Maastricht University

Neuroimmune and molecular aspects of antidepressants

Citation for published version (APA):

Kenis, G. R. L. (2004). *Neuroimmune and molecular aspects of antidepressants*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. https://doi.org/10.26481/dis.20041111gk

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

DOI:
10.26481/dis.20041111gk

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

Chapter 1 is a general introduction to this thesis and outlines the scientific background of the hypothesis and the presented experiments. Current views on the mechanism of action of antidepressants and the different antidepressant classes are briefly discussed. This is followed by an introduction to the following topics: cytokines and the immune system, the putative role of cytokines in the pathophysiology of major depression, and intracellular signalling through the cyclic AMP/Protein Kinase A (cAMP/PKA) pathway. The first part of the hypothesis states that antidepressants have anti-inflammatory effects by inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines and/or by stimulating that of anti-inflammatory cytokines. The second part states that these effects are mediated by the cAMP/PKA pathway.

Chapter 2 provides a review of the current literature concerning the effects of antidepressants on the production of cytokines. These effects have been examined in depressed patients before and after treatment with antidepressants, in animal models of depression, and in *in-vitro* experiments. The results of the human studies are not always conclusive. The methodological shortcomings underlying these inconsistencies are discussed. From animal experiments it is clear that tricyclic antidepressants have anti-inflammatory effects, while antidepressants of all classes have anti-inflammatory effects *in-vitro*.

In **chapter 3** the stability of cytokines was examined using an accelerated stability testing protocol. We found that samples for the determination of interleukin-6 (IL-6), soluble IL-6 Receptor and CC16 can be stored at –20°C for a longer period of time (years). IL-10 is less stable at –20°C and should be stored at –70°C.

In **chapter 4**, the effects of several antidepressants (imipramine, venlafaxine and fluoxetine) and 5 hydroxytryptophan (5-HTP) on the production of interferon-γ (IFN-γ) and IL-10 were examined. Whole blood from healthy volunteers and treatment resistant depressed patients was stimulated with lipopolysaccharides (LPS) and phytohaemagglutinin (PHA). This stimulates white blood cells to produce cytokines. By incubating the blood in the presence or absence of antidepressants, one can examine the effects of these pharmacological agents on the cytokine network. All examined antidepressants and 5-HTP reduced the IFN-γ/IL-10 production ratio, and, hence, have anti-inflammatory effects.

Antidepressants clearly act on the central serotonergic system by inhibiting the reuptake of serotonin (5-HT) or by stimulation of serotonergic receptors. White blood cells are also capable of synthesizing serotonin and express serotonergic

receptors on their cell membrane. In order to examine whether serotonin mediates the effects of antidepressants on cytokine secretion, the effects of serotonergic agonists and antagonists on the production of cytokines in stimulated whole blood were explored in **chapter 5**. Stimulation of 5-HT1A-receptors (using flesinoxan) did not influence cytokine secretion. Both an agonist (m-chlorophenylpiperazine) and an antagonist (ritanserin) of 5-HT2A/C receptors reduced the IFN-γ/IL-10 ratio. Serotonin itself also decreases the IFN-γ/IL-10 ratio. Intracellular depletion of serotonin (using para-chlorophenylalanine) inhibited both IFN-γ and IL-10 production. It is concluded that intracellular serotonin is necessary for the optimal production of IFN-γ and IL-10 and that 5-HT1A receptors are not involved in the effects of antidepressants on cytokine production. Further, the reduction of the IFN-γ/IL-10 ratio by 5-HT was due to the inhibition of IFN-γ secretion, while previous studies indicated that antidepressants predominantly increased the production of IL-10. Therefore, it is concluded that the effects of antidepressants on cytokines are probably not mediated by serotonin.

In **chapter 6**, the effects of agonists and antagonists of the cAMP/PKA-pathway on *in-vitro* cytokine production are described. The major findings are that stimulation of adenylate cyclase decreases the production of IFN-γ, while it enhances that of IL-10. Stimulation of PKA inhibits both IFN-γ and TNF-α production. Blocking of adenylate cyclase reduces the IFN-γ and TNF-α secretion, while inhibition of PKA stimulates TNF-α and IL-10. We also examined the effects of rolipram on cytokine secretion. Rolipram is an inhibitor of phosphodiesterase type 4, and inhibits the breakdown of cAMP and, hence, increases intracellular cAMP-concentrations. Rolipram, which is also known as an antidepressant, inhibited the secretion of IFN-γ and TNF-α, and to a lesser extend also that of IL-10. However, rolipram reduced the IFN-γ/IL-10 ratio, an effect that is comparable with that of other antidepressants. Clearly, *in-vitro* cytokine production is differentially affected by inhibitors and activators of the cAMP/PKA-pathway.

