

Sildenafil, alleen en in kombinasie met imipramien, vertoon antidepressantagtige effekte in 'n tydafhanklikesensitiseringgeïnduseerde (TAS-) rotmodel van behandelingsweerstandige depressie

JLB Saayman,¹ BH Harvey,^{1,2,3,4} G Wegener,⁵ CB Brink¹

¹ Sentrum van Uitnemendheid vir Farmaseutiese Wetenskappe (Pharmacen™), Fakulteit Gesondheidswetenskappe, Noordwes-Universiteit, Suid-Afrika

² Eenheid vir Risiko en Veerkragtigheid in Geestesversteurings, Suid-Afrikaanse Mediese Navorsingsraad, Suid-Afrika

³ Departement Psigiatrie en Instituut vir Neurowetenskap, Universiteit van Kaapstad, Suid-Afrika

⁴ Die Instituut vir Geestes- en Fisieke Gesondheid en Kliniese Translasie, Skool vir Geneeskunde, Deakin-universiteit, Australië

⁵ Translasionele Neuropsigiatrie Eenheid, Departement Kliniese Geneeskunde, Aarhus-universiteit, Denemarke

Korresponderende outeur: Tiaan Brink **E-pos:** Tiaan.Brink@nwu.ac.za

Agtergrond: Ten spyte van talle farmakoterapieë tot ons beskikking om major depressiewe versteuring (MDV) te behandel, heers daar uiters hoë koerse van behandelingsweerstandigheid, terwyl lastige nuwe-effekte algemeen voorkom. Om hierdie uitdagings die hoof te bied en behandelingsuitkomst te verbeter, is daar 'n dringende behoefte aan nuwe, verbeterde en beter verdraagde farmakologiese opsies. Bewyse dui daarop dat dit noodsaaklik is om ander gemoedsmodulerende biochemiese stelsels benewens die monoaminergiese stelsel te teiken, wat belowende alternatiewe bied. In hierdie verband verteenwoordig patofisiologiese kenmerke van MDV, met inbegrip van hiperaktiwiteit van die hipotalamus-pituitêre-bynier-as (HPB-as), verswakte neuroplastisiteit, neuro-inflammasie, immuundisfunksie en oksidatiewe stres, teikens van belang. Die selektiewe fosfodiësterasetipe 5-inhibeerder (FDE5-inhibeerder), sildenafil, is een so 'n potensiële kandidaat, met prekliniese data wat daarop dui dat dit oor antidepressantagtige eienskappe beskik. Hoewel dit tans spekulasie is, kan hierdie aksies moontlik veranderde neuroplastisiteit behels, asook anti-inflammatoriese en antioksidant-aksies. Die terapeutiese potensiaal daarvan in behandelingsweerstandige depressie (BWD) is egter nog nie ondersoek nie.

Doel: Om te ondersoek of sildenafil, hetsy as 'n monoterapie of as aanvulling by 'n tradisionele antidepressant, antidepressantagtige biogedragseffekte kan uitoefen in 'n knaagdiermodel van BWD, en of sodanige aksies die bogenoemde prosesse behels.

Metodes: 'n Tydafhanklikesensitisering-geïnduseerde (TAS-geïnduseerde) model van BWD in Flinders Sensitive Line- (FSL-) manlike rotte is gebruik. TAS-naïewe groepe is ongestoord gelaat vanaf nageboortelike dag 40 (NGD40) tot NGD54, terwyl TAS-blootgestelde groepe vanaf nageboortelike dag NGD40 aan 'n TAS-paradigma onderwerp is. Vanaf NGD55 het rotte vir 10 dae óf draerstof (VEH), óf imipramien (15 mg/kg/dag) (IMI-15), sildenafil (3 mg/kg/dag) (SIL-3), sildenafil (10 mg/kg/dag) (SIL-10) of IMI-15 + SIL-3 ontvang. Die oopveldtoets (OVT) en geforseerde swemtoets (GST) is onderskeidelik op NGD62 en NGD63 uitgevoer. Vlakke van hippokampale breinafgeleide neurotrofiese faktor (BANF), serotonien (5-HT), norepinefrien (NE), glutatioon (GSH) en glutatioondisulfied (GSSG) is op NGD65 ontleed.

Resultate: TAS-blootstelling het immobiliteitstyd in FSL-rotte (depressiefagtige gedrag) in die GST ($p = 0,0186$) vergelyke met stresnaïewe FSL-rotte verleng. Subchroniese IMI-15-behandeling het immobiliteit in TAS-blootgestelde rotte verlaag, vergeleke met VEH-behandelde TAS-blootgestelde rotte ($p = 0,0097$), en het dus 'n behandelingsreaksie in TAS-rotte veroorsaak. SIL-10 ($p = 0,0196$), en IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0005$) was soortgelyk effektief, terwyl SIL-3 nie was nie. Wat belangrik is, is dat SIL-3 die antidepressantagtige effekte van IMI-15 aangevul het, met IMI-15 + SIL-3 wat groter immobiliteitverlagende vermoë getoon het, vergeleke met IMI-15, in TAS-blootgestelde rotte. Boonop het TAS-blootstelling die vlakke van hippokampale BANF ($p = 0,0007$), 5-HT ($p < 0,0001$), NE ($p = 0,0227$), GSH ($p < 0,0001$) en GSSG ($p = 0,0185$) in FSL-rotte verhoog, vergeleke met nie-gestresde FSL-rotte. IMI-15 ($p = 0,0317$) en SIL-10 ($p = 0,0078$) het hippokampale BANF-vlakke in TAS-blootgestelde rotte verlaag, maar het nie hippokampale 5-HT-, NE-, GSH- en GSSG-vlakke beïnvloed nie, vergeleke met VEH. Daarbenewens, vergeleke met VEH, het subchroniese SIL-3-behandeling hippokampale GSH-vlakke ($p = 0,0018$) van TAS-blootgestelde rotte verlaag sonder om hippokampale BANF-, 5-HT-, NE- en GSSG-vlakke te verander. Subchroniese IMI-15 + SIL-3-behandeling het vlakke van hippokampale BANF ($p = 0,0024$), 5-HT ($p = 0,0115$), GSH ($p < 0,0001$) en GSSG ($p = 0,0002$) by TAS-blootgestelde rotte vergeleke met VEH, maar sonder om hippokampale NE-vlakke te beïnvloed. SIL-3 het die 5-HT- ($p = 0,0115$) en GSSG-verlagende ($p = 0,0002$) effekte van IMI-15 versterk, met IMI-15 + SIL-3 wat statistiese betekenisvolheid in TAS-blootgestelde rotte bereik het, maar wat nie met IMI-15 nie of SIL-3 alleen die geval was nie. Laastens het SIL-3 die GSH-verlagende werking van IMI-15 ($p < 0,0001$) versterk, vergeleke met SIL-3 alleen ($p = 0,0018$), terwyl IMI-15 op sigself geen sodanige effekte in TAS-blootgestelde rotte gehad het nie.

Gevolgtrekking: TAS + FSL rotte het depressiewe gedrag en bewyse van oksidatiewe stres getoon, maar paradoksaal het hulle verhoogde hippokampale monoamiene en BANF gehad. Hierdie oënskynlik teenregulerende werking van BANF word herbevestig deur IMI-15, SIL-10 en IMI-15 + SIL-3, wat verhoogde BANF en depressiefagtige gedrag in TAS + FSL-rotte omgekeer het. Ook het SIL-3 slegs sommige redoksveranderinge omgekeer, terwyl IMI-15 + SIL-3 serotonergiese en alle redoksveranderinge omgekeer het. SIL-3 het die antidepressantagtige effekte van IMI-15 in TAS-blootgestelde rotte aangevul.

Sleutelwoorde

Behandelingsweerstandige depressie, Flinders Sensitiewe Lyn-rot, fosfodiësterase tipe 5-inhibeerder, major depressiewe versteuring, sildenafil, Sprague-Dawley-rot, tydafhanklike sensitisering.

Betekenisvolle uitkomst

- TAS + FSL-rotte presenter met 'n beduidend groter mate van depressiefagtige gedrag vergeleke met FSL-rotte.
- TAS + FSL-rotte vertoon verhoogde hippokampale BANF-, 5-HT-, NE-, GSH- en GSSG-vlakke vergeleke met FSL-rotte.
- IMI-15, SIL-10 en IMI-15 + SIL-3 het depressiefagtige gedrag in TAS + FSL-rotte omgekeer.
- Subchroniese behandeling met IMI-15, SIL-3, SIL-10 en/of IMI-15 + SIL-3 het verhoogde hippokampale BANF-, 5-HT-, GSH- en/of GSSG-vlakke in TAS + FSL-rotte verlaag.
- SIL-3 het die antidepressantagtige effekte van IMI-15 in TAS + FSL rotte aangevul.

Beperkings

- Hierdie studie het slegs van manlike FSL-rotte gebruik gemaak.
- Die hippokampale sGMF-vlakke van die rotte is nie in hierdie studie gemeet nie.
- Weerstandigheid teen antidepressantbehandeling is nie met IMI-15 gedemonstreer nie.

Sildenafil, alone and in combination with imipramine, displays antidepressant-like effects in a time-dependent sensitisation-induced (TDS) rat model of treatment-resistant depression:

Background: Despite numerous pharmacotherapies at our disposal to treat major depressive disorder (MDD), extremely high rates of treatment resistance prevail, while burdensome side effects are common. To address these challenges and improve treatment outcomes, there is an urgent need for novel, improved and better-tolerated pharmacological options. Evidence suggests that targeting mood-modulating biochemical systems other than the monoaminergic system is essential, offering promising alternatives. In this regard, pathophysiological features of MDD, including hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis hyperactivity, impaired neuroplasticity, neuroinflammation, immune dysfunction and oxidative stress, represent targets of interest. The selective phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitor, sildenafil, is one such potential candidate, with pre-clinical data suggesting it has antidepressant-like properties. Although speculative, these actions may involve altered neuroplasticity, and anti-inflammatory and antioxidant actions. However, its therapeutic potential in treatment resistant depression (TRD) has not been explored.

Aim: To investigate whether sildenafil, either as a monotherapy or as augmentation with a traditional antidepressant, can exert antidepressant-like bio-behavioural effects in a rodent model of TRD, and whether such actions involve the above-mentioned processes.

Methods: A time-dependent sensitisation-induced (TDS-induced) model of TRD in Flinders Sensitive Line (FSL) male rats was used. TDS-naïve groups were left undisturbed from postnatal day 40 (PND40) to PND54, whereas TDS-exposed groups were subjected to a TDS paradigm from postnatal day PND40. Starting on PND55, rats received either vehicle control (VEH), imipramine (15 mg/kg/day) (IMI-15), sildenafil (3 mg/kg/day) (SIL-3), sildenafil (10 mg/kg/day) (SIL-10) or IMI-15 + SIL-3 for 10 days. The open field test (OFT) and forced swim test (FST) were performed on PND62 and PND63, respectively. Hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF), serotonin (5-HT), norepinephrine (NE), glutathione (GSH), and glutathione disulphide (GSSG) levels were assayed on PND65.

Results: TDS exposure elevated immobility time in FSL rats (depressive-like behaviour) in the FST ($p = 0,0186$) compared to stress-naïve FSL rats. Sub-chronic IMI-15 treatment decreased immobility in TDS- compared to VEH-treated TDS-exposed rats ($p = 0,0097$), hence inducing a treatment response in TDS rats. SIL-10 ($p = 0,0196$), and IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0005$) were similarly effective while SIL-3 was not. Importantly, SIL-3 augmented the antidepressant-like effects of IMI-15, with IMI-15 + SIL-3 displaying greater immobility-reducing capability compared to IMI-15 in TDS-exposed rats. Moreover, TDS exposure elevated hippocampal BDNF ($p = 0,0007$), 5-HT ($p < 0,0001$), NE ($p = 0,0227$), GSH ($p < 0,0001$), and GSSG ($p = 0,0185$) levels in FSL rats compared to non-stressed FSL rats. IMI-15 ($p = 0,0317$) and SIL-10 ($p = 0,0078$) reduced hippocampal BDNF levels in TDS-exposed rats but did not influence hippocampal 5-HT, NE, GSH, and GSSG levels compared to VEH. In addition, compared to VEH, sub-chronic SIL-3 treatment reduced hippocampal GSH ($p = 0,0018$) levels of TDS-exposed rats without altering hippocampal BDNF, 5-HT, NE, and GSSG levels. Sub-chronic IMI-15 + SIL-3 treatment reduced hippocampal BDNF ($p = 0,0024$), 5-HT ($p = 0,0115$), GSH ($p < 0,0001$), and GSSG ($p = 0,0002$) levels of TDS-exposed rats compared to VEH, but without affecting hippocampal NE levels. SIL-3 augmented the 5-HT- ($p = 0,0115$) and GSSG-lowering ($p = 0,0002$) effects of IMI-15, with IMI-15 + SIL-3 reaching statistical significance in TDS-exposed rats but not IMI-15 or SIL-3 alone. Finally, SIL-3 augmented the GSH-reducing action of IMI-15 ($p < 0,0001$) compared to SIL-3 alone ($p = 0,0018$), whereas IMI-15 by itself had no such effects in TDS-exposed rats.

Conclusion: TDS + FSL rats displayed depressive-like behaviour and evidence for oxidative stress but paradoxically with elevated hippocampal monoamines and BDNF. This apparent counterregulatory action of BDNF is reaffirmed by IMI-15, SIL-10, and IMI-15 + SIL-3 reversing elevated BDNF and depressive-like behaviour in TDS + FSL rats. Also, SIL-3 only reversed some redox changes, whereas IMI-15 + SIL-3 reversed serotonergic and all redox changes. SIL-3 augments the antidepressant-like effects of IMI-15 in TDS-exposed rats.

Keywords

Flinders Sensitive Line rat, major depressive disorder, phosphodiesterase type 5 inhibitor, sildenafil, time-dependent sensitisation, treatment-resistant depression.

Significant outcomes

- TDS + FSL rats present with significantly greater depressive-like behaviour compared to FSL rats.
- TDS + FSL rats display elevated hippocampal BDNF, 5-HT, NE, GSH, and GSSG levels compared to FSL rats.
- IMI-15, SIL-10, and IMI-15 + SIL-3 reversed depressive-like behaviour in TDS + FSL rats.
- Sub-chronic IMI-15, SIL-3, SIL-10 and/or IMI-15 + SIL-3 treatment reduced elevated hippocampal BDNF, 5-HT, GSH, and/or GSSG levels in TDS + FSL rats.
- SIL-3 augmented the antidepressant-like effects of IMI-15 in TDS + FSL rats.

Limitations

- This study only made use of male FSL rats.
- Hippocampal cGMP levels of the rats were not measured in this study.
- Antidepressant treatment resistance was not demonstrated with IMI-15.

