

Comparison of the influence of selected psychotropic drugs on the level of tumour necrosis factor in experimentally induced depression

Porównanie wpływu wybranych leków psychotropowych na poziom czynnika martwicy nowotworu w doświadczalnie wywołanej depresji

Katarzyna Manikowska, Agnieszka Plebańska, Przemysław Ł. Mikołajczak

ABSTRACT

Objectives. Our knowledge of the role of cytokines in the pathogenesis of mental disorders is still insufficient. The aim of this study was to evaluate the effect of antidepressants such as venlafaxine or paroxetine, as well as that of an atypical antipsychotic, i.e. aripiprazole, on the level of TNF α in the peripheral blood of rats.

Material and methods. The study was carried out in three separate experiments on male Wistar rats, each

time dividing them into two groups. The first group was subjected for 6 weeks to chronic mild stress (CMS) and the second was a control group (of unstressed animals). Following the development of induced anhedonia, some of the stressed and control rats were treated with venlafaxine (20 mg/kg, *p.o.* daily), paroxetine (12.5 mg/kg, *p.o.* daily) or aripiprazole (2,5 mg/kg, *p.o.* daily) for 3 weeks. On the last day of the experiment a lipopolysaccharide (LPS, 100 μ g/kg *b.m.*, *i.p.*) was injected into 25% of the rats and levels of TNF- α were assayed with ELISA.

Results. The results indicated an increase of TNF- α level in the stressed animals administered LPS. The paroxetine treatment resulted in a significant decrease in TNF- α level in the stressed animals that were also administered LPS. Venlafaxine did not have a significant effect on TNF- α level, whereas aripiprazole significantly increased the level of TNF- α in animals which were administered LPS.

Conclusions. The paroxetine-induced normalisation of the TNF- α level, increased by CMS and LPS, confirms the hypothesis of the influence of some antidepressants on the immunological system. Some atypical antipsychotics, on the other hand, such as aripiprazole can have a stimulatory effect on the immunological factors in the case of acute stress.



Received 17.04.2018

Accepted 7.06.2018

AFFILIATION / AFILIACJA

Katedra i Zakład Farmakologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

KEYWORDS

- depression
- antidepressants
- cytokines

SŁOWA KLUCZOWE

- depresja
- leki przeciwdepresyjne
- cytokiny

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Katarzyna Manikowska
Katedra i Zakład Farmakologii Uniwersytet Medyczny
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
Ul. Rokietnicka 5a, 60-806 Poznań, Poland
email: kmanikowska@ump.edu.pl

STRESZCZENIE

Cel pracy. Mimo licznych badań, wiedza na temat roli cytokin w patogenezie chorób psychicznych oraz wpływu leków na te czynniki jest wciąż niepełna. Dlatego celem pracy było zbadanie i porównanie działania leków

przeciwdepresyjnych, takich jak wenlafaksyna, paroksetyna oraz atypowego neuroleptyku – aripiprazolu na poziom TNF- α w surowicy krwi zwierząt.

Materiał i metody. Badania przeprowadzono w trzech odrębnych doświadczeniach na szczurach, samcach szczepu Wistar, które każdorazowo były podzielone na dwie grupy. Pierwsza grupa zwierząt została poddana procedurze przewlekłego, łagodnego stresu (CMS) przez 6 tygodni, a druga stanowiła grupę kontrolną (niestresowaną). Po wywołaniu anhedonii części zwierząt stresowanych i kontrolnych podawano wenlafaksynę (20 mg/kg, *p.o.*), paroksetynę (12,5 mg/kg, *p.o.*) lub aripiprazol (2,5 mg/kg, *p.o.*) przez 3 tygodnie. W ostatnim dniu badania 25% zwierząt podano jednorazowo lipopolisaccharyd (LPS, 100 μ g/kg *m.c.*, *i.p.*). Stężenie TNF- α zostało oznaczone metodą ELISA.

Wyniki. Zanotowano wzrost stężenia TNF- α u zwierząt stresowanych oraz poddanych działaniu LPS w porównaniu z grupą zwierząt niestresowanych. Podawanie paroksetyny obniżyło poziom TNF- α u zwierząt stresowanych oraz po LPS. Wenlafaksyna nie wykazała znaczącego efektu na poziom badanej cytokiny, podczas gdy aripiprazol znamienne podniósł stężenie TNF- α u zwierząt, którym podawano LPS.

Wnioski. Normalizacja przez paroksetynę poziomu TNF- α , podwyższonego stresem i LPS, może stanowić o możliwości działania tego leku na układ immunologiczny. Przeciwnie, niektóre atypowe neuroleptyki, takie jak aripiprazol, mogą wykazywać stymulujące działanie na czynniki układu immunologicznego w warunkach ostrego stresu.

Introduction

The inflammatory process, as a part of many somatic diseases, is one of the main factors underlying pathogenic changes in the body. The process itself involves a number of successive changes making it very complex. It has been suggested that the increased concentration of pro-inflammatory factors, such as tumour necrosis factor (TNF- α), plays a key role in the development of mental diseases (McNamara *et al.* 2012, You *et al.* 2011). However, despite many attempts to understand the mechanisms of variations in the level of pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines, the role of these immunological factors in the pathomechanism of psychiatric diseases has not been yet clearly defined (Singhal *et al.* 2014, Leboyer *et al.* 2016).

Reports in the literature indicate a significant role of the inflammatory process in the pathogenesis of depression. For example, in the course of unipolar affective disorder a notable increase has been observed in levels tumour necrosis factor (TNA- α) and in interleukin-1 IL-1). (You *et al.* 2011, Singhal *et al.* 2014, Bortolato *et al.* 2015, Ganança *et al.* 2016). What remains debatable is the extent to which antidepressants might have an impact on the development of processes of inflammation. In the treatment of depression, particularly the type resistant to treatment, the inclusion of atypical neuroleptics in the therapy often increases its effectiveness (Yoshimura *et al.* 2012, Lenze *et al.* 2015). The question is whether antidepressants and atypical neuroleptics act in the same way, affecting the levels of immune system factors. Therefore, the aim of our study was to assess the effect of two frequently used types of antidepressants with different basic mechanisms of action, i.e. paroxetine

and venlafaxine, and also of the atypical neuroleptic aripiprazole on the concentration of pro-inflammatory cytokine TNF α in the serum of animals subjected to the chronic mild stress procedure (CMS) as well as those under severe stress. We hypothesized that aripiprazole, with its effect on serotonin transmission, may also partially act in the same way as antidepressants.

Material

Animals

The results presented below were obtained by performing 3 separate experiments, in which the material consisted of 80 male Wistar rats. The animals, whose initial body weight was 230 \pm 15 g, were kept in standard conditions, i.e. in a room temperature of 22 \pm 2°C, humidity around 55%, and a 12/12 LD cycle; each was placed in a separate cage. The rats were fed with standard Labofeed and had unrestricted access to drinking water, except for specific time intervals for behavioural testing. Those subjected to stress factors were kept in a separate room, away from the animals which were not submitted to stress.

Medication and substance used in the experiment

Aripiprazole (A) “Abilify” 15 mg tablets, 15 mg, manufactured by Otsuka Pharmaceutical Europe, administered in 1% methylcellulose solution, 1 \times 2.5 mg/kg *b.m.* intragastrically (*p.o.*); paroxetine hydrochloride (P) in the form of Seroxat tablets produced by GlaxoSmithKline, suspended in a 1% solution of methylcellulose, administered 1 \times intragastrically (*p.o.*) at a dose of 12,5 mg/kg *b.m.*;

venlafaxine (VX) in the form of Efectin tablets produced by Wyeth, administered in 1% methylcellulose solution, 1×20 mg/kg b.m., intragastrically (p.o.); lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* bacteria serotype O26:B6, produced by Sigma Chemical Co., Sigma-Aldrich Chemie GmbH was dissolved in physiological saline and given intraperitoneally in a single dose of 100 μ g/kg; physiological saline (0.9% NaCl); methylcellulose (V), producer: Sigma Chemical Co., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 1% solution, physiological saline - NaCl 0.9% (SOL).

Methods

Animal model used in the experiment

Anhedonia induced by the chronic mild stress (CMS) method

The experiment involved the use of the animal model of chronic mild stress (CMS) according to Willner (2005), which is widely recognized in the literature as one of the most suitable methods, producing reliable and reproducible results of factors that are a sign of depression in animals. Based on this method, the animals in each experiment were divided into two groups of 40. One group of animals was placed in a separate room in individual cages and subjected to long-term stress (S) for 6 weeks, with such stressful factors (one a day) as: coupling, pouring 200 ml of water, intermittent lack of access to water and food, reversal of the circadian rhythm, several hours of exposure to a stroboscopic lamp with a flare rate of 150 flashes/min, episodic tilting of cages to 45° according to the typical scheme used in this method. This induced a state of stress in the animals, the axial symptom of depression being the reduced amount of consumed sucrose solution associated with anhedonia.

The development of anhedonia in the stressed animals was controlled once a week by the measurement of the amount of a 1% sucrose solution consumed by the rats per hour. The solution bottles were weighed before and after feeding it to the rats previously deprived of access to water and food. The bottles were removed for re-weighing after 1 hour. The amount of consumed liquid was calculated on the basis of the difference between the two weights.

The control group consisted of unstressed animals (NS), kept in analogous conditions to the rats under the CMS procedure, but without the exposure to any stressogenic factors.

Administration of psychotropic drugs to animals with experimentally induced anhedonia.

