. (2000) Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein. *Acta Neuropathologica (Berlin)*, 99, 469-481.

Purves, D.; Augustine, G. J.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; LaMantia, A.-S.; McNamara, J. O. & Williams, M. S. (Eds.) (2001) Human Memory: I: *Neuroscience*, 2. udgave. Sinauer.

Reber, P. J.; Siwiec, R. M.; Gitleman, D. R.; Parrish, T. B.; Mesulam, M.-M. & Paller, K. A. (2002) Neural Correlates of Successful Encoding Identified Using Functional Magnetic Resonance Imaging. *The Journal of Neuroscience*, 22(21), 9541-9548.

Reed, L. J.; Marsden, P.; Lasserson, D.; Sheldon, N.; Lewis, P.; Stanhope, N.; Guinan, E. & Kopelman, M. D. (1999) FDG-PET analysis and findings in amnesia resulting from hypoxia. *Memory*, 7(5-6), 599-612.

Reed, L. J.; Lasserson, D.; Marsden, P.; Bright, P.; Stanhope, N. & Kopelman, M. D. (2005) Correlations of regional cerebral metabolism with memory performance and executive function in patients with herpes encephalitis or frontal lobe lesions. *Neuropsychology*, 19(5), 555-565.

Reisber, B. & Franssen, E. H. (1999) Clinical stages of Alzheimer's disease: I: de Leon, M. J. (Ed.) *An Atlas of Alzheimer's Disease*. Parthenon.

Rempel-Clower, N. L., Zola-Morgan, S.; Squire, L. R. & Amaral, D. G. (1996) Three Cases of Enduring Memory Impairment after Bilateral Damage Limited to the Hippocampal Formation. *Journal of Neuroscience*, 16(16), 5233-5255.

Rosenzweig, M. R.; Breedlove, S. M. & Leiman, A. L. (2002) *Biological Psychology*, 3. udgave. Sinauer Associates.

Rosier, A.-M.; Cornette, L.; Dupont, P.; Bormans, G.; Mortelmans, L. & Orban, G. (1999) Regional brain activity during shape recognition impaired by a scopolamine challenge to encoding. *European Journal of Neuroscience*, 11, 3701-3714.

Sakoh, L.; Rohl, L.; Gyldensted, C.; Gjedde, A. & Østergaard, L. (2000) Cerebral blood volume measured by magnetic resonance imaging bolus tracking after acute stroke in pigs: comparison with [(15)O]H(2)O positron emission tomography. *Stroke*, 31, 1958-1964.

Saunders, A. M. (2001) Apolipoprotein E as a risk factor for Alzheimer's disease: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Schacter, D. L., & Wagner, A. D. (1999). Medial Temporal Lobe Activations in fMRI and PET Studies of Episodic Encoding and Retrieval. *Hippocampus*, 9, 7-24.

Scheltens, P & Korf, E. S. C. (2000) Contribution of neuroimaging in the diagnosis of Alzheimer's disease and other dementias. *Current Opinion in Neurology*, 13(4): 391-396.

Schon, K.; Atri, A.; Hasselmo, M. E.; Tricarico, M. D.; LoPresti, M. L. & Stern, C. E. (2005) Scopolamine reduces persistent activity related to long-term encoding in the parahippocampal gyrus during delayed matching in humans. *Journal of Neuroscience*, 25(40), 9112-9123.

Scoville, W. B. & Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 20, 11-21.

Selkoe, D. J. (1997) Alzheimer's disease: genotypes, phenotypes and treatments. *Science*, 175, 630-631.

Shamy, J. L.; Buonocore, M. H.; Makaron, L. M.; Amaral, D. G.; Barnes, C. A. & Rapp, P. R. (2005) Hippocampal volume is preserved and fails to predict recognition memory in aged rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Neurobiology of Aging*, xx, xx-xx.

Shaw, C. & Aggleton, J. P. (1993) The effects of fornix and medial prefrontal lesions on delayed non-matching-to-sample by rats. *Behavioral Brain Research*, 54(1), 91-102.

Shaw, C. & Aggleton, J. P. (1993) The effects of fornix and medial prefrontal lesions on delayed non-matching-to-sample by rats. *Behav. Brain Res.*, 54(1), 91-102.

Singer, B.A.; Tresser, N. J.; Frank, J. A.; McFarland, H. F.; Biddison, W. E. (2000) Induction of experimental allergic encephalomyelitis in the NIH minipig. *Journal of Neuroimmunology*, 105, 7-19.

