

## University of Groningen

### A time to remember

Biemans, Barbara Agatha Maria

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2003

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Biemans, B. A. M. (2003). *A time to remember: Consequences of ageing on the circadian memory modulation in rodents*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## **Nederlandse Samenvatting**

werden getest, en dat het optreden van de dips in geheugen dus niet afhankelijk is van licht-donker informatie.

Een tweede belangrijke voorwaarde voor een endogeen ritme is dat de periodiciteit in het gedrag binnen een individu aanwezig moet zijn, en gedurende minimaal een paar circadiane cycli blijft bestaan. Eerdere studies werden bijna altijd uitgevoerd met afzonderlijke groepen ratten op de verschillende tijdstippen, onder andere om afleer-effecten (in het geval van de passieve schokvermijding taak), en overtrainings-effecten (in het geval van ASA) te voorkómen. Hoofdstuk 6 beschrijft een experiment waarin individuele Fischer 344 × Brown Norway hybride (F×BN) ratten herhaaldelijk (elke 6 uur) worden getest in een passieve schokvermijding (PSA) taak, gedurende drie volledige circadiane cycli (72 uur) in DD. In deze taak leren ratten om een aanvankelijk geprefereerd donker compartiment te vermijden nadat ze er een voetschok hebben gekregen. Hieruit bleek wederom dat ratten optimaal presteerden op de 24-uurs tijdstippen.

Als het vóórkomen van periodieke retentie dalen aan het circadiane systeem wordt toegeschreven, komt automatisch de vraag naar boven welke neuropeptides of neurotransmitters uit de SCN hierbij een rol kunnen spelen. Wij richtten onze aandacht op twee systemen: het neuropeptide vasopressine, dat een belangrijk deel van de SCN output verzorgt, en het cholinerge systeem, vanwege zijn welbekende rol in leer- en geheugenprocessen. Vasopressine (AVP) uit de SCN speelt vermoedelijk een belangrijke rol bij het genereren van de fluctuaties in geheugenretentie, aangezien Brattleboro ratten (die geen AVP hebben door een mutatie in het genoom) geen geheugendip hebben wanneer ze 18 uur na de ASA leertaak worden getest (hoofdstuk 2). Zij werden vergeleken met Long Evans ratten, de controle stam waaruit de Brattleboro's zijn ontstaan. Long Evans ratten vertoonden wel weer het effect van betere retentie op 24 dan 18 uur na de leertaak, net zoals de Wistar ratten. Bij muizen is het effect van de ASA taak op AVP in de SCN bekeken met behulp van een immunocytochemische kleuring (detectie door middel van antilichaam) van het peptide. In hoofdstuk 3 is beschreven dat het AVP gehalte direct (20 minuten) na de leertaak lager was dan in controle muizen. Muizen die na 24 uur nog een ASA sessie krijgen hadden ook minder AVP in de SCN. Bij het bestuderen van het tijdsverloop van de veranderingen op AVP niveau na een enkele ASA sessie bleek dat tussen deze momenten van lage AVP (20 minuten, 24 en 48 uur), de intensiteit weer steeg (op 12 en 36 uur na ASA). Mogelijkerwijs wordt AVP in de neuronen dus weer aangevuld. Bij Wistar ratten werd echter dit effect niet gevonden 24 uur na ASA (zie hoofdstuk 8). Het lijkt er dus op dat vasopressine een rol speelt bij het genereren van de geheugenoscillaties, maar meer experimenten zullen moeten worden uitgevoerd om dit te bevestigen.