Inleiding

Major depressiewe versteuring (MDV) is 'n ernstige, aftakelende en hoogs ongeskiktheidveroorsakende gemoedsversteuring (Bylund & Reed, 2007; Reiersen *et al.*, 2011; National Institute of Mental Health, 2023) met 'n kenmerkend chroniese, terugvallende of herhalende verloop van die siekte (Preboth, 2000; Hardeveld *et al.*, 2010; Reiersen *et al.*, 2011; Ten Have *et al.*, 2018; Verhoeven *et al.*, 2018). Benewens die feit dat MDV die grootste oorsaak van gestremdheid wêreldwyd is (Preboth, 2000; Friedrich, 2017), is MDV 'n groot bydraer tot die wêreldwye las van siektes (Vos *et al.*, 2017; World Health Organization, 2023b). MDV diskrimineer nie wat betref ouderdom, geslag, ras en sosio-ekonomiese status nie (Hasin *et al.*, 2005; Forman-Hoffman & Viswanathan, 2018; Hasin *et al.*, 2018; Ghandour *et al.*, 2019). Na raming ly soveel as 322 miljoen individue wêreldwyd, of 4,4% van die wêreldbevolking, aan MDV (World Health Organization, 2017), wat dit die mees algemene psigiatriese versteuring maak (Willner *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2018).

Behandelingsweerstandige depressie (BWD) is 'n uiters ernstige, moeilik bestuurbare en blywende vorm van MDV, met 'n hoë wêreldwye voorkoms (Fagiolini & Kupfer, 2003; Rush *et al.*, 2008; Al-Harbi, 2012; Cleveland Kliniek, 2023b). Hoewel dit bekend is dat dit ontwikkel in vatbare individue wat aan traumatiese gebeure blootgestel word (Brand & Harvey, 2017), is BWD geassosieer met 'n aantal komorbiditeite, waaronder angsvesteuring, posttraumatiese stresversteuring (PTSV) en psigose (Kornstein & Schneider, 2001; Hauksson *et al.*, 2017; Albott *et al.*, 2018; Lucchese *et al.*, 2021). Simptome van BWD is dikwels soortgelyk aan dié van MDV, maar individue is meer geneig om ernstiger simptome, major depressiewe episodes (MDE's) wat langer duur en 'n groter getal MDE's gedurende hul leeftyd te ervaar (Cleveland Clinic, 2023a). Individue met BWD ervaar nie net 'n ononderbroke depressiewe gemoedstoestand (hartseergevoel, prikkelbaarheid en/of leegheid) en anhedonie (verlies aan plesier en/of belangstelling in daaglikse aktiwiteite) nie,

maar ook verskeie ander minder onderskeibare hoewel lastige simptome, die grootste deel van die dag en byna elke dag vir ten minste twee weke, soos veranderinge in eetlus en slaappatrone (Fava & Kendler, 2000; American Psychiatric Association, 2013; National Institute of Mental Health, 2023; World Health Organization, 2023d).

Soos verwag kon word, ondervind diegene wat deur MDV en BWD geaffekteer word, gewoonlik beduidende funksionele inkorting, veral verswakke sosiale, kognitiewe en/of beroepsfunksionering (Preboth, 2000; Harley *et al.*, 2008; Al-Harbi, 2012; Lam *et al.*, 2013; Gregory *et al.*, 2020; Li, 2023; World Health Organization, 2023a). Dit dra by tot 'n aansienlike finansiële las op die geaffekteerde individue, hul gesinne en die gemeenskap oor die algemeen (Lam *et al.*, 2013; Greenberg *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2017; McCrone *et al.*, 2018; Li, 2023). Boonop word 'n merkbaar verlaagde lewenskwaliteit gesien by individue wat aan gemoedsversteurings ly, waaronder MDV en BWD (Papakostas *et al.*, 2004; IsHak *et al.*, 2011; Lépine & Briley, 2011; Williams *et al.*, 2017; Lex *et al.*, 2019), en het hulle 'n verhoogde risiko van selfdood, vergeleke met hul niedepressiewe eweknieë (Hawton *et al.*, 2013; Bergfeld *et al.*, 2018). Trouens, meer as 700 000 selfdoodverwante sterftes word jaarliks wêreldwyd aangemeld (World Health Organization, 2023c).

Afgesien van niefarmakologiese terapeutiese opsies vir BWD, soos kognitiewe gedragsterapie (KGT) en elektrokonvulsiewe terapie (EKT), is farmakologiese strategieë daarop gemik om farmakologiese klasse van tradisionele antidepressante te optimaliseer, te kombineer en om te ruil, deur nuwe psigoaktiewe middels soos ketamien en psilosibien toe te dien, en deur bestaande farmakoterapie aan te vul. Laasgenoemde behels gewoonlik die byvoeging van 'n tweede medikasie, wat nie konvensioneel as 'n antidepressant beskou word nie, soos die gemoedstabiliseerder litium, of 'n tweedegenerasie-antipsigotiese middel soos olansapien (Voineskos *et al.*, 2020). Dit is

merkwaardig dat hedendaagse antidepressante nie aan al die kliniese vereistes vir die bestuur van MDV voldoen nie, wat nog te sê van BWD, bv. lastige nuwe-effekte, vertraagde aanvang van werking en swak respons. Trouens, eenderde van MDV-pasiënte bereik nie remissie nadat hulle 'n reeks konvensionele antidepressantproewe deurloop het nie, selfs met optimale dosis en duur van behandeling (Rush *et al.*, 2006; Rosenzweig-Lipson *et al.*, 2007; Al-Harbi, 2012; Zorumski *et al.*, 2015). Laasgenoemde persone word as behandelingsweerstandig beskou. Gevolglik is studies oor nuwe, beter verdraagde farmakoterapieë wat meer effektief is by weerstandige tipes MDV geregverdig.

Konvensionele antidepressante moduleer hoofsaaklik sentrale monoaminergiese seining (Malhi *et al.*, 2013; Willner *et al.*, 2013; Boku *et al.*, 2018; Duarte-Silva *et al.*, 2020), wat spesifiek die sinaptiese vlakke van serotonien (5-HT), norepinefrien (NE) en/of dopamien (DA) verhoog (Goldberg *et al.*, 2014). Hierdie benadering tot behandeling beskryf die onderbou van die monoaminergiese hipotese van MDV (Schildkraut, 1965; Hirschfeld, 2000). Nietemin beklemtoon die hoë voorkoms van weerstandigheid teen hierdie middels (Duarte-Silva *et al.*, 2020) dat die patofisiologie onderliggend aan MDV baie meer kompleks en uiteenlopend is as wat verwag is, wat verskillende en nuwe meganistiese strategieë vereis.

In hierdie verband speel verswakte neuroplastisiteit, wat insluit strukturele plastisiteit en funksionele sinaptiese plastisiteit, 'n sentrale rol in die neuropatologie van MDV, sowel as in die werking van antidepressante (Duman, 2002; Duman & Monteggia, 2006; Duman *et al.*, 2008). Hierdie prosesse word op hul beurt gereguleer deur die hipotalamus-pituitêre-bynier-as (HPB-as) (Carlson *et al.*, 2006; Kunugi *et al.*, 2010). HPB-as-hiperaktiwiteit, en by implikasie hipersekresie van sirkulerende adrenokortikotropiese hormoon (AKTH) en glukokortikoïede, word dikwels by MDV waargeneem (Plotsky *et al.*, 1998; Varghese & Brown, 2001; Barden, 2004; Pariante & Lightman, 2008). Wat belangrik is, is dat suksesvolle farmakoterapie geassosieer word met 'n omkering van die voorgenoemde HPB-as-veranderinge (Plotsky *et al.*, 1998; Varghese & Brown, 2001; Barden, 2004; Pariante & Lightman, 2008), sowel as omkering van hippokampale atrofie (Warner-Schmidt & Duman, 2006). BWD word geassosieer met geabrogeerde negatiewe HPB-as-terugvoer (Hornig-Rohan *et al.*, 1996; Markopoulou *et al.*, 2009; Markopoulou, 2013; Caraci *et al.*, 2018), d.w.s., hiperkortisolemie, terwyl die gebrek aan reaksie daarvan op tradisionele middels weerspannige neuroplastiese meganismes suggereer wat nie op sulke behandeling reageer nie (Harvey *et al.*, 2003).

'n Vroeë hipotese het die rol van die sikliese stikstofoksied (NO-) guanosienmonofosfaatstelsel (sGMF-stelsel) in behandelingsnierespons in MDV as rede aangevoer (Harvey, 1996; Harvey *et al.*, 2003). Dit is belangrik dat die selektiewe fosfodiësterase tipe 5-inhibeerders (FDE5-inhibeerders), soos sildenafil en tadalafil, wat sGMF-proteïenkinase-G-seining (PKG-seining) versterk, antidepressantagtige kenmerke in translasionele rotmodelle van MDV het (Brink *et al.*, 2008; Liebenberg *et al.*, 2010a, Tomaz *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Socała *et al.*, 2016). Daar is gedemonstreer dat by hoër dosisse van 10 of 20 mg/kg sildenafil, maar nie by 'n laer dosis van 3 mg/kg nie,

byvoeging van 'n sentraal aktiewe anticholinergiese geneesmiddel nodig is om die antidepressantaktiwiteit van die FDE5-inhibeerder te ontmasker (Brink *et al.*, 2008; Liebenberg *et al.*, 2010a). Dit is ook opmerklik dat die trisikliese antidepressant imipramien welbekend is daarvoor dat dit oor kragtige inherente anticholinergiese aktiwiteit beskik, wat 'n redelike aanvullingstrategie suggereer wanneer dit met FDE5-inhibeerders gekombineer word. Die sGMF/PKG-seiningsweg speel 'n deurslaggewende rol om die stroomafwaartse sikliese adenosienmonofosfaatresponselement-bindende (sAMF-responselementbindende) proteïen/breinafgeleide neurotrofiese faktor-seiningskaskade (sAMF/BANF-seiningskaskade) te reguleer. Gevolglik sal versterking van sGMF/PKG-seining deur FDE5-inhibeerders sAMF/BANF-seining en uiteindelik neuroplastisiteit verhoog. Hence, amplification of cGMP/PKG signalling by PDE5 inhibitors would increase CREB/BDNF signalling and ultimately neuroplasticity (Feil *et al.*, 2005; Dhir & Kulkarni, 2007; Brunoni *et al.*, 2008; Kapczinski *et al.*, 2008; Puzzo *et al.*, 2008; Reiersen *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014).

Daarbenewens speel FDE5 'n diepgesetelde rol in die regulering van sellulêre redoksstatus, wat op sigself indirekte effekte op sinaptiese plastisiteit, oksidatiewe stres en korrekte funksionering van die senuweestelsel sal hê (Reay, 2010; Savas *et al.*, 2010; Verit *et al.*, 2010; Thakur *et al.*, 2013; Tomaz *et al.*, 2014; Sikandner *et al.*, 2017). Verder word MDV geassosieer met 'n biologiese wanbalans tussen die vlakke van reaktiewe suurstofspesies (ROS) en dié van antioksidante, bv. glutatioon (GSH), wat lei tot oksidatiewe stres (Bakunina *et al.*, 2015) en veranderde biomolekules soos monoamien (Brand *et al.*, 2015; Mokoena *et al.*, 2015). Die mislukking van selle om aan te pas by veranderde redokshomeostase en die daaropvolgende voorkoms van selfafsterwe is sleutelfaktore wat by die etiologie van MDV geïmpliceer is (Bakunina *et al.*, 2015).

Laastens, 'n onlangse studie in ons laboratoriums (Saayman *et al.*, 2024) het in 'n adrenokortikotropiese hormoon- (AKTH-) geïnduseerde knaagdiermodel van BWD getoon dat 'n imipramien-plus-sildenafil-kombinasie 'n meer effektiewe aanvullingstrategie bied om BWD om te keer as 'n essitalopraam-plus-sildenafil-kombinasie. Aangesien essitalopraam oor geen anticholinergiese eienskappe beskik nie, ondersteun dit voorlopig bogenoemde idee, hoewel verdere ondersoek met imipramien en sildenafil in 'n ander dieremodel van BWD nodig is om hierdie bewering te verifieer. Daarbenewens, hoewel dit bekend is dat verskeie trisikliese antidepressante antimuskariene werking het (kyk die betekenis daarvan wat hierbo verduidelik is), wat insluit 'n onlangse studie in 'n AKTH-geïnduseerde model van BWD (Saayman *et al.*, 2024), is imipramien goed in ons laboratorium bestudeer en dus 'n gepaste antidepressant om te gebruik.

Gevalideerde dieremodelle wat translasië waarde vir mense het, word gereeld deur prekliniese navorsers gebruik om middels te identifiseer met die potensiaal om gemoedsversteurings soos BWD te behandel (Pereira *et al.*, 2019). Deur gebruik te maak van 'n geen-x-omgewingsmodel van BWD, gebaseer op die blootstelling van Flinders Sensitive Line- (FSL-) rotte aan 'n tydafhanklikesensitisering-model (TAS-) model van stres/

herstres (Brand & Harvey, 2017), het ons die dosisafhanklike antidepressantagtige effekte van sildenafil alleen en in kombinasie met 'n bekende monoaminergiese antidepressant ná subchroniese behandeling bestudeer. Daarbenewens het die geassosieerde depressiefagtige gedragsveranderinge met hippokampale BANF-, monoamien-, glutatioon- (GSH-) en glutatioondisulfied- (GSSG-) vlakke gekorreleer. Ons het veronderstel dat TAS-blootgestelde FSL-rotte 'n nie-respons op imipramien sou toon, maar 'n gedeeltelike respons op subchroniese laedosis-sildenafilmonoterapie en 'n volle respons op subchroniese hoëdosissildenafilmonoterapie en imipramien plus laedosis-sildenafilkombinasieterapie versus behandeling naïewe TAS-blootgestelde FSL-rotte. Ten slotte het ons voorspel dat imipramien plus laedosis-sildenafil aanvulling sal demonstreer, vergeleke met enige van die middels alleen.

