Maastricht University

Serotonin and behavior: animal studies applying the method of acute tryptophan depletion

Citation for published version (APA):

Lieben, C. K. J. (2004). *Serotonin and behavior: animal studies applying the method of acute tryptophan depletion*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. https://doi.org/10.26481/dis.20041223cl

Document status and date:
Published: 01/01/2004

DOI:
10.26481/dis.20041223cl

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

Summary

An imbalance in central serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) synthesis is presumed to play a prominent role in the etiology of several psychiatric disorders such as anxiety disorders, depression and neurodegenerative disorders. The main objective of this thesis is to investigate the function of 5-HT in affective and cognitive behavior in rats.
Due to the rate-limiting function of tryptophan-hydroxylase, a change in tryptophan (TRP; 5-HT precursor) levels will result in a similar change in concentrations of 5-HT. Based on this parallel mechanism of the 5-HT synthesis, the method of acute TRP depletion was selected to reduce brain 5-HT concentrations in rodents. Consequently, it was evaluated whether the administration of a nutritional TRP-lacking mixture could induce behavioral effects related to anxiety, depression and cognition.
So, by means of lowering 5-HT synthesis, we tried to integrate both biochemical and functional findings in order to investigate how exactly 5-HT could contribute to certain neuropsychological functions.

Chapter 1 provides a general introduction on 5-HT synthesis and a concise overview of methods applied in animal studies to reduce serotonergic activity. In this chapter, functions such as mood, depression and cognition are discussed. This is followed by a review of widely used animal models, 5-HT-related theories and treatments of these neuropsychological functions. Furthermore, biological and psychological consequences of acute plasma TRP depletion in humans and animals are evaluated. Finally, this chapter outlines the aims and scientific questions which form the base of the different studies presented in this thesis.

Chapter 2 presents the behavioral effects of a study in which adult rats received a TRP-free amino acid mixture, similar to that previously used in human studies. The results revealed anxiogenic and depressive-like behavior at a moderate reduction (34%) in plasma TRP levels. However, this moderate reduction in plasma TRP levels did not affect cognitive functions, such as spatial working and reference memory, nor did it change sustained attention. Furthermore, corticosterone levels (prior and post stress-induced exposure) were not affected. Besides a reduction in plasma TRP levels, the TRP-free amino acid mixture also reduced central TRP levels in the hippocampus (33%). The TRP depletion seems to be less pronounced in rats when compared to humans. The different levels of TRP depletion between this study (moderate) and human studies (marked), hampers comparison of behavioral effects between rat and man.

Clearly, development of a novel method, leading to a more substantial TRP depletion in rats, would facilitate comparison with results from human studies. This was the aim of the studies described in the next chapters.

Chapter 3 reports the effects of a gelatin-based protein mixture on plasma TRP levels and methodological procedures are investigated in detail. Within two hours after a single administration, the TRP-free protein-carbohydrate mixture caused a considerable reduction (43%) in plasma TRP levels. Multiple administrations of this mixture resulted in an even more pronounced and prolonged depletion. A substantial reduction of 73% in plasma TRP levels occurred less then 4 h after the first administration was given. Compared to the TRP-free amino acid mixture, the gelatin-based protein mixture induced a higher reduction in plasma TRP levels, which mimicked more closely the degree of TRP depletion in humans. In addition, the effects were reversible since plasma TRP levels increased back to normal levels within several hours. Finally, it was shown that this TRP-free protein-carbohydrate mixture can be balanced for plasma TRP levels by enriching the mixture with an additional amount of TRP.

Chapter 4 provides a more detailed evaluation of the biochemical effects of a TRP-free protein-carbohydrate mixture in rats. Except for TRP and TYR, the gelatin-based protein mixture increased the plasma levels of the most amino acids. Both plasma TRP levels and TRP/ΣLNAA values showed a reduction of 75-78% within 4 h after the first administration. At this time point, the TRP depleted rats displayed a 50% reduction in central 5-HT concentration. As in plasma, the TRP levels in the brain could be balanced by an additional amount of TRP. The TRP-lacking treatment also affected TYR (i.e. precursor of DA) levels. Nevertheless, these effects appeared to be specifically related to TYR and not to DA concentrations in the brain. Based on these data, this treatment was selected as a tool to further examine the role of 5-HT in affective and cognitive behavior.

