

DISS. ETH NO. 22922

**Exploring the antidepressant effects of ketamine:  
Insights from multimodal neuroimaging**

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR OF SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**Milan Scheidegger**

Dr. med. MA ETH HPK, University and ETH Zurich

born on 09.09.1982

citizen of

Winterthur, ZH, Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Markus Rudin

Dr. Anke Henning

Prof. Dr. med. Erich Seifritz

2015

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines multimodalen Bildegebungsansatzes für die Untersuchung neuronaler Mechanismen der Neurorezeptor-Regulation, des Glutamatstoffwechsels und der Gehirnfunktion, die von besonderer Relevanz für affektive Störungen wie die Depression sind und translational in klinische Anwendungen übersetzt werden können. Bildgebende Verfahren wie die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) zeigen neuronale Aktivierungsmuster (positive / negative BOLD-Signale; PBRs/NBRs) während emotionaler Verarbeitung auf. Demgegenüber bietet die Magnetresonanzspektroskopie ( $^1\text{H}$ -MRS) die Möglichkeit, Konzentrationen bestimmter Neurotransmitter und Energiemetaboliten nicht-invasiv in vivo zu bestimmen, während die Positronenemissionstomographie (PET) die Quantifizierung von Neurotransmitter-Rezeptordichten mittels spezifisch markierter radioaktiver Tracer-Moleküle erlaubt. Somit kann eine multimodale Erhebung von BOLD-Signalen via fMRI, Neurotransmitterkonzentrationen via  $^1\text{H}$ -MRS und Neurotransmitter-Rezeptordichten mittels PET innerhalb eines integrierten Studienprotokolls neue Einblicke in die komplexe Beziehung zwischen Rezeptorfunktion, Neurotransmission und Gehirnmotabolismus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen vermitteln.

Biochemische, pharmakologische, behaviorale und klinische Daten konvergieren dahingehend, dass die glutamaterge Neurotransmission über NMDA-, AMPA- und metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) einen biologisch relevanten Prozess in der Emotionsregulation darstellt. Die Befunde einer reduzierten Konzentration an N-Acetylaspartat (NAA) sowie geringere Konzentrationen von Glutamat und Glutamin im prägenualen anterioren cingulären Cortex (pACC) bei depressiven Patienten stützt die Hypothese einer glutamatergen Stoffwechselstörung bei der Depression. Zusätzlich wird diese Hypothese durch die schnelle antidepressive Wirkung des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin und metabotroper Gluta-

matrezeptor-Modulatoren unterstützt. Die Erforschung der Beziehung zwischen BOLD-Signalen, Metabolitenkonzentrationen und der Neurorezeptor-Plastizität in verschiedenen depressionsrelevanten Gehirnregionen und ihre Modulation durch pharmakologische Interventionen wie Ketamin bleibt jedoch ein wichtiges Thema für weitere Untersuchungen. Die multimodale Erfassung der pharmakologischen Effekte des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin innerhalb eines integrierten Studienprotokolls mittels PET,  $^1\text{H}$ -MRS, funktioneller Bildebung in Ruhe (rsfMRI) und während emotionaler Stimulation (fMRI), sowie funktioneller Parameter wie der emotionalen Responsivität, bietet Einblicke in die komplexe Beziehung zwischen Rezeptorfunktion, Neurotransmission und Metabolismus und ihrer Rolle bei der Emotionsregulation. Die folgenden Zeitpunkte wurden systematisch in drei unabhängigen Stichproben von gesunden Probanden untersucht, die jeweils eine intravenöse Dosis von S-Ketamin (0,25 mg/kg i.v. Infusion über 40 Minuten) bzw. Placebo (0,9% Kochsalzlösung) erhielten:

- 1) **Studie A:** fMRI unter emotionaler Stimulation, rsfMRI und  $^1\text{H}$ -MRS während der Ketamininfusion (im Vergleich zum Grundzustand; n = 23).
- 2) **Studie B:**  $^{11}\text{C}$ -ABP688-PET und  $^1\text{H}$ -MRS (2-4 Stunden nach der Infusion, im Vergleich zu Placebo; n = 20).
- 3) **Studie C:** fMRI unter emotionaler Stimulation, rsfMRI und  $^1\text{H}$ -MRS (24 Stunden nach der Verabreichung von Ketamin; doppelblindes, placebo-kontrolliertes, randomisiertes Crossover-Studiendesign; n = 19).