After 6 weeks of submitting the animals to stress to induce anhedonia, both the rats subjected to the CMS

procedure and the unstressed control animals were separated into two further subgroups of 20 animals each. The stressed animals in one subgroup were additionally given a drug, i.e. paroxetine, venlafaxine or aripiprazole (S-LEK). The stressed animals of the second subgroup received vehiculum, i.e. 1% methylcellulose (S-V). The two subgroups of control rats (NS) were divided in the same way as the stressed and the analogous procedures were implemented.

After three weeks of drug administration, each subgroup, i.e. S-LEK, S-V and NS-LEK, NS-V, were divided again into two parts; one was administered intraperitoneally with LPS at a dose of 100 μ g/kg b.m. two hours before decapitation (S-LEK-LPS, NS-LEK-LPS, SV-LPS, NS-V-LPS), while the other was administered a single dose of the placebo, i.e. physiological saline-SOL (S-LEK-SOL, NS-LEK-SOL, SV-SOL, NS-V-SOL), according to the modification of the CMS model described in the previous publication (Manikowska *et al.* 2014). In this way, 8 groups of 10 animals each had been observed by the end of the study.

After decapitation, blood was collected and spun for 15 minutes in a 4000 rpm centrifuge. The serum was then separated and frozen at -80 °C.

Methods of biochemical examination

Estimating TNF α levels with the ELISA method

Biochemical tests were carried out via the ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method, using immunological tests of the Quantikine Rat TNF- α type, manufactured by the R&D System Inc., USA. These contained recombinant TNF- α from *Escherichia coli* and anti-rat TNF- α antibodies. The test allows for the measurement of the amount of the rat cytokine based on the measurement of the absorbance of the ready TNF- α complexes with antibodies. The TNF- α concentration was read out from the standard curve. The sensitivity of the test was under 5 pg/ml.

Statistical Calculations

The results were presented in the form of the means \pm SEM. Statistica 10.0 available with Windows XP was used for the analysis. The calculations were performed using the analysis of one- (ANOVA I) and two-factor variance with repetitions (ANOVA II) and the Duncan test (post-hoc test) for independent and dependent variables. The results of the probability level $p < 0.05$ were assumed as significant differences in the means.

The research was conducted in compliance with the legal regulations and the permission issued by the Local Research Ethics Committee for Animal Experiments in Poznań, Poland.

Result

Evaluation of anhedonia development in animals submitted to CMS

The progress of anhedonia was controlled once a week, with a supply of 1% sucrose solution. The reduced intake of the sucrose solution made it possible to determine when the state of anhedonia was reached. The difference between the groups of stressed (S) and unstressed animals (NS) reached the level of statistical significance ($p < 0.05$) after 6 weeks of using the stress factors in each of the three experiments, which indicated the achievement of anhedonia in the stressed animals.

The amount of 1% sucrose solution consumed by animals after 6 weeks in each of the 3 experiments are shown in Figure 1.

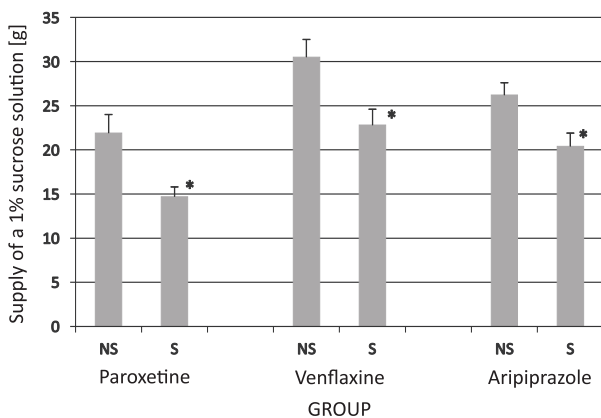


Figure 1 Evaluation of the state of anhedonia after 6 weeks of the animals being subjected to the procedure of chronic mild stress (CMS), before drug administration* $p < 0.05$ vs NS NS – unstressed rats S – stressed rats

Evaluation of the effect of administered drugs on the state of anhedonia

After the state of anhedonia was reached, the stressed and unstressed animals were again each divided into two subgroups. One subgroup of the stressed and of the unstressed animals were then administered paroxetine, venlafaxine or aripiprazole for 3 weeks. The subgroups of control animals (unstressed) received vehiculum, i.e. a 1% methylcellulose solution.

The amount of the supply consumed by the animals consisting in the 1% sucrose solution after 3 weeks of drug use are shown in Figure 2.

The results suggest that the prolonged administration of antidepressants, i.e. paroxetine and venlafaxine, alleviated the state of anhedonia in the stressed animals (S-LEK) compared to the stressed animals which did not receive the drugs (S-V) ($p < 0.05$). However, there was no effect of the prolonged administration of aripiprazole

on anhedonia in the stressed animals (S-LEK vs. S-V, $p > 0.05$). The researchers did not observe any effect of the drug on unstressed animals (NS-LEK vs. NS-V, $p > 0.05$) in any of the three experiments.

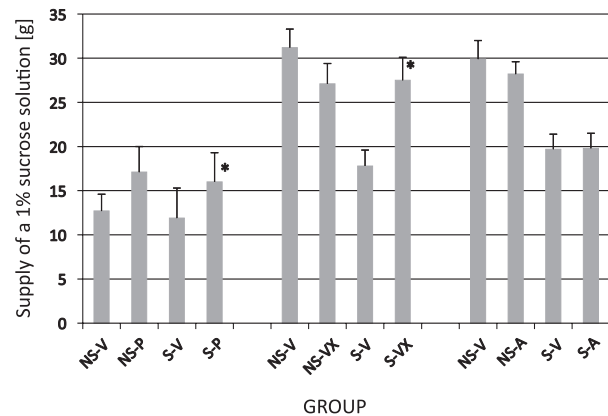


Figure 2 The effect of paroxetine, venlafaxine and aripiprazole on anhedonia after 3 weeks of their administration to the rats. * $p < 0.05$ vs. SV NS-V – unstressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); SV – stressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); NS-P – unstressed rats treated with paroxetine; NS-VX – unstressed rats treated with venlafaxine; S-VX – stressed rats treated with venlafaxine; NS-A – unstressed rats treated with aripiprazole; S-A – stressed rats treated with aripiprazole

Effect of the selected drugs alone and in combination with lipopolysaccharide on TNF- α concentration

Two hours before decapitation, each group of the stressed (S) and unstressed animals (NS) receiving the drug or the placebo (V) was again divided into two subgroups, one of which received a single dose of lipopolysaccharide at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. b.m. ip (LPS) and the other the placebo (physiological saline – SOL). The results in terms of TNF- α serum concentration in the rats treated with paroxetine are shown as Figure 3.

In the animals in the control group (unstressed) who were administered a single LPS, the long term administration of the drug caused a slight decrease in the TNF- α concentration (NS-P-LPS vs. NS-V-LPS); however, the figure was not statistically significant ($p > 0.05$).

Another experiment was performed using venlafaxine; the results are included as Figure 4.

Similarly to the previous experiment, a higher TNF- α concentration was found in the group of stressed animals (S-V-SOL) compared to the control group (NS-V-SOL) ($p < 0.05$). A single administration of LPS in the groups of stressed and unstressed animals enforced this effect (S-V-LPS vs S-V-SOL, $p < 0.05$), (NS-V-LPS vs. NS-V-SOL, $p < 0.05$). The administration of venlafaxine did not significantly affect the level of TNF- α level either in the group of the stressed or unstressed animals.

The last experiment was carried out using aripiprazole, and the results are presented as Figure 5.

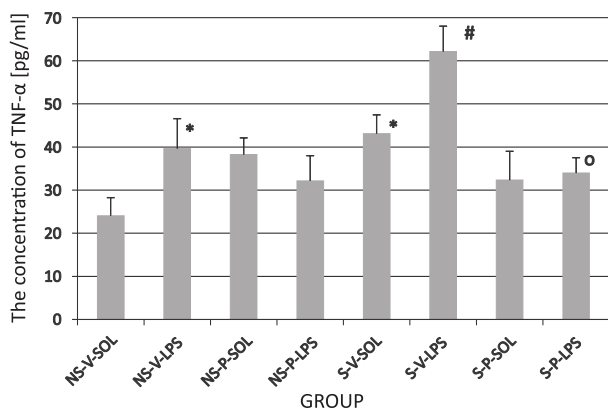


Figure 3 TNF-α concentration in the serum of stressed and unstressed rats after repeated administration of paroxetine and a single dose of LPS. NS-V-SOL – unstressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); NS-V-LPS – unstressed rats treated with 1% methylcellulose and a single-dose of LPS; NS-P-SOL – unstressed rats given paroxetine; NS-P-LPS – unstressed rats treated with paroxetine and a single dose of LPS; S-V-SOL – stressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); S-V-LPS – stressed rats administered vehiculum (1% methylcellulose) and a single dose of LPS; S-P-SOL – stressed rats administered paroxetine; S-P-LPS – stressed rats treated with paroxetine and a single dose of LPS * $p < 0.05$ vs. NS-V-SOL # $p < 0.05$ vs S-V-SOL ^o $p < 0.05$ vs S-V-LPS

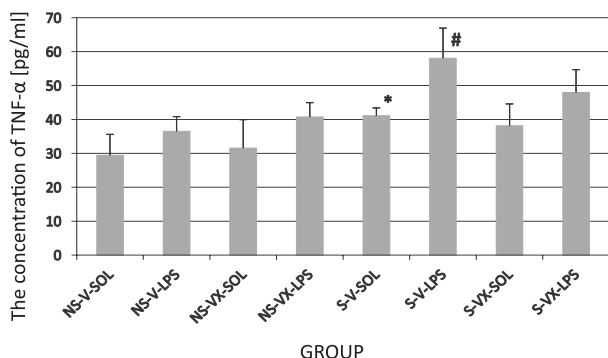


Figure 4 TNF-α concentrations in the serum of stressed and unstressed rats after the repeated administration of venlafaxine and a single dose of LPS. NS-V-SOL – unstressed rats treated with 1% methylcellulose; NS-V-LPS – unstressed rats treated with 1% methylcellulose and a single dose of LPS; NS-VX-SOL – unstressed rats treated with venlafaxine; NS-VX-LPS – unstressed rats treated with venlafaxine and a single dose of LPS; S-V-SOL stressed rats treated with 1% methylcellulose; S-V-LPS – stressed rats treated with 1% methylcellulose and a single dose of LPS; S-VX-SOL – stressed rats treated with venlafaxine; S-VX-LPS – stressed rats treated with venlafaxine and a single dose of LPS* $p < 0.05$ vs. NS-V-SOL # $p < 0.05$ vs SV-SOL

The administration of aripiprazole did not significantly affect TNF-α levels in the stressed or unstressed animals. The single injection of lipopolysaccharide resulted in a statistically significant increase in TNF-α concentration, especially in the stressed animals (SV-LPS vs. SV-SOL, $p < 0.05$), but also in the control animals (NS-V-LPS vs. NS-V-SOL, $p < 0.05$).