Sisson, S. & Grossman, J. D. (1965) *The anatomy of the domestic animals*, 4. udgave. Philadelphia, USA, WB Saunders Company.

Smith, D.H.; Chen, X.H.; Nonaka, M.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.; Saatman, K.E.; Leoni, M.J.; Xu, B.N.; Wolf, J.A. & Meaney, D.F. (1999) Accumulation of amyloid beta and tau and the formation of neurofilament inclusions following diffuse brain injury in the pig. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58, 982-92.

Spires, T. L. & Hyman, B. T. (2005) Transgenic Models of Alzheimer's Disease: Learning from Animals. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2, 423-437.

- Squire, L. R.; Stark, C. E. L. & Clark, R. E. (2004) The Medial Temporal Lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279-306.
- Squire, L. R. & Zola-Morgan, S. (1988). Memory: Brain Systems and Behavior. *Trends in Neuroscience*, 11(4), 170-175.
- Squire, L. R.; Zola-Morgan, S. & Chen, K. S. (1988) Human amnesia and animal models of amnesia: performance of amnesic patients on tests designed for the monkey. *Behavioral Neuroscience*, 102, 210-221.
- Stark, C. E. L. & Squire, L. R. (2000) fMRI activity in the hippocampal region during recognition memory. *Journal of Neuroscience*, 20, 7776-7781.
- Stefanacci, L.; Buffalo, E. A.; Schmolck, H. & Squire, L. R. (2000) Profound Amnesia After Damage to the Medial Temporal Lobe: A Neuroanatomical and Neuropsychological Profile of Patient E.P. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), 7024-7036.
- Stéphan, A. & Phillips, A.G. (2005) A case for a non-transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Genes, Brain and Behavior*, 4, 157-172.
- Stephan, H. (1951) Vergleichende untersuchung über den Feinbau des Hirnes von Wild- und Haustieren (nach studien am Schwein und Schaf.). *Zool JB ABT ANAT ONT*, 71, 487-586.
- Sturchler-Pierrat, C.; Abramowski, D.; Duke, M.; Wiederhold, K. H.; Mistl, C.; Rothacher, S.; Ledermann, B.; Burki, K.; Frey, P.; Paganetti, P. A.; Waridel, C.; Calhoun, M. E.; Jucker, M.; Probst, A.; Staufenbiel, M. & Sommer, B. (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceeding of the National Academy of Scieince of USA*, 94, 13287-13292.
- Sunderland, T.; Tariot, P. N.; Weingartner, H.; Murphy, D. L.; Newhouse, P. A.; Mueller, E. A. & Cohen, R. M. (1986) Pharmacologic modelling of Alzheimer's disease. *Progresses in Neuropsychopharmacology, Biology and Psychiatry*, 10(3), 599-610.

Suzuki, W. A. & Clayton, N. S. (2000) The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 768-773.

Sweatt, D. J. (2004) Hippocampal function in cognition. *Psychopharmacology*, 174, 99-110.

Taffe, M.; Weed, M. R. & Gold, L. H. (1999) Scopolamine alters rhesus monkey performance on a novel neuropsychological test battery. *Cognitive Brain Research*, 8, 203-212.

Tanzi, R. E. & Bertram, L. (2005) Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell*, 120, 545-555.

Tayebati, S. K. (2005) Animal models of cognitive dysfunction. *Mechanisms of Aging and Development*, xxx, xxx-xxx.

Tenenbaum, L.; Chtarto, A.; Lehtonen, E.; Vela, T.; Brotchi, J. & Levivier, M. (2004) Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system. *Journal of Genetic Medicine*, 6, Supplement 1, S212-S222.

Thibault, K. & Margulies, S. (1998) Age-dependant material properties of the porcine cerebrum: effect on pediatric inertial head injury criteria. *Journal of biomechanics*, 31, 1119-1126.

Tulving, E.; Kapur, S.; Craigh, F. I. M.; Markowitsch, H. J. & Houle, S. (1994) Hemispheric encoding/retrieval asymmetry in episodic memory: positron emission tomography findings. *Proceedings of the National Academy of Science of USA*, 91.

Tulving, E. (2002) Episodic memory: From mind to brain. *Annual Review of Psychology*, 53, 1-25.

Uchida, M.; Shimatsu, Y.; Onoe, K.; Matsuyama, N.; Niki, R.; Ikeda, J.-E. & Imai, H. (2001) Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Research*, 10, 577-582.

Uylings, H. B. M.; Groenewegen, H. J. & Kolb, B. (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioral Brain Research*, 146, 3-17.