Unsere Ergebnisse konvergieren mit den neuesten präklinischen Befunden, welche eine stimulierende Wirkung von Ketamin auf die glutamaterge Neurotransmission und den Gehirnstoffwechsel nachgewiesen haben. Mittels fMRI in Ruhe und unter emotionaler Stimulation konnten wir in Studie A bei gesunden Probanden zeigen, dass eine akute Verabreichung von Ketamin in subanästhetischer Dosis die neuronale Reaktivität im bilateralen amygdalo-hippocampalen Komplex während emotionaler Stimulation reduziert. Insbesondere für negative Reize zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Abnahme der Amygdala-Reaktivität und der funktionellen Konnektivität zum pACC sowie der subjektiv empfundenen Intensität der

psychedelischen Bewusstseinsveränderung während der Ketamininfusion. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die pharmakologische Modulation von glutamatergen Gehirnschaltkreisen, die mit einer Verringerung der negativen Gefühlsausrichtung und der Reduktion der limbischen Reagibilität auf emotionale Reize verbunden ist, einen frühen Biomechanismus darstellt, um Teile der gestörten neurobehavioralen Homöostase und der negativen Gefühlsausrichtung bei depressiven Patienten wieder herzustellen. Dieses auf Beobachtungen bei gesunden Probanden basierende explorative Modell muss in randomisierten, kontrollierten klinischen Studien mit Ketamingabe an depressiven Patienten überprüft werden.

In Studie C wurde das Potenzial von Ketamin zur Wiederherstellung systematischer Veränderungen von Konnektivitäten in übergeordneten funktionalen Netzwerke getestet, die bei schwer depressiven Patienten mittels rsfMRI pathologisch verändert vorgefunden wurden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein dysfunktionales Netzwerk im mediopräfrontalen "Dorsal Nexus", der kürzlich in depressiven Patienten als hyperrigide beschrieben wurde (Sheline et al. 2010), spezifisch durch Ketamin-assoziierte Reduktionen der funktionellen Konnektivität moduliert wird (Scheidegger et al. 2012). Somit berichten wir bei gesunden Probanden über Reduktionen der funktionellen Konnektivität in neuronalen Netzwerken, die eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Depression spielen. In unserem cross-over, placebo-kontrollierten fMRI Design zeigen wir, dass diese pharmakologischen Effekte in einem Zeitfenster von 24 Stunden nach der Infusion auftreten und zeitlich mit dem antidepressiven Wirkmaximum nach einmaliger intravenöser Gabe von Ketamin überlappen (Murrough et al. 2013, Zarate et al 2006). Auf der Grundlage dieser Ergebnisse stellen wir die Hypothese auf, dass eine Reduktion der funktionellen Konnektivität des dorsalen Nexus zugrunde liegende molekulare Mechanismen widerspiegelt, die für die antidepressive Wirkung von Ketamin relevant sind. In derselben Studienpopulation fanden wir 24h nach Ketamingabe im pACC stärkere NBRs während der Verarbeitung von negativen Reizen. Bei Versuchspersonen mit geringerer Fähigkeit auf unangenehme Erfahrungen mit Ablenkung zu reagieren waren die NBRs deutlicher ausgeprägt. Insofern deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass Ketamin seine Wirkung auf die Stimmung über

eine Dämpfung des erhöhten Selbstfokus bei negativen Erfahrungen innerhalb des Default-Mode-Netzwerkes (DMN) entfalten könnte. Ob diese Effekte bei depressiven Patienten tatsächlich korrigierend auf emotionale und behaviorale Dysfunktionen einwirken, muss in weiteren klinischen Studien untersucht werden.

Schliesslich wurde in Studie B die Beziehung zwischen Ketamin-induzierten Veränderungen der glutamatergen Neurotransmission ( $^1\text{H-MRS}$ ) und der mGluR5-Rezeptordichten (PET) im Intervall von 3-4 Stunden nach der Infusion untersucht, wodurch erstmals in vivo Einblicke in die glutamaterge Neurorezeptorplastizität ermöglicht werden. Da die Wechselwirkung zwischen Neurotransmittern und Rezeptoren erwartungsgemäss die Dynamik der Rezeptorexpression bestimmt, ist eine bessere Kenntnis der molekularen Mechanismen, die dieser funktionellen Kopplung zugrundeliegen, für das Verständnis der physiologischen wie auch der pathologisch veränderten synaptischen Plastizität entscheidend. In dieser Studie zeigen wir erstmals, dass pharmakologisch induzierte Veränderungen der präsynaptischen Glutamatausschüttung sowie konsekutive Agonist-Rezeptor-Interaktionen durch kombinierte  $^1\text{H-MRS}$ - und PET-Bildgebung in vivo untersucht werden können. Zudem stellen wir die Hypothese auf, dass die präsynaptische Glutamatausschüttung durch die Ermittlung der totalen CholinKonzentration sowie der pharmakologisch induzierten Korrelation zwischen Glutamat und Cholin als indirektem spektroskopischem Marker für einen erhöhten präsynaptischen Membranumsatz erfasst werden kann. Hierfür absolvierten drei unabhängige, jedoch alters- und geschlechts-äquivalente Probandenkohorten 1) eine  $^1\text{H-MRS}$  Messung 20 min nach Beginn einer intravenösen Ketamingabe (im Vergleich zum Grundzustand), 2) eine  $^1\text{H-MRS}$  Messung 3-4 Stunden nach Placebo- oder Ketamininfusion, und 3) eine  $^1\text{H-MRS}$  Messung 24h nach Placebo- oder Ketamininfusion in einem cross-over, doppelblinden und randomisierten Studiendesign. Korrelationen zwischen Glutamat und Cholin wurden durchgehend während, 3-4h nach und 24h nach Ketamininfusion gefunden. Im Gegensatz dazu wurde weder im Grundzustand noch in einer der drei Teilkohorten eine Korrelation zwischen Glutamat und Cholin unter Placeboinfusion gefunden. Dies stützt die Annahme, dass eine erhöhte Glutamatausschüttung und eine