The aim of the study presented in **Chapter 5** was to investigate whether an acute reduction in plasma TRP levels could induce a change in affective and cognitive behavior of adult rats. It was found that, 4 h after administration, a TRP-free protein-carbohydrate mixture substantially reduced plasma TRP levels but did not cause anxiety-related or depressive-like behavior. Although TRP depleted rats were not affected in spatial learning and memory functions, object memory was severely impaired after treatment. It was concluded that a substantial 5-HT depletion caused a selective effect on object recognition.

Furthermore, the data revealed that enriching the gelatin-based mixture with TRP functioned as a good control condition for both biochemical and behavioral aspects.

Chapter 6 reports long-term consequences of a 5-HT depletion on affective and cognitive behavior. Injection of the neurotoxin 5,7-DHT in the dorsal raphe nucleus caused a permanent damage in 5-HT neurons which prevented further transmission of 5-HT. Although the treatment with 5,7-DHT did not induce anxiety-related or depressive-like behavior, it generated a severe impairment in object recognition. Furthermore, the corticosterone response to a stress-induced situation was not affected by a chronic 5-HT depletion. These results are consistent with a previous study in which it was found that an acute reduction of plasma TRP levels did not affect corticosterone response to a stressor. This suggests that a depletion in 5-HT synthesis is not involved in the deregulation of the HPA-axis as often observed in depressed patients. The results of this study further support the hypothesis that 5-HT mediates cognitive processes. The findings from this study presented a great similarity with the behavioral effects observed after a substantial reduction in plasma TRP levels and this suggests that the effects on recognition memory are associated with the availability of 5-HT.

Based on a threshold-theory, it was speculated that cognitive performance is be related to the concentration of 5-HT. The notion that the performance in an object recognition task may depend on the degree of TRP/5-HT depletion is investigated in **Chapter 7**. A gradual reduction in plasma TRP levels was accomplished by varying the amount of gelatin-based protein used in the carbohydrate mixture. In the control (TRP+) and lower doses, the animals could still recognize the objects which they had previously explored. Indications of impaired recognition memory were found at higher doses. In the dose condition where the amount of TRP-lacking protein was similar as in previous studies, the rats failed to discriminate the familiar object from the novel object. It was concluded that a relationship exists between plasma TRP and recognition memory: a reduction in plasma TRP levels of about 50% or higher leading to an impairment in object memory.

Hence, the method of acute TRP depletion can be considered as a model of memory deficiency. The aim of **Chapter 8** was to investigate potential memory-enhancing effects of a 5-HT_6 receptor antagonist (Ro4368554). The effect of Ro4368554 on recognition memory was assessed in memory-deficient paradigms of time-dependent forgetting, treatment with scopolamine (an ACh muscarinic antagonist) and acute TRP depletion. The

effect of Ro4368554 was compared with that of metrifonate (a cholinesterase inhibitor) in the three memory deficiency models. Unlike Ro4368554, treatment with metrifonate improved the performance in object recognition at a 24-h delay. Both Ro4368554 and metrifonate reversed the memory deficit after treatment with scopolamine and the TRP-free protein-carbohydrate mixture. The interaction between 5-HT and ACh neurotransmitter systems is discussed with regard to the memory effects induced by an reduction in plasma TRP levels.

Finally, **Chapter 9** provides a general discussion where concluding remarks are given concerning the involvement of 5-HT in behavioral functions such as anxiety, depression and cognition. The use of a gelatin-based protein-carbohydrate mixture is evaluated as a powerful tool to induce a reduction in central 5-HT concentrations. Although no change in affective behavior was found after reducing 5-HT levels (method of acute TRP depletion and 5,7-DHT lesion), object memory was severely impaired. The decrease in performance in the object recognition task when gradually lowering plasma TRP levels indicates the relationship between plasma TRP levels and the object memory. It is further discussed how exactly this method of acute TRP depletion can be applied to further investigate the neuropsychological function of 5-HT in both animals and humans. Consequently, several suggestions are given for further experimental research which might benefit our insight on the relationship between 5-HT and behavioral functions.

