

Diss. ETH No. 9273

**LERN- UND GEDÄCHTNISLEISTUNGEN BEI RATTEN:
EINFLUSS DER N-methyl-D-aspartat (NMDA) REZEPTOREN**

Dissertation überreicht an die

EIDGENOESSISCHE TECHNISCHE HOCHSCHULE ZUERICH

zur Erlangung des
Doktor der Naturwissenschaften

vorgelegt von:

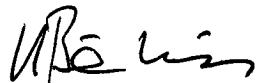
Beat Alessandri
dipl. Natw. ETH

geboren am 07. Dezember 1961
Bürger von Schüpfheim LU

Angenommen auf Antrag von:

21.5.92

Prof. Dr. Karl Bättig, Referent, ETH Zürich
Dr. PD Hans-Peter Lipp, Korreferent, UNI Zürich
Dr. PD Hans Welzl, Korreferent, ETH Zürich



1990

teilweise publiziert in:

- Behavioral & Neural Biology (1989) 52: 194-212.
- Psychobiology (1990) 18: 43-47.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur neuronalen Grundlage des Gedächtnisses werden beispielsweise anhand Läsionen oder pharmakologischer Manipulationen gemacht. Dabei verwendete Lernaufgaben sind häufig Radiallabyrinth oder Wasserlabyrinth. In diesem Zusammenhang pharmakologisch sehr gut untersucht wurde das cholinerge Transmittersystem. Seit der Entdeckung der Langzeitpotenzierung (LTP), einer langandauernden Verstärkung der synaptischen Reizübertragung, die als elektro-physiologisches Gedächtnismodell gilt, wurde vermehrt das glutamerge Neurotransmittersystem in Zusammenhang mit Lernen und Gedächtnis betrachtet. Es zeigte sich nämlich, dass eine wichtige Komponente für die Induktion, jedoch nicht für die Beibehaltung von LTP, ein Subtyp der exzitatorischen Aminosäurerezeptoren, der *N*-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptor, ist. Die pharmakologische Blockierung dieses Rezeptors mit NMDA Rezeptorantagonisten verhindert die Induktion von LTP, hat aber keinen Effekt mehr auf eine schon gebildete Potenzierung. In der vorliegenden Arbeit sollte daher in 5 Experimenten verhaltenspharmakologisch der Zusammenhang zwischen NMDA Rezeptoren und Lern- und Gedächtnisleistungen von Ratten untersucht werden.

Im ersten Experiment wurde die Lernfähigkeit von Ratten in einem hexagonalen Tunnellabyrinth (HTM) nach Injektionen von Ketamin (0 - 25 mg/kg; i.p.), einem nicht-kompetitiven NMDA Rezeptorantagonisten¹, untersucht. Das HTM erlaubte die simultane Messung von lokomotorischer Aktivität, Perimeteraktivität (Aktivität im äussersten Rundgang) und kognitiven Parametern wie dem Arbeitsgedächtnis (Anzahl repetitiver Armwahlen; und Position der ersten Armrepetition) und dem Referenzgedächtnis (Anzahl Wahlen des kurzen "Blindganges" in jedem Arm) in der radialen Konfiguration des HTM. Vor allem die höchste Dosierung (25 mg/kg) bewirkte eine Aktivitätsdepression und eine Erhöhung der Perimeteraktivität. Von den kognitiven Parametern war das Arbeitsgedächtnis, aber nicht das Referenzgedächtnis durch die Dosierungen 6, 12, und 25 mg/kg Ketamin verschlechtert. Die Blockierung von NMDA Rezeptoren durch 3 mg/kg Ketamin bewirkte nur eine kurzfristige Verschlechterung im Arbeitsgedächtnis.

¹ In hohen Dosierungen (>80 mg/kg) wirkt Ketamin auch als Anaesthetikum und wird häufig auch als dissoziatives Anaesthetikum bezeichnet (siehe: Experimenteller Teil, Experiment 1, Methode).

Im zweiten Experiment wurde die räumliche Orientierung unter Ketamin (12 und 25 mg/kg) in einem Wasserlabyrinth untersucht. Im Gegensatz zum HTM, in dem die Bildung eines räumlichen Konzepts des Labyrinthes ohne visuelle Hilfe gemacht werden musste, orientierten sich die Tiere im Wasserlabyrinth hauptsächlich visuell. In beiden Ketamindosierungen war die Akquisition der Aufgabe, eine unter Wasser versteckte und nicht sichtbare Plattform von verschiedenen Startpositionen aus zu finden, durch Ketamin verschlechtert, aber nicht verhindert. Das Entfernen der Plattform aus dem Wasserlabyrinth zeigte jedoch, dass die NMDA Rezeptorblockierung die Abspeicherung der relevanten räumlichen Information verhinderte, da keine Präferenz für den Quadranten gefunden werden konnte, in dem während der Akquisition die Plattform war. Das Lernen einer neuen Plattformposition war auch durch beide Dosierungen verschlechtert. Die gefundenen Lerndefizite beruhten jedoch nicht auf sensomotorischen Störungen induziert durch Ketamin, da alle Tiere problemlos eine sichtbare Plattform finden konnten.