De SCN wordt geïnnerveerd door uitlopers van cholinerge neuronen uit het basale voorbrein. Receptoren die de acetylcholinerge signaaltransductie verwerken

---

(muscarine en nicotine receptoren) zijn volop aanwezig op SCN neuronen. Het cholinerge systeem is betrokken bij attentionele processen en dus belangrijk voor associatief leren. De optische dichtheid van de immunocytochemische aankleuring van muscarine acetylcholine receptoren (mAChRs) in de SCN was aanzienlijk toegenomen 24 uur na een PSA of ASA leertaak (hoofdstuk 4 en 8). Waarschijnlijk geeft deze toegenomen intensiteit een verminderde neuronale gevoeligheid weer voor (cholinerge) input door receptor internalisatie. Een volgend experiment toonde aan dat de habituatiefase in de experimentele opstelling, die vooraf gaat aan de daadwerkelijke trainingsfase, al voldoende was om deze verhoging te induceren, hetgeen betekent dat waarschijnlijk het "novelty"-aspect van de leertaak de grootste impact heeft op mAChR niveau. Ook hier werd het tijdsverloop van de veranderingen bestudeerd, en verrassend genoeg was er pas na een (bijna) complete circadiane cyclus een verhoging zichtbaar, een effect dat typerend is voor de SCN. In andere hersengebieden die betrokken zijn bij leren en geheugen (hippocampus en amygdala) treden er namelijk al veel sneller veranderingen op naar aanleiding van een dergelijke taak. Het aantal mAChR-immunopositieve astrocyten was echter al na 2 uur significant verhoogd. Van astrocyten in de SCN is nog niet vastgesteld welke functie zij vervullen, maar gedacht wordt aan een rol bij faseverschuivingen. Na 13 dagen was bij de helft van de ratten de intensiteit weer gedaald naar controle niveau's, terwijl in de andere helft van de ratten het kleuringsniveau net zo hoog bleef als 24 uur na de ASA leertaak (hoofdstuk 4). Waarschijnlijk hebben we hier te maken met een alles-of-niets effect.

Alles samen beschouwd is in de bovengenoemde experimenten aangetoond dat AVP en mAChRs een rol spelen bij de verwerking van de impact van een associatieve leertaak. Voor vasopressine is het echter nog niet duidelijk of het effect ook al optreedt na alleen een habituatiefase, zoals dat het geval is bij de mAChRs. AVP staat dus nog kandidaat voor de rol van directe bron van retentie-oscillaties, hetgeen gesuggereerd wordt door de Brattleboro gegevens en de muizen studie. Mogelijk wordt een deel van de SCN neuronen gerecrueteerd om een neuronaal substraat te vormen voor deze specifieke actie. Op dit punt in het onderzoek is dit echter nog speculatie.

## **Deel 2: Veroudering van de circadiane pacemaker en geheugen**

In hoofdstuk 1 is een literatuuroverzicht gegeven van de veranderingen die het circadiane systeem ondergaat met veroudering, en onze eigen bevindingen in verschillende rattenstammen en muizen op dit gebied worden gepresenteerd in hoofdstuk 5. Enkele gedragsparameters waren in alle groepen en in dezelfde richting aangedaan met veroudering. Zowel oude ratten als oude muizen vertoonden een langere dagelijkse activiteitsperiode ( $\alpha$ ) dan jongere soortgenoten. Absolute

activiteits-niveau's daalden, en de sterkte van het ritmische signaal ging achteruit. Verder werd gevonden dat de dag-tot-dag variatie in het moment van het zwaartepunt van de activiteit toenam met leeftijd. In oudere Wistar en F×BN ratten was de eigen periode ( $\tau$ , vastgesteld in vrijloop condities) korter dan in jonge ratten, terwijl  $\tau$  in oudere muizen juist langer was. De aard en mate van de veranderingen op gedragsniveau hingen af van welke soort of specifieke stam er werd bekeken, maar ook van de specifieke licht-omstandigheden en voorafgaande (experimentele) ervaring, zoals de beschikking over een loopwiel. Verder is het belangrijk om te beseffen dat een effect dat op gedragsniveau wordt geconstateerd, het gevolg is van een optelsom van zowel centrale als perifere factoren. Immuno-cytochemische technieken werden gebruikt om de invloed van leeftijd op verschillende SCN peptiden te bestuderen. In tegenstelling tot wat er gevonden is voor SCN neuropeptiden als AVP en vasoactive intestinal peptide (VIP) (hoofdstuk 1, 7 en 8), bleek dat somatostatine sterk verhoogd is in de SCN van oude ratten (hoofdstuk 7). Dat somatostatine de fase van de klok kan "resetten" en een remmende werking heeft op de ritmische expressie van VIP, suggereert een specifieke rol voor somatostatine in het proces van klok-veroudering.