A subsequent study, described in **Appendix 1**, was concerned with the effects of an acute TRP depletion on the metabolism of kynurenine. Besides its involvement in the TRP/5-HT pathways, a high amount of TRP also serves for the synthesis of kynurenine. Therefore it was hypothesized that administration of a gelatin-based protein-carbohydrate mixture would reduce the levels of kynurenine and its metabolites (kynurenine acid and quinolinic acid). Since these metabolites are related to glutamatergic activity through the NMDA receptors (i.e. associated with learning and memory processes), a change in the concentration of kynurenine acid or quinolinic acid could underly the deficit in object memory induced by an acute TRP depletion. Although a moderate peripheral reduction in the levels of kynurenine and the metabolites occurred in the TRP depleted animals, this treatment did not reduce the synthesis of kynurenine in the brain. Therefore, it was concluded that an acute reduction in plasma TRP levels may not have affected recognition memory by a reduction in central kynurenine levels.

Samenvatting

Een uit evenwicht geraakte synthese van serotonine (5-hydroxytyptamine; 5-HT) in het brein wordt aanschouwd als een voorname factor in de etiologie van diverse psychiatrische stoornissen zoals angst, depressie en neurodegeneratieve stoornissen. Het hoofddoel van deze thesis bestaat erin de betrokkenheid van 5-HT in affectief en cognitief gedrag in ratten te onderzoeken.
Omwille van de snelheid-beperkende functie van tryptofaan-hydroxylase, resulteert een verandering in tryptofaan (TRP; precursor van 5-HT) waarden op gelijke wijze in een verandering in 5-HT concentraties. Op basis van dit parallel mechanisme in de 5-HT synthese, werd de methode van acute TRP depletie geselecteerd om centrale 5-HT concentraties in ratten te verlagen. Vervolgens werd er onderzocht of een toediening van een voedzaam mengsel, waarbij TRP ontbreekt, gedragseffecten kon induceren die verwant zijn met angst, depressie en cognitie.
Door middel van een verlaging in de 5-HT synthese, hebben we getracht biochemische en gedragsmatige bevindingen met elkaar te integreren. Aan de hand hiervan werd getracht conclusies te vormen omtrent de relevantie van 5-HT bij bepaalde neuropsychologische functies.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene inleiding ontrent het mechanisme onderliggend aan de 5-HT synthese en geeft en beknopte overzicht van de verschillende methodes die bij dierstudies gehanteerd worden om de serotonerge activiteit te reduceren. Dit hoofdstuk geeft uitleg over stemming, depressie en cognitie. Vervolgens is er een weergave van de meest voorkomende diermodellen, 5-HT gerelateerde theorieën en behandelingen ontwikkeld voor deze neuropsychologische functies. Verder worden biologische en psychologische gevolgen van een acute verlaging in plasma TRP geëvalueerd bij zowel mensen als dieren. Tenslotte schetst dit hoofdstuk de doelstellingen en de wetenschappelijke vraagstellingen onderliggend aan de verschillende studies die in dit proefschrift worden voorgesteld.

Hoofdstuk 2 omschrijft de gedragseffecten van een studie waarin volwassen ratten behandeld met een TRP-vrij aminozuren mengsel, gelijkend op wat voorheen gebruikt werd in humane studies. De resultaten tonen angstig en depressie-gerelateerd gedrag aan bij een matige verlaging in plasma TRP (34%) waarden. Deze matig plasma TRP depletie had geen effect op cognitieve functies zoals spatieel werk- en referentie geheugen, noch veranderde het volgehouden aandacht. Verder waren de corticosterone

waarden (voor en na blootstelling aan een stressvolle situatie) niet aangetast door de acute verlaging in plasma TRP waarden. Naast de verlaging in plasma TRP, verminderd het TRP-vrij aminozuur mengsel ook de hippocampale waarden van TRP (33%). Maar, bij ratten bleek de TRP depletie minder uitgesproken te zijn dan bij mensen. Het verschil in TRP depletie niveaus in deze studie (matig) en humane studies (ernstig), belemmert de vergelijking van gedragseffecten tussen rat en mens.

De ontwikkeling van een nieuwe methode, die leidt tot een substantiëlere TRP depletie in ratten, zal weliswaar het vergelijk met de resultaten uit humane studies vergemakkelijken. Dit was het doel van de studies die worden weergegeven in de volgende hoofdstukken.