In **chapter 7**, we examined whether the effects of antidepressants on cytokine production are mediated by activation of the cAMP/PKA-pathway. Stimulated whole blood was incubated with paroxetine and imipramine in the presence or absence of SQ22536 (an inhibitor of adenylate cyclase) or Rp-8-Br-cAMPS (an inhibitor of PKA). We found that both paroxetine and imipramine reduced the secretion of TNF-α, IFN-γ and IL-10. Paroxetine also decreased the IFN-γ/IL-10 ratio. The effects of both antidepressants on TNF-α secretion was reversed by Rp-8-Br-cAMPS. Pre-incubation with SQ22536 had no effect. It is concluded that PKA mediates the effects of antidepressants on TNF-α, but not the effects on IFN-γ or IL-10.

Chapter 8 presents results of the effects of antidepressants on cAMP-concentrations in white blood cells. Both antidepressants affected neither basal cAMP-concentrations nor those after stimulation with LPS and PHA.
The effects of antidepressants on the production of cytokines by brain cells has never been examined before. In **chapter 9**, we used primary rat whole brain cell cultures to examine the effects imipramine on the production of IL-6, TNF-α, and IL-10. The cultures consist of a three-dimensional network of differentiated neurons, astrocytes and microglia. In this way, one can examine the net effect of imipramine on cytokine secretion by all types of brain cells. Imipramine reduced the production of IL-6 and TNF-α. We concluded that imipramine inhibits pro-inflammatory cytokine production by brain cells, and, hence, that it may modulate cytokine expression in the brain.
In **chapter 10**, all the results presented in this thesis are critically discussed in the light of current views on the mechanism of action of antidepressants.

Samenvatting

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie en beschrijft de wetenschappelijke achtergrond van de hypothese en de uitgevoerde experimenten. Eerst wordt de huidige visie op de werkingsmechanismen van antidepressiva belicht. Daarna volgt een inleiding tot de volgende onderwerpen: cytokines en het immuunsysteem, de mogelijke rol van cytokines in de pathophysiologie van depressie, en intracellulaire signaaloverdracht via cyclisch AMP/Proteine Kinase A (cAMP/PKA). Het eerste deel van de hypothese luidt dat antidepressiva anti-inflammatoire effecten hebben door het remmen van pro-inflammatoire cytokines en/of door het stimuleren van anti-inflammatoire cytokines. Het tweede deel stelt dat deze effecten gemedieerd worden door de cAMP/PKA-pathway.

Hoofdstuk 2 is een literatuuronderzoek betreffende de effecten van antidepressiva op de productie van cytokines. Deze effecten werden zowel in depressieve patiënten (voor en na behandeling met antidepressiva), in diermodellen van depressie, als in *in-vitro* experimenten onderzocht. De resultaten van de humane studies zijn niet eenduidig en de methodologische gebreken van deze studies worden besproken. Uit de diermodellen blijkt dat voornamelijk de tricyclische antidepressiva een anti-inflammatoir effect hebben, terwijl antidepressiva van alle klassen anti-inflammatoire eigenschappen vertonen *in-vitro*.

Hoofdstuk 3 beschrijft een versnelde stabiliteitsstudie van cytokines in serum. We kwamen tot de conclusie dat interleukine-6 (IL-6), de oplosbare IL-6 receptor en CC16 gedurende lange tijd (verschillende jaren) op –20°C kunnen bewaard worden. IL-10 blijft maar enkele maanden stabiel bij –20°C en wordt best bij –70°C bewaard.

Met de experimenten beschreven in **hoofdstuk 4** onderzochten we de effecten van verschillende antidepressiva (imipramine, venlafaxine en fluoxetine) en 5-hydroxy-tryptofaan (5-HTP) op de gestimuleerde productie van interferon-γ (IFN-γ) en IL-10 *in-vitro*. Bloed van gezonde vrijwilligers en therapieresistente patiënten werd gestimuleerd met lipopolysacchariden (LPS) en phyto-hemagglutinine (PHA). Hierdoor worden de witte bloedcellen aangezet tot cytokine productie. Door het bloed zowel in aan- als afwezigheid van de antidepressiva te incuberen, krijgen we een idee van de effecten van deze farmacologische stoffen op het cytokine netwerk. Alle onderzochte antidepressiva en 5-HTP reduceren de IFN-γ/IL-10 ratio, en hebben dus anti-inflammatoire effecten.