Materiale en metodes

Diere

Manlike FSL-rotte ($n = 60$) is geteel, verskaf en gehuisves by die Proefdiersentrum (vivarium) van die Pre-kliniese Geneesmiddelontwikkelingsplatform (Pre-Clinical Drug Development Platform (PCDDP)) van die Suid-Afrikaanse Departement van Wetenskap en Innovasie (DSI) en Noordwes-Universiteit (NWU), Suid-Afrika. Die Proefdiersentrum is by die Suid-Afrikaanse Veterinêre Raad (SAVR) (registrasienommer: FR15/13458) geregistreer en geakkrediteer deur die Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) (internasionale lêer #1717). Die oorspronklike FSL-rotkolonies is verkry van Dr David H. Overstreet, Universiteit van Noord-Carolina, Chapel Hill, Noord-Carolina, Verenigde State van Amerika. Al die rotte wat in hierdie studie gebruik is, is in groepe gehuisves (twee rotte/hok) in individueel geventileerde polisulfoonhokke ($395 \times 346 \times 213$ mm ($l \times b \times h$)) onder toestande van konstante kamertemperatuur (22 ± 1 °C), humiditeit ($55 \pm 10\%$) en positiewe lugdruk. Die lug in die Proefdiersentrum is 16 tot 18 keer per uur met vars ongesirkuleerde lug uitgeruil, en die luggehalte is met hoëdoeltreffendheid-lugdeeltjiefilters (*high-efficiency particulate air* (HEPA)-filters) beheer. 'n Lig/donkersiklus van 12 uur is altyd gehandhaaf (ligte is tussen 06:00 en 18:00 aangeskakel). Hokke is skoongemaak, en beddegoed (saamgestel uit gekapte mieliekoppe) is weekliks vervang. Al die rotte het konstant toegang gehad tot 'n polivinielchloried- (PVC-) tonnelskuiling en nesmateriaal (bestaande uit papierhanddoeke) in hul tuishokke as omgewingsverryking. Voedsel (standaard-rotkos) en kraanwater is *ad libitum* voorsien. Rotte en eksperimentele fasiliteite is teen eksterne geraas beskerm.

Geneesmiddelbehandelings

Al die rotte is daaglik gedurende die subchroniese behandelingstydperk (oor 10 dae) van hierdie studie geweeg, en die korrekte hoeveelheid van die individuele geneesmiddels is dienooreenkomstig bereken vir elke dosis wat aan elke rot toegedien is. Om produkstabiliteit te verseker, is die individuele geneesmiddelpoeiers in hul oorspronklike houers en volgens die spesifikasies van die vervaardiger gehou. Al die geneesmiddelpoeiers is in fosfaatgebufferde soutoplossing (FGFS) opgelos en dan deur middel van subkutane (SK-) inspuitings

aan die rotte toegedien. Geneesmiddelpoeiers is opgelos in 'n maksimum van 0,25 ml FGFS vir elke dosis, om te verseker dat die poeiers heeltemal opgelos is tydens visuele inspeksie, met die kleinste moontlike volume om enige ongemak van die inspuiting van groter volumes via die SK-roete te beperk. Kontrole rotte is met draerstofkontrole (VEH), wat uit FGFS alleen bestaan het, op dieselfde wyse as geneesmiddelbehandelde rotte ingespuut.

Die volgende middels is tussen 08:00 en 10:00 as monoterapieë toegedien en sommige ook as kombinasie terapieë: (1) imipramienhidrochloried (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Duitsland) teen 15 mg/kg/dag (IMI-15) (Sales *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2019) en (2) sildenafilsitraat (Sigma-Aldrich®, Schnelldorf, Duitsland) teen 3 mg/kg/dag (SIL-3) of 10 mg/kg/dag (SIL-10) (Liebenberg *et al.*, 2010a). Die dosisse wat vir sildenafil en imipramien gekies is, is in 'n vorige susterartikel geverifieer (Saayman *et al.*, 2024). Ter opsomming, daardie artikel het hoëdosissildenafil (10 mg/kg), laedosis-sildenafil (3 mg/kg) en imipramien (15 mg/kg) vir gebruik in hierdie studie geïdentifiseer.

Eksperimentele ontwerp

Figuur 1 is 'n skematiese illustrasie van die studie-uitleg. Op NGD21 is al die rotjies gespeen en lukraak aan tuishokke toegewys. Al die rotte is individueel op NGD21 met kepe in hul ore gemerk. Ná hul toewysing aan tuishokke, is die rotjies ewekansig verdeel in 'n TAS-naïewe en TAS-blootgestelde groep, wat onderskeidelik uit 12 en 48 rotte bestaan het. Die rotjies is daarna ewekansig verdeel in verskeie subchroniese behandelingsgroepe, wat uit 12 rotte elk bestaan het.

Van NGD40 tot NGD54 is TAS-blootgestelde rotte aan die TAS-paradigma (kyk afdeling 2.3.1.) onderwerp, terwyl TAS-naïewe rotte ongestoord gelaat is. Die verskillende subchroniese behandelings het tussen NGD55 en NGD64 gevolg. Op die aand van NGD61 is alle rotte vir 10 minute onder rooi lig (80 lux) in 'n oopveldtoetsarena (OVT-arena) geakklimatiseer. Die OVT-toetsprosedure is 24 uur later uitgevoer, op die aand van NGD62, gevolg deur die geforseerde swemtoets (GST) op die aand van NGD63. Die OVT-toetsprosedure is uitgevoer om te kontroleer vir enige effekte van behandeling op algemene lokomotoriese aktiwiteit wat die vertolking van die GST kon omvergooi (Saayman *et al.*, 2021). Al die rotte is toe op NGD65 aan genadedood onderwerp (ten minste 36 uur ná die GST om enige korttermyn-effekte van swemstres op biochemiese merkers uit te skakel), waarna breinmonsters (hipokampusmonsters) versamel en vir daaropvolgende biochemiese ontledings by -80 °C gestoor is. Laastens is vlakke van neurochemiese merkers, naamlik BANF, 5-HT, NE, GSH en glutatioondisulfied (GSSG), in die hippokampus gemeet.

Knaagdiermodel van behandelingsweerstandige depressie

'n Voorheen gevestigde geen-x-omgewing-rotmodel van BWD is gebruik. Hier word BWD-agtige gedrag in FSL-rotte geïnduseer ná blootstelling aan 'n posttraumatische stresversteuringsparadigma (PTSV-paradigma) (kyk afdeling 2.4.1.) (Brand, 2017; Brand & Harvey, 2017).

Tydafhanklikesensitisering-paradigma (TAS-paradigma)

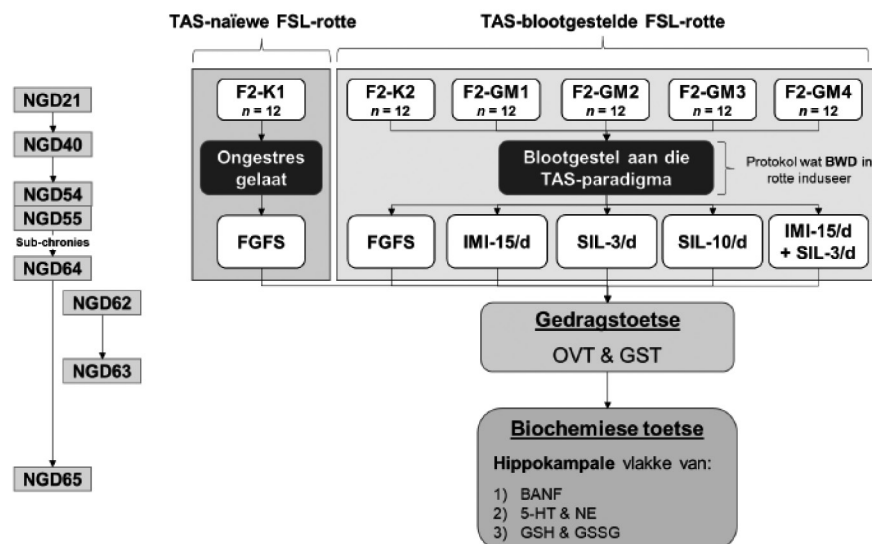
TAS is 'n diereemodel van PTSV (Harvey *et al.*, 2006). In hierdie verband vertoon rotte noemenswaardige biogedragsveranderinge nadat hulle 'n erge traumatiese gebeurtenis ervaar het wat oor tyd voortduur ná blootstelling aan daaropvolgende kontekstuele herinneringe. Hierdie biogedragsveranderinge toon 'n tydafhanklike volhouding of verergering in die afwesigheid van die inisiërende stressor (Yehuda & Antelman, 1993; Harvey *et al.*, 2006). Figuur 2 illustreer die TAS-paradigma wat in hierdie studie geïmplementeer is.

Die TAS-paradigma het bestaan uit 'n aanvanklike ernstige traumatiese ervaring, gevolg een en twee weke later deur kontekstuele herinneringe aan die aanvanklike trauma (kyk Figuur 2). Kortom, 'n translasie-genetiese knaagdiermodel van MDV, naamlik die stressensitiwe FSL-rotte, is op nageboortelike dag 40 (NGD40) aan 'n akute volgorde van enkele langdurige stres (ELS) onderwerp, wat uit drie tipes stressors bestaan het, naamlik 'n somatosensoriese stressor (bewegingsinperking), 'n psigologiese stressor (geforceerde swem met kortstondige

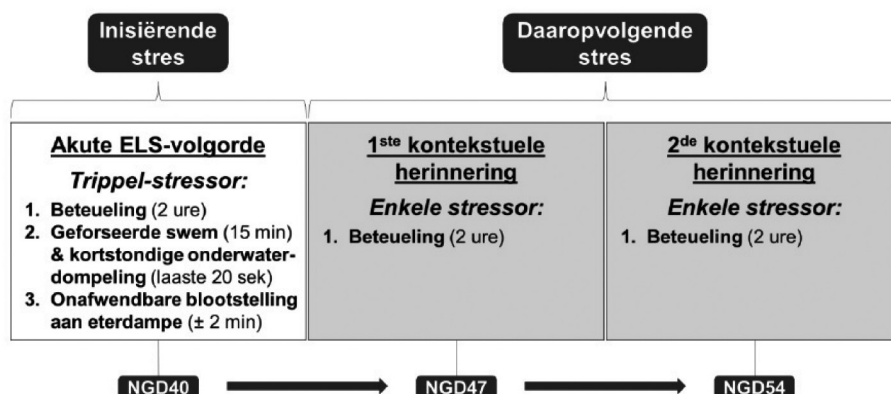
onderwaterdompeling) en 'n komplekse stressor (onafwendbare blootstelling aan eterdampe totdat verlies van bewussyn plaasgevind het). Daarna is die rotte blootgestel aan 'n enkele kontekstuele herinnering (KH) op NGD47 en NGD54, wat inperkingstres behels het soos hierbo genoem (Harvey *et al.*, 2006). Die somatosensoriese, psigologiese en komplekse stressors word in afdeling 2.4.1.1., 2.4.1.2. en 2.4.1.3. onderskeidelik bespreek.

Somatosensoriese stressor (inperking)

Die rotte is individueel op NGD40 vir 2 uur in Perspex®-kompartemente geplaas, met die agterflappe wat vir elke rot verstel is om te verseker dat die rotte behoorlik ingeperk was sonder om perfusie na hul ledemate te benadeel. Dieselfde prosedure is op NGD47 en NGD54 herhaal (Harvey *et al.*, 2006; Brand & Harvey, 2017). Die navorser was binne die eksperimentvertrek saam met die ingeperkte rotte vir die duur van die 2 ure om te kan monitor en te kan ingryp indien dit nodig sou wees, nl. ingeval rotte meer nood ervaar het as wat verwag is.



Figuur 1: 'n Skematiese illustrasie van die studie-uitleg. BANF: brein-afgeleide neurotrofiese faktor. GST: geforceerde swemtoets. GSH: glutatien. GSSG: glutatioondisulfied. 5-HT: serotonien. IMI-15: imipramienhidrochloried (15 mg/kg/dag). n: getal rotte per behandelingsgroep. NE: norepinefrien. OVT: oopveldtoets. NGD: nageboortelike dag. SIL-3: sildenafilisitraat (3 mg/kg/dag). SIL-10: sildenafilisitraat (10 mg/kg/dag). TAS: tydafhanklike sensitiwiteit. BWD: behandeling-weerstandige depressie. VEH: draerstofkontrole. *Slegs 1 VEH- of geneesmiddeldosis is daaglik gedurende hierdie tydperk toegedien (met die finale dosis toegedien 24 uur voor die biochemiese ontledings uitgevoer is).



Figuur 2: 'n Skematiese illustrasie van die TAS-paradigma wat gebruik word om BWD in FSL-rotte te induseer. NGD: nageboortelike dag. ELS: enkele langdurige stres. Aangepas uit (Harvey *et al.*, 2006).

Sielkundige stressor (geforceerde swem en kortstondige onderwaterdompeling)

Onmiddellik nadat hulle op NGD40 aan die somatosensoriese stressor onderwerp is (kyk afdeling 2.4.1.1.) is die rotte individueel in onontkombare Perspex®-silinders met afmetings van 20 x 100 cm ($d \times h$), gevul met 40 cm omgewingswater ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), en toegelaat om vir 15 min. te swem. Vir die laaste 20 sekondes is die rotte onder die water ingeforseer. Die rotte is daarna uit die Perspex®-silinders verwyder, saggies met handdoeke afgedroog en vir 15 minute na hul tuishokke teruggeneem om te herstel (Harvey *et al.*, 2006; Brand & Harvey, 2017). Dit is belangrik om te noem dat enige potensiële gekondisioneerde respons op geforseerde swemstres tydens gedragstoetsing in die aangepaste weergawe van die geforseerde swemtoets (GST) op NGD63 onwaarskynlik was, aangesien geforseerde swem, wat deel uitgemaak het van die TAS-paradigma (geïmplementeer op NGD40), 23 dae voor die gedragstoetsing met die GST (Brand & Harvey, 2017) uitgevoer is. Die ondersoeker was binne die eksperimentvertrek met die swemmende rotte vir die duur van die 15 min, wat hom in staat gestel het om te monitor en in te gryp indien dit nodig was, nl. ingeval rotte ophou probeer om kop bo water te hou en in gevaar van verdrinking sou verkeer.

Komplekse stressor (onafwendbare blootstelling aan eterdampe)

Sodra die 15-minuutherstelperiode ná die sielkundige stressor verstryk het (kyk afdeling 2.4.1.2.), steeds op NGD40, is rotte aan eterdampe onderwerp totdat bewussynsverlies voorgekom het (vir 'n duur van ongeveer 2 min). 5 ml 100%-diëtleter is op 'n papierhanddoek binne 'n pasgemaakte dampkap gegooi, wat dan onderin 'n verseëlde 5 L-plastiekhouer geplaas is. Daarna is rotte individueel op 'n verhoogde metaalplatform binne die plastiekhouer geplaas om direkte kontak met die eter te vermy. Onmiddellik nadat hulle hul bewussyn verloor het, is die rotte uit die plastiekhouer verwyder en na hul tuishokke teruggeneem, waar hulle waargeneem is totdat volle bewussyn herwin is (Harvey *et al.*, 2006; Brand & Harvey, 2017).

Kontekstuele herinneringe

Ná voltooiing van die akute ELS-stappe op NGD40 soos hierbo beskryf (kyk afdeling 2.4.1.1. tot 2.4.1.3.), is al die rotte teruggeneem na hul groePHuisvesting-tuishokke in die houervertrek en ongestoord gelaat tot NGD47, toe die eerste herblootstelling aan die somatosensoriese stressor (kontekstuele herinnering) plaasgevind het. Onmiddellik daarna is die rotte weer na hul tuishokke in die houervertrek teruggeneem en ongestoord gelaat. Die tweede en laaste herblootstelling aan die kontekstuele herinnering is vervolgens op NGD54 uitgevoer (Harvey *et al.*, 2006; Brand & Harvey, 2017).

