

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20152> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Dalm, Sergiu

Title: Towards a mouse model of depression : a psychoneuroendocrine approach

Issue Date: 2012-11-21

Hoofdstuk 10

Samenvatting

Wereldwijd behoort depressie tot een van de meest voorkomende ziektebeelden. Het is een stemmingsstoornis welke zich kenmerkt door een verminderde levenslust of zware neerslachtigheid, en die ertoe bijdraagt dat een individu moeite heeft met het uitvoeren van alledaagse taken. Behandeling met antidepressiva en kortdurende, gestructureerde psychotherapie hebben geen effect bij 20-40% van de mensen. Effectievere geneesmiddelen en behandelingen zijn daarom dringend nodig.

De complexe aard van depressie, waarbij meerdere hersenfuncties betrokken zijn, bemoeilijkt de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Er zijn aanwijzingen dat chronische stress leidt tot verhoogde kans op ontwikkeling van depressie, in individuen met een genetische aanleg. Stress leidt tot activatie van de Hypothalamus-Hypofyse-Bijnier-(HHB-) as, waarna de bijnieren de glucocorticoïden (stresshormonen) meer cortisol en corticosteron (verder aangeduid als "CORT") in het bloed uitscheiden. Deze verhoging in de CORT concentratie komt bovenop de reeds aanwezige ultradiane en circadiane ritmes van het stresshormoon. Het ultradiane ritme geeft de amplitude en frequentie van de pulsatiele hormoonafgifte aan. Het circadiane ritme weerspiegelt de schommelingen in het dag-en nachtritme. Bij het aanbreken van de actieve periode (bij mensen is dit het begin van de lichtperiode; bij muizen is dit het begin van de donkerperiode) bereikt het circulerend CORT niveau zijn circadiane piek waarde. Deze wordt gekenmerkt door een grotere amplitude in de pulsen van CORT afgifte door de bijnieren die ieder uur voorkomen. De effecten van CORT komen tot stand na binding aan de mineralocorticoid- en glucocorticoid receptoren (MR en GR respectievelijk). MR is betrokken bij de activatie van de HHB-as in reactie op een stress, en bij de gedragsresponse dien ten gevolge. Wanneer door de stressde CORT concentratie toeneemt, wordt de GR geactiveerd dat leidt tot normalisatie van de HHB-as activiteit. Tevens is de GR betrokken bij leer- en geheugen processen. Deze endocriene reactie op stress zorgt ervoor dat (i) het individu zich kan aanpassen aan de stressvolle situatie en (ii) het individu leert hoe er mee om te gaan indien een soortgelijke stressvolle situatie zich weer voordoet.

Het doel van het in dit proefschrift beschreven promotie-onderzoek was om een muismodel voor depressie te ontwikkelen. Het model is gebaseerd op de blootstelling van muizen aan de aanwezigheid van ratten, wat diende als een chronische stressor.

Gebruikmakend van ons muismodel is onderzocht hoe chronisch stress kan leiden tot verstoringen in emotionele en cognitieve processen die kenmerkend zijn voor symptomen van depressie zoals die mensen voorkomt. Het meest kenmerkende symptoom van depressie is een verminderde reactie op positieve prikkels, dat *anhedonie* wordt genoemd. *Anhedonie* is in ons muismodel gemeten door te bepalen of er een

afname of verandering plaatsvond in de reactie op een aangeboden positieve prikkel (beloning).

Alvorens we de effecten van chronische stress op HHB-as activatie en activiteit in ons muismodel hebben bestudeerd, werd eerst de basale circadiane (licht/donker ritme) 24 uren CORT concentratie bepaald. Tevens is op de tijdstippen dat de CORT concentratie het laagst en het hoogst is, de expressie van MR en GR in de hersenen, en het adrenocorticotroop hormoon (ACTH) bepaald in 3, 9, en 16 maanden oude mannelijke C57BL/6J muizen. Deze resultaten staan beschreven in **Hoofdstuk 2**.