Interestingly, the effect of the drug was particularly evident in the groups of stressed and control animals that were administered LPS at the end of the experiment. The

administration of aripiprazole diametrically increased the TNF-α levels after LPS in the stressed animals, compared to the corresponding group that was not treated with the drug (S-A-LPS vs. S-V-LPS, $p < 0.05$). Similarly, when analysing the results of the groups of unstressed animals that received LPS, the level of TNF-α was several times higher than the concentrations recorded in the corresponding group of animals not exposed to the drug (NS-A-LPS vs. NS-V-LPS, $p < 0.05$).

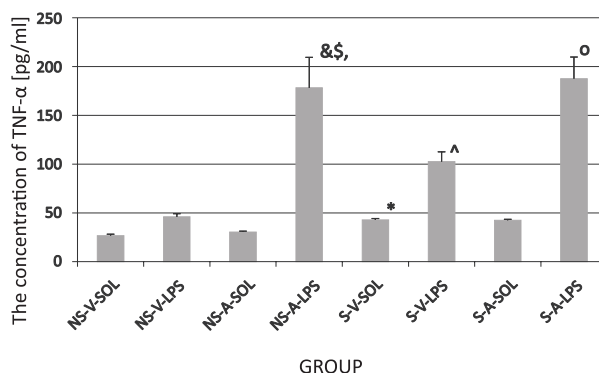


Figure 5 TNF-α concentration in the serum of the stressed and unstressed rats after repeated administration of aripiprazole and single dose of LPS. NS-V-SOL – unstressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); NS-V-LPS – unstressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose) and a single dose of LPS; NS-A-SOL – unstressed rats treated with aripiprazole; NS-A-LPS – unstressed rats given aripiprazole and a single dose of LPS; S-V-SOL – stressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose); S-V-LPS – stressed rats treated with vehiculum (1% methylcellulose) and a single dose of LPS; S-A-SOL – stressed rats treated with aripiprazole; S-A-LPS – stressed rats treated with aripiprazole and a single LPS * vs NS-V-SOL, $p < 0.05$ ^o-vs SV-LPS, $p < 0.05$ [^]-vs SV-SOL, $p < 0.05$ &-vs NS-V-LPS, $p < 0.05$ \$ vs NS-A-SOL, $p < 0.05$

Comparison of the effect of selected psychotropic drugs on TNF-α concentration

This paper reports on experiments based on the administration of multiple doses of two antidepressants with various mechanisms of action, i.e. paroxetine and venlafaxine, and also of one drug from the group of neuroleptics with an atypical mechanism of action: aripiprazole. Our analyses revealed that in the animals regularly submitted to stress factors, which were administered a single dose of lipopolysaccharide, the antidepressants reduced the levels of pro-inflammatory cytokine-TNF-α, although paroxetine was more effective in this regard than venlafaxine, because in most groups of animals tested the administration of paroxetine resulted in the reduction of TNF-α levels elevated by stress as well as by stress and lipopolysaccharide. In contrast, in most groups of animals venlafaxine did not have a conclusive effect on the level of the cytokine studied. The tendency to reduce the TNF-α concentration was demonstrated only in the group of the stressed animals treated with

LPS. The inverse effect was noted after the use of the neuroleptic in the stressed animals, because aripiprazole significantly increased the concentration of the cytokine. The administration of this neuroleptic resulted in a considerable increase in TNF- α level, both in the groups of stressed and unstressed animals that received LPS. In the groups of animals who were not treated with LPS as an additional factor of acute stress, aripiprazole did not produce such a strong reaction.

The summary of the discussed effects of the drugs is graphically presented in Table 1.

Table 1 A schematic comparison of the impact of the selected drugs on the concentration of TNF- α

Group	Paroxetine	Venlafaxine	Aripiprazole
NS-LEK-SOL	↑	↔	↑
NS-LEK-LPS	↓	↑	↑↑↑↑
S-LEK-SOL	↓	↔	↔
S-LEK-LPS	↓↓	↓	↑↑

NS-LEK-SOL – unstressed rats, which were administered a drug

NS-LEK-LPS – unstressed rats, which were administered a drug and a single dose of LPS

S-LEK-SOL – stressed rats, which were administered a drug

S-LEK-LPS – stressed rats, which were administered a drug and a single dose of LPS

Discussion

The results of numerous studies reveal that the dysregulation of the immune system due to, among other things, the influence of stress, is associated with the appearance of numerous neuropathological processes that contribute to the occurrence of depressive disorders.

The activation of the immune system is manifested by an increased level of pro-inflammatory cytokines, with an increase in the release of mainly IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α . It is believed that tricyclic antidepressants (TCAs) such as clomipramine and selective SSRIs, e.g. citalopram, sertraline, are capable of suppressing the production of pro-inflammatory cytokines as well as the activation of macrophages or lymphocytes to release interleukin IL-10 with an anti-inflammatory effect, resulting in an increase in its concentration and the related suppression of pro-inflammatory cytokine production (Miller *et al.* 2005, Schiepers *et al.* 2005, Sutcgil *et al.* 2007, Mesquita *et al.* 2009, Yasui *et al.* 2009, McNamara and co-operative 2011, Feltes *et al.* 2017). It is well-known that cytokines such as IL-1, IL-6, TNF- α have a direct effect on the nervous system and can interfere with the functioning of the brain, resulting in behavioural changes such as anhedonia, which is an axial symptom of depression (Pollmacher 2002). In this study, in order to induce anhedonia we used the chronic mild stress (CMS) method developed by Willner; this is the animal model reflecting part of the depression

criteria (Willner 2005). In the sixth week of submitting the animals to stress, it was found that compared to the control group their consumption of the sucrose solution indicated the onset of anhedonia. Comparable findings are also found by other authors (Jayatissa *et al.* 2006, Casarotto and Andreatini 2007). What followed was the administration of antidepressants of varied mechanism of action or of an atypical neuroleptic. After 21 days, the anhedonia was relieved through the antidepressant impact of paroxetine or venlafaxine. Other authors who have examined the impact of fluoxetine or escitalopram have obtained similar results (Caldarone *et al.* 2015). The impact of neuroleptics on anhedonia was examined by Morais *et al.* (2017). Their results demonstrated that a classic neuroleptic, haloperidol, had no effect on the state of anhedonia; it even enhanced the condition. In the same study anhedonia was alleviated by the use of clozapine, which is an atypical neuroleptic (Morais *et al.* 2017). The study discussed in this paper demonstrated that the administration of aripiprazole did not have an impact on anhedonia, which might be evidence of the lack of strong antidepressant activity of this atypical neuroleptic. Perhaps the profile of aripiprazole is in this range closer to the activity of typical neuroleptics. On the last day of the experiment, the rats were administered a single dose of lipopolysaccharide. This bacterial endotoxin triggers a strong immune response, increasing the level of IL- β , IL-6 i TNF-acytokines (Henry *et al.* 2009, Mesquita *et al.* 2009, Stepanichev *et al.* 2014). Weinstein's research, which compared the levels of CRP, IL-6 and TNF- α in the blood of patients with and without depression, demonstrated that people who suffered from depression and were subjected to psychological stress showed an excessive activity of the immune system and increased concentrations of the above-mentioned inflammation mediators (Weinstein and *et al.* 2010). In addition, in depressed persons, apart from the elevated TNF- α in the serum, researchers also found higher levels of soluble receptors for this cytokine (Himmerich *et al.* 2008).

In this study, when analysing changes in the level of pro-inflammatory cytokine in the animals an induced depressive-like state, a significant increase in the concentration of TNF- α in the blood plasma of the stressed animals was observed compared to the unstressed animals (control group). The same results were obtained in the group of stressed animals who were administered with a single dose of LPS, compared to the control group of unstressed animals who were also given LPS. These results are consistent with some previous reports regarding increase in pro-inflammatory cytokines in the course of depression (You *et al.* 2011). An important observation in our work, however, is the fact that TNF- α levels normalize in the stressed animals with the use of paroxetine. This effect was not clearly seen with venlafaxine. The results are partly compliant with

those presented by Connor *et al.* who did not, however, observe a reduction in TNF- α level either in the case of venlafaxine or paroxetine (Connor *et al.* 2000). The lack of a definitive influence of venlafaxine on the level of pro-inflammatory cytokines in patients is also discussed in the collective publication by Feltes *et al.* 2017. The effect of paroxetine on the concentration of pro-inflammatory cytokines is inconclusive. In the study by Durairaj *et al.*, paroxetine in LPS-treated macrophages reduced the level of interleukin 6, but increased the level of TNF- α (Durairaj *et al.* 2015).