Korrelation mit Cholin Ausdruck eines erhöhten Membranumsatzes im Rahmen der Neurotransmitter-Vesikelfusion und möglicherweise auch der gesteigerten Rezeptormobilität nach Stimulation durch Ketamin ist.

Abschliessend lässt sich festhalten, dass ein mehrstufiges und multimodales Bildgebungsprotokoll zur dynamischen Untersuchung der Biomechanismen der antidepressiven Wirkung von Ketamin entwickelt und in drei unabhängigen Kohorten von gesunden Probanden zu drei verschiedenen Zeitpunkten der Arzneimittelwirkung getestet wurde. Somit können akute und verzögerte Arzneimittelwirkungen unterschieden und zugunsten eines dynamischen Verständnisses von homöostatischen Anpassungen in relevanten neuronalen Schaltkreisen der Emotionsregulation integriert werden. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Entwicklungsmöglichkeiten für eine innovative Diagnostik und Therapie von stressbedingten und affektiven Störungen.

## SUMMARY

The aim of this PhD thesis was to establish a multimodal imaging approach for the investigation of the neural mechanisms underlying neuroreceptor regulation, glutamatergic metabolism and brain function that are of particular relevance for major depressive disorder (MDD) and that can be translated into clinical applications. Imaging techniques such as functional magnetic resonance imaging (fMRI) reveal distinct neural activation patterns (positive/negative BOLD responses; PBRs/NBRs) during emotional processing. In contrast, proton magnetic resonance spectroscopy ( $^1\text{H}$ -MRS) offers the possibility to non-invasively determine concentrations of neurotransmitters and metabolites related to energy metabolism *in vivo*, whereas positron emission tomography (PET) allows for the quantification of neurotransmitter receptor densities using specifically labeled radioactive tracer molecules. Hence, a multi-modal assessment of BOLD responses via fMRI, neurotransmitter concentrations via  $^1\text{H}$ -MRS and neurotransmitter receptor densities via PET within an integrated study protocol may lead to novel insights into the complex relationship between receptor function, neurotransmission and metabolism under physiological and pathological conditions.

Convergent biochemical, pharmacological, behavioral and clinical data establish glutamatergic neurotransmission via NMDA-, AMPA- and metabotropic glutamate receptors (mGluRs) as a biologically relevant process in the regulation of mood. The hypothesis of a glutamatergic dysfunction in MDD is supported by reduced N-acetylaspartate (NAA) as well as reduced concentrations of glutamate and glutamine in the pregenual anterior cingulate cortex (pACC) in patients with MDD. The glutamatergic dysfunction in MDD is further supported by the rapid antidepressant effect of the NMDA-receptor antagonist ketamine and metabotropic glutamate receptor modulators. However, the exact relationship between BOLD responses, metabolite concentrations and neuroreceptor plasticity within different brain regions of the neurocircuitry of MDD and its modulation by pharmacological intervention with ketamine remains an important topic for

further investigation. Specifically, multimodal assessment of the pharmacological effects of the NMDA-receptor antagonist ketamine within an integrated study protocol including PET,  $^1\text{H}$ -MRS, resting-state (rsfMRI) and task fMRI, and functional measurements such as emotional responsiveness provides novel insights into the complex relationship between receptor function, neurotransmission and metabolism and its role in emotion regulation. The following time points were systematically investigated in three independent subsamples of healthy subjects receiving an intravenous dose of either S-ketamine (0.25 mg/kg i.v. infusion over 40 minutes) or placebo (0.9% saline solution):

- 1) **Study A:** fMRI during emotional stimulation, rsfMRI, and  $^1\text{H}$ -MRS during ketamine infusion (compared to baseline;  $n = 23$ ).
- 2) **Study B:**  $^{11}\text{C}$ -ABP688-PET and  $^1\text{H}$ -MRS (2-4 hours post-infusion, compared to placebo;  $n = 20$ ).
- 3) **Study C:** fMRI during emotional stimulation, rsfMRI, and  $^1\text{H}$ -MRS (24 hours after ketamine administration in a double-blind, placebo-controlled, randomized, cross-over study design;  $n = 19$ ).