De 9 maanden oude muizen vertoonden *hypercortisisme* (te veel CORT). Daarentegen, de 16 maanden oude muizen vertoonden *hypocortisisme* (te weinig CORT), also ook een verhoogde ACTH concentratie in het bloed gedurende de dag. De expressie van MR en GR mRNA was lager in de hippocampus van de 9 maanden oude muizen, terwijl de expressie in de 16 maanden oude muizen vergelijkbaar was met die van 3 maanden oude muizen. Verder liet de parvocellulaire paraventriculaire kern (PVN) in de hypothalamus van de 16 maanden oude muizen een zeer hoge expressie van vasopressine mRNA en een significante verhoging van MR mRNA zien.

We concluderen dat de activiteit van de HHB-as mede door de leeftijd wordt bepaald en dat de maximale CORT afgifte over de leeftijd zich laat zien als een omgekeerde U-vorm. Niet de oudste dieren, maar de 9 maanden oude dieren vertonen de hoogste maximale CORT afgifte. De 3 maanden oude muizen hebben een HHB-as activiteit waarbij we voorzagen dat de effecten van chronische stress het best meetbaar zou zijn. Voor de rest van de in deze thesis beschreven onderzoeken is gebruikt gemaakt van de 3 maanden oude muizen.

De traditionele methoden voor het toedienen van geneesmiddelen bij muizen (b.v. subcutaan, intraperitoniaal of *per os*) zorgen voor een stressreactie. Deze stressreactie kan ertoe leiden dat zowel de werking van het geneesmiddel wordt beïnvloed, als ook het eventuele daarna bepaalde gedrag. Daar we in ons chronisch stressmodel de GR antagonist RU38486 (ook wel bekend als mifepristone –MIF- dat klinische resultaten laat zien) wilde gaan toedienen (zie **Hoofdstuk 4**), en we dat gepaard wilde gaan met een zeer lage stressreactie, is een nieuwe niet-invasieve en stressvrije methode ontwikkeld welke beschreven staat in **Hoofdstuk 3**. Voor deze toediening is gebruikt gemaakt van havervlokken waarop de te in te brengen stof is toegevoegd. Deze toediening via havervlokken werd vergeleken met toediening via injecties en orale toediening, door de stress/CORT reactie in het bloedplasma te meten.

De consumptie van de onbehandelde havervlokken veroorzaakte een kleine toename in de CORT concentratie na 15 minuten ($< 50\text{ng/ml}$), welke na 30 minuten terugkeerde naar de eerdere lage basale waarde ($< 10\text{ng/ml}$). Zowel de toediening *per os* als de intraperitoneale injectie resulteerde in een langdurige CORT verhoging 30 en 60 minuten na toediening (respectievelijk $> 100\text{ng/ml}$ en $\sim 50\text{ng/ml}$).

Om te weten of de havervlok methode ook gebruikt kon worden om CORT-pulsen te induceren, werden 3 verschillende doseringen van CORT toegediend. Dit gebeurde bij muizen waarbij bijnieren waren verwijderd, zodoende dat het endogene CORT niet van invloed was op de CORT metingen. Het toedienen van CORT via havervlokken resulteerde in een 3 maal hogere plasma-CORT waarde in de 15.0mg/kg groep ($\pm 250\text{ng/ml}$) in vergelijking met de 4.5mg/kg groep 30 en 90 minuten later. De toediening van mifepristone (MIF - 200mg/kg) via havervlokken leidde eveneens tot een verhoging van plasma CORT die ten minste acht uur duurde.

Het toedienen van medicatie via de consumptie van havervlokken is een goede, niet-invasieve methode. De toediening gaat gepaard met een zeer lage stress/CORT reactie en met kan er tevens een CORT-pulse mee genereren. Deze toedieningsmethode wordt verder toegepast in **Hoofdstuk 4**.