Valenstein, E., Bowers, D., Verfaellie, M. Heilman, K. M., Day, A. & Watson, R. T. (1987) Retrosplenial amnesia. *Brain*, 110(6), 1631-1646.

Vargha-Khadem, F., Gadian, D. G., Watkins, K. E., Connely, A., Van Paesschen, W. & Mishkin, M. (1997) Differential Effects of Hippocampal Pathology on Episodic and Semantic Memory. *Science*, 277, 376-280.

Vargha-Khadem, F.; Gadian, D. G. & Mishkin, M. (2001) Dissociations in cognitive memory: the syndrome of developmental amnesia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 356, 1435-1440.

Vogel, A.; Hasselbach, S. G.; Gade, A.; Ziebell, M. & Waldemar, G. (2005a) Cognitive and functional neuroimaging for anosognosia in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 20, 238-246.

Vogel, A.; Gade, A.; Stockholm, J. & Waldemar, G. (2005b) Semantic Memory Impairment in the Earliest Phases of Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 19, 75-81.

von Bechterew, W. (1900) Demonstration eines gehirns mit zerstörung der vorderen und inneren theile der hirnrinde beider schlafenlappen. *Neurologisch. Zentralbl*, 19, 990-9991.

Wasco, W. (2001) Molecular genetics of Alzheimer's disease: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Watanabe, H.; Andersen, F.; Simonsen, C.Z.; Evans, S.M.; Gjedde, A. & Cumming, P. (2001) MR-based statistical atlas of the Gottingen minipig brain. *Neuroimage*, 14, 1089-96.

Whischik, C. M.; Theuring, F. & Harrington, C. R. (2001) The molecular basis of tau protein pathology in Alzheimer's disease and related neurodegenerative dementias: I: Dawbarn, D. & Shelley, A. J. (Eds.) *Neurobiology of Alzheimers Disease*. Oxford University Press.

Wiegel, J. & Wisniewski, H. M. (1999) β -amyloidosis in Alzheimer's disease: I: de Leon, M. J. (Ed.) *An Atlas of Alzheimer's Disease*. Parthenon.

Woolsey, C. N. & Fairman, D. (1946) Contralateral, ipsilateral and bilateral representation of cutaneous receptors in somatic areas I and II of the cerebral cortex of pig, sheep, and other mammals. *Surgery*, 19, 684-702.

World Health Organization (1992) *International classification of mental and behavioural disorders*, 10. udgave. WHO.

www.med.harvard.edu/AANLIB/home.htm: *The Whole Brain Atlas*.

www.msu.edu/~brains/: *Brain Biodiversity Bank*.

www.random.org/sform.html

Yoshikawa, T. (1967) *Atlas of the brains of domestic animals*. Tokyo, University of Tokyo Press.

Zilles, K. (2005) Evolution of the Human Brain and Comparaative Cyto- and Receptor Architecture: I: Dahaene, S.; Duhamel, J.-R.; Hauser, M. D. & Rizzolatti, G. (Eds.) *From Monkey Brain to Human Brain. A Fyssen Foundation Symposium*. MIT Press.

Zeineh, M. M.; Engel, S. A.; Thompson, T. & Bookheimer, S. Y. (2003) Dynamics of the Hippocampus During Encoding and Retrieval of Face-Name Pairs. *Science*, 299, 577-580.

Zola-Morgan, S. & Squire, L. R. (1985). Medial temporal lesions in monkeys impair memory on a variety of tasks sensitive to human amnesia. *Behavioral Neuroscience*, 99, 22-34.

Zola-Morgan, S.; Squire, L. R. & Amaral, D. G. (1986). Human Amnesia and the Medial Temporal Region: Enduring Memory Impairment Following a Bilateral Lesion Limited to Field CA1 of the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950-2967.

Zola-Morgan, S.; Squire, L. & Amaral, D. (1989a) Lesions of the hippocampal formation but not lesions of the fornix or the mammillary nuclei produce long-lasting memory impairment in monkeys. *Journal of Neuroscience*, 9, 897-912.

Zola-Morgan, S.; Squire, L. R. & Amaral, D. (1989b) Lesions of the amygdala that spare adjacent cortical regions do not impair memory or exacerbate the impairment following lesions of the hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 9, 1922-1936.

Zola-Morgan, S.; Squire, L. R.; Rempel, N. L.; Clower, R. P. & Amaral, D. (1992). Enduring memory impairment in monkeys after ischemic damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 12, 2582-2596.