Our findings converge with recent preclinical evidence highlighting the stimulatory effect of ketamine on glutamatergic signaling and cerebral neuroenergetics. Using resting-state and task fMRI in healthy subjects, we found in study A that acute administration of subanaesthetic ketamine reduced neural reactivity in the bilateral amygdalo-hippocampal complex during emotional stimulation. Particularly for negative stimuli, reductions of amygdala reactivity were related to functional connectivity to the pACC and to the subjective intensity of psychedelic alterations of consciousness during ketamine infusion. Our findings suggest that the pharmacological modulation of glutamate-responsive cerebral circuits, which is associated with a shift in emotional bias and a reduction of limbic reactivity to emotional stimuli, represents an early biomechanism to restore parts of the disrupted neurobehavioral homeostasis and negative emotional bias in MDD patients. As an exploratory model based on observations in healthy subjects, it has to be further confirmed in randomized-controlled clinical trials in MDD patients receiving ketamine.



In study C we aimed to evaluate ketamine's potential to restore systematic alterations in connections among higher-order functional networks that are found in major depression using rsfMRI. Our results indicate that a core network of dysfunction around a medioprefrontal "dorsal nexus", recently described as rigidly overconnected in MDD patients (Sheline et al. 2010), is specifically affected by ketamine-induced reductions of functional connectivity (Scheidegger et al. 2012). Thus, we report a reduction of functional connectivity in networks that play a critical role in the pathophysiology of MDD in healthy subjects. In our cross-over, placebo-controlled fMRI design, we demonstrate that these pharmacological effects appear at a time window of 24h post-infusion, overlapping with the peak of antidepressant action after a single intravenous dose of ketamine (Zarate et al. 2006; Murrough et al. 2013). Based on those findings we raise the hypothesis that reducing functional connectivity of the dorsal nexus reflects underlying molecular mechanisms relevant to the antidepressant efficacy of ketamine. In the same study population, we found increased NBRs in the pACC during processing of negative stimuli 24h after ketamine administration. The increase of NBRs was more pronounced for subjects with a low ability to apply distraction during unpleasant experiences. Our results therefore suggest that ketamine might exert its effect on mood state via an attenuation of increased self-focus within the default-mode network (DMN) during negative experiences. Whether these effects are likely to be associated with reversing aspects of emotional and behavioral dysregulation has to be further investigated in a clinical study involving MDD patients.

Finally, in study B we investigated the relationship between ketamine-induced changes in glutamatergic neurotransmission ( $^1\text{H}$ -MRS) and mGluR5 neuroreceptor densities (PET) in the post-infusion interval of 3-4 hours, providing for the first time insights into glutamate-dependent neuroreceptor plasticity in vivo. Since the interaction between neurotransmitters and receptors is expected to drive the dynamics of receptor expression, a better knowledge of the molecular mechanisms underlying such functional coupling is crucial for the understanding of synaptic plasticity in health and disease. Here we showed for the first time that drug-induced changes in

presynaptic glutamate release and consecutive agonist-receptor-interaction can be assessed by combined  $^1\text{H}$ -MRS and PET imaging in vivo. Furthermore, we raised the hypothesis that presynaptic glutamate release can be assessed by exploring total choline concentrations and drug-induced correlation between glutamate and choline as indirect spectroscopic marker for increased presynaptic membrane turnover. To that, three independent cohorts of sex- and age-matched healthy subjects underwent 1) an  $^1\text{H}$ -MRS scan 20 min after onset of an acute infusion of ketamine (compared to baseline), 2) an  $^1\text{H}$ -MRS scan 3-4h post placebo or ketamine infusion, and 3) an  $^1\text{H}$ -MRS scan 24h after placebo or ketamine in a cross-over, double-blind, and randomized study design. Correlations between glutamate and choline have been consistently found during, 3-4h post and 24h post ketamine infusion. In contrast, neither at baseline condition nor under placebo infusion glutamate and choline correlated in any of the three sub-cohorts. This is in support of the notion of increased glutamate secretion and correlations with choline related to membrane restructuring processes in the context of neurotransmitter vesicle fusion and possibly also neurotransmitter receptor trafficking following stimulation with ketamine.

In conclusion, a multistage and multimodal imaging protocol was developed for the dynamic investigation of the biomechanisms of antidepressant drug action of ketamine and tested in three independent cohorts of healthy subjects at three different time points of drug action. Thus, acute and delayed drug effects can be distinguished and integrated into a dynamic understanding of homeostatic adaptations in cerebral neurocircuits relevant to mood regulation. These insights may open-up novel possibilities for the development of improved diagnostics and treatment of stress-related and affective disorders.