In **Hoofdstuk 4** zijn de effecten beschreven van een éénmalige en herhaalde GR blokkade middels de GR-antagonist MIF, op circadiane CORT veranderingen en stressgeïnduceerde neuro-endocriene en gedragsmatige reacties. De opzet van dit experiment kwam wat betreft de dosis en de tijdsduur van behandeling overeen met de succesvol gebleken therapie toegepast bij patiënten die lijden aan een psychotische depressie. Mannelijke C57BL/6J muizen gedurende 1 week/1x per dag een zeer hoge dosis MIF (200mg/kg) via havervlokken toegediend (zie **Hoofdstuk 3**). De CORT concentratie in bloed werd gedurende 24 uur gemeten op dag 1 (1XMIF) en dag 7 (7XMIF) na toediening, en vergeleken met een controle groep, die havervlokken kregen met daarin alleen het oplosmiddel.

De éénmalige toediening van de zeer hoge dosis van MIF resulteerde in zeer hoge CORT concentraties, terwijl herhaalde toediening van dezelfde hoge concentratie (7XMIF) leidde tot een geleidelijke verlaging in HHB-as activatie. Een mogelijke verklaring voor dit onverwachte resultaat is dat de hoge CORT concentratie de activiteit van de HHB-as onderdrukt via GR activatie, nadat MIF van de GR gedissocieerd is. Deze terugkoppeling via CORT bleef tot 32 uur na de laatste toediening van MIF aanwezig vanwege genomische processen, waarbij de CORT concentratie zelfs nog lager was dan eerder gemeten.

De expressie van de CORT receptoren MR en GR in de hersenen zijn ook bepaald. Terwijl de GR in de hersenen en hypofyse achtereenvolgens door MIF werden geblokkeerd, en door het endogene CORT werden geactiveerd, zijn de MR in de hersenen vrij toegankelijk voor CORT. Als gevolg hiervan was de MR expressie in de hippocampus aanvankelijk lager tijdens de hoge CORT concentratie, maar was deze verhoogd na herhaalde toediening van de GR-antagonist in het CA2 gebied van de hippocampus. Toediening van MIF leidde ook tot een verandering in de gedragsparameters gemeten in de 'circular hole board test' (= een ronde plaat met gaten, zonder wanden, waar de dieren getest worden op exploratief gedrag). De 1xMIF muizen waren hyperactief, terwijl de 7xMIF muizen een voorkeur hadden voor het gebruik van een meer seriële zoekstrategie. Een dergelijke voorkeur voor zoekstrategie wijst eveneens op beïnvloeding van de centrale MR functie die betrokken is bij de beoordeling van een situatie, en bij de vervolgens gekozen strategie om met die situatie om te gaan.

Concluderend, dagelijkse herhaalde toediening van een hoge dosis MIF, leidde in tegenstelling tot onze verwachting niet tot hypercortisisme, maar juist normalisering van circulerende CORT gehaltes opleverde. De onderdrukking van de HHB-as activiteit komt vermoedelijk tot stand doordat na het dissociëren van MIF van de GR, de hoge CORT concentratie de GR activeert en zo de HHB-as activiteit onderdrukt. De dagelijkse MIF toediening gaat gepaard met MR gerelateerde processen, omdat deze receptor door de antagonist ongemoeid gelaten wordt (Wulsin et al., 2010). De activatie van MR kan ook de activatie van de HHB-as remmen.

Voordat de effecten van chronisch stress op leer en geheugenprocessen werd bepaald (zie **Hoofdstukken 6, 7, en 8**), is bepaald welke gedragstaak daarvoor het meest geschikt zou zijn. Hiervoor zijn twee veel gebruikte gedragstaken vergeleken: de 'circular hole board' en 'de water maze', zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**. Tevens werd de beïnvloeding van het ruimtelijk geheugen door beloning in deze gedragstaken onderzocht. Als beloning was gekozen het vrijwillige innemen van een hoeveelheid suikerkorrels in de thuishooi, direct (0-uur groep) of 4-uur (4-uur groep) na de leertaak. De controle dieren kregen geen suiker.

Op zowel de 'circular hole board' als in de 'water maze' vertoonden de muizen die direct na de training suiker als beloning kregen (0-uur) superieure prestaties. Ze vonden de ontsnappingslocatie sneller en onthielden die beter. Het effect van de suikerbeloning op de leerprestatie was zichtbaar op verschillende tijdstippen tijdens de training. Bij de 'circular hole board' was dit effect reeds meteen zichtbaar vanaf de eerste trainingsdag, maar bij de 'water maze' pas tijdens de 4^{de} en 5^{de} trainingsdag.