The mechanism of action by which antidepressants affect the production of cytokines is not fully understood. One hypothesis suggests the serotonergic activity of antidepressants, associated with an increase in the extracellular concentration of serotonin, as well as the effect on its receptors, and their relationship with the production of pro-inflammatory cytokines. The results of research conducted by Kubera *et al.* indicated a decreased production of IL-6 and TNF- α by elevated serotonin levels (Kubera *et al.* 2005, Maes *et al.* 2005).

There is also a hypothesis that the increased level of cyclic adenosine monophosphate (cAMP), caused by taking antidepressants (Xia *et al.* 1996, Feltes *et al.* 2007), is involved in these drugs having an effect on the production of cytokines (Kubera *et al.* 2001, Maes *et al.* 2005).

It has been shown that agents that increase the level of cAMP cause a decrease in the production of TNF- α production. It has also been proven that the inhibition of TNF- α production by fluoxetine is at least in part related to the activation of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) (Eigler *et al.* 2000, Maes *et al.* 2005). The results of the above research may partly explain the results obtained in this work. However, it should be mentioned that the antidepressants used in the study have different mechanisms of action. Each of them affects the serotonergic transmission, but to a different degree. The worst response is due to venlafaxine, which is why it is not possible to obtain a clear effect of changes in the cytokine levels, which could suggest no effect of venlafaxine on the immune system in the course of depression.

The research results indicate that many systems and mutual dependencies are involved in the pathophysiology of affective disorders. Therefore, it was decided to investigate the effect of aripiprazole as a drug with the basic mechanism of action associated with the dopaminergic system, which may partially work like other antidepressants by also acting on the serotonergic system. Analysing the results obtained in this study, it was demonstrated that although aripiprazole alone did not produce a significant difference in TNF- α levels in the serum of both stressed and unstressed rats, the animals which received the drug and LPS showed a significant increase in the concentration of this cytokine compared to rats which received only LPS. The effect was true for both groups of the stressed and unstressed animals. This may indicate the effect of aripiprazole on the symptoms of acute stress or on increasing the sensitivity of rats to acute stress under the influence of the combination of the drug and LPS, and this effect is not a mere summation of the observed changes in concentration, but rather is hyperaddition. LPS added to aripiprazole in the stressed and unstressed animals also caused a significant increase in TNF- α concentration. It follows that a stronger inflammatory reaction depends on the combined administration of aripiprazole and LPS and that it is not associated with the earlier state of the animals, as it concerns both the stressed and unstressed groups.

Conclusions

The normalization of TNF- α levels increased by stress and LPS with paroxetine may translate into the possibility of this drug having an effect on the immune system. In contrast, some atypical neuroleptics, such as aripiprazole, may have a stimulatory effect on the immune system under acute stress. This conclusion is particularly interesting and presents a new direction of research based on the analysis of the impact of atypical neuroleptics on the pathomechanism of disorders associated with acute stress. ■

Wstęp

Proces zapalny jest jednym z głównych czynników wskazujących na toczące się w organizmie zmiany chorobotwórcze, jest wykładnikiem wielu schorzeń somatycznych. Zagłębiając się w mechanizmy następujących po sobie zmian, można dostrzec złożoność tego procesu. Sugeruje się, że w przebiegu wielu chorób psychicznych podwyższone stężenie czynników prozapalnych, takich jak

czynnik martwicy nowotworu (TNF- α) pełni kluczową rolę w rozwoju choroby (McNamara i wsp. 2012, You i wsp. 2011). Pomimo wielu badań nad poznaniem mechanizmów zmian poziomu prozapalnych lub przeciwzapalnych cytokin, nie określono jednoznacznie roli tych czynników immunologicznych w patomechanizmie chorób psychicznych (Singhal i wsp. 2014, Leboyer i wsp. 2016).

Doniesienia literaturowe wskazują na znaczącą rolę procesu zapalnego w patogenezie depresji. Dowiedziono,

że w przebiegu choroby afektywnej jednobiegunowej następuje wzrost stężenia prozapalnych cytokin, takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), interleukina 1 (IL-1) (You i wsp. 2011, Singhal i wsp. 2014, Bor-tolato i wsp. 2015, Ganança i wsp. 2016). Dyskusyjny pozostaje nadal stopień ingerencji stosowanych leków przeciwdepresyjnych w rozwój procesu zapalnego. W terapii depresji, a w szczególności tej odpornej na leczenie, dodanie atypowego neuroleptyku wydaje się celowe, aby zwiększyć skuteczność terapii (Yoshimura i wsp. 2012, Lenze i wsp. 2015). Stąd pytanie czy leki przeciwdepresyjne i atypowe neuroleptyki wykazują ten sam kierunek działania, wpływając na poziomy czynników układu immunologicznego.

Celem badania była ocena wpływu leków przeciwdepresyjnych z dwóch, często stosowanych grup, o różnych podstawowych mechanizmach działania, takich jak paroksetyna i wenlafaksyna oraz neuroleptyku atypowego, aripiprazolu na stężenie prozapalnej cytokiny, TNF- α w surowicy krwi zwierząt poddanych procedurze łagodnego, przewlekłego stresu, a także działaniu ostrego stresu. Postawiono hipotezę, że aripiprazol, lek o nietypowym mechanizmie działania, między innymi przez wpływ na przekąźnictwo serotoninowe może także po części działać jak leki przeciwdepresyjne.

Materiały

Zwierzęta

Przedstawione poniżej wyniki uzyskano przeprowadzając trzy odrębne doświadczenia, w których materiał stanowiło po 80 szczurów, samców, szczepu Wistar. Zwierzęta o początkowej masie ciała 230 ± 15 g przebywały w warunkach standardowych, to jest w pomieszczeniach o temperaturze $22 \pm 2^\circ\text{C}$, wilgotności około 55%, przy zachowanym 12-godzinnym cyklu dobowym. Każdego szczura umieszczono pojedynczo w odrębnej klatce. Szczury karmione były standardową paszą Labofeed i miały nieograniczony dostęp do wody pitnej z wyjątkiem określonych przedziałów czasowych, przeznaczonych na badania behawioralne. Zwierzęta poddawane działaniu czynników stresujących przebywały w osobnym pomieszczeniu w porównaniu ze zwierzętami niestresowanymi.

Leki i substancje użyte w doświadczeniu

Aripiprazol (A), preparat Abilify (tabletki, 15 mg), producent Otsuka Pharmaceutical Europe, podawany w 1% roztworze metylocelulozy 1 \times dziennie w dawce 2,5 mg/kg m.c., dożyłdkowo (p.o.); chlorowoderek paroksetyny (P) w postaci tabletek preparatu Seroxat wyprodukowanego przez GlaxoSmithKline, zawieszony w 1% roztworze metylocelulozy, podawany był 1 \times dziennie

dożyłdkowo (p.o.) w dawce 12,5 mg/kg m.c.; wenlafaksyna (VX) w postaci tabletek preparatu Efectin – producent Wyeth, podawana w 1% roztworze metylocelulozy 1 \times dziennie w dawce 20 mg/kg m.c., dożyłdkowo (p.o.); lipopolisacharyd (LPS) z bakterii *Escherichia coli* serotyp 026:B6 (producent Sigma Chemical Co., Sigma-Aldrich Chemie GmbH) został rozpuszczony w soli fizjologicznej i podany dootrzewnowo, jednorazowo w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c.; sól fizjologiczna (0,9 % NaCl); metyloceluloza (V), producent (Sigma Chemical Co., Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 1% roztwór, sól fizjologiczna – NaCl 0,9% (SOL).

Metody

Model zwierzęcy wykorzystany w doświadczeniu

Wywołanie anhedonii metodą łagodnego przewlekłego stresu (CMS)

W zaplanowanym doświadczeniu wykorzystany został zwierzęcy model przewlekłego łagodnego stresu (CMS) według Willnera (2005), uznawany powszechnie w piśmiennictwie za jeden z najbardziej odpowiednich i dający wiarygodne oraz powtarzalne wyniki czynników świadczących o rozwoju depresji u zwierząt. Opierając się na tej metodzie zwierzęta w każdym badaniu podzielono na dwie podstawowe grupy liczące po 40 sztuk. Jedną grupę zwierząt umieszczono w osobnym pomieszczeniu w pojedynczych klatkach i poddawano długotrwałemu stresowi (S) przez 6 tygodni za pomocą takich czynników stresogennych jak (jednego dnia tylko jeden czynnik): parowanie zwierząt, polewanie 200 ml wody, okresowy brak dostępu do wody i pokarmu, odwrócenie rytmu dobowego, kilkugodzinne narażenie na działanie lampy stroboskopowej o częstotści błysków 150 błysków/min, okresowy przechyl klatek pod kątem 45° według typowego schematu stosowanego w tej metodzie. Pozwoliło to na uzyskanie u zwierząt stanu stresowego, w którym za osiowy objaw depresji u zwierząt uznaje się powstanie objawu zmniejszenia ilości wypijanego roztworu sacharozy, kojarzonego z anhedonią.

Rzeczywistość anhedonii u zwierząt stresowanych kontrolowano raz w tygodniu, przez podaż (pomiar ilości wypijanego przez szczury w ciągu godziny) 1% roztworu sacharozy. Butelki z roztworem ważono, następnie podawano szczurom, które uprzednio pozbawiono dostępu do wody i pożywienia. Po godzinie butelki zabierano do ponownego zważenia. Na podstawie różnicy mas obliczano ilość wypitego płynu.

Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta niestresowane (NS), które przebywały w analogicznych warunkach dla szczurów poddanych procedurze CMS, jednak nie były narażone na działanie czynników stresogennych.