Gedragstoetse

'n Studie wat voorheen in ons laboratoriums uitgevoer is, het aangedui dat die voorgenoemde gedragstoetse nie die resultate van latere opeenvolgende toetse beïnvloed nie indien die mins stresvolle gedragstoets eerste uitgevoer word, gevolg deur die meer stresvolle toetse in volgorde van toenemende stresvolheid (Mokoena *et al.*, 2015). Om hierdie rede is die OVT 24 uur voor

die GST uitgevoer. Gedragstoetse is tydens die donker siklus (tussen 18:00 en 06:00) uitgevoer, in ag genome dat rotte nagdiere is. Trouens, gedragstoetse het eers 1 uur ná die begin van die donker siklus (om 19:00) begin, ten einde vir die aanvanklike kossoek- en ander aktiwiteit van rotte voorsiening te maak. Die toerusting en metodes wat in hierdie studie gebruik is om die gedragstoetse uit te voer (die OVT en GST) word hier onder beskryf (kyk afdeling 2.5.1. en 2.5.2.).

Oopveldtoets (OVT)

Op grond van die waarneming dat knaagdiere van nature nuuskierige diere is en geneig is om nuwe omgewings te verken, word die OVT-toetsprosedure gebruik om hul algemene lokomotoriese aktiwiteit te meet. Algemene lokomotoriese aktiwiteit kan omskryf word as 'n maatstaf van knaagdiere se vermoë om rond te beweeg en hul omgewing te verken (Schoeman *et al.*, 2017). Dit is belangrik dat resultate verkry uit die OVT-toetsprosedure met betrekking tot algemene lokomotoriese aktiwiteit beïnvloed kan word deur knaagdiere wat 'n verhoogde angsagtige gedrag toon, wat veroorsaak word deur hulle in 'n nuwe omgewing te plaas (Misslin & Cigrang, 1986), in ag genome dat angstiger knaagdiere geneig is om roerloos in 'n hoek of langs 'n muur van die OVT-arena te sit (waar hulle voel dat die mure van die OVT-arena hulle beskerm en hulle gevolglik veilig voel), relatief tot dié wat minder angstig is (Ramos *et al.*, 1997; Prut & Belzung, 2003; Hiroi & Neumaier, 2006). Om dus die angs te verlaag wat die rotte ervaar het omdat hulle tydens die OVT-toetsprosedure in 'n nuwe omgewing geplaas is, is hulle 24 uur voor die OVT-toetsprosedure in 'n OVT-arena geakklimatiseer.

Die OVT-apparaat het uit vier 100 x 100 x 45 cm ($l \times b \times h$) vierkantige arenas met ondeursigtige swart mure en 'n afsonderlike videokamera direk bo elke OVT-arena bestaan. Die OVT-toetsprosedure is onder rooi lig (80 lux) op NGD62 en soos voorheen beskryf vir ons laboratoriums uitgevoer (Schoeman *et al.*, 2017; Saayman *et al.*, 2021). Rotte is individueel in die middel van die OVT-arenas geplaas en toegelaat om hul nuwe omgewing vir 5 minute te verken terwyl hulle opgeneem is deur videokameras wat direk bo die OVT-arenas geleë was. Die rotte is ná elke toetssessie na hul tuishokke teruggeneem, waarna die OVT-arenas met 'n 10%-etanoloplossing skoongevee is om enige olfaktoriese afleiers tydens daaropvolgende toetssessies te verwyder. Die video-opnames is daarna met gebruik van EthoVision XT 14-sagteware (Noldus Information Technology BV, Wageningen, Nederland) ontleed en die totale afstand (cm) wat tydens die OVT-toetsprosedure beweeg is, is as 'n maatstaf van die algemene lokomotoriese aktiwiteit van die rotte gebruik.

Geforseerde swemtoets (GST)

Die GST is gebaseer op die waarneming dat wanneer knaagdiere in onontkombare, waterge vulde silinders geplaas word, hulle aanvanklik sal probeer om te ontsnap deur ontsnappingsgerigte gedrag (Armario *et al.*, 1988), waarna hulle 'n beweginglose postuur ontwikkel (met depressiefagtige knaagdiere wat vinniger 'n beweginglose postuur vergeleke met gesonde kontroles ontwikkel). Immobiteit in die GST word dus geassosieer met die versuim om te volhard in ontsnappingsgerigte

gedrag (gedragswanhoop), wat depressiefagtige gedrag weerspieël (Porsolt *et al.*, 1977; Porsolt, 1979; Lucki, 1997; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Gevolglik word die GST algemeen in knaagdiere uitgevoer om antidepressantagtige aktiwiteit oor 'n breë spektrum van antidepressante te evalueer (Borsini & Meli, 1988). Dit is belangrik dat FSL-rotte inherent met verhoogde depressiefagtige gedrag ('n verhoogde tyd wat bewegingloos deurgebring word) in die GST presenteer, en 'n vooraf-kondisionering-swemsessie 24 uur voor die GST dus nie geregverdig is vir hierdie rotte om gedragswanhoop tydens die GST te toon nie (Overstreet *et al.*, 2005; Saayman *et al.*, 2021).

Die GST-apparaat het bestaan uit vier 20 x 100 cm ($d \times h$) silindriese tenks wat langs mekaar geposisioneer is, elk tot 'n diepte van 30 cm gevul met water by omgewingstemperatuur (by $25 \pm 1^\circ\text{C}$ gehandhaaf), en 'n videokamera wat direk voor die vier GST-silinders geleë was. Die GST is op NGD63 onder rooi lig (80 lux) en soos voorheen beskryf vir ons laboratoriums uitgevoer (Schoeman *et al.*, 2017; Saayman *et al.*, 2021). Kortom, rotte is individueel in die waterge vulde GST-silinders geplaas en 7 min. lank toegelaat om te swem terwyl daar video-opnames van hulle gemaak is. Die rotte is onmiddellik nadat die 7 min. verloop het uit die waterge vulde GST-silinders verwyder, liggies met 'n handdoek afgedroog en na hul tuishokke teruggeneem. Ná elke GST-proef is die water in die GST-silinders met skoon water vervang, wat enige effek uitgeskakel het wat alarmstowwe tydens daaropvolgende GST-proewe op rotte kon gehad het (Abel & Bilitzke, 1990).

Die navorser het vir die volle duur van die GST 'n duidelike uitsig oor al die rotte gehad, wat ingryping moontlik gemaak het indien dit nodig was, nl. ingeval rotte nie hul koppe bo water kon hou nie en die risiko geloop het om te verdrink. Die video-opnames is met behulp van EthoVision XT 14-sagteware (Noldus Information Technology BV, Wageningen, Nederland) ontleed, en die totale tyd wat tydens die GST bewegingloos deurgebring is (in sekondes), is as 'n maatstaf van depressiefagtige gedrag van die rotte gebruik. Die eerste en laaste minute van die GST is egter nie ontleed nie (sodat 'n totaal van 5 min ontleed is), om sodoende die akkuraatheid van die resultate te maksimeer.

Biochemiese ontledings

Breinweefselversameling en voorbereiding

Ná genadedood is heelbreine van die rotte onmiddellik verwyder en in yskoue FGFS geplaas. Die hippokampusse is onmiddellik op 'n ysverkoelde disseksieblad gedissekteer voordat dit by -80°C gesnelvries is totdat ontledings van hippokampale BANF, 5-HT, NE, GSH en GSSG gedoen is (Harvey *et al.*, 2006; Brand & Harvey, 2017; Steyn *et al.*, 2018; Saayman *et al.*, 2021).

Toets vir hippokampale breinafgeleide neurotrofiese faktor (BANF-toets)

BANF is met behulp van ensiemgekoppelde immuunsorberende ("ELISA") ontledingstelle (katalogusno.: E-EL-R1235; Elabscience Biotechnology Inc.) volgens die aanwysings van die vervaardiger getoets. Konsentrasies van BANF is uit 'n standaardkromme geëkstrapoleer en uitgedruk as pg/ml natweefselgewig (Steyn *et al.*, 2018; Saayman *et al.*, 2021).

Toets vir hippokampale serotonien (5-HT), norepinefrien (NE), glutatioon (GSH) en glutatioondisulfied (GSSG)

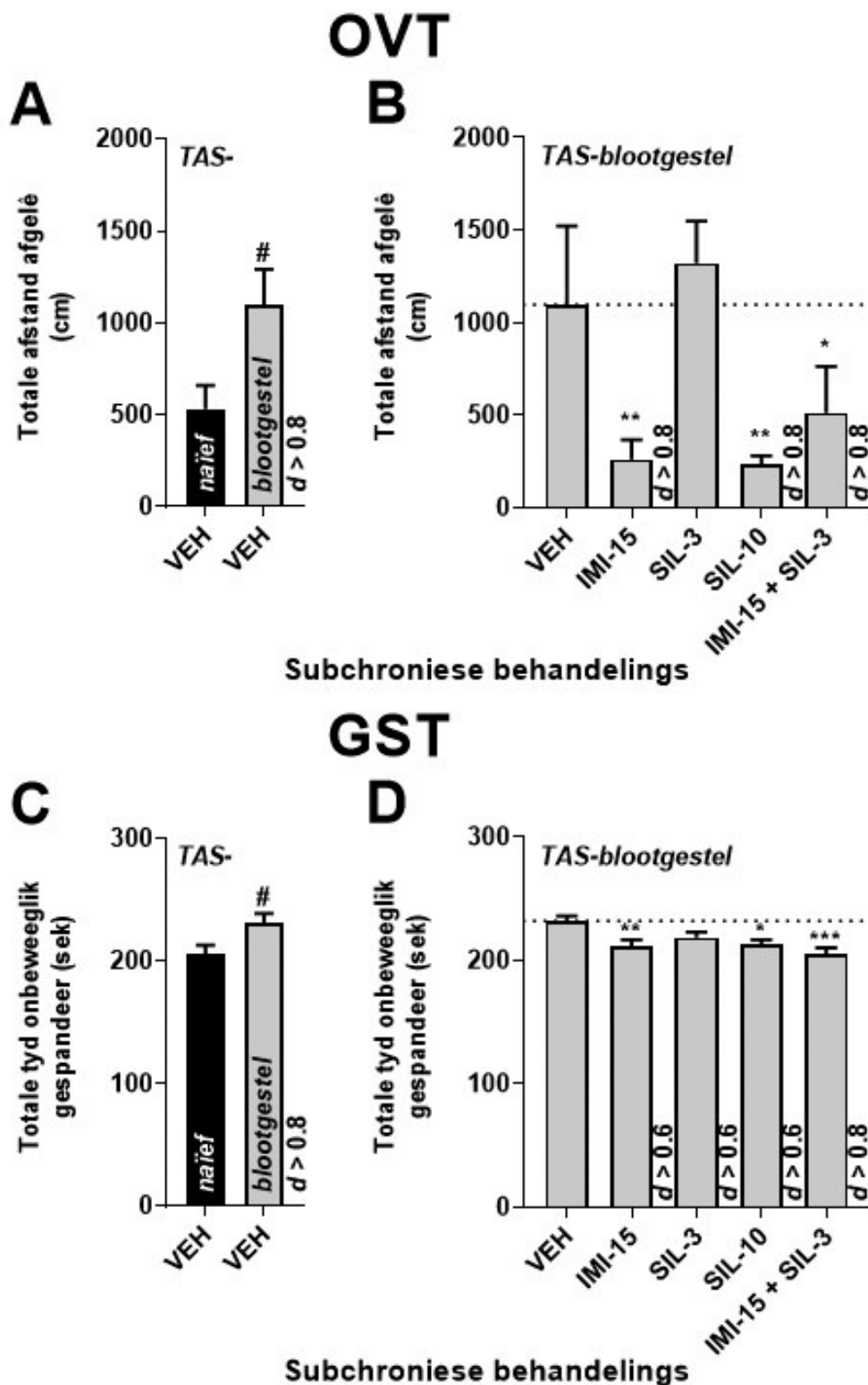
Hippokampale weefselmonsters is volgens vorige metodes vir 5-HT, NE, GSH en GSSG met gebruik van vloeistofchromatografie-massaspektrometrie getoets (LC-MS) (Moriarty *et al.*, 2011; Squellerio *et al.*, 2012; Fuertig *et al.*, 2016; Wojnicz *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

Statistiese ontledings

Statistiese kragontledings is uitgevoer om die minimum getal rotte te bepaal wat nodig was om per behandelingsgroep in te sluit om statisties betekenisvolle resultate te verseker, met behulp van G*power-weergawe 3.1.9.2. In gevalle waar 'n eenrigtingvariensieanalise (ANOVA) uitgevoer is, is kragberekeninge uitgevoer met inagneming van die omnibustoets (F -statistiek). Die gestandaardiseerde effekgrootte is as medium ($F = 0,25$) tot groot ($F = 0,40$) gedefinieer. In alle gevalle is kragberekeninge uitgevoer met inagneming van 'n tipe-I-foutkoers van 5% ($\alpha = 0,05$), en die drempel vir 'n tipe-II-fout wat oorweeg is, was 20% ($1 - \beta \geq 0,8$).

GraphPad Prism® weergawe 8 vir Windows (GraphPad Prism®-sagteware, weergawe 8.0, San Diego Kalifornië, Verenigde State van Amerika) is gebruik om al die statistiese ontledings uit te voer en om grafiese voorstellings te skep. Om vir uitskieters te sif, is Grubbs se toets op alle datastelle uitgevoer (met aanvaarding van $\alpha = 0,05$ as betekenisvol). Die Shapiro-Wilk-toets en die Levene-toets is uitgevoer om onderskeidelik vir normaliteit van verspreiding en homogeniteit van variansies te toets (met aanvaarding van $p < 0,05$ as 'n skending van beide aannames). 'n Ongepaarde Student se t -toets (data normaal versprei) of Mann-Whitney U-toets (data nie normaal versprei) is gebruik om die effekte van TAS-paradigmablootstelling op die biogedragparameters vergeleke met dié van die TAS-naïewe kontrolegroep te bepaal. 'n Gewone eenrigting-ANOVA (meervoudige vergelykings vir data wat normaal versprei is) of Kruskal-Wallis-eenrigting-ANOVA (veelvuldige vergelykings vir data wat nie normaal versprei is) is uitgevoer om die effekte van verskillende subchroniese behandelings in TAS-blootgestelde rotte te bepaal. Om die verskillende subchroniese geneesmiddelbehandelingsgroepe met die VEH-behandelingsgroep in TAS-blootgestelde rotte te vergelyk, is Gewone eenrigting-ANOVA's deur Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings gevolg, terwyl Kruskal-Wallis-eenrigting-ANOVA's deur 'n Dunn-toets gevolg is. Data word aangebied as die gemiddelde $\pm$ standaardfout van die gemiddelde (SFG), en statistiese betekenisvolheid is vir alle vergelykings op $p \leq 0,05$ gestel.