De resultaten tonen aan dat een suikerbeloning die direct na de training gegeven wordt, het geheugen van het zojuist geleerde gedrag kan versterken. Deze bevinding is in overeenstemming met de theorie 'reinforcement and memory' opgesteld door Huston & Oitzl (1989). Op basis van de bevindingen in **Hoofdstuk 5** is gekozen voor de 'circular hole board' in de vervolggexperimenten om de rol van beloning en de effecten van chronische stress op leer- en geheugenprocessen (**Hoofdstukken 6, 7 en 8**) te bestuderen

In **Hoofdstuk 6** werd het effect van chronische stress op de dagelijkse organisatie van foeragerend en exploratief gedrag in de bekende omgeving van de thuiskooi onderzocht. Als stressor werd gekozen voor de herhaalde blootstelling van de muis aan de aanwezigheid van een rat. De rat kon door de muis wel worden geroken en gezien, maar zonder dat er fysiek contact mogelijk was.

Deze 'rat stress' leidde tot een verlaging in verkennende en foeragerende activiteiten (regelmatig terugkerend zoeken en vinden van voedsel) van de muis in de thuiskooi. Er werd meer tijd in de schuilplaats doorgebracht en minder tijd in de open ruimte, wat duidt op angst. Tevens vertoonden de gestresste muizen een verminderde consumptie van sucrose en een langzamere ontwikkeling in de voorkeur voor een sucrose oplossing boven water. Daarbij gebruikten de muizen een meer persistente zoekstrategie tijdens het verkennen van de 'circular hole board' terwijl de locomotorische activiteit onveranderd bleef.

De resultaten laten zien dat ons chronisch stress model, d.i. de herhaalde blootstelling van muizen aan de aanwezigheid van een rat ('rat stress'), een verandering in het beloningssysteem teweegbrengt. Dit is af te leiden uit een afname in verkennende en foerageeractiviteiten, als ook een verminderde reactie op een belonende stimulus. Deze verminderde reactie op een beloning kan gedefinieerd worden als *anhedonie*, een belangrijk symptoom dat kenmerkend is voor depressie.

In **Hoofdstuk 7** werd een combinatie van eerder toegepaste en ontwikkelde methoden gebruikt om verdere effecten van de 'rat stress' procedure op leer-, geheugen- en beloningsprocessen te bepalen. Dit gebeurde in een nieuwe omgeving buiten de thuiskooi. Hiertoe werden de volgende parameters bepaald na afloop aan de blootstelling aan de chronische stressor: leer- en geheugenprocessen met en zonder suikerbeloning, de reactie op positieve prikkels en de CORT concentratie in het bloed.

De chronische 'rat stress' onderdrukte de gedragsrespons tijdens blootstelling aan een nieuwe omgeving en verminderde het effect van suikerbeloning op de geheugenprocessen. Suikerbeloning verbeterde de ruimtelijke leerprestatie bij controle

muizen. Daarnaast werd de verminderde leerprestatie bij gestresste muizen verbeterd door de beloning, waardoor ze evengoed presteerden als de controle muizen die geen suikerbeloning hadden gekregen. Verder vertoonden de gestresste muizen die na training op de 'circular hole board' de suikerbeloning hadden kregen, een voorkeur voor de fles met water die was aangeboden op de plaats waar eerder een fles met sucrose was geplaatst. Een dag na afloop van de chronische 'rat stress' periode was de totale CORT secretie tijdens de lichtperiode hoger dan die een week later gemeten.

Concluderend, de chronische 'rat stress' zorgt voor veranderingen die wijzen op verschijnselen van anhedonie. Daarnaast blijkt een suikerbeloning de door stress veroorzaakte emotionele en cognitieve stoornissen gedeeltelijk te herstellen. De resultaten suggereren dat een beloning een deel van de negatieve gevolgen van de chronische 'rat stress' op het geheugenproces, kan verbeteren.