Zola-Morgan, S.; Squire, L. R.; Clower, R. P. & Rempel, N. L. (1993). Damage to the perirhinal cortex exacerbates memory impairment following lesions to the hippocampal formation. *Journal of Neuroscience*, 13(1), 251-265.

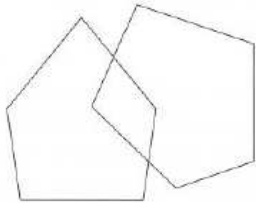
Bilag

Bilag 1

MINI MENTAL STATE EXAMINATION (MMSE)

Patient: _____
 Evalueringsdato: _____ Undersøgt af: _____

		Score	Max Point			Score	Point
Orientering				Genkaldelse			
1. Hvilket år har vi?	år har vi?	-	1	5. Spørg efter de 3 genstande, som blev gentaget før. Giv 1 point for hvert korrekt svar		-	3
	årstid?	-	1				
	dato?	-	1	Sprog			
	ugedag?	-	1	6. Benævn en blyant og et ur		-	2
	måned?	-	1	7. Gentag følgende sætning: „Ingen hvis'er, og'er eller men'er		-	1
2. Hvor er vi?	Land?	-	1	8. Følg en ordre på 3 trin: „Tag papiret i højre hånd, fold det på midten og læg det på gulvet”.		-	3
	Ami?	-	1	9. Læs og adlyd følgende: „Luk øjnene”		-	1
	By?	-	1	10. Skriv en sætning		-	1
	Hospital/ hjemadresse?	-	1				
	Sal?	-	1				
Registrering							
3. Nævn 3 genstande: 1 sekund til at sige hver af dem. Spørg så patienten efter alle 3, efter at man har sagt dem. Giv 1 point for hvert korrekt svar. Gentag så ordene, indtil han/hun lærer alle 3. Tæl antallet af forsøg og skriv det her.		-	3				
Opmærksomhed og regning							
4. „100-7” prøven. 1 point for hvert korrekt svar. Stop efter 5 svar. Alternativt: stav ordet PENGE bagfra		-	5				

11. Eftergør denne tegning	Score	Point
	-	1
Total score		
	-	30

Bilag 2

NINCDS-ADRDA kriterier for den kliniske diagnose af Alzheimers sygdom

- I The criteria for the clinical diagnosis of probable Alzheimer's disease include:
 - dementia established by clinical examination and documented by the mini mental test, Blessed dementia scale or some similar examination, and confirmed by neuropsychological tests;
 - deficits in two or more areas of cognition;
 - progressive worsening of memory and other cognitive functions;
 - no disturbance of consciousness;
 - onset between ages 40 and 90, most often after age 65; absence of systemic disorders or other brain diseases that in and of themselves could account for the progressive deficits in memory and cognition.
- II Other clinical features consistent with the diagnosis of probable Alzheimer's disease, after exclusion of causes of dementia other than Alzheimer's disease, include:
 - progressive deterioration of specific cognitive functions such as language (aphasia), motor skills (apraxia), and perception (agnosia);
 - impaired activities of daily living and altered patterns of behaviour;
 - family history of similar disorders, particularly if confirmed neuropathologically;
 - laboratory results of:
 - normal lumbar puncture as evaluated by standard techniques
 - normal pattern or non-specific changes in EEG such as increased slow-wave activity;
 - evidence of cerebral atrophy on CT with progression documented by serial observation
- III Other clinical features consistent with the diagnosis of probable Alzheimer's disease after exclusion of causes of dementia rather than Alzheimer's disease, include
 - plateaus in the course of progression of the illness;
 - other neurological abnormalities in some patients especially with more advanced disease and including motor signs such as increased muscle tone, myoclonus, or gait disorder;
 - seizures in advanced diseases;
 - CT normal for age.
- IV Features that make the diagnosis of probable Alzheimer's disease uncertain or unlikely include:
 - sudden apoplectic onset;
 - focal neurological findings such as hemiparesis, sensory loss, visual field deficits, and uncoordination early in the course of the illness
 - seizures or gait disturbance at the onset or very early in the course of the illness

- V Clinical diagnosis of possible Alzheimer's disease.
- may be made on the basis of the dementia syndrome, in the absence of other neurological, psychiatric or systemic disorders sufficient to cause dementia and in the presence of variations in the onset, in the presentation, or in the clinical course;
 - may be made in the presence of a second systemic or brain disorder sufficient to produce dementia, which is not considered to be the cause of the dementia;
 - should be used in research studies when a single gradually progressive severe cognitive deficit is identified in the absence of other identifiable cause.