Bij oude mensen, maar met name bij gedementeerde patiënten treden ernstige cognitieve stoornissen op die vaak gepaard gaan met een achteruitgang in circadiane ritmiek, vooral een sterk verhoogde fragmentatie van de dagelijkse activiteit. Om na te gaan of een verslechterde ritmiek bijdraagt aan geheugen-stoornissen -met andere woorden of er een causaal verband tussen die twee bestaat- hebben we studies verricht naar de relatie tussen geheugen, expressie van circadiaan gedrag en neurochemie van de SCN in oude ratten. Om te beginnen zou men voorspellen dat geheugenoscillaties niet, of in afgezwakte mate voorkomen bij individuen met een zwakke circadiane functie, aangenomen dat het circadiane systeem verantwoordelijk is voor het optreden van deze fluctuaties. Dit werd inderdaad gevonden bij oude ratten die getrained waren in een PSA taak (hoofdstuk 6). In tegenstelling tot de jonge ratten, vertoonden de oude dieren geen enkele fluctuatie in hoe goed ze zich de schok konden herinneren, maar hadden ze hoge latentietijden (tijd alvorens de donkere kamer in te gaan) op alle tijdstippen waarop ze werden getest. Verder bestond er een verband tussen de sterkte van de ritmiek (in activiteit) en het verschil tussen de latentietijden op de 24- en niet 24-uurs tijdstippen binnen een individu. Het lijkt er dus op dat een robuuster circadiaan systeem het geheugen sterker onderdrukt op de niet 24-uurs tijdsintervallen (hoofdstuk 6).

Is dit verschil in gedrag van de ratten terug te vinden in een verschil op het niveau van SCN neurochemie, bijvoorbeeld peptide respons? Deze vraag werd onderzocht in hoofdstuk 8. De eerder genoemde toename in mAChR intensiteit 24 uur na ASA die werd gevonden bij jonge ratten in hoofdstuk 4, treedt niet op bij de oude ratten, hetgeen impliceert dat de neuronen niet meer in staat zijn om te

---

*Dit proefschrift bevat studies die zijn uitgevoerd in het kader van het NWO prioriteitenprogramma "Geheugenprocessen en dementie", en die tot doel hadden te onderzoeken hoe circadiane processen geheugenfunctie beïnvloeden, en of veroudering deze interacties verandert.*

## **Deel 1: Geheugen en het circadiane systeem**

Het is alom bekend dat de biologische klok ons van een dag-nacht ritme voorziet. In de studies naar de invloed van circadiane (van het latijn *circa* = ongeveer, en *dies* = etmaal) processen op allerlei gedrags- en fysiologische parameters is het cognitieve aspect onderbelicht gebleven. In de zestiger en zeventiger jaren kwam het onderwerp tijdelijk meer in de belangstelling te staan. Vooral de groep van Holloway en Wansley heeft een aantal belangrijke studies uitgevoerd. Zij toonden aan dat er bij ratten in het geheugen voor een leertaak (retentie) een periodiciteit bestaat, die minstens drie dagen aanhoudt. De retentie bleek direct na en (op veelvoud van) 24 uur na de leertaak optimaal te zijn. Op tussenliggende tijdstippen (bijv. 6, 18 en 30 uur na de taak) was de retentie veel slechter. Verder bleek dit patroon onafhankelijk te zijn van het tijdstip op de dag waarop de dieren werden getraind. Zij toonden dit fenomeen aan in leertaken waarbij er gebruik wordt gemaakt van een milde voetschok (negatieve reinforcer) zoals de actieve en passieve schokvermijding taken. Later bleek het ook op te treden in leertaken waarbij gebruik werd gemaakt van voedselbeloning (positieve reinforcer). Een andere groep (Stephan en Kovacevic) liet zien dat de periodiciteit in de retentie verdwijnt wanneer je de suprachiasmatische nucleus (SCN) kapot maakt. Dit hersengebied is de coördinator van circadiane ritmiek bij zoogdieren, de zogenaamde circadiane pacemaker.