Podawanie leków psychotropowych u zwierząt z doświadczalnie wywołaną anhedonią

Po upływie 6-tygodniowego okresu stresowania i wytworzeniu anhedonii, zarówno szczury poddane procedurze CMS, jak i zwierzęta kontrolne (niestresowane) każdorazowo rozdzielono na dalsze dwie podgrupy po 20 zwierząt. Zwierzętom stresowanym jednej podgrupy dodatkowo podawano lek (paroksetynę, wenlafaksynę lub aripiprazol) (S-LEK). Zwierzęta stresowane drugiej podgrupy otrzymywały *vehiculum*-nośnik (S-V) (1% metyloceluloza). Obie podgrupy szczurów kontrolnych (NS) podzielono w taki sam sposób jak stresowanych i prowadzono analogiczne postępowanie. Po trzech tygodniach podawania leku, na dwie godziny przed dekapitacją każdą podgrupę, to jest S-LEK i S-V oraz NS-LEK i NS-V ponownie podzielono na dwie części, z których jednej podano dootrzewnowo LPS w dawce 100 µg/kg m.c. (S-LEK-LPS, NS-LEK-LPS, S-V-LPS, NS-V-LPS), natomiast drugiej podano jednorazowo placebo (sól fizjologiczną-SOL) (S-LEK-SOL, NS-LEK-SOL, S-V-SOL, NS-V-SOL), według modyfikacji modelu CMS opisanego we wcześniejszej publikacji (Manikowska i wsp. 2014). Uzyskano w ten sposób na końcu badania osiem grup po 10 zwierząt.

Po dekapitacji pobrano krew, odwirowano ją w wirówce o częstotliwości 4000 obrotów/min przez 15 minut. Następnie oddzielono surowicę i zamrożono w temperaturze -80°C.

Metody badań biochemicznych

Oznaczenie poziomu TNF-α metodą ELISA

Badania biochemiczne przeprowadzono metodą ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) z wykorzystaniem testów (zastawów) immunologicznych – typu Quantikine Rat TNFα produkcji R&D System, Inc. USA. Testy te zawierały rekombinowane TNF-α z *Escherichia coli* i przeciwciała przeciw szczurzym TNF-α. Test ten pozwala zmierzyć ilość tej szczurzej cytokiny na podstawie pomiaru absorbancji gotowych kompleksów TNF-α z przeciwciałami. Stężenie TNF-α odczytywano z krzywej wzorcowej. Czułość stosowanego testu wynosiła mniej niż 5 pg/ml.

Obliczenia statystyczne

Wyniki przedstawiono w formie średnich ± SEM. W analizie statystycznej posłużono się programem Statistica 10.0, dostępnym w systemie operacyjnym Windows XP. Obliczenia wykonano za pomocą analizy wariancji jedno- (ANOVA I) i dwuczynnikowej z powtórzeniami (ANOVA II) oraz testu Duncana (*post-hoc test*) dla zmiennych niezależnych i zależnych. Jako istotne różnice średnich przyjęto wyniki dla poziomu prawdopodobieństwa $p < 0,05$.

Badania przeprowadzono zgodnie z wymaganiami obowiązującego prawa i za zezwoleniem wydanym przez

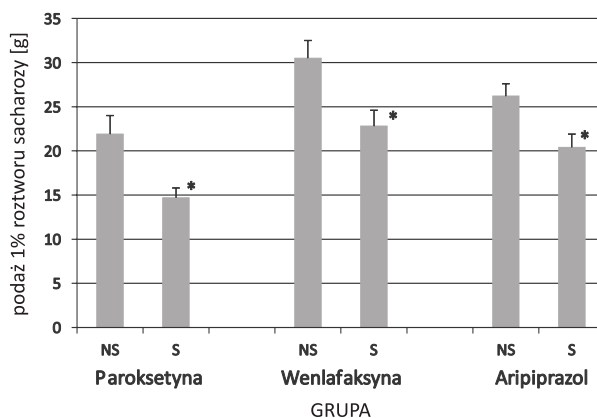
Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Poznaniu.

Wyniki

Ocena rozwoju anhedonii u zwierząt poddanych działaniu przewlekłego, łagodnego stresu

Kontrolę rozwoju anhedonii przeprowadzano raz w tygodniu, za pomocą testu podaży (picia) 1% roztworu sacharozy. Zmniejszenie spożycia roztworu sacharozy pozwoliło określić moment wystąpienia stanu anhedonii. Różnica pomiędzy grupą zwierząt stresowanych (S) a niestresowanych (NS) osiągnęła poziom znamienności statystycznej ($p < 0,05$) po 6 tygodniach stosowania czynników stresogennych w każdym z trzech badań, co wskazywało na osiągnięcie anhedonii u zwierząt stresowanych.

Wartości liczbowe spożytego przez zwierzęta 1% roztworu sacharozy po 6 tygodniach w każdym z trzech doświadczeń umieszczono na rycinie 1.



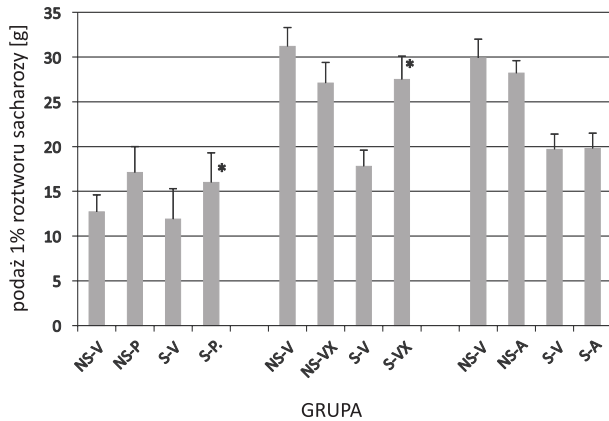
Rycina 1 Ocena stanu anhedonii po 6 tygodniach poddawania zwierząt procedurze łagodnego przewlekłego stresu (CMS), przed podaniem leków. * $p < 0,05$ vs NS NS – szczury niestresowane, S – szczury stresowane

Ocena wpływu podawanych leków na stan anhedonii

Po wywołaniu u zwierząt stanu anhedonii każdorazowo grupy zwierząt stresowanych i niestresowanych podzielono na dwie podgrupy. Jednej podgrupie zwierząt stresowanych i niestresowanych rozpoczęto podawanie leków: paroksetyny, wenlafaksyny lub aripiprazolu przez 3 tygodnie. Odpowiednie podgrupy zwierząt kontrolnych (niestresowanych) otrzymywały nośnik, to jest 1% roztwór metylocelulozy. Wartości liczbowe podaży (spożytego przez zwierzęta) 1% roztworu sacharozy po 3 tygodniach stosowania leków przedstawiono na rycinie 2.

Przedstawione wyniki wskazują, że przewlekłe podawanie leków przeciwdepresyjnych, to jest paroksetyny i wenlafaksyny, łagodziło stan anhedonii w grupie

zwierząt stresowanych (S-LEK) w porównaniu z grupą zwierząt stresowanych niepoddanych działaniu tych leków (S-V) ($p < 0,05$). Natomiast nie zanotowano wpływu przewlekłego podawania aripiprazolu na zmiany stanu anhedonii u zwierząt stresowanych (S-LEK vs S-V, $p > 0,05$). W żadnym z doświadczeń nie zauważono wpływu leku u zwierząt niestresowanych (NS-LEK vs NS-V, $p > 0,05$).



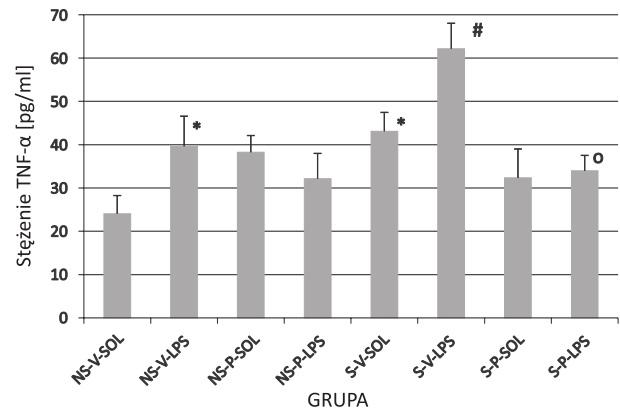
Rycina 2 Wpływ paroksetyny, wenlafaksyny i aripiprazolu na stan anhedonii po 3 tygodniach ich podawania szczurom. * $p < 0,05$ vs S-V NS-V – szczury niestresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), S-V – szczury stresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), NS-P – szczury niestresowane, którym podawano paroksetynę, S-P – szczury stresowane, którym podawano paroksetynę, NS-VX – szczury niestresowane, którym podawano wenlafaksynę, S-VX – szczury stresowane, którym podawano wenlafaksynę NS-A – szczury niestresowane, którym podawano aripiprazol, S-A – szczury stresowane, którym podawano aripiprazol

Wpływ wybranych samych leków oraz w łącznym podaniu z lipopolisacharydem na stężenie TNF- α

Dwie godziny przed dekapitacją każdorazowo wszystkie grupy zwierząt stresowanych (S) i niestresowanych (NS) otrzymujących lek lub placebo (V) zostały podzielone na dwie podgrupy, z których jedna otrzymała jednorazowo lipopolisacharyd w dawce 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ m.c. i.p. (LPS), a druga placebo (sól fizjologiczną – SOL). Otrzymane wyniki pomiaru stężenia TNF- α w surowicy zwierząt poddanych działaniu paroksetyny przedstawiono na rycinie 3.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że stężenia TNF- α u szczurów stresowanych (S-V-SOL) były znacznie wyższe ($p < 0,05$) w porównaniu z grupą zwierząt kontrolnych (NS-V-SOL). Jednorazowe podanie LPS w grupie zwierząt stresowanych pogłębiło ten efekt (S-V-LPS vs S-V-SOL) ($p < 0,05$). Podanie szczurom niestresowanym LPS (NS-V-LPS) spowodowało istotne ($p < 0,05$) podwyższenie stężenia TNF- α w porównaniu ze zwierzętami niestresowanymi bez LPS (NS-V-SOL). Podawanie paroksetyny spowodowało obniżenie stężenia TNF- α w grupach zwierząt stresowanych

poddanych działaniu LPS lub bez tego dodatkowego stresora (S-P-SOL vs S-V-SOL, S-P-LPS vs S-V-LPS, $p < 0,05$). W grupach zwierząt kontrolnych (niestresowanych), którym podano jednorazowo LPS, przewlekłe podawanie leku spowodowało nieznaczny spadek stężenia TNF- α (NS-P-LPS vs NS-V-LPS), nie była to jednak różnica istotna statystycznie ($p > 0,05$).