Für die räumliche Orientierung im Tunnel- und Wasserlabyrinth ist der Hippocampus (HC) eine zentrale Hirnstruktur. Durch Läsionen des HC wird räumliches Lernen verhindert. Dazu besitzt der HC die grösste Dichte an NMDA Rezeptoren im ZNS von Ratten. In einem Experiment mit dem Wasserlabyrinth wurde den Tieren deshalb der kompetitive NMDA Rezeptorantagonist 2-Amino-5-phosphonovalerat (APV) direkt in den Hippocampus injiziert (bilateral je 50 μ M), um so eine Rezeptorblockierung vor allem in der für räumliches Lernen relevanten Struktur zu erhalten. Die Tiere lernten ohne Substanzinjektion relativ rasch, täglich eine von vier asymmetrisch organisierten Plattformpositionen innerhalb der ersten beiden Schwimmversuche zu finden. Nach diesem Training war die Akquisition einer versteckten, aber nicht einer sichtbaren Plattform durch die APV Injektion verschlechtert. Der Abruf einer gelernten Plattformposition, gemessen an der räumlichen Präferenz ohne Plattform kurz nach der Akquisition der Position, war durch APV im Vergleich zur Kontrolle verschlechtert. Dies schien jedoch vor allem auf motorischen Störungen, induziert durch APV, zu beruhen.

Neben den räumlich zu lösenden Aufgaben wurde in einem vierten Experiment die konditionierte Geschmacksaversionsaufgabe als "nicht-räumlicher" Gedächtnistest verwendet. Dabei wurde den Tieren 1 Stunde (Std.) nach der Präsentation einer Saccharinlösung (0.1%; konditionierter Stimulus = CS) Lithiumchlorid (LiCl; 0.14 M; unkonditionierter Stimulus = UCS) injiziert, das Uebelkeit auslöste. Die dadurch gebildete Assoziation zwischen dem neuen Geschmack und der Uebelkeit verursachte 48 Std. später bei der Wahl zwischen einer mit Wasser und einer mit Saccharin gefüllten Flasche (2-Flaschen-Wahltest) eine Aversion gegenüber Saccharin, die durch 25 mg/kg, aber nicht durch 6 und 12 mg/kg Ketamin blockiert werden konnte. Die Blockierung der Aversion durch den NMDA Rezeptorantagonist Ketamin beruhte jedoch nicht auf einer Beeinflussung des Assoziationsprozesses durch Ketamin, einem zustandsabhängigem Lernen oder einer veränderten Geschmacksempfindung nach Ketamin. Ketamin (25 mg/kg) injiziert als UCS (unkonditionierter Stimulus) verursachte eine Aversion gegenüber Saccharin im Vergleich zu den mit physiologischer Kochsalzlösung als UCS injizierten Tieren, d.h. Ketamin besitzt selber eine aversive Wirkung.

Um die aversive Wirkung von psychoaktiven Substanzen (vgl. Riley & Tuck, 1985) und den möglichen Einfluss auf den Assoziationsprozess zu umgehen, wurde den Tieren im letzten Experiment 24 Stunden (Std.) vor der CS-UCS Konditionierung für 2, 6, oder 10 Minuten Saccharin (0.1%) präsentiert. Dabei wurde versucht, die Bildung einer Geschmacksspur durch MK-801 (0.2 mg/kg) zu verhindern. 48 Std. nach der Konditionierung zeigten MK-801 behandelte Tiere eine vollständige Saccharinaversion an drei 2-Flaschen-Wahltagen. Die Abspeicherung der Geschmacksspur während der 6- und 10-minütigen, aber nicht während der 2-minütigen Trinksitzung 24 Std. vor der Konditionierung führte nach einer kompletten Saccharinaversion am ersten 2-Flaschen-Wahltest zu einer früheren Extinktion, d.h. zu einem erhöhten Saccharinkonsum im Vergleich zu MK-801 Tieren. Das könnte bedeuten, dass die Injektion von MK-801 die Abspeicherung des Geschmacksstimulus als "sicher" verhinderte und so zu einer kompletten Aversion über mehrere Tage führte. MK-801 verursachte jedoch eine Verminderung des Saccharinkonsums, was sich auch auf die Bildung einer Aversion ausgewirkt haben könnte.