- VI Criteria for diagnosis of definite Alzheimer's disease are:
- the clinical criteria for probable Alzheimer's disease and histopathological evidence obtained from a biopsy or autopsy.
- VII Classification of Alzheimer's disease for research purposes should specify features that may differentiate subtypes of the disorder, such as:
- familial occurrence;
 - onset before the age of 65;
 - presence of trisomy-21.

(Gengivet fra McKhan et al., 1984)

Bilag 3

Træningsskema for indlæring af DNMS opgaven.

Gris nr.:

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	H			
Session:	2	V			
	3	H			
	4	V			
	5	H			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	V			
Session:	2	V			
	3	H			
	4	H			
	5	H			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	H			
Session:	2	V			
	3	V			
	4	V			
	5	V			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	H			
Session:	2	V			
	3	V			
	4	V			
	5	H			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	V			
Session:	2	H			
	3	V			
	4	H			
	5	H			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	V			
Session:	2	H			
	3	H			
	4	V			
	5	H			

Dato:	Trial nr.	Forced trial	Delay	Tid	Bemærkninger
	1	H			
Session:	2	V			
	3	H			
	4	V			
	5	V			

Bilag 4

Oversigt over administreret dosis skopolamin.

UGE 23 Skopolamin			UGE 23 Saltvand		
6/6-06 kl. 8.15	6/6-06 kl. 11.15	6/6-06 kl. 14.45	6/6-06 kl. 8.15	6/6-06 kl. 11.15	6/6-06 kl. 14.45
1+2	5+6	1+2+5+6	3+4	7+8	3+4+7+8
7/6-06 kl. 8.45	7/6-06 kl. 11.15	7/6-06 kl. 14.45	7/6-06 kl. 8.45	7/6-06 kl. 11.15	7/6-06 kl. 14.45
1+2	5+6	1+2+5+6	3+4	7+8	3+4+7+8
8/6-06 kl. 8.45	8/6-06 kl. 11.15	8/6-06 kl. 14.45	8/6-06 kl. 8.45	8/6-06 kl. 11.15	8/6-06 kl. 14.45
1+2	5+6	1+2+5+6	3+4	7+8	3+4+7+8
9/6-06 kl. 8.15	9/6-06 kl. 10.17	9/6-06 kl. 13.45	9/6-06 kl. 8.15	9/6-06 kl. 10.17	9/6-06 kl. 13.45
1+2	5+6	1+2+5+6	3+4	7+8	3+4+7+8
NR. 5 - 23 kg. = 1,15 ml. NR. 6 - 29 kg. = 1,45 ml. NR. 7 - 25 kg. = 1,0 ml. NR. 8 - 30 kg. = 1,5 ml.					
NR. 1 - 30 kg. = 1,5 ml. NR. 2 - 21 kg. = 1,05 ml. NR. 3 - 22 kg. = 1,1 ml. NR. 4 - 21 kg. = 1,05 ml.					

UGE 24 Skopolamin			UGE 24 Saltvand		
12/6-06 kl. 8.20	12/6-06 kl. 11.15	12/6-06 kl. 14.00	12/6-06 kl. 8.20	12/6-06 kl. 11.15	12/6-06 kl. 14.00
3+4	7+8	3+4+7+8	1+2	5+6	1+2+5+6
13/6-06 kl. 8.15	13/6-06 kl. 10.55	13/6-06 kl. 13.5 5	13/6-06 kl. 8.15	13/6-06 kl. 10.5 5	13/6-06 kl.13.55
3+4	7+8	3+4+7+8	1+2	5+6	1+2+5+6
14/6-06 kl. 8.30	14/6-06 kl. 10.45	14/6-06 kl. 14.0 6	14/6-06 kl. 8.30	14/6-06 kl. 10.45	14/6-06 kl.14.06
3+4	7+8	3+4+7+8	1+2	5+6	1+2+5+6
15/6-06 kl. 8.30	15/6-06 kl. 10.30	15/6-06 kl. 13.59	15/6-06 kl. 8.30	15/6-06 kl. 10.30	15/6-06 kl. 13.59
3+4	7+8	3+4+7+8	1+2	5+6	1+2+5+6
16/6-06 kl. 8.14	16/6-06 kl. 10.48	16/6-06 kl. 13.46	16/6-06 kl. 8.14	16/6-06 kl. 10.48	16/6-06 kl. 13.46
3+4	7+8	3+4+7+8	1+2	5+6	1+2+5+6
NR. 5 - 23 kg. = 0,92 ml. NR. 6 - 29 kg. = 1,16 ml. NR. 7 - 26 kg. = 1,04 ml. NR. 8 - 30 kg. = 1,2 ml.					
NR. 1 - 30 kg. = 1,2 ml. NR. 2 - 21 kg. = 0,84 ml. NR. 3 - 22 kg. = 0,88 ml. NR. 4 - 21 kg. = 1,0 ml.					