Hoofdstuk 3 rapporteert de effecten van een op gelatine gebaseerd eiwit mengsel waarbij de methodologische aspecten omtrent deze behandeling in detail worden bestudeerd. Een enkelvoudige toediening van het TRP-vrij eiwit-koolhydraten mengsel veroorzaakt, binnen twee uur, een aanzienlijke verlaging in plasma TRP waarden (43%). Meervoudige toedieningen van het mengsel resulteerde in een meer uitgesproken plasma TRP depletie die tevens langer aanhoud over tijd. Een substantiële verlaging (73%) in plasma TRP waarden trad op bij een interval van minder dan 4 uur na de eerste toediening. Vergeleken met het TRP-vrij aminozuur mengsel, werd er bij dit op gelatine gebaseerd eiwit mengsel een meer substantiëlere verlaging in plasma TRP waarden gevonden, dat meer gelijkend was op de mate van depletie zoals gevonden bij mensen. Bovendien zijn de effecten omkeerbaar omdat de plasma TRP waarden terug toenemen binnen een tijdspan van enkele uren. Als laatste werd er bewijs geleverd dat dit TRP-vrij eiwit-koolhydraten mengsel gebalanceerd kan worden voor plasma TRP levels door het mengsel te verrijken met een aanvullende hoeveelheid TRP.

Hoofdstuk 4 voorziet een meer gedetailleerde evaluatie van de biochemische effecten van het TRP-vrij eiwit-koolhydraten mengsel bij ratten. Het op gelatine gebaseerd mengsel verhoogde de plasma waarden van de meeste aminozuren, behalve die van TRP en TYR. Zowel de waarden van TRP als de waarden van TRP/ΣLNAA in plasma vertoonden een 75-78% reductie, 4 uur na de eerste toediening. Op dit tijdsstip, lieten de TRP gedepleteerde ratten een 50% verlaging zien in centrale 5-HT concentraties. Zoals in het plasma, konden de effecten in het brein gebalanceerd worden door een aanvullende hoeveelheid TRP. Ofschoon de behandeling ook de TYR (precursor van DA) waarden beïnvloedde, bleken deze effecten zich specifiek voor te doen bij

TYR en niet voor DA waarden in het brein. Gebaseerd op deze data, werd de behandeling geselecteerd als een middel om de rol van 5-HT op affectief en cognitief gedrag verder te onderzoeken.

Het doel van de studie in **Hoofdstuk 5** was vast te stellen of een kortdurende verlaging in plasma TRP waarden een verandering kon teweeg brengen in affectief en cognitief gedrag bij volwassen ratten. Er werd aangetoond dat, 4 uur na de toediening van het TRP-vrij eiwit-koolhydraten mengsel, plasma TRP waarden aanzienlijk verlaagd waren. Nochtans veroorzaakte de behandeling geen angst of depressie gerelateerd gedrag bij de dieren. Ofschoon geen veranderingen in ruimtelijke leer- en geheugen functies werden waargenomen, vertoonden de TRP gedepleteerde ratten een verslechtte prestatie in object discriminatie. Daaruit werd geconcludeerd dat een aanzienlijke 5-HT depletie een selectief effect veroorzaakt op object herkenning. Vervolgens bleek dat het met TRP verrijkt mengsel een goede controle conditie was voor zowel biochemisch als gedragsmatig aspecten.

Hoofdstuk 6 rapporteert de lange termijn gevolgen van een 5-HT depletie op stemming en cognitief gedrag. Injectie van de neurotoxische stof 5,7-DHT in de dorsale raphe kern veroorzaakt een permanente beschadiging in de 5-HT neuronen dat verdere overdracht van 5-HT voorkomt. Ofschoon deze behandeling met 5,7-DHT het gedrag gerelateerd aan angst en depressie niet aantastte, leidde het wel tot ernstige stoornissen in object herkenning. Verder werd de corticosterone response bij blootstelling aan een stress situatie, niet beïnvloed door de chronische 5-HT depletie. Deze resultaten zijn overeenkomstig met die van een eerdere studie waarin werd aangetoond dat een acute verlaging in plasma TRP waarden geen effect heeft op de response van corticosterone bij blootstelling aan een stressfactor. Dit suggereert dat een verlaging in de synthesis van 5-HT niet betrokken is bij de verstoorde HPA-as zoals vaak voorkomend bij depressieve patiënten. De resultaten van deze studie ondersteunen de hypothese dat 5-HT een belangrijke rol speelt bij cognitieve processen. De gedragsmatige bevindingen van deze studie zijn gelijkend aan de effecten van een substantiële verlaging in plasma TRP waarden. Dit suggereert dat de effecten op object geheugen geassocieerd zijn met een verandering in 5-HT.