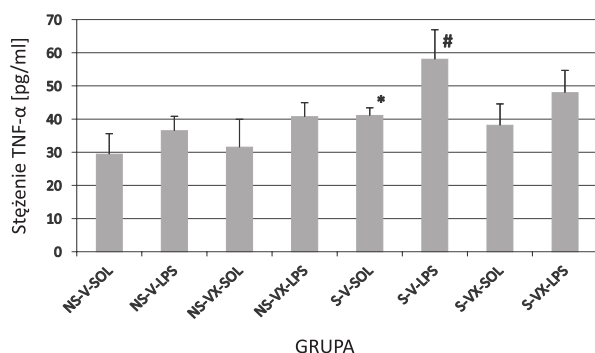
Rycina 3 Stężenia TNF- α w surowicy szczurów stresowanych i niestresowanych po wielokrotnym podaniu paroksetyny i jednorazowym podaniu LPS. NS-V-SOL – szczury niestresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), NS-V-LPS – szczury niestresowane, którym podawano 1% metylocelulozę i podano jednorazowo, LPS NS-P-SOL – szczury niestresowane, którym podawano paroksetynę, NS-P-LPS – szczury niestresowane, którym podawano paroksetynę i podano jednorazowo LPS, S-V-SOL – szczury stresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), S-V-LPS – szczury stresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę) i podano jednorazowo LPS S-P-SOL – szczury stresowane, którym podawano paroksetynę, S-P-LPS – szczury stresowane, którym podawano paroksetynę i podano jednorazowo LPS * $p < 0,05$ vs NS-V-SOL # $p < 0,05$ vs S-V-SOL ^o $p < 0,05$ vs S-V-LPS.

Kolejne doświadczenie przeprowadzono z zastosowaniem wenlafaksyny. Otrzymane wyniki badania zamieszczono na rycinie 4.

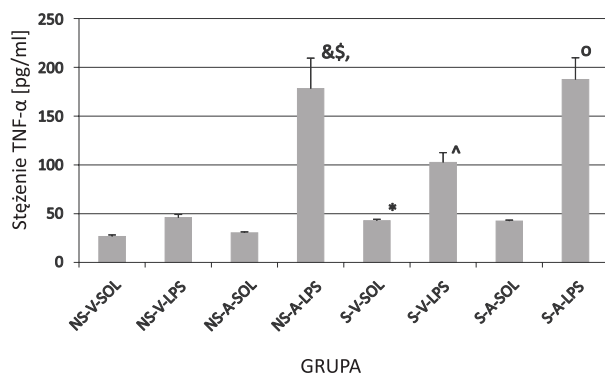
Podobnie jak to miało miejsce w poprzednim doświadczeniu, stwierdzono wyższe stężenie TNF- α w grupie zwierząt stresowanych (S-V-SOL) w porównaniu z grupą kontrolną (NS-V-SOL) ($p < 0,05$). Jednorazowe podanie LPS w grupach zwierząt stresowanych i niestresowanych pogłębiło ten efekt (S-V-LPS vs S-V-SOL, $p < 0,05$), (NS-V-LPS vs NS-V-SOL, $p < 0,05$). Podanie wenlafaksyny nie wpłynęło znacząco na poziom TNF- α w grupach zwierząt stresowanych i niestresowanych.

Ostatnie badanie przeprowadzono z wykorzystaniem aripiprazolu, a wyniki zamieszczono na rycinie 5.

Podanie aripiprazolu nie wpłynęło znacząco na poziomy TNF- α zarówno u zwierząt stresowanych, jak i niestresowanych. Wstrzyknięcie jednorazowe lipopolisacharydu spowodowało zdecydowany, znamieny statystycznie wzrost stężenia TNF- α , szczególnie u zwierząt stresowanych (S-V-LPS vs S-V-SOL, $p < 0,05$), a także u zwierząt kontrolnych (NS-V-LPS vs NS-V-SOL, $p < 0,05$).



Rycina 4 Stężenia TNF- α w surowicy szczurów stresowanych i niestresowanych po wielokrotnym podaniu wenlafaksyny i jednorazowym podaniu LPS. NS-V-SOL – szczury niestresowane, którym podawano 1% metylocelulozę, NS-V-LPS – szczury niestresowane, którym podawano 1% metylocelulozę i podano jednorazowo LPS, NS-VX-SOL – szczury niestresowane, którym podawano wenlafaksynę, NS-VX-LPS- szczury niestresowane, którym podawano wenlafaksynę i jednorazowo LPS, S-V-SOL – szczury stresowane, którym podawano 1% metylocelulozę, S-V-LPS – szczury stresowane, którym podawano 1% metylocelulozę i jednorazowo LPS, S-VX-SOL – szczury stresowane, którym podawano wenlafaksynę, S-VX-LPS – szczury stresowane, którym podawano wenlafaksynę i podano jednorazowo LPS, * $p < 0,05$ vs NS-V-SOL # $p < 0,05$ vs S-V-SOL



Rycina 5 Stężenia TNF- α w surowicy szczurów stresowanych i niestresowanych po wielokrotnym podaniu aripiprazolu i jednorazowym podaniu LPS. NS-V-SOL – szczury niestresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), NS-V-LPS – szczury niestresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę) i podano jednorazowo LPS, NS-A-SOL – szczury niestresowane, którym podawano aripiprazol NS-A-LPS – szczury niestresowane, którym podawano aripiprazol i podano jednorazowo LPS, S-V-SOL – szczury stresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę), S-V-LPS – szczury stresowane, którym podawano vehiculum (1% metylocelulozę) i podano jednorazowo LPS, S-A-SOL – szczury stresowane, którym podawano aripiprazol, S-A-LPS – szczury stresowane, którym podawano aripiprazol i jednorazowo podano LPS, * – vs NS-V-SOL, $p < 0,05$ ° – vs S-V-LPS, $p < 0,05$ ^ – vs S-V-SOL, $p < 0,05$ &-vs NS-V-LPS, $p < 0,05$ § – vs NS-A-SOL, $p < 0,05$

Co ciekawe, efekt działania leku był szczególnie widoczny w grupach zwierząt stresowanych i kontrolnych, którym na końcu badania podano LPS. Podawanie aripiprazolu diametralnie podwyższyło poziomy TNF- α u zwierząt stresowanych po LPS w porównaniu

z analogiczną grupą niepoddaną działaniu leku (S-A-LPS vs S-V-LPS, $p < 0,05$). Podobnie, analizując wyniki grup zwierząt niestresowanych, które otrzymały LPS, poziom TNF- α kilkakrotnie przewyższał stężenia zanotowane w odpowiadającej grupie zwierząt nie-narażonej na działanie leku (NS-A-LPS vs NS-V-LPS, $p < 0,05$).

Porównanie wpływu wybranych leków psychotropowych na stężenia TNF- α

W niniejszej pracy opisano doświadczenia związane z podawaniem wielokrotnym dwóch leków przeciwdepresyjnych o różnym mechanizmie działania, to jest paroksetyny i wenlafaksyny oraz lek z grupy neuroleptyków o atypowym mechanizmie działania – aripiprazol. Analizując otrzymane wyniki, stwierdzono, że u zwierząt poddanych przewlekłe działaniu czynników stresogennych oraz jednorazowo lipopolisacharydu, badane leki przeciwdepresyjne obniżały poziomy prozapalnej cytokiny – TNF- α , z tym że paroksetyna zadziałała silniej w tym zakresie niż wenlafaksyna, ponieważ podawanie paroksetyny w większości grup badanych zwierząt spowodowało obniżenie podwyższonego stresem oraz stresem i lipopolisacharydem poziomu TNF- α . Wenlafaksyna w większości grup zwierząt nie wykazała natomiast tak zdecydowanego wpływu na poziom badanej cytokiny. Tendencję obniżającą stężenie TNF- α wenlafaksyna wykazała tylko w grupie zwierząt stresowanych i poddanych działaniu LPS. Odwrotne działanie zanotowano po stosowaniu u zwierząt przewlekłe stresowanych zwierząt neuroleptyku, bowiem aripiprazol zdecydowanie podwyższył stężenie badanej cytokiny. Podawanie tego neuroleptyku spowodowało kilkakrotne podwyższenie poziomów TNF- α zarówno w grupach zwierząt stresowanych, jak i niestresowanych, które otrzymały LPS. W grupach zwierząt niepoddanych działaniu LPS, jako dodatkowego czynnika o charakterze ostrego stresu, aripiprazol nie spowodował tak zdecydowanej reakcji.