Antidepressiva beïnvloeden het centrale serotonine systeem door het blokkeren van de heropname van serotonine of door stimulatie van serotonine receptoren. Witte bloedcellen synthetiseren serotonine en brengen serotonine receptoren tot expressie. Om na te gaan of serotonine betrokken is in het effect van antidepressiva op cytokine secretie, werd in **hoofdstuk 5** gekeken naar de invloed van serotonine en agonisten/antagonisten van serotonine op de productie van cytokines. We gebruikten hiervoor gestimuleerd volbloed. Stimulatie van 5-HT1A-receptoren (met flesinoxan) heeft geen invloed op de secretie van cytokines. Zowel een agonist (m-chlorophenylpiperazine) als een antagonist (ritanserin) van 5-HT2A/C receptoren verlagen de IFN-γ/IL-10 ratio. Serotonine zelf verminderde de IFN-γ/IL-10 ratio, net zoals antidepressiva. Intracellulaire depletie van serotonine (door incubatie met para-chlorophenylalanine) onderdrukt de secretie van zowel IFN-γ en IL-10. Uit deze experimenten besluiten we dat intracellulair serotonine noodzakelijk is voor een optimale productie van IFN-γ en IL-10, en dat 5-HT1A receptoren niet betrokken zijn in de effecten van antidepressiva op cytokines. Verder is de reductie in de IFN-γ/IL-10 ratio door serotonine voornamelijk te wijten aan een onderdrukking van de IFN-γ productie, terwijl uit eerdere studies bleek dat antidepressiva voornamelijk de IL-10 stimuleren. Daarom werd besloten dat de effecten van antidepressiva op cytokines waarschijnlijk niet gemedieerd worden door serotonine.

Hoofdstuk 6 beschrijft de effecten van agonisten en antagonsiten van de cAMP/PKA-weg op de *in-vitro* cytokine productie. De belangrijkste bevindingen zijn dat stimulatie van adenylaat cyclase de secretie van IFN-γ remt en deze van IL-10 stimuleert. PKA-activatie remt de productie van IFN-γ en TNF-α. Het blokkeren van adenylaat cyclase vermindert de IFN-γ en TNF-α productie, terwijl inhibitie van PKA zowel TNF-α als IL-10 stimuleert. Bij deze experimenten werd ook het effect van de phosphodiesterase remmer rolipram onderzocht. Rolipram, wat ook een antidepressivum is, remt de afbraak van cAMP en verhoogt zo de intracellulaire cAMP-concentraties. Rolipram verminderde de secretie van IFN-γ en TNF-α, en in mindere mate deze van IL-10. Net zoals andere antidepressiva verminderde rolipram de IFN-γ/IL-10 ratio. Activatie of inhibitie van de cAMP/PKA-pathway heeft dus diverse effecten op de secretie van cytokines.

In **hoofdstuk 7** werd nagegaan of de effecten van antidepressiva op de *in-vitro* cytokine secretie gerelateerd zijn aan activatie van de cAMP/PKA-pathway. Volbloed werd geïncubeerd met paroxetine of imipramine, telkens in aan- of afwezigheid van SQ22536 (een remmer van adenylaat cyclase), of Rp-8-Br-cAMPS (een inhibitor van PKA). We vonden dat paroxetine en imipramine de productie van TNF-α, IFN-γ en IL-10 reduceerden, waarbij paroxetine ook de IFN-γ/IL-10 reduceerde. De effecten van beide antidepressiva op TNF-α

secretie werd tegengegaan door pre-incubatie met Rp-8-Br-cAMPS. Dit was niet het geval met de andere cytokines. Pre-incubatie met SQ22536 had geen effect. PKA medieert dus de effecten van antidepressiva op TNF-α, maar niet op deze van andere cytokines.

Hoofdstuk 8 geeft de resultaten weer van de effecten van antidepressiva op cAMP-concentraties in witte bloedcellen. Er was geen effect van paroxetine en imipramine op de basale en de gestimuleerde cAMP-concentraties.

De effecten van antidepressiva op cytokine productie in hersencellen werd nog nooit onderzocht. In **hoofdstuk 9** maakten we gebruik van een primaire cultuur van foetale rat hersencellen om de effecten van imipramine op IL-6, TNF-α en IL-10 na te gaan. Het voordeel van een dergelijke cultuur is dat er macroscopische sferen, bestaande uit gedifferentieerde astrocyten, microglia en neuronen gevormd worden. Dit laat ons toe om het effect van imipramine op alle celtypen zoals ze in de hersenen voorkomen te onderzoeken. Imipramine verminderde de productie van IL-6 en TNF-α, maar niet deze van IL-10. We besluiten hieruit dat imipramine de productie van pro-inflammatoire cytokines door hersencellen remt, en dat imipramine dusdanig de secretie van cytokines in de hersenen kan beïnvloeden.

In **hoofdstuk 10** worden de resultaten uit de verschillende hoofdstukken kritisch besproken. Hierbij worden de resultaten ook besproken in het licht van andere gangbare hypothesen betreffende de werkingsmechanismen van antidepressiva.