De genoemde bevindingen suggereerden sterk de invloed van een biologische klok. Een aantal vragen bleef onbeantwoord; vragen die te maken hadden met het endogene karakter van de periodieke geheugenstoornissen. Circadiane ritmen in gedrag zijn namelijk alleen endogeen (intern gegenereerd) als zij doorgaan in afwezigheid van een externe Zeitgeber. Voor zoogdieren is licht de sterkste Zeitgeber, en het werd uit de studies van Holloway and Wansley niet duidelijk of de periodiciteit zou blijven bestaan als het experiment in constante lichtomstandigheden zou zijn uitgevoerd. In hoofdstuk 2 van dit proefschrift is een experiment beschreven met ratten in een actieve schokvermijding taak (ASA). In deze taak leren ze aan een voetschok te ontkomen door tijdens een aan de schok voorafgaande toon naar de andere kant van de leerbox (shuttlebox) te springen. De Wistar ratten werden in constant donker (DD) gezet, tijdens hun actieve fase (subjectieve nacht) getraind en 18, 24 of 30 uur later getest op hun geheugen. Het bleek dat de ratten 24 na de training een betere retentie hadden dan de ratten die op 18 en 30 uur

---

reageren op cholinerge input, of, meer in het algemeen, op een chemisch signaal dat de receptorverandering bewerkstelligt. Voor AVP is het tegengestelde het geval, hierbij was er een duidelijke toename in kleurings-intensiteit 24 uur na ASA in de oude, maar niet in de jonge ratten. Een verklaring hiervoor kan gezocht worden in een verminderd vermogen van oude ratten tot afgifte van AVP. Jonge ratten kunnen mogelijkwijs dit (extra geproduceerde) AVP wel afgeven. Dit zou dan weer kloppen met de resultaten uit hoofdstuk 3 bij de huismuizen. Vooralsnog is de conclusie dat de twee systemen in de SCN die hier zijn onderzocht, afhankelijk van leeftijd verschillend reageren.

**Concluderend** kunnen we zeggen dat de SCN niet bepaalt hoe goed een individu leert, of zich een geleerde respons herinnert. Dit is niet geheel onverwacht want er zijn vele andere hersenstructuren waarvan bekend is dat zij hier een cruciale rol in vervullen. De SCN lijkt wel te bepalen wanneer het geheugen optimaal benut kan worden of juist tijdelijk buiten gebruik is. Hoewel dit op het eerste gezicht eerder nadelen dan voordelen lijkt te hebben, kunnen we aannemen dat deze tijdsregulatie van belang is voor de overleving van een individu, aangezien het optreedt in jonge gezonde dieren. Het zou voor een dier in zijn voordeel kunnen werken als de herinnering voor een angstig voorval geen belemmering vormt in zijn dagelijkse routine, maar alleen "opspeelt" op het moment dat het de grootste kans heeft om weer te gebeuren. Zo krijgt het de kans op dat moment adequaat te reageren. Tot slot wijzen de studies in dit proefschrift erop dat een verouderde circadiane pacemaker geen nadelige invloed heeft op cognitief functioneren als zodanig bij knaagdieren. Als het circadiane systeem van de mens op een vergelijkbare manier geheugenfunctie reguleert, zullen therapieën die erop gericht zijn de circadiane functie te verbeteren, alleen invloed op dit mentale proces uitoefenen via een algemene welzijnsverbetering.