Die Experimente haben gezeigt, dass sowohl räumlich wie auch nicht räumlich zu lösende Aufgaben durch eine NMDA Rezeptorblockierung beeinflusst waren. Die nicht-kompetitiven und kompetitiven NMDA Rezeptorantagonisten Ketamin, MK-801 oder APV verhinderten die kurzzeitige Abspeicherung der Sequenz schon besuchter Tunnellabyrintharme (Arbeitsgedächtnis), die Abspeicherung und Verknüpfung visueller labyrinthexterner Stimuli im Wasserlabyrinth und die Bildung einer Geschmacksspur beim konditionierten Geschmacksaversionslernen. Weniger ausgeprägt war der Effekt auf den Abruf vorher gelernter Information, wobei der Abruf eher nicht beeinflusst zu sein scheint, da die Defizite im Wasserlabyrinth nach APV auf initial starke motorische Störungen zurückgeführt werden können. Auch keinen Effekt konnte in der Blindgangaktivität im Tunnellabyrinth (Referenzgedächtnis) und auf das Finden einer sichtbaren Plattform in fixer und variabler Position im Wasserlabyrinth gefunden werden.

Die Resultate unterstützen die Meinung, dass NMDA Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Gedächtnisbildung, aber nicht beim Gedächtnisabruf spielen. Die Blockierung der NMDA Rezeptoren scheint jedoch nicht die Fähigkeit zum Lernen *per se* zu verhindern und alle Lern und Gedächtnisleistungen in gleicher Weise zu stören.

SUMMARY

Pharmacological manipulations or central brain lesions are often used to investigate the neural basis of memory. In the nervous system several neurotransmitter systems exist which contribute to different behavior. Since the discovery of long-term potentiation (LTP), a long-lasting potentiation of synaptic efficacy, which is believed to be an electrophysiological model of memory, the glutamergic neurotransmitter system has been associated with learning and memory mechanisms. It was found that a subtype of excitatory amino acid receptors, the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, plays an important role in the induction but not in the maintenance of LTP. Pharmacological blockade of this receptor type prevents the induction of LTP but has no effects on already induced LTP. In the presented work the relationship between NMDA receptors and learning and memory in rats was investigated in 5 experiments using a hexagonal tunnel maze, a water maze and conditioned taste aversion as learning tasks.

In the first experiment, the hexagonal tunnel maze (HTM) as spatial learning task and ketamine (0, 3, 6, 12, or 25 mg/kg; i.p.) as non-competitive NMDA receptor antagonist were used. The HTM allows the measurement of locomotor activity, perimeter activity (activity in the outer ring of the maze) and cognitive parameters, e.g. exploration efficiency or working and reference memory. The maze provides no extramaze cues for orientation and therefore the animals have to explore the maze in the dark. The dosage of 25 mg/kg ketamine depressed locomotor activity throughout the experiment and increased perimeter activity. The lowest dose (3 mg/kg) increased locomotor activity only during the first three experimental days. Ketamine at dosages of 6, 12, and 25 mg/kg attenuated working (arm repetitions) but not reference memory performance ("blind-alley" visits) in a 6-arm radial configuration of the HTM. Only a short-lasting impairment of working memory was found with 3 mg/kg ketamine. The experiment showed that NMDA receptors impaired spatial memory abilities of rats and that not all forms of learning in the tunnel maze interfered with an NMDA receptor blockade.

In the second experiment, the effects of ketamine (0, 12, or 25 mg/kg; i.p.) on spatial memory were investigated in a water maze (WM). Contrary to the HTM, spatial orientation in a WM, i.e. finding a hidden escape platform in a fixed spatial position, is based on visual discrimination of extramaze cues. With both ketamine dosages the task acquisition (time to escape onto a hidden and not visible platform) was impaired but not completely blocked. Ketamine-injected animals showed no spatial bias for the previous platform position during a 30-sec test trial with the platform removed from the pool. These results and the impaired relearning of a new platform position indicated that the NMDA receptor blockade impaired encoding of spatial information. Ketamine had no effects on the time to escape onto a visible (2 cm above water surface) platform compared with control animals; thus the learning deficits could be separated from sensorimotor disturbances induced by ketamine.