Om die praktiese (kliniese) betekenis van effekgrootte te bepaal, is die onsydige Cohen- d -waarde (d) gebruik om effekgrootte van interaksies en intergroepeverskille (met 'n 95% vertrouensinterval (VI, Engels CI) van die effekgrootte) te bereken. Slegs medium en groot effekgroottes ($d \geq 0,6$ en $d \geq 0,8$, onderskeidelik) is as betekenisvol beskou. Dit is bereken deur gebruik te maak van Exploratory Software for CIs (Cohen, 1988).



Figuur 3: 'n Grafiese voorstelling van die OVT- en GST-data. **A:** Afstand wat deur FSL-rotte beweeg is nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het. **B:** Afstand wat deur FSL-rotte beweeg is nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. **C:** Tyd wat bewegingloos deur FSL-rotte spandeer is nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang. **D:** Tyd wat bewegingloos deur FSL-rotte spandeer is nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. Alle groepgroottes is gelyk ($n = 12$). Datapunte verteenwoordig die gemiddelde $\pm$ SFG. Statistiese ontledings word in die teks gerapporteer met # $p < 0,05$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **A**, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **B**, # $p < 0,05$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **C**, en * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **D**. d : onsydige Cohen- d -waarde. GST: geforseerde swemtoets. IMI-15: imipramienhidrochloried (15 mg/kg/dag). OVT: oopveldtoets. SIL-3: sildenafilsiitraat (3 mg/kg/dag). SIL-10: sildenafilsiitraat (10 mg/kg/dag). TAS: tydafhanklike sensitisering. VEH: draerstofkontrolle.

Resultate

Gedragsontleiding

Data verkry uit die gedragstoets wat op NGD62 en NGD63 uitgevoer is, nadat die rotte ongestres gelaat of aan die TAS-paradigma blootgestel is en al die VEH- en geneesmiddel-behandelings toegedien is, word hier onder aangebied (kyk afdeling 3.1.1.).

Afstand beweeg en tyd bewegingloos spandeer

Figuur 3 beeld die totale afstand uit wat FSL-rotte in die OVT beweeg het en die tyd wat hulle bewegingloos in die GST deurbring het nadat hulle ongestres gelaat of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese (meer as 10 dae) VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het. GST-data word gekorrigeer vir behandelinggeïnduseerde veranderinge in die algemene lokomotoriese aktiwiteit van rotte met behulp van kovariansieanalises (ANCOVA's).

'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die afstand wat FSL-rotte in die OVT beweeg vergeleke met ongestreste FSL-rotte beduidend verhoog ($p = 0,0231$, $d = 0,96$) (kyk Figuur 3A). 'n Gewone eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui op statisties beduidende verskille tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot afstand wat in die OVT beweeg is ($F_{(4, 52)} = 10,64$, $p < 0,0001$). Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het in TAS-blootgestelde FSL-rotte getoon dat subchroniese behandelings met IMI-15 ($p = 0,0010$, $d = 1,63$), SIL-10 ($p = 0,0010$, $d = 1,67$) en IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0256$, $d = 1,03$), vergeleke

met VEH die afstand wat in die OVT beweeg word beduidend verminder (kyk Figuur 3B).

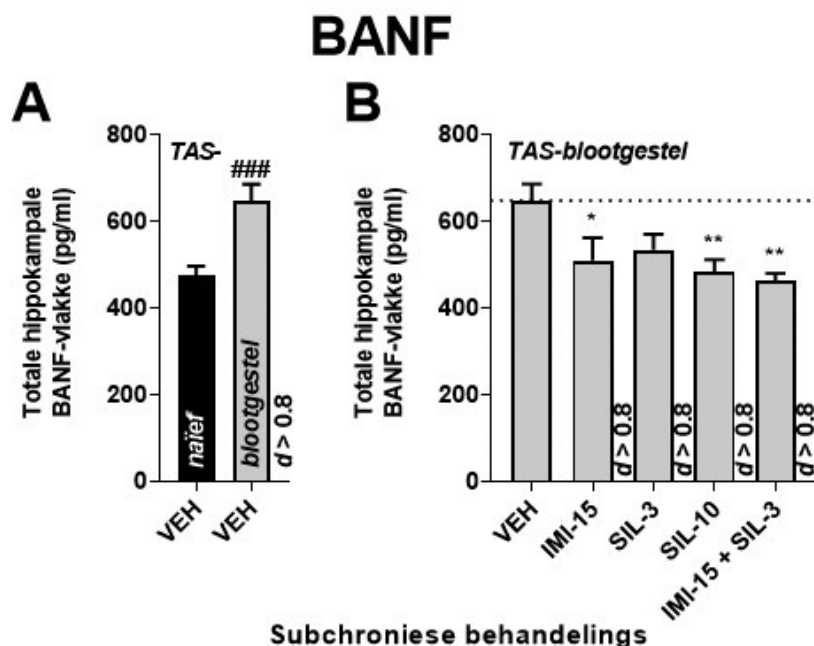
'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling in FSL-rotte die tyd wat bewegingloos in die GST spandeer is vergeleke met ongestreste FSL-rotte ($p = 0,0186$, $d = 0,97$) beduidend verhoog het (kyk Figuur 3C). 'n Gewone eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot tyd wat bewegingloos in die GST spandeer word ($F_{(4, 55)} = 4,802$, $p = 0,0021$). Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het getoon dat in TAS-blootgestelde FSL-rotte subchroniese behandelings met IMI-15 ($p = 0,0097$, $d = 0,64$), SIL-10 ($p = 0,0196$, $d = 0,61$) en IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0005$, $d = 1,02$) die tyd wat bewegingloos in die GST spandeer word, vergeleke met VEH-behandelde TAS-blootgestelde FSL-rotte, beduidend verminder (kyk Figuur 3D).

Biochemiese merkervlakke van die rotte

Data verkry uit die verskillende biochemiese ontledings wat op NGD65 uitgevoer is nadat die rotte ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is, al die VEH- en geneesmiddel-behandelings toegedien is en gedragstoets uitgevoer is, word hier onder aangebied (kyk afdeling 3.2.1 tot 3.2.3.).

Vlakke van hippocampale breinafgeleide neurotrofiese faktor (BANF-vlakke)

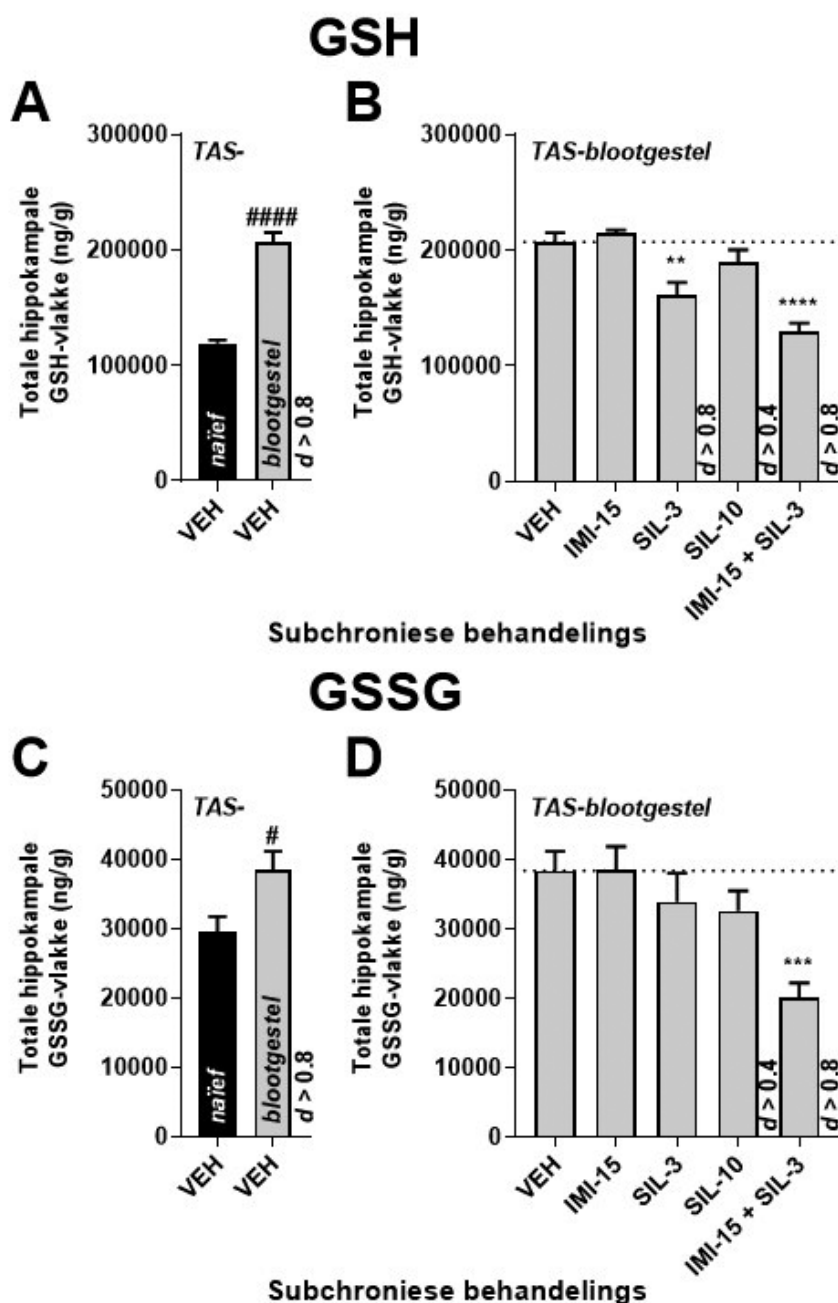
Figuur 4 beeld die totale hippocampale BANF-vlakke van FSL-rotte uit nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddel-behandeling ontvang het.



Figuur 4: 'n Grafiese voorstelling van die hippocampale BANF-ontledingsdata. **A:** BANF-vlakke van FSL-rotte nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het. **B:** BANF-vlakke van FSL-rotte nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. Alle groepgroottes is gelyk ($n = 12$). Datapunte verteenwoordig die gemiddelde $\pm$ SFG. Statistiese ontledings word in die teks gerapporteer met ### $p < 0,001$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **A**, en met * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **B**. BANF: breinafgeleide neurotrofiese faktor. d : onsydige Cohen- d -waarde. IMI-15: imipramienhidrochloried (15 mg/kg/dag). SIL-3: sildenafilsitraat (3 mg/kg/dag). SIL-10: sildenafilsitraat (10 mg/kg/dag). TAS: tydafhanklike sensitisering. VEH: draerstofkontrolle.

'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die hippocampale BANF-vlakke van FSL-rotte vergeleke met ongestreste FSL-rotte ($p < 0,0007$, $d = 1,55$) beduidend verhoog (kyk Figuur 54A). 'n Gewone eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot hippocampale BANF-vlakke ($F_{(4, 55)} = 4,015$, $p < 0,0063$).

Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het in TAS-blootgestelde FSL-rotte getoon dat subchroniese behandelings met IMI-15 ($p = 0,0317$, $d = 0,85$), SIL-10 ($p = 0,0078$, $d = 1,37$) en IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0024$, $d = 1,74$) hippocampale BANF-vlakke vergeleke met VEH beduidend verlaag (kyk Figuur 54B).



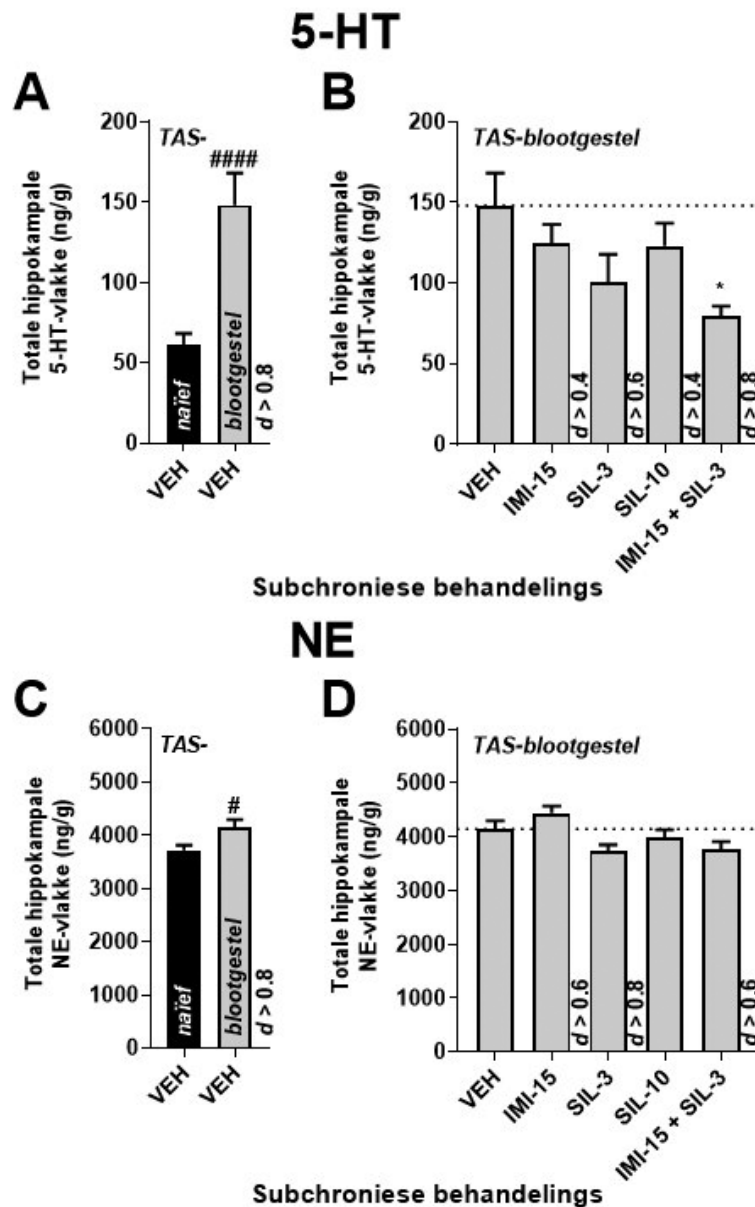
Figuur 5: 'n Grafiese voorstelling van die hippocampale GSH- en GSSG-ontledingsdata. **A:** GSH-vlakke van FSL-rotte nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het. **B:** GSH-vlakke van FSL-rotte nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. **C:** GSSG-vlakke van FSL-rotte nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het. **D:** GSSG-vlakke van FSL-rotte nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. Alle groepgroottes is gelyk ($n = 12$). Datapunte verteenwoordig die gemiddelde $\pm$ SFG. Statistiese ontledings word in die teks gerapporteer met #### $p < 0,0001$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **A**, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **B**, # $p < 0,05$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **C**, *** $p < 0,001$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **D**. d : onsydige Cohen- d -waarde. GSH: glutatien. GSSG: glutatioondisulfaat. IMI-15: imipramienhidrochloried (15 mg/kg/dag). SIL-3: sildenafilitraat (3 mg/kg/dag). SIL-10: sildenafilitraat (10 mg/kg/dag). TAS: tydafhanklike sensitiviteit. VEH: draerstofkontrolle.