UGE 25 Skopolamin		UGE 25 Saltvand	
<i>19/6-06 kl. 8.30</i>	<i>19/6-06 kl. 11.00</i>	<i>19/6-06 kl.8.30</i>	<i>19/6-06 kl. 11.00</i>
3+4	7+8	1+2	5+6
<i>20/6-06 kl. 8.30</i>	<i>20/6-06 kl. 10.30</i>	<i>20/6-06 kl. 8.30</i>	<i>20/6-06 kl. 10.30</i>
3+4	7+8	1+2	5+6
<i>21/6-06 kl. 8.30</i>	<i>21/6-06 kl. 10.45</i>	<i>21/6-06 kl. 8.30</i>	<i>21/6-06 kl. 10.45</i>
3+4	7+8	1+2	5+6
<i>22/6-06 kl. 8.20</i>	<i>22/6-06 kl. 10.40</i>	<i>22/6-06 kl.8.20</i>	<i>22/6-06 kl. 10.40</i>
3+4	7+8	1+2	5+6
<i>23/6-06 kl. 8.20</i>	<i>23/6-06 kl. 10.45</i>	<i>23/6-06 kl. 8.20</i>	<i>23/6-06 kl. 10.45</i>
3+4	7+8	1+2	5+6
NR. 5 - 23 kg. = 0,92 ml. NR. 6 - 30 kg. = 1,2 ml. NR. 7 - 25 kg. = 1,0 ml. NR. 8 - 28 kg. = 1,12 ml.			
NR. 1 - 29 kg. = 1,16 ml. NR. 2 - 21 kg. = 0,84 ml. NR. 3 - 21 kg. = 0,84 ml. NR. 4 - 23 kg. = 0,92 ml.			

UGE 26 Skopolamin		UGE 26 Saltvand	
26/6-06 kl. 8.20	26/6-06 kl. 10.40	26/6-06 kl. 8.20	26/6-06 kl. 10.40
1+2	5+6	3+4	7+8
27/6-06 kl. 8.20	27/6-06 kl. 10.50	27/6-06 kl. 8.20	27/6-06 kl. 10.50
1+2	5+6	3+4	7+8
28/6-06 kl. 8.20	28/6-06 kl. 10.38	28/6-06 kl. 8.20	28/6-06 kl. 10.38
1+2	5+6	3+4	7+8
29/6-06 kl. 8.20	29/6-06 kl. 10.40	29/6-06 kl. 8.20	29/6-06 kl. 10.40
1+2	5+6	3+4	7+8
30/6-06 kl. 8.20	30/6-06 kl. 10.50	30/6-06 kl. 8.20	30/6-06 kl. 10.50
1+2	5+6	3+4	7+8
NR. 5 - 24 kg. = 0,96 ml. NR. 6 - 29 kg. = 1,16 ml. NR. 7 - 24 kg. = 0,96 ml. NR. 8 - 30 kg. = 1,2 ml.			
NR. 1 - 30 kg. = 1,2 ml. NR. 2 - 21 kg. = 0,84 ml. NR. 3 - 23 kg. = 0,92 ml. NR. 4 - 23 kg. = 0,92 ml.			

UGE 27 (Mandag fra uge 23 d. 5/6-06)			UGE 27 (Mandag fra uge 23 d.5/6-06)		
Skopolamin			Saltvand		
4/6-06 kl. 8.10	3/6-06 kl. 8.50		4/6-06 kl. 8.10	3/6-06 kl. 8.50	
1+2	5+6		3+4	7+8	
NR. 5 - 25 kg. = 1,00 ml. NR. 6 - 29 kg. = 1,16 ml. NR. 7 - 27 kg. = 1,08 ml. NR. 8 - 33 kg. = 1,32 ml.					
NR. 1 – 30 kg. = 1,20 ml. NR. 2 - 21 kg. = 0,84 ml. NR. 3 - 21kg. = 0,84 ml. NR. 4 - 23kg. = 0,92 ml.					