Informatie wordt door de hersenen op verschillende manieren verwerkt en bewaard voor gebruik indien nodig. Eerdere studies hebben aangetoond dat door acute stress eerder gebruik gemaakt wordt van een directe stimulus-respons strategie dan van een hippocampus-afhankelijke ruimtelijke leer- en geheugenprocessen om een leertaak uit te voeren. In **Hoofdstuk 8** is bij muizen en mensen onderzocht of chronische stress hetzelfde effect heeft als acute stress, op het gebruik van één of beide leer en geheugensystemen in een vergelijkbare leertaak. Hiertoe moesten de muizen de locatie van een uitgang vinden op de 'circular hole board', terwijl de mensen de locatie van een voorwerp dienden te onthouden in een 2-dimensionele leertaak.

De mannelijke C57BL/6J muizen die blootgesteld waren aan 'rat stress' maakten vaker gebruik van een stimulus-respons strategie (33%) dan de controle dieren, die vasthielden aan de hippocampus-afhankelijke zoekstrategie. Veertig gezonde proefpersonen werden verdeeld in een 'hoge chronische stress' en een 'lage chronische stress'-groep op basis van hun antwoorden op vragen uit een vragenlijst (de "Trier Inventaris van Chronische Stress"-TICS), waarmee de symptomen van chronische stress bepaald kunnen worden. Van de proefpersonen behorende bij de "hoge chronische stress" groep gebruikte 94% vaker de stimulus-respons leerstrategie, terwijl dit bij de "lage chronische stress" groep slechts 52% was.

Concluderend, chronische stress beïnvloedt voornamelijk de kwaliteit van het leren. Dit betekent dat chronische stress beïnvloedt *welk* leer- en geheugensysteem wordt gebruikt, en zo dus *hoe* een individu leert. De verschuiving naar het gebruik van de meer *rigide* vorm van stimulus-respons leren lijkt één van de gevolgen van chronische

stress. Dit kan ertoe bijdragen dat een individu kwetsbaarder wordt voor de gevolgen van een toekomstige stresssituatie.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 9**, komen we tot de volgende conclusies:

- 1) Ons chronische 'rat stress' model waarbij muizen herhaaldelijk en op onvoorspelbare tijden worden blootgesteld aan de aanwezigheid van een rat, voldoet aan de 'construct en face validity criteria' voor depressie.
- 2) De langdurig verminderde reactie op beloning, die wordt gezien als kenmerk van anhedonie, werd geïnduceerd in ons chronisch stress model als een symptoom van depressie.
- 3) Een voorgeschiedenis van chronische stress resulteert bij muizen en mensen in een toename van het gebruik van stimulus-response (minder flexibel) leren en gaat ten kosten van het ruimtelijk (meer flexibel) leren.
- 4) Starheid in gedrag, uitgedrukt als een geremdheid en een minder flexibele manier van leren, lijkt één van de gevolgen van chronische stress die er toe kan leiden dat een individu gevoelig wordt voor toekomstige stressvolle situaties.
- 5) De nieuwe methodiek om stress (en de gevolgen ervan) te verlagen via toediening van het 'anti-stress' medicijn mifepristone, of via extra positieve prikkels en beloning tijdens gedragstaken vergroot het welzijn van de muizen en kan – vertaald naar de menselijke situatie - beschermen tegen de gevolgen van depressie.
- 6) De dagelijkse blokkade van GR met de zeer hoge doses van mifepristone kan de HHB-as onderdrukken doordat de verhoging van het endogene CORT de negatieve terugkoppeling van de HHB-as tot stand brengt. Hierbij zijn zowel de GR betrokken die beschikbaar worden na het verdwijnen van de antagonist, als ook de MR die door verhoging in CORT extra geactiveerd worden. De veranderingen in neuroendocriene functie wordt ook gezien in exploratief gedrag dat overgaat van hyperactiviteit naar een meer seriële zoekstrategie bij herhaalde toediening.
- 7) Een geïnduceerde verandering in de expressie en activatie van de MR-GR kan leiden tot een nieuwe klasse van medicijnen tegen depressie of psychotische aandoeningen.