Vlakke van hippocampale glutatien (GSH) en glutatien-disulfied (GSSG)

Figuur 5 beeld die totale hippocampale GSH- en GSSG-vlakke van FSL-rotte uit nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het.

'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die hippocampale GSH-vlakke van FSL-rotte vergeleke met ongestreste FSL-rotte ($p < 0,0001$, $d = 4,17$)

beduidend verhoog (kyk Figuur 5A). 'n Gewone eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot hippocampale GSH-vlakke ($F_{(4, 52)} = 15,92$, $p < 0,0001$). Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het in TAS-blootgestelde FSL-rotte getoon dat subchroniese behandelings met SIL-3 ($p = 0,0018$, $d = 1,33$) en IMI-15 + SIL-3 ($p < 0,0001$, $d = 2,93$) hippocampale GSH-vlakke vergeleke met VEH beduidend verlaag (kyk Figuur 5B).



Figuur 6: 'n Grafiese voorstelling van die hippocampale 5-HT- en NE-ontledingsdata. **A:** 5-HT vlakke van FSL-rotte nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het. **B:** 5-HT vlakke van FSL rotte nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. **C:** NE-vlakke van FSL rotte nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH-behandeling ontvang het, soos aangedui. **D:** NE-vlakke van FSL-rotte nadat hulle aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het, soos aangedui. Alle groepgroottes is gelyk ($n = 12$). Datapunte verteenwoordig die gemiddelde $\pm$ SFG. Statistiese ontledings word in die teks gerapporteer met #### $p < 0,0001$ en d vs die TAS-naïef + VEH-behandelingsgroep in **A**, * $p < 0,05$ en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **B**, # $p < 0,05$ en d vs die TAS-naïewe + VEH-behandelingsgroep in **C**, en d vs die TAS-blootgestelde + VEH-behandelingsgroep in **D**. d : onsydige Cohen- d -waarde. 5-HT: serotonien. IMI-15: imipramienhidrochloried (15 mg/kg/dag). NE: norepinefrien. SIL-3: sildenafilsitraat (3 mg/kg/dag). SIL-10: sildenafilsitraat (10 mg/kg/dag). TAS: tydafhanklike sensitiviteit. VEH: draerstofkontrole.

'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die hippocampale GSSG-vlakke van FSL-rotte vergeleke met ongestreste FSL-rotte ($p = 0,0185$, $d = 1,03$) beduidend verhoog (kyk Figuur 5C). 'n Kruskal-Wallis-eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot hippocampale GSSG-vlakke ($p = 0,0004$). Dunn se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het in TAS-blootgestelde FSL-rotte getoon dat subchroniese behandeling met IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0002$, $d = 2,15$) hippocampale GSSG-vlakke vergeleke met VEH-behandelde TAS-blootgestelde FSL-rotte beduidend verlaag (kyk Figuur 5D).

Vlakke van hippocampale serotonien (5-HT) en norepinefrien (NE)

Figuur 6 beeld die totale hippocampale 5-HT- en NE-vlakke van FSL-rotte uit nadat hulle ongestres gelaat is of aan die TAS-paradigma blootgestel is en daarna subchroniese VEH- of geneesmiddelbehandeling ontvang het.

'n Mann-Whitney u-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die hippocampale 5-HT-vlakke van FSL-rotte vergeleke met ongestreste FSL-rotte beduidend verhoog ($p < 0,0001$, $d = 1,70$) (kyk Figuur 6A). 'n Kruskal-Wallis-eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot hippocampale 5-HT-vlakke ($p = 0,0141$). Dunn se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het in TAS-blootgestelde FSL-rotte getoon dat subchroniese behandeling met IMI-15 + SIL-3 ($p = 0,0115$, $d = 1,34$) vergeleke met VEH hippocampale 5-HT-vlakke beduidend verlaag (kyk Figuur 6B).

'n Ongepaarde Student se t-toets het aan die lig gebring dat TAS-blootstelling die hippocampale NE-vlakke van FSL-rotte vergeleke met ongestreste FSL-rotte beduidend verhoog ($p = 0,0227$, $d = 0,99$) (kyk Figuur 6C). 'n Gewone eenrigting-ANOVA-toets vir veelvuldige vergelykings in TAS-blootgestelde FSL-rotte dui statisties beduidende verskille aan tussen die verskillende subchroniese behandelingsgroepe met betrekking tot hippocampale NE-vlakke ($F_{(4,54)} = 4,431$, $p = 0,0036$). Dunnett se *post hoc*-toets vir veelvuldige vergelykings het getoon dat in TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met VEH-behandelde TAS-blootgestelde FSL-rotte, geeneen van die subchroniese geneesmiddelbehandelings hippocampale NE-vlakke beduidend verander het nie (kyk Figuur 6D).

Bespreking

Die sleutelbevindinge van hierdie studie is dat TAS-blootgestelde FSL-rotte groter depressiefagtige gedrag toon as dié in stresnaïewe FSL-rotte, gepaardgaande met beduidende hippocampale oksidatiewe stres. Nog belangriker, hierdie depressiefagtige gedrag word geassosieer met *verhoogde* hippocampale monoamien en *verhoogde* BANF. Dis interessant dat IMI-15, SIL-10 en IMI-15 + SIL-3 die verhoogde BANF sowel as die depressiefagtige gedrag in TAS + FSL-rotte omgekeer het, maar verskillende effekte op monoamien- en redoksveranderinge

gehad het. Boonop het SIL-3 die antidepressantagtige effekte van IMI-15 in TAS-blootgestelde FSL-rotte aangevul, terwyl laedosis-SIL-3 op sy eie weglaatbare effekte gehad het.

TAS-blootstelling het die algemene lokomotoriese aktiwiteit in FSL-rotte beduidend verhoog vergeleke met TAS-naïewe diere (kyk Figuur 3A). Dit verskil egter van 'n soortgelyke studie waar lokomotoriese aktiwiteit nie deur blootstelling aan TAS verander is nie (Brand & Harvey, 2017). Hoewel daar teenstrydige verslae is oor die effek van imipramien op die bewegingsaktiwiteit by rotte (Garcia *et al.*, 2008; Liebenberg *et al.*, 2010b; Réus *et al.*, 2011; Guan *et al.*, 2014; Brand & Harvey, 2017), het IMI-15 hier algemene lokomotoriese aktiwiteit in TAS-blootgestelde rotte beduidend verminder (kyk Figuur 3B). Dit is nie so onverwags indien die kalmerende effekte van imipramien in ag geneem word nie (Rickels *et al.*, 1993; Ramirez & Sheridan, 2016), hoewel dit dikwels in knaagdiers beskryf is, en geassosieer word met langtermyn- neurobiologiese reseptorveranderinge (Aulakh *et al.*, 1987), maar dis na die beste van ons kennis nie volledig toegelig nie. Subchroniese SIL-10-, maar nie SIL-3-behandeling nie, het ook die algemene lokomotoriese aktiwiteit van TAS-blootgestelde rotte beduidend verminder, vergeleke met kontroles (kyk Figuur 3B). Terwyl vorige studies, hoewel sonder TAS-blootstelling, geen veranderde lokomotoriese aktiwiteit by rotte ná SIL-3- en SIL-10-behandelings gevind het nie (Liebenberg *et al.*, 2010a; Liebenberg *et al.*, 2010b; Saayman *et al.*, 2021), hou die reaksie soos hier genoem hoogs waarskynlik verband met die ansiogeniese kenmerke van TAS en dat FDE5-inhibeerders ook ansiolitiese werking in FSL-rotte het (Liebenberg *et al.*, 2012), as 'n werkshiptese vir moontlike toekomstige studies in modelle van BWD. Net so het subchroniese IMI-15 + SIL-3-behandeling ook algemene lokomotoriese aktiwiteit in TAS-blootgestelde rotte beduidend verminder, vergeleke met VEH-kontroles (kyk Figuur 3B).

Met inagneming daarvan dat TAS en die geneesmiddels wat in hierdie studie gebruik is algemene lokomotoriese aktiwiteit beduidend verander, is die GST-data daarna gekorrigeer om die invloed van hierdie koveranderlike te verreken om psigomotoriese aktiwiteit meer spesifiek te weerspieël (d.w.s. depressiefagtige gedrag). Vir hierdie doel is ANCOVA-aansuiwerings toegepas (Steyn *et al.*, 2018), soos uitgebeeld in Figuur 3C en Figuur 3D. TAS-blootstelling het die depressiefagtige gedrag (tyd bewegingloos spandeer) van FSL-rotte vergeleke met TAS-naïewe FSL-rotte beduidend vermeerder (kyk Figuur 3C). Dit stem ooreen met vroeëre bevindings (Brand & Harvey, 2017) en bevestig dat 'n oordrewe depressiefagtige fenotipe 'n primêre kenmerk van die TAS + FSL-model van BWD is, wat robuuste siggeldigheid suggereer. Subchroniese IMI-15-behandeling het egter die depressiefagtige gedrag van TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met kontrole-FSL-rotte beduidend verlaag, hoewel met medium effekgrootte (kyk Figuur 3D).

Behandelingsweerstand in hierdie model was dus nie robuus nie. Hoewel dit die geval is, het Brand en Harvey (2017) getoon dat imipramienbehandeling depressiefagtige gedrag in beide TAS-naïewe en TAS-blootgestelde FSL-rotte beduidend verlaag het, maar dat depressiefagtige gedrag beduidend meer gebly

het in TAS-blootgestelde teenoor TAS-naïewe FSL-rotte (Brand & Harvey, 2017). Trouens, MDV is dikwels beskryf as 'n heterogene versteuring, sodat BWD, 'n ernstiger manifestasie daarvan, waarskynlik selfs meer kompleks en multifaktoriaal in beide die etiologie en onderliggende neurobiologiese grondslag daarvan sou wees. In hierdie verband is daar dan die huidige TAS + FSL-model, 'n etiologiese model gebaseer op die ontwikkeling van depressiefagtige gedrag ná drie akute traumatiese ervarings plus kontekstuele herinneringe (d.w.s. kousaliteit), wat ook etiologies met posttraumatiese ontwikkeling van BWD by mense kan korreleer. As sodanig word van die dieremodel verwag om nie net BWD te modelleer nie, maar ook elemente van ander algemene komorbiditeite, soos angs wat tipies van posttraumatiese stresversteuring is (Brand & Harvey, 2017). Gevolglik mag geneesmiddelbehandelingsreaksies moontlik ook nie so eenvoudig, voorspelbaar of robuus wees as in 'n meer simplistiese BWD-model nie, soos ons vroeër met behulp van die adrenokortikotropiese hormoon-model (AKTH-model) van BWD aangebied het nie (Saayman et al., 2024). Ten spyte van hierdie beperkings, weerspieël dit wel 'n model wat werklikelewe-veranderlikheid oor diere en studies heen, soortgelyk aan die veranderlike siektetoestand wat die behandelingsrespons, of gebrek daaraan, by pasiënte met BWD predetermineer (Nierenberg & DeCecco, 2001). Alles in ag genome is antidepressant-behandelingsweerstand moontlik nie so diep in hierdie model as byvoorbeeld as wat die geval is met die grootmaak in sosiale isolasie van FSL-rotte ná spening nie (Mncube et al., 2021; Mncube & Harvey, 2022).

Verskeie studies het die antidepressantagtige eienskappe van FDE5-inhibeerders in behandelingresponsiewe knaagdiermodelle van MDV getoon (Brink et al., 2008; Liebenberg et al., 2010a; Liebenberg et al., 2010b; Matsushita et al., 2012; Tomaz et al., 2014; Wang et al., 2014; Socała et al., 2016; Saayman et al., 2021). Hier wys ons dat subchroniese SIL-10-behandeling alleen depressiefagtige gedrag in TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met FSL-kontroles beduidend verlaag het (met groot effekgrootte), terwyl subchroniese SIL-3-behandeling 'n soortgelyke neiging van medium effek getoon het (kyk Figuur 3D). 'n Mens kan dus redeneer dat die TAS + FSL-model van BWD op subchroniese behandelings met SIL-3 en SIL-10 reageer. FDE5-inhibeerders (soos sildenafil) veroorsaak dus dosisafhanklike antidepressantagtige effekte. Ons het onlangs dieselfde dosisafhanklike antidepressantagtige aktiwiteit vir sildenafil in 'n adrenokortikotropiese hormoon- (AKTH-) geïnduseerde knaagdiermodel van BWD getoon (Saayman et al., 2024).

Hierbenewens het subchroniese IMI-15 + SIL-3-behandeling die depressiefagtige gedrag van TAS-blootgestelde rotte vergeleke met FSL-kontroles beduidend verminder, wat deur 'n groot effekgrootte ondersteun is (kyk Figuur 3D). Trouens, SIL-3 het die antidepressantagtige effekte van IMI-15 in TAS-blootgestelde FSL-rotte aangevul (kyk Figuur 3D). Daar is voorheen gedemonstreer dat hoër dosisse sildenafil by rotte gelyktydige antimuskariene aktiwiteit (soos dié wat deur imipramien in hierdie studie oplewer word) kan vereis om die antidepressantagtige effekte daarvan te ontmasker (Brink et al., 2008; Liebenberg et al., 2010a). Dit kan die bevindinge van die huidige studie verklaar. Alles in ag genome kan sildenafil moontlik

antidepressantagtige effekte in die TAS-geïnduseerde knaagdiermodel van BWD hê.