Podsumowanie wyżej omówionych efektów działania badanych leków przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1 Schematyczne porównanie wpływu wybranych leków na stężenie TNF- α

Grupa	Paroksetyna	Wenlafaksyna	Aripiprazol
NS-LEK-SOL	↑	↔	↑
NS-LEK-LPS	↓	↑	↑↑↑
S-LEK-SOL	↓	↔	↔
S-LEK-LPS	↓↓	↓	↑↑

NS-LEK-SOL – szczury niestresowane, którym podawano dany lek
NS-LEK-LPS – szczury niestresowane, którym podawano dany lek i podano jednorazowo LPS

S-LEK-SOL – szczury stresowane, którym podawano dany lek
S-LEK-LPS – szczury stresowane, którym podawano dany lek i podano jednorazowo LPS

Omówienie

Wyniki licznych badań wskazują, iż dysregulacja funkcjonowania systemu odpornościowego spowodowana między innymi oddziaływaniem czynników stresowych, wiąże się z występowaniem licznych neuropatologicznych procesów, przyczyniając się do pojawienia zaburzeń depresyjnych. Aktywacja systemu immunologicznego przejawia się zwiększonym poziomem cytokin prozapalnych, obserwuje się wzrost uwalniania głównie IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α . Uważa się, iż trójcykliczne leki przeciwdepresyjne – TLPD (np. klomipramina) oraz leki z grupy selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny – SSRI (np. citalopram, sertralina) są zdolne do hamowania wytwarzania prozapalnych cytokin, a także aktywacji makrofagów czy limfocytów do uwalniania interleukiny IL-10 o działaniu przeciwzapalnym, powodującym wzrost jej stężenia i związaną z tym supresję wytwarzania cytokin prozapalnych (Miller i wsp. 2005, Schiepers i wsp. 2005, Sutcgil i wsp. 2007, Mesquita i wsp. 2009, Yasui i wsp. 2009, McNamara i wsp. 2011, Feltes i wsp. 2017). Wiadomo, że cytokiny, takie jak IL-1, IL-6, TNF- α , mają bezpośredni wpływ na układ nerwowy i mogą zaburzać funkcjonowanie mózgu, powodując zmiany behawioralne, takie jak anhedonia, która jest osiowym objawem depresji (Pollmacher 2002).

W niniejszej pracy w celu indukcji tego stanu w doświadczeniu zastosowano metodę chronicznego łagodnego stresu (*chronic mild stress*, CMS) opracowaną przez Willnera, zwierzęcy model odzwierciedlający część kryteriów depresji (Willner 2005). W szóstym tygodniu poddawania zwierząt czynnikom stresogennym, stwierdzono zmniejszenie spożycia roztworu sacharozy przez zwierzęta stresowane porównaniu z grupą kontrolną, pozwoliło to określić moment pojawienia się stanu anhedonii, co potwierdzają także dane uzyskane przez innych autorów (Jayatissa i wsp. 2006, Casarotto i Andreatini 2007). Następnie podawano wybrane leki przeciwdepresyjne o różnym mechanizmie działania lub atypowy neuroleptyk. Po upływie 21 dni uzyskano zniesienie anhedonii przez działanie przeciwdepresyjne paroksetyny i wenlafaksyny. Łagodzenie stanu anhedonii otrzymali także inni autorzy, badający leki, takie jak fluoksetyna czy escitalopram (Caldarone i wsp. 2015). Wpływ neuroleptyków na stan anhedonii został zbadany przez Morais i wsp. (2017). Wyniki tych badań wskazują, że haloperidol, przedstawiciel klasycznych neuroleptyków nie wpływał na stan anhedonii, a nawet wykazywał tendencję do pogłębiania tego stanu. W tym samym badaniu otrzymano zniesienie anhedonii przez zastosowanie klozapiny, należącej do grupy atypowych neuroleptyków (Morais i wsp. 2017). W niniejszym przeprowadzonym przez nas doświadczeniu stwierdzono, że podawanie aripiprazolu nie wpłynęło na stan anhedonii, co może świadczyć o braku silnego działania przeciwdepresyjnego tego atypowego neuroleptyku. Możliwe, że

profil działania aripiprazolu w tym zakresie bliższy jest działaniu typowych neuroleptyków. W ostatnim dniu doświadczenia podano jednorazowo lipopolisacharyd. Ta endotoksyna bakteryjna wyzwała silną odpowiedź immunologiczną, powoduje podwyższenie poziomu cytokin IL- β IL-6 i TNF- α (Henry i wsp. 2009, Mesquita i wsp. 2009, Stepanichev i wsp. 2014). Badania Weinsteina porównujące stężenia białka CRP, IL-6 i TNF- α we krwi u pacjentów z depresją i bez depresji udowodniły, że osoby cierpiące na depresję i poddane działaniu stresu psychicznego wykazują nadmierną aktywność układu immunologicznego i zwiększone stężenia wyżej wymienionych mediatorów zapalenia (Weinstein i wsp. 2010). U osób z depresją stwierdzono, poza podwyższonym stężeniem TNF- α w surowicy, także wyższy poziom rozpuszczalnych receptorów tej cytokiny (Himmerich i wsp. 2008).

W niniejszej pracy, analizując zmiany poziomu cytokiny prozapalnej TNF- α u zwierząt z wywołanym stanem depresyjnopodobnym, stwierdzono znamienne wzrost stężenia tej cytokiny w osoczu krwi zwierząt stresowanych w porównaniu z niestresowanymi (stanowiącymi kontrolę). Takie same wyniki uzyskano w grupie zwierząt stresowanych, którym podano jednorazowo LPS, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt niestresowanych po podaniu LPS. Wyniki te są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, dotyczącymi wzrostu cytokin prozapalnych w przebiegu depresji (You i wsp. 2011). Istotną obserwacją w naszej pracy jest jednak fakt normalizacji poziomu TNF- α u zwierząt stresowanych po zastosowaniu paroksetyny. Efektu tego nie zaobserwowano wyraźnie w wypadku wenlafaksyny. Wyniki te w części zgadzają się z przedstawionymi przez Connora i wsp., którzy nie obserwowali obniżenia poziomu TNF- α w wypadku wenlafaksyny i paroksetyny (Connor i wsp. 2000). Brak zdecydowanego wpływu wenlafaksyny na poziom prozapalnych cytokin u pacjentów również opisują w zbiorczej publikacji Feltes i wsp. (2017). Wpływ paroksetyny na stężenie prozapalnych cytokin jest niejednoznaczny. W badaniu Durairaj i wsp. paroksetyna w makrofagach poddanych działaniu LPS obniżała poziom interleukiny 6, ale podwyższała poziom TNF- α (Durairaj i wsp. 2015).

Mechanizm działania, dzięki któremu leki przeciwdepresyjne wpływają na produkcję cytokin, nie jest do końca poznany. Jedną z hipotez dotyczących tego tematu wskazuje na aktywność serotoninerгіczną leków przeciwdepresyjnych, związaną ze zwiększeniem stężenia pozakomórkowego serotoniny, a także wpływem na jej receptory i ich związek z wytwarzaniem prozapalnych cytokin. Wyniki bowiem badań Kubery i wsp. wskazały na zmniejszenie produkcji IL-6 i TNF- α przez podwyższony poziom serotoniny (Kubera i wsp. 2005, Maes i wsp. 2005).

Istnieje też hipoteza, że zwiększony poziom cyklicznego adenozyńomofosforanu (cAMP), wywołany podawaniem leków przeciwdepresyjnych (Xia i wsp.

1996, Feltes i wsp. 2017), bierze udział w oddziaływaniu tych leków na wytwarzanie cytokin (Kubera i wsp. 2001, Maes i wsp. 2005). Wykazano bowiem, że czynniki podnoszące poziom cAMP powodują obniżenie produkcji TNF- α . Udowodniono także, że hamowanie produkcji TNF- α przez fluoksetynę jest przynajmniej w części związane z aktywacją cAMP zależnej białkowej kinazy A (PKA) (Eigler i wsp. 2000, Maes i wsp. 2005). Wyniki powyższych badań być może w części tłumaczą otrzymane wyniki w niniejszej pracy. Należy jednak wspomnieć, że leki przeciwdepresyjne użyte w badaniu posiadają różne mechanizmy działania. Każdy z nich wpływa na przekazywanie serotonergiczne, ale w różnym stopniu. Najślabiej na to przekazywanie oddziałuje wenlafaksyna, być może dlatego nie uzyskano wyraźnego efektu zmian poziomu cytokiny, co mogłoby sugerować brak wpływu wenlafaksyny na układ immunologiczny w przebiegu depresji.

Wyniki badań wskazują, że w patofizjologię zaburzeń afektywnych zaangażowanych jest wiele układów i występują wzajemne zależności między nimi. Dlatego postanowiono zbadać efekt działania aripiprazolu jako leku o podstawowym mechanizmie działania związanym z układem dopaminergicznym, który przez oddziaływanie na układ serotonergiczny może także po części działać jak leki przeciwdepresyjne. Analizując otrzymane wyniki, w niniejszej pracy stwierdzono, że mimo iż sam aripiprazol nie powodował znamiennej różnicy poziomów TNF- α w surowicy zarówno szczurów stresowanych, jak i niestresowanych, to u zwierząt, które

otrzymywały lek i LPS, nastąpił znamienny wzrost stężenia tej cytokiny w porównaniu ze szczurami, które otrzymały wyłącznie LPS. Efekt ten dotyczy obu grup zwierząt – zarówno stresowanych, jak i niestresowanych. Może to świadczyć o wpływie aripiprazolu na objawy ostrego stresu lub o zwiększeniu wrażliwości szczurów na działanie ostrego stresu pod wpływem łącznego podawania leku i LPS-u, a efekt ten nie jest zwykłym sumowaniem się obserwowanych zmian stężenia, a raczej ma charakter hiperaddycji. LPS na tle podawania zwierzętom stresowanym i niestresowanym aripiprazolu również powodował znamienny wzrost stężenia TNF- α . Wynika z tego, że silniejsza reakcja zapalna zależy od łącznego podania aripiprazolu i LPS oraz, że nie jest ona związana z wcześniejszym stanem zwierząt, bowiem dotyczy zarówno grupy stresowanej, jak i niestresowanej.