In a second experiment using a WM, rats were injected with the competitive NMDA receptor antagonist 2-amino-5-phosphonovalerate (APV). APV was injected intrahippocampally (50 μ M, bilateral), because the hippocampus formation plays a crucial role in spatial learning and contains the highest density of NMDA receptors. During training sessions (16 trials/day) rats had to learn to locate a hidden escape platform which was in a new position each day. At the end of the training phase they were able to find accurately a new platform position during the first 2 of 16 trials. After this training phase the injection of APV (30-40 min pre-trial) impaired the acquisition of a new position of a hidden but not of a visible platform compared with vehicle-injected control animals. The NMDA receptor blockade also impaired the retrieval of an acquired platform position, measured as spatial bias for the previous position following during a 60-sec search trial with the platform removed from the pool. However, the impaired retrieval of an acquired platform position seemed to be affected by strong motor disturbances after APV injections.

In the fourth experiment, the conditioned taste aversion (CTA) learning task was used to assess the effects of ketamine (0, 6, 12, or 25 mg/kg) on a non-spatial learning task. Rats were exposed to a saccharin solution (0.1%) as

conditioned stimulus (CS) and 1 hour later injected with lithium chloride (LiCl, 0.14 M) as unconditioned stimulus (UCS) to induce malaise. Forty-eight hours after the CS presentation, rats were allowed to choose between two bottles, one filled with water and one with a saccharin solution (2-bottle choice test) measuring taste aversion (i.e. avoidance of saccharin solution). Ketamine (25 mg/kg) given 30 min before the first exposure to saccharin blocked taste aversion learning. In contrast, animals injected with lower dosages (6, and 12 mg/kg), as well as saline-injected control animals, developed a strong avoidance of the sweet solution. The results from other experimental groups showed that the blockade of CTA learning was not due to effects of ketamine (25 mg/kg) on the association of the newly acquired gustatory trace with the malaise or on state-dependency effects. Ketamine also did not interfere with the retrieval of an already acquired taste aversion. Thus, the NMDA receptor appears to play a role in the acquisition but not in the retrieval of a new taste cue. Further, NMDA receptors did not affect the association of a new taste cue with malaise.

Many psychoactive drugs have aversive properties (Riley & Tuck, 1985), e.g. they can serve as UCS instead of LiCl in the conditioned taste aversion (CTA) paradigm. In this way such drugs could also influence the CS-UCS association processes (new taste - malaise). Therefore, in the last experiment rats were injected with saline or MK-801 (0.2 mg/kg; i.p.) and preexposed to a new taste (saccharin, 0.1%) 24 hours before the conditioning day. The animals had access to tap water or saccharin solution for 2, 6, or 10 minutes. On the conditioning day, one hour after exposing all animals to a saccharin solution, LiCl was injected to induce malaise. Forty-eight hours later, taste aversion was measured in two-bottle choice tests (saccharin vs. tap water) on three consecutive test days. MK-801-injected animals, preexposed to tap water or saccharin, as well as saline-injected animals preexposed to tap water, totally avoided the saccharin solution on all three two-bottle choice tests. Saline-injected rats preexposed to saccharin for 6 and 10 min showed also a complete aversion to the sweet taste on the first two-bottle choice test, but developed an extinction of taste aversion on the second and third two-bottle choice test, i.e. these rats drank more saccharin solution compared with the first

two-bottle choice test and the MK-801 groups. The results might indicate that MK-801 blocked the storage of a new taste cue and prevented labeling of the new taste as "save" during preexposure. Because the amount of CS intake can affect CTA learning, the results might be affected by the MK-801-induced decrease of total saccharin intake on the preexposure day.

The experiments have shown that the NMDA receptor blockade influenced learning and memory abilities in spatial and non-spatial behavioral tasks. The non-competitive as well as the competitive NMDA receptor antagonists ketamine, MK-801 and APV impaired the short-term storage of already visited radial arms in a tunnel maze system (working memory; Experiment 1), the encoding of extramaze cues in a water maze (Experiments 2 and 3) and the formation of a gustatory memory trace in conditioned taste aversion tasks (Experiments 4 and 5). In contrast to task acquisition, effects of an NMDA receptor blockade on retrieval of previously acquired information were less clear. In experiment 4, ketamine did not influence the retrieval of a conditioned taste aversion to saccharin, but in experiment 3, APV affected the spatial bias for an already acquired platform position in a water maze. However, the latter effect might be due to APV-induced, severe motor disturbances and not to impaired retrieval processes. The number of blind-alley visits in a tunnel maze system (reference memory) and the time to find a visible escape platform at a fixed or variable spatial position in a water maze were not affected by NMDA receptor antagonists.

These results support the crucial role of NMDA receptors in memory formation, but not in memory retrieval. The blockade of NMDA receptors through non-competitive or competitive receptor antagonism appears not to influence learning per se or to impair all forms of learning.