Soos die AKTH-gebaseerde model van BWD, waar subchroniese AKTH-behandeling hippokampale BANF verhoog (Saayman et al., 2024), het TAS-blootstelling hippokampale BANF-vlakke vergeleke met TAS-naïewe rotte beduidend verhoog (kyk Figuur 4A), terwyl subchroniese IMI-15-behandeling hierdie verhoging in hippokampale BANF-vlakke in TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met FSL-kontroles beduidend verlaag het (kyk Figuur 4B). Met inagneming van die neurotrofiese hipotese van MDV, waar MDV tipies met verlaagde hippokampale BANF-vlakke geassosieer word (Jacobsen & Mørk, 2006; Huang et al., 2011; Antunes et al., 2015; Gong et al., 2016), is hierdie data paradoksaal. Daar is inderdaad getoon dat antidepressante (en niefarmakologiese ingrepe) BANF-vlakke verhoog (Balu et al., 2008; Vidal et al., 2011; Sheldrick et al., 2017; Mondal & Fatima, 2019). Laasgenoemde word ook geassosieer met 'n omkering van depressiewe simptome (Duman, 2002; Duman & Monteggia, 2006; Piccinni et al., 2015; Polyakova et al., 2015; Duman et al., 2016). Soos met IMI-15 het subchroniese SIL-10- en IMI-15 + SIL-3-behandelings ook hippokampale BANF-vlakke in TAS + FSL-rotte beduidend verlaag, terwyl SIL-3 alleen 'n afname met 'n groot effekgrootte in BANF veroorsaak het (kyk Figuur 4B). Trouens, ons het 'n soortgelyke antidepressantgeïnduseerde verlaging van BANF-konsentrasies in 'n adrenokortikotropiese hormoon- (AKTH-) geïnduseerde model van BWD in Sprague Dawley-rotte getoon (Saayman et al., 2024).

Gesamentlik presenteer TAS + FSL-rotte met verhoogde hippokampale BANF en depressiefagtige gedrag, 'n paradoksale bevinding. Nietemin is die feit dat albei in effek deur 'n antidepressant omgekeer is 'n merkwaardige bevinding. Deur veerkragtigheid nadelig te beïnvloed, fasiliteer BANF aktiwiteitafhanklike plastisiteit, wat 'n veranderlike effek in gemoedstoestand en ander plastisiteitafhanklike funksies kan beteken. So het Martinez en kollegas (2012) 'n positiewe korrelasie tussen BANF en die ernstigheid van selfmoord-denkbeldvorming gevind (Martinez et al., 2012), terwyl 'n ander kliniese studie verslegtende redoks- en metaboliese status as 'n moontlik teenregulerende werking van BANF beskryf (Harvey et al., 2012). Na gelang van stand van siekte of 'n volgehoute ongunstige omgewing, kan BANF dus ongewenste redoks- en metaboliese veranderinge bemiddel, wat die ontwikkeling van depressie bevorder (Harvey et al., 2012). In ons studie kan dit die gekombineerde effek van TAS plus die FSL-rotstam verteenwoordig. Ter ondersteuning hiervan oefen regstreekse inspuiting van BANF in mesolimbiese dopamien- (DA-) stroombane 'n paradoksale depressogeniese effek uit (Castrén et al., 2007). Terwyl die antidepressantagtige effekte van sildenafil dus met die verhoging van sikliese guanosienmonofosfaat (sGMF)/BANF-seining in die hippokampus geassosieer word (Wang et al., 2014), kan die teenwoordigheid van ernstig nadelige omstandighede teenregulerende aksies hê wat die resultate lewer wat in hierdie studie getoon word. Die vraag is of enige ongewenste redoks- en neurochemiese veranderinge in TAS + FSL-rotte sigbaar was, en hoe hulle op behandeling gereageer het.

TAS + FSL-rotte het met beduidend verhoogde hippokampale GSH- en GSSG-vlakke gepresenteer, vergeleke met TAS-naïewe diere (kyk Figuur 5A en Figuur 5C onderskeidelik). Met inagneming van die feit dat MDV en BWD met verhoogde oksidatiewe stres en verlaagde vlakke van GSH as antioksidant geassosieer word (Lapidus *et al.*, 2014; Black *et al.*, 2015; D Rosenblatt *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015), moet 'n mens in gedagte hou dat dit in hierdie geval nie MDV of BWD is nie, maar 'n dieremodel van hierdie toestande. Daarom kan die resultate moontlik nie presies met die kliniese toestand ooreenstem nie, maar tog 'n sterk argument vir 'n toestand van redokswanbalans in TAS + FSL-rotte vorm. Trouens, die AKTH-gebaseerde BWD-model wat hierbo genoem is, vertoon ook verhoogde GSH (Saayman *et al.*, 2024). Daarby verlaag lae intrasellulêre GSH-vlakke sellulêre antioksidantkapasiteit, terwyl verhoogde GSH-vlakke gewoonlik antioksidantkapasiteit en weerstand teen oksidatiewe stres verhoog (Ballatori *et al.*, 2009). Inaktivering van reaktiewe suurstofspesies (ROS) behels oksidasie van GSH tot GSSG (Prchal *et al.*, 1975; Griffith, 1999). Die verhouding van gereduseerde glutatioon (GSH) tot geoksideerde glutatioon (GSSG) kan dus as 'n merker van oksidatiewe stres gebruik word (Zitka *et al.*, 2012). Dit sou aansluit by die argumente wat hierbo uitgemaak is dat redoksversteurings saam met verhoogde BANF kan presenteer.

Subchroniese IMI-15-behandeling het nie hippokampale GSH- en GSSG-vlakke in TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met FSL-kontroles beduidend beïnvloed nie (kyk onderskeidelik Figuur 5B en Figuur 5D). Dus is die antidepressanteffekte van IMI-15 op die eenvoudigste vlak nie redoksafhanklik nie. Subchroniese SIL-3- en IMI-15 + SIL-3-behandelings het egter GSH-vlakke in TAS + FSL-rotte beduidend verlaag, wat die antioksidantwerking van FDE5-inhibeerders bevestig (Swiecicka, 2023). Dit is interessant dat hierdie reaksie dosisafhanklik blyk te wees, aangesien subchroniese SIL-10-behandeling nie GSH-vlakke verander het nie (kyk Figuur 5B). Dit is nogal soortgelyk aan die antidepressantagtige aksies daarvan wat vroeër opgemerk is nie. Desnieteenstaande het slegs subchroniese IMI-15 + SIL-3-behandeling die hippokampale GSSG-vlakke van TAS-blootgestelde rotte vergeleke met kontroles beduidend verlaag (kyk Figuur 5D).

TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met TAS-naïewe diere het beduidend verhoogde hippokampale 5-HT- en NE-vlakke getoon (kyk Figuur 6A en Figuur 6C onderskeidelik), wat met 'n vorige studie in muis ná sielkundige stres ooreenstem (MA *et al.*, 2008). Hierbenewens het 'n ander BWD-model ook verhoogde hippokampale 5-HT getoon (Saayman *et al.*, 2024). Trouens, daar is getoon dat verhoogde 5-HT onder sekere toestande depressogeniese werking het (Andrews *et al.*, 2015). In teenstelling met die werkswyse daarvan, het subchroniese IMI-15-behandeling nie hippokampale 5-HT- en NE-vlakke in TAS + FSL-rotte vergeleke met FSL-kontroles beduidend verander nie (kyk Figuur 6B en Figuur 6D onderskeidelik), hoewel 'n medium effekgroottoename in NE duidelik was, soos voorspel (kyk Figuur 6D) (Taylor *et al.*, 2005; Sheffler *et al.*, 2019). Subchroniese SIL-3- en SIL-10-behandelings het ook nie hippokampale 5-HT- en NE-vlakke in TAS-blootgestelde FSL-rotte vergeleke met FSL kontroles beduidend verander nie.

Subchroniese SIL-3-behandeling het egter 'n medium en 'n groot effekgroottoename tot verlaging van hippokampale 5-HT en NE onderskeidelik getoon (kyk Figuur 6B en Figuur 6D). Subchroniese IMI-15 + SIL-3-behandeling het hippokampale 5-HT-vlakke beduidend verlaag, met 'n medium effekgroottoename tot verlaging van hippokampale NE-vlakke (kyk onderskeidelik Figuur 6B en Figuur 6D).

Op grond van hierdie bevindinge kan die neurobiologiese konstruk van BWD verskil van dié van MDV, en vereis dit dus altyd verskillende farmakologiese benaderings. Dit wil voorkom of BWD-modelle elemente van oksidatiewe stres deel, wat bekend is dat dit uiteenlopende effekte op regionale breinmonoamiene uitoefen (Möller *et al.*, 2013). Meer relevant, die teenwoordigheid van oksidatiewe stres, soos blootstelling aan osoon, inhibeer die antidepressantaksies van imipramien (Mokoena *et al.*, 2010; Mokoena *et al.*, 2015). Dit wil voorkom asof die TAS-gebaseerde knaagdiermodel van BWD met verhoogde hippokampale BANF-vlakke presenteer, wat ook in 'n ander BWD-model gedemonstreer is (Saayman *et al.*, 2024), terwyl die teenoorgestelde duidelik is in knaagdiermodelle van MDV, soos die FSL-rot (Elfving *et al.*, 2010). Dit is belangrik dat verhoogde hippokampale 5-HT- en NE-vlakke gedemonstreer is in die TAS + FSL- (hierdie studie) en die AKTH-model van BWD (Saayman *et al.*, 2024), sowel as in FSL-rotte (Zangen *et al.*, 1997; Zangen *et al.*, 1999).

As sodanig blyk verhoogde hippokampale 5-HT- en NE-vlakke 'n konsekwente patofisiologiese kenmerk van beide MDV en BWD te wees, ten minste in knaagdiere. Dit lyk paradoksaal, hoewel dit bekend is dat 5-HT bekend 'n Janusgesig-molekule is, wat beide voordelige en nadelige effekte op sellulêre en gedragsfunksies het (Harvey *et al.*, 2004; Andrews *et al.*, 2015). Die TAS + FSL-model presenteer ook met 'n angskonstruk wat, in die konteks van BWD, belangrik is, gegewe dat mense met posttraumatiese stresversteuring (PTSV) sonder uitsondering BWD ontwikkel (Brand & Harvey, 2017). Dit moet ook i ag geneem word by die vertolking van die reaksie op behandeling, soos vroeër opgemerk is. 'n Beduidende beperking op hierdie studie moet genoem word. Ten spyte van sekere bewyse vir behandelingsweerstand het subchroniese behandeling met IMI-15 (tradisionele monoaminergiese antidepressant) antidepressantagtige effekte in die TAS-model geïnduseer.

TAS-blootgestelde FSL-rotte het depressiefagtige gedrag en bewyse vir oksidatiewe stres vergeleke met TAS-naïewe FSL-rotte getoon. Dis paradoksaal dat TAS-blootgestelde FSL-rotte ook met verhoogde hippokampale monoaminergiese en BANF-vlakke gepresenteer het, wat 'n teenregulerende werking van BANF suggereer, sowel as verhoogde motoriese funksie. Die presiese biochemiese meganismes waardeur subchroniese behandelings met IMI-15, SIL-10 en IMI-15 + SIL-3 hul antidepressantagtige effekte in die TAS-model van BWD produseer, bly egter onduidelik. Die bydraes wat deur hierdie studie tot BWD-navorsing gemaak word, kan seminaal wees en verdere ondersoek regverdig, veral met inagneming van die beduidende uitdagings wat tans met die behandeling van hierdie siekte gepaard gaan.

Etiese standaarde

Alle pogings is aangewend om die lyding van diere tydens hierdie studie te beperk. Daar is onafhanklik oor alle etiese oorewegings beraadslaag, 'n behoorlike skade-tenoor-voordeel-analise is uitgevoer, en alle moontlike verliggende faktore is geïmplementeer om te verseker dat hierdie uiters impakvolle prosedure op knaagdiere geregverdig kon word. Met inagneming van respek vir redelike diere en die erge lyding van mense met BWD, sowel as begrip vir die etiese dilemma wat daardeur gestel word, is die studie op streng voorwaardes as eties geregverdig beskou.

Die Etiekkomitee vir Navorsing vir Diersorg, Gesondheid en Veiligheid (NHREC-reg.-no.: AREC-130913-015) van die Fakulteit Gesondheidswetenskappe, NWU, Suid-Afrika, het hierdie studie goedgekeur (NWU-AnimCareREC-etiekgoedkeuringsno.: NWU-00598-19-A5). Alle eksperimente en prosedures wat as deel van hierdie studie op diere uitgevoer is en hul huisvestingstoestande het aan die institusionele beleide en ander riglyne oor die versorging en gebruik van laboratoriumdiere voldoen, sowel as aan nasionale wetgewing. Die wyse waarop eksperimente en prosedures uitgevoer is en hoe diere aangehou is, was ook in ooreenstemming met die riglyne van die Suid-Afrikaanse Nasionale Standaard: Die Sorg en Gebruik van Diere vir Wetenskaplike Doeleindes (*South African National Standards: The Care and Use of Animals for Scientific Purposes*) (SANS 10386:2008), asook die riglyne van Etiek in Gesondheidsnavorsing: Beginsels, Prosesse en Strukture (*Ethics in Health Research: Principles, Processes and Structures*) van 2015.

Om die uitvoering, verslagdoening en beoordeling van dierenavorsing te verbeter, het Smith en kollegas (2018) onlangs 'n stel beplanningsriglyne ontwikkel wat bekend staan as die riglyne vir die Beplanning van Navorsing en Eksperimentele Prosedures op Diere: Aanbevelings vir Uitnemendheid (*Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence*) (PREPARE) (Smith *et al.*, 2018). In hierdie verband is die PREPARE-riglyne tydens die beplanningsfase van hierdie studie nageset in aanmerking geneem en geïmplementeer om die kwaliteit, reproduceerbaarheid en toepasbaarheid van eksperimentele resultate te verbeter. Hierbenewens, ten einde 'n deursigtige, reproduceerbare, akkurate, omvattende, bondige, logies geordende en goedgeskrewe manuskrip in die hand te werk, is alle eksperimentele data gerapporteer volgens die Verenigde Koninkryk se Nasionale Sentrum vir die Vervanging, Verfyning en Vermindering van Diere in Navorsing (*National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs)*) se riglyne in Dierenavorsing: Rapportering van In Vivo-eksperimente (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE)*) (Kilkenny *et al.*, 2010).

Erkennings

Die skrywers bedank graag dr Nico M Minnaar, sr Irene Serage, mnr Cor Bester en mnr Kobus Venter en verleen aan hulle erkenning vir die toesig oor die welsyn van die diere, asook dr Francois P Viljoen en mnr Walter Dreyer vir hulp met die biochemiese ontledings wat tydens hierdie studie gedoen is.

Finansiële bystand

Befondsing van die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns (SAAWK) het hierdie navorsing moontlik gemaak.

Verklaring van belang

GW het rapporteer dat hy navorsingsondersteunings-/lesing-/konsultasiegelde van H. Lundbeck A/S, Eli Lilly A/S, Takeda/Shire A/S, HB Pharma A/S, Arla Foods Amba., Janssen Pharma A/S en Mundipharma International, Ltd ontvang het.

BHH en CBB verklaar dat, behalwe vir inkomste vanaf die primêre werkgewer (NWU) en navorsingsbefondsing aan JLB (SAAWK; Jaschafoundation), hierdie organisasies geen gevestigde belang in die studie gehad het nie. BHH het in adviesrade deelgeneem vir en honoraria ontvang van Adcock-Ingram, Servier en Lundbeck, en het navorsingsbefondsing van Servier, Lundbeck en HG&H Pharma ontvang. Geen ander finansiële ondersteuning of vergoeding is oor die afgelope drie jaar van enige individu of korporatiewe entiteit vir navorsing of professionele dienste ontvang nie, en daar is geen persoonlike finansiële besit wat as 'n potensiële botsing van belange beskou kan word nie.