Wnioski

Normalizacja przez paroksetynę poziomu TNF- α , podwyższonego stresem i LPS, może stanowić o możliwości działania tego leku na układ immunologiczny. Przeciwnie, niektóre atypowe neuroleptyki, takie jak aripiprazol, mogą wykazywać stymulujące działanie na czynniki układu immunologicznego w warunkach ostrego stresu. Stwierdzenie to jest szczególnie interesujące i prezentujące nowy kierunek badań oparty na analizie wpływu atypowych neuroleptyków na patomechanizm zaburzeń związanych z ostrym stresem. ■

The study was financed from the statutory resources of the Chair of Pharmacology of the Poznań University of Medical Sciences.

Badanie sfinansowane ze środków statutowych Katedry Farmakologii UMP.

Conflict of interest and financial support was not declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów oraz dofinansowania.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helseńskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Authors' contributions / Wkład autorów: PM – a fundamental contribution to the concept and project of the study, critical review of work in terms of significant intellectual content and acceptance of the final version for publication / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, krytyczne zrecenzowanie pracy pod kątem istotnej zawartości intelektualnej oraz akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania; KM – participation in creating the concept of work, collecting data, preparing research results, conducting a statistical analysis,

gathering the literature and preparing the work / udział w tworzeniu koncepcji pracy, zebranie danych, przygotowanie wyników badań, dokonanie analizy statystycznej, zebranie piśmiennictwa i przygotowanie pracy; AP – participation in conducting experiments, collecting data / udział w przeprowadzaniu doświadczeń, zebranie danych.

References / Piśmiennictwo

1. Bortolato B, Carvalho AF, Soczynska JK, Perini GI, McIntyre RS. The Involvement of TNF- α in Cognitive Dysfunction Associated with Major Depressive Disorder: An Opportunity for Domain Specific Treatments. *Curr Neuropharmacol* 2015; 13: 558–576.
2. Caldarone BJ, Zachariou V, King SL. Rodent models of treatment-resistant depression. *Eur J Pharmacol* 2015; 15(753): 51–65.
3. Casarotto P, Andreatini R. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia induced in rats by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007; 7: 735–742.
4. Connor TJ, Harkin A, Kelly JP, Leonard E. Olfactory bulbectomy provokes a suppression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α production in response to an in vivo challenge with lipopolysaccharide: effect of chronic desipramine treatment. *Neuroimmunomod* 2000; 7: 27–35.

5. Durairaj H, Steury MD, Parameswaran N. Paroxetine differentially modulates LPS-induced TNF α and IL-6 production in mouse macrophages. *Int Immunopharmacol* 2015; 25(2): 485–492.
6. Eigler A, Matschke V, Hartmann G, Erhardt S, Boyle D, Firestein GS *et al.* Suppression of TNF- α production in human mononuclear cells by an adenosine kinase inhibitor. *J Leukoc Biol* 2000; 68: 97–103.
7. Feltes PK, Doorduyn J, Klein HC, Juárez-Orozco LE, AJO Dierckx R, Moriguchi-Jeckel CM *et al.* Anti-inflammatory treatment for major depressive disorder: implications for patients with an elevated immune profile and non-responders to standard antidepressant therapy *J Psychopharmacology* 2017; 31(9): 1149–1165.
8. Ganança L, Oquendo MA, Tyrka AR, Cisneros-Trujillo S, Mann JJ, Sublette ME. The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Suicidal Behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2016; 63: 296–310.
9. Henry Ch, Huang Y, Wynne A, Godbout J. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun* 2009; 23: 309–317.
10. Himmerich H, Fulda S, Linseisen J, Seiler H, Wolfram G, Himmerich S *et al.* Depression, comorbidities and the TNF- α system. *Eur Psychiatry J Assoc Eur Psychiatrists* 2008; 23: 421–429.
11. Jayatissa M, Bisgaard Ch, Tingstro A, Papp M, Wiborg O. Hippocampal Cytogenesis Correlates to Escitalopram-Mediated Recovery in a Chronic Mild Stress Rat Model of Depression. *Neuropsychopharmacol* 2006; 31: 2395–2404.
12. Kim HJ, Jeong JS, Kim SR, Park SY, Chae HJ, Lee YCh. Inhibition of endoplasmic reticulum stress alleviates lipopolysaccharide-induced lung inflammation through modulation of NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway. *Scientific Rep* 2013; 3: 1142. doi: 10.1038/srep01142.
13. Kubera M, Maes M, Holan V, Basta-Kaim A, Roman A, Shani J. Prolonged desipramine treatment increases the production of interleukin-10, an antiinflammatory cytokine, in C57BL/6 mice subjected to chronic mild stress model of depression. *J Affect Disord* 2001; 63: 171–178.
14. Kubera M, Maes M, Kim Y-K, Lason W. Effect of serotonin and serotonergic agonists and antagonists on the production of TNF- α and IL-6 in human whole blood. *Psychiatry Res* 2005; 134: 251–258.
15. Leboyer M, Berk M, Yolken RH, Tamouza R, Kupfer D, Groc L. Immuno-psychiatry: an agenda for clinical practice and innovative research. *BMC Medicine* 2016; 14: 173. doi 10.1186/s12916-016-0712-5.
16. Lenze EJ, Mulsant BH, Blumberger DM, Karp JF, Newcomer JW, Anderson SJ *et al.* Efficacy, safety, and tolerability of augmentation pharmacotherapy with aripiprazole for treatment-resistant depression in late life: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2015; 386(10011): 2404–2412.
17. Maes M, Kenis G, Kubera M, De Baets M, Steinbusch H, Bosmans E. The negative immunoregulatory effects of fluoxetine in relation to the cAMP-dependent PKA pathway. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 609–618.
18. Manikowska K, Mikołajczyk M, Mikołajczak PŁ, Bobkiewicz-Kozłowska T. The influence of mianserin on TNF- α , IL-6 and IL-10 serum levels in rats under chronic mild stress. *Pharmacol Rep* 2014; 66: 22–27.
19. McNamara RK, Lotrich FE. Elevated immune-inflammatory signaling in mood disorders: a new therapeutic target? *Expert Rev Neurother* 2012; 12(9): 1143–1161.
20. Mesquita A, Correia-Neves M, Roque S, Castro A, Vieira P, Pedrosa J *et al.* IL-10 modulates depressive-like behavior. *J Psychiatr Res* 2009; 43: 89–97.
21. Miller G, Rohleder N, Stetler C, Kirschbaum C. Clinical depression and regulation of the inflammatory response during acute stress. *Psychosom Med* 2005; 67: 679–687.
22. Morais M, Patrício P, Mateus-Pinheiro A, Alves ND, Machado-Santos AR, Correia JS *et al.* The modulation of adult neuroplasticity is involved in the mood-improving actions of atypical antipsychotics in an animal model of depression. *Transl Psychiatry* 2017; 7: 1146.
23. Pollmacher T. Low levels of circulating inflammatory cytokines – Do they affect human brain functions? *Brain Behav Immun* 2002; 16: 525–532.
24. Schiepers O, Wichers M, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 201–217.
25. Shyamsundar M, McKeown ST, O’Kane CM, Craig TR, Brown V, Thickett DR *et al.* Simvastatin Decreases Lipopolysaccharide-induced Pulmonary Inflammation in Healthy Volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(12): 1107–1114.
26. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci* 2014; 8: art.315.
27. Stepanichev M, Dygalo NN, Grigoryan G, Shishkina GT, Gulyaeva N. Rodent Models of Depression: Neurotrophic and Neuroinflammatory Biomarkers. *BioMed Res Int* 2014; Article ID 932757, 20 pages.
28. Sutçigil L, Oktenli C, Musabak U, Bozkurt A, Cansever A, Uzun O *et al.* Pro- and Anti-Inflammatory Cytokine Balance in Major Depression: Effect of Sertraline Therapy. *Clin Develop Immun* 2007; Article ID 76396, 1–6.
29. Weinstein AA., Deuster PA, Francis JL, Bonsall RW, Tracy RP, Kop WJ. Neurohormonal and inflammatory hyper-responsiveness to acute mental stress. *Biol Psychol* 2010; 84(2): 228–234.
30. Willner P. Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychobiology* 2005; 52: 90–110.
31. Xia Z, DePierre JW, Nassberger L. Tricyclic antidepressant inhibit IL-6, IL-1 β , TNF α and release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cell. *Immunopharmacol* 1996; 34: 27–37.
32. Yasui T, Yamada M, Uemura H, Ueno S, Numata S, Ohmori T *et al.* Changes in circulating cytokine levels in midlife women with psychological symptoms with selective serotonin reuptake inhibitor and Japanese traditional medicine. *Maturitas* 2009; 62: 146–152.
33. Yoshimura R, Kishi T, Hori H, Ikenouchi-Suita A, Katsuki A, Umene-Nakano W *et al.* Comparison of the efficacy between paroxetine and sertraline augmented with aripiprazole in patients with refractory major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2012; 39: 355–357.
34. You Z, Luo Ch, Zhang W, Chen Y, He J, Zhao Q *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat’s brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression. *Behav Brain Res* 2011; 225: 135–141.