Op basis van een theorie over drempel waarden, werd er gespeculeerd of cognitieve prestaties gerelateerd kunnen worden aan 5-HT waarden. Het idee dat de de prestatie van object herkenning kan afhangen van de mate van TRP/5-HT depletie werd onderzocht in **Hoofdstuk 7**. Een geleidelijke

verlaging in plasma TRP waarden werd bekomen door de hoeveelheid van het op gelatine gebaseerd eiwit in het koolhydraten mengsel te variëren. In de controle (TRP+) en de lage dosis condities herkenden de dieren nog steeds het object dat ze kort voorheen verkend hadden. Indicaties in de richting van een verstoring in object herkenning werden gevonden bij hogere doseringen. In de conditie waarbij de hoeveelheid op gelatine gebaseerd eiwit gelijk is aan die van voorheen uitgevoerde studies, konden de ratten het nieuwe object niet meer onderscheiden van het bekende object. Daaruit volgend, bleek er een relatie te bestaan tussen plasma TRP waarden en herkenning geheugen, aantonend dat bij een plasma TRP daling van meer dan 50%, de prestatie in object herkenning afzwakt.

Hieruit volgde dat de methode van acute TRP depletie aanschouwd kan worden als een model voor geheugen verstoring. De opzet van **Hoofdstuk 8** was om de potentiële geheugen verbeteringseffecten van 5-HT_6 receptor antagonist (Ro4368554) te onderzoeken in drie modellen van geheugenstoornis. Het effect van Ro4368554 op object herkenning werd getest in de geheugenverstorende paradigma's van tijdsgerelateerd vergeten, behandeling met scopolamine (een ACh muscarine antagonist) en na een acute TRP depletie. Het effect van Ro4368554 werd in ieder model vergeleken met dat van metrifonaat (een cholinesterase inhibitor). In tegenstelling tot Ro438554, verbeterde de behandeling met metrifonaat de prestatie in object herkenning na een 24-uur interval. Zowel RO4368554 als metrifonaat konden de geheugenverstoring bij behandeling van scopolamine en van het TRP-vrij eiwit-koolhydraten mengsel opheffen. De interactie tussen 5-HT en ACh neurotransmitter systemen wordt bediscussieerd met betrekking tot de geheugeneffecten bekomen door een verlaging in plasma TRP waarden.

Als laatste voorziet **Hoofdstuk 9** ons van een algemene discussie waarin besluitende opmerkingen worden gemaakt over de betrokkenheid van 5-HT op gedragsfuncties zoals angst, depressie en cognitie. Het gebruik van het op gelatine gebaseerd eiwit-koolhydraten mengsel wordt als een middel bediscussieerd om een verlaging in 5-HT concentraties te bewerkstelligen. Ofschoon er zich geen verandering voordeed in affectief gedrag na een verlaging in 5-HT waarden (door acute TRP depletie en 5,7-DHT), trad er wel een verstoring op in het object geheugen. De verminderde prestaties in the object herkenningstaak bij geleidelijke daling in plasma TRP waarden wijst op de relatie tussen plasma TRP waarden en object geheugen. De manier waarop deze methode van acute TRP depletie kan dienen als middel om neuropsychologische functies van 5-HT bij zowel dieren als mensen te

bestuderen, wordt verder besproken. Dit wordt opgevolgd door enkele suggesties voor verder experimenteel onderzoek dat ons kennis betreffende de betrokkenheid van 5-HT op gedragsfuncties kan bevorderen.

Een latere studie, zoals beschreven in **Appendix 1**, handelt over de effecten van een acute TRP depletie op het metabolisme van kynurenine. Sinds de meerderheid van TRP wordt omgezet in kynurenine, luidt de hypothese dat de toediening van een op gelatine gebaseerd eiwit-koolhydraten mengsel leidt tot een verlaging in de waarden van kynurenine en zijn metabolieten (kynurenine zuur en quinoline zuur). Deze metabolieten staan in relatie tot glutamaterge activiteit door middel van de NMDA receptoren (betrokken bij leer en geheugen processen). Hierdoor kan een concentratie verandering van het kynurenine zuur of het quinoline zuur een onderliggende factor zijn bij de stoornis in object geheugen na een acute TRP depletie. Ofschoon er een matige perifere verlaging optrad in kynurenine en de metabolieten bij de TRP gedepleteerde dieren, deden er zich geen centrale effecten voor in de synthese van kynurenine. Daaruit werd geconcludeerd dat een acute verlaging van TRP waarden niet in relatie stond met centrale waarden van kynurenine.