ORCID

JLB Saayman	https://orcid.org/0000-0003-0174-5242
BH Harvey	https://orcid.org/0000-0002-9864-7894
G Wegener	https://orcid.org/0000-0002-0081-0068
CB Brink	https://orcid.org/0000-0003-2707-1258

Datums

Ontvang:	23/11/2023
Aanvaar:	03/04/2024
Gepubliseer:	21/08/2024

Bibliografie

- Abel, E.L., Bjilitzke, P., 1990, A possible alarm substance in the forced swimming test, *Physiology & Behavior* 48(2), 233-239. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90306-O](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90306-O).
- Al-Harbi, K.S., 2012, Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions, *Patient Preference and Adherence* 6, 369-388. <https://doi.org/10.2147/PPA.S29716>.
- Albott, C.S., Lim, K.O., Forbes, M.K., et al., 2018, Efficacy, safety, and durability of repeated ketamine infusions for comorbid posttraumatic stress disorder and treatment-resistant depression, *The Journal of Clinical Psychiatry* 79(3), 17462. <https://doi.org/10.4088/JCP.17m11634>.
- American Psychiatric Association, 2013, Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5, fifth edition, American Psychiatric Association, Washington, DC. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>.
- Andrews, P.W., Bharwani, A., Lee, K.R., et al., 2015, Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 51, 164-188. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.01.018>.
- Antunes, M.S., Ruff, J.R., de Oliveira Espinosa, D., et al., 2015, Neuropeptide Y administration reverses tricyclic antidepressant treatment-resistant depression induced by ACTH in mice, *Hormones and Behavior* 73, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.05.018>.
- Armario, A., Gavalda, A., Marti, O., 1988, Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate, *European Journal of Pharmacology* 158(3), 207-212. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90068-4](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90068-4).

- Aulakh, C.S., Cohen, R.M., Hill, J.L., et al., 1987, Long-term imipramine treatment enhances locomotor and food intake suppressant effects of *m*-chlorophenylpiperazine in rats, *Br J Pharmacol* 91(4), 747-52. PMC1853590. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1987.tb11272.x>.
- Bakunina, N., Pariante, C.M., Zunszain, P.A., 2015, Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression, *Immunology* 144(3), 365-373. <https://doi.org/10.1111/imm.12443>.
- Ballatori, N., Krance, S.M., Notenboom, S., et al., 2009, Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases, *Biological Chemistry* 390, 191-214. <https://doi.org/10.1515/BC.2009.033>.
- Balu, D.T., Hoshaw, B.A., Malberg, J.E., et al., 2008, Differential regulation of central BDNF protein levels by antidepressant and non-antidepressant drug treatments, *Brain Research* 1211, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.03.023>.
- Barden, N., 2004, Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression, *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 29(3), 185-193.
- Bergfeld, I.O., Mantione, M., Figuee, M., et al., 2018, Treatment-resistant depression and suicidality, *Journal of Affective Disorders* 235, 362-367. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.04.016>.
- Black, C.N., Bot, M., Scheffer, P.G., et al., 2015, Is depression associated with increased oxidative stress? A systematic review and meta-analysis, *Psychoneuroendocrinology* 51, 164-175. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.09.025>.
- Boku, S., Nakagawa, S., Toda, H. et al., 2018, Neural basis of major depressive disorder: beyond monoamine hypothesis, *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 72(1), 3-12. <https://doi.org/10.1111/pcn.12604>.
- Borsini, F., Meli, A., 1988, Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94(2), 147-160. <https://doi.org/10.1007/BF00176837>.
- Brand, S., Moller, M., Harvey, B., 2015, A review of biomarkers in mood and psychotic disorders: a dissection of clinical vs. preclinical correlates, *Current Neuropsychopharmacology* 13(3), 324-368. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150307004545>.
- Brand, S.J., 2017, Development and validation of an animal model of treatment resistant depression, North-West University (South Africa), Potchefstroom Campus.
- Brand, S.J., Harvey, B.H., 2017, Exploring a post-traumatic stress disorder paradigm in Flinders sensitive line rats to model treatment-resistant depression I: bio-behavioural validation and response to imipramine, *Acta Neuropsychiatrica* 29(4), 193-206. <https://doi.org/10.1017/neu.2016.44>.
- Brink, C., Clapton, J., Eagar, B., et al., 2008, Appearance of antidepressant-like effect by sildenafil in rats after central muscarinic receptor blockade: evidence from behavioural and neuro-receptor studies, *Journal of Neural Transmission* 115, 117-125. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0806-5>.
- Brunoni, A.R., Lopes, M., Fregni, F., 2008, A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression, *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 11(8), 1169-1180. <https://doi.org/10.1017/S1461145708009309>.
- Bylund, D.B., Reed, A.L., 2007, Childhood and adolescent depression: why do children and adults respond differently to antidepressant drugs? *Neurochemistry International* 51(5), 246-253. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.025>.
- Caraci, F., Calabrese, F., Molteni, R., et al., 2018, International union of basic and clinical pharmacology CIV: the neurobiology of treatment-resistant depression: from antidepressant classifications to novel pharmacological targets, *Pharmacological Reviews* 70(3), 475-504. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014977>.
- Carlson, P.J., Singh, J.B., Zarate Jr, C.A., et al., 2006, Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets, *NeuroRx* 3(1), 22-41. <https://doi.org/10.1016/j.nurx.2005.12.009>.
- Castrén, E., Vöikar, V., Rantamäki, T., 2007, Role of neurotrophic factors in depression, *Current Opinion in Pharmacology* 7(1), 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.08.009>.
- Cleveland Clinic, 2023a, Treatment-resistant depression: What are the symptoms of treatment-resistant depression? Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/24991-treatment-resistant-depression>. Accessed 12 August 2023.
- Cleveland Clinic, 2023b, Treatment-resistant depression: What is treatment-resistant depression? Available from: <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/24991-treatment-resistant-depression>. Accessed 23 August 2023.
- Cohen, J., 1988, Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 2nd edn Lawrence Erlbaum Associates: Hillsdale, NJ, USA.
- Dhir, A., Kulkarni, S., 2007, Effect of addition of yohimbine (alpha-2-receptor antagonist) to the antidepressant activity of fluoxetine or venlafaxine in the mouse forced swim test, *Pharmacology* 80(4), 239-243. <https://doi.org/10.1159/000104877>.
- Duarte-Silva, E., Chaves Filho, A.J.M., Barichello, T., et al., 2020, Phosphodiesterase-5 inhibitors: Shedding new light on the darkness of depression? *Journal of Affective Disorders* 264, 138-149. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2019.11.114>.
- Duman, C.H., Schlesinger, L., Russell, D.S., et al., 2008, Voluntary exercise produces antidepressant and anxiolytic behavioral effects in mice, *Brain Research* 1199, 148-158. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.12.047>.
- Duman, R.S., 2002, Pathophysiology of depression: the concept of synaptic plasticity, *European Psychiatry* 17, 306-310. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(02\)00654-5](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(02)00654-5).
- Duman, R.S., Aghajanian, G.K., Sanacora, G., et al., 2016, Synaptic plasticity and depression: new insights from stress and rapid-acting antidepressants, *Nature Medicine* 22(3), 238. <https://doi.org/10.1038/nm.4050>.
- Duman, R.S., Monteggia, L.M., 2006, A neurotrophic model for stress-related mood disorders, *Biological Psychiatry* 59(12), 1116-1127. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.02.013>.
- Elfving, B., Plougmann, P.H., Müller, H.K., et al., 2010, Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression, *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13(5), 563-572. <https://doi.org/10.1017/S1461145709990721>.
- Fagioli, A., Kupfer, D.J., 2003, Is treatment-resistant depression a unique subtype of depression? *Biological Psychiatry* 53(8), 640-648. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01670-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01670-0).
- Fava, M., Kendler, K.S., 2000, Major depressive disorder, *Neuron* 28(2), 335-341. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00112-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00112-4).
- Feil, S., Zimmermann, P., Knorn, A., et al., 2005, Distribution of cGMP-dependent protein kinase type I and its isoforms in the mouse brain and retina, *Neuroscience* 135(3), 863-868. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.051>.
- Forman-Hoffman, V.L., Viswanathan, M., 2018, Screening for depression in pediatric primary care, *Current Psychiatry Reports* 20(8), 62. <https://doi.org/10.1007/s11920-018-0926-7>.
- Friedrich, M., 2017, Depression is the leading cause of disability around the world, *JAMA* 317(15), 1517-1517. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.3826>.
- Fuertig, R., Ceci, A., Camus, S.M., et al., 2016, LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain, *Bioanalysis* 8(18), 1903-1917. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0111>.
- Garcia, L.S., Comim, C.M., Valvasori, S.S., et al., 2008, Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32(1), 140-144. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.07.027>.
- Ghandour, R.M., Sherman, L.J., Vladutiu, C.J., et al., 2019, Prevalence and treatment of depression, anxiety, and conduct problems in US children, *The Journal of Pediatrics* 206, 256-267.e253. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.09.021>.
- Goldberg, J.S., Bell Jr, C.E., Pollard, D.A., 2014, Revisiting the monoamine hypothesis of depression: a new perspective, *Perspectives in Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.4137/PMC.S11375>.
- Gong, M.-J., Han, B., Wang, S.-M., et al., 2016, Icarin reverses corticosterone-induced depression-like behavior, decrease in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and metabolic network disturbances revealed by NMR-based metabolomics in rats, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 123, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.001>.
- Greenberg, P.E., Fournier, A.-A., Sisitsky, T., et al., 2015, The economic burden of adults with major depressive disorder in the United States (2005 and 2010), *The Journal of Clinical Psychiatry* 76(2), 155-162. <https://doi.org/10.4088/JCP.14m09298>.
- Gregory, E., Torres, I.J., Ge, R., et al., 2020, Predictors of cognitive impairment in treatment-resistant depression, *Journal of Affective Disorders* 274, 593-601. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2020.05.101>.
- Griffith, O.W., 1999, Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis, *Free Radical Biology and Medicine* 27(9-10), 922-935. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00176-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00176-8).
- Guan, X.-T., Shao, F., Xie, X., et al., 2014, Effects of aspirin on immobile behavior and endocrine and immune changes in the forced swimming test: comparison to fluoxetine and imipramine, *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 124, 361-366. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.002>.
- Gupta, A., Sharma, V., Singh, L., 2018, Devastating depression of youth and its remedial drug: A review, *European Journal of Biomedical Science* 5(4), 962-971.
- Hardeveld, F., Spijker, J., De Graaf, R., et al., 2010, Prevalence and predictors of recurrence of major depressive disorder in the adult population, *Acta Psychiatrica Scandinavica* 122(3), 184-191. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.2009.01519.x>.
- Harley, R., Sprich, S., Safren, S., et al., 2008, Adaptation of dialectical behavior therapy skills training group for treatment-resistant depression, *The Journal of Nervous and Mental Disease* 196(2), 136-143. <https://doi.org/10.1097/NMD.0b013e318162aa3f>.
- Harvey, B.H., 1996, Affective disorders and nitric oxide: a role in pathways to relapse and refractoriness? *Human Psychopharmacology: Clinical*

- and Experimental 11(4), 309-319. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1077\(199607\)11:4<309::AID-HUP775>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1077(199607)11:4<309::AID-HUP775>3.0.CO;2-B).
- Harvey, B.H., Brand, L., Jeeva, Z. et al., 2006, Cortical/hippocampal monoamines, HPA-axis changes and aversive behavior following stress and rest in an animal model of post-traumatic stress disorder, *Physiology and Behavior* 87(5), 881-890. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.01.033>.
- Harvey, B.H., Hamer, M., Louw, R., et al., 2012, Metabolic and glutathione redox markers associated with brain-derived neurotrophic factor in depressed African men and women: evidence for counterregulation? *Neuropsychobiology* 67(1), 33-40. <https://doi.org/10.1159/000343501>.
- Harvey, B.H., McEwen, B.S., Stein, D.J., 2003, Neurobiology of antidepressant withdrawal: implications for the longitudinal outcome of depression, *Biological Psychiatry* 54(10), 1105-1117. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00528-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00528-6).
- Harvey, B.H., Naciti, C., Brand, L., et al., 2004, Serotonin and stress: protective or malevolent actions in the biobehavioral response to repeated trauma? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032(1), 267-272. <https://doi.org/10.1196/annals.1314.035>.
- Hasin, D.S., Goodwin, R.D., Stinson, F.S. et al., 2005, Epidemiology of major depressive disorder: results from the National Epidemiologic Survey on Alcoholism and Related Conditions, *Archives of General Psychiatry* 62(10), 1097-1106. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.10.1097>.
- Hasin, D.S., Sarvet, A.L., Meyers, J.L., et al., 2018, Epidemiology of adult DSM-5 major depressive disorder and its specifiers in the United States, *JAMA Psychiatry* 75(4), 336-346. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2017.4602>.
- Hauksson, P., Ingibergsdóttir, S., Gunnarsdóttir, T. et al., 2017, Effectiveness of cognitive behaviour therapy for treatment-resistant depression with psychiatric comorbidity: comparison of individual versus group CBT in an interdisciplinary rehabilitation setting, *Nordic Journal of Psychiatry* 71(6), 465-472. <https://doi.org/10.1080/08039488.2017.1331263>.
- Hawton, K., Casanovi Comabella, C., Haw, C., et al., 2013, Risk factors for suicide in individuals with depression: a systematic review, *Journal of Affective Disorders* 147(1-3), 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.01.004>.
- Hiroi, R., Neumaier, J.F., 2006, Differential effects of ovarian steroids on anxiety versus fear as measured by open field test and fear-potentiated startle, *Behavioural Brain Research* 166(1), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.07.021>.
- Hirschfeld, R.M., 2000, History and evolution of the monoamine hypothesis of depression, *Journal of Clinical Psychiatry* 61(6), 4-6.
- Hornig-Rohan, M., Wolkowitz, O.M., Amsterdam, J.D., 1996, Novel strategies for treatment-resistant depression, *Psychiatric Clinics of North America* 19(2), 387-405. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70294-X](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70294-X).
- Huang, Z., Zhong, X.-M., Li, Z.-Y., et al., 2011, Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats, *Neuroscience Letters* 493(3), 145-148. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.02.030>.
- IsHak, W.W., Greenberg, J.M., Balayan, K., et al., 2011, Quality of life: the ultimate outcome measure of interventions in major depressive disorder, *Harvard Review of Psychiatry* 19(5), 229-239. <https://doi.org/10.3109/10673229.2011.614099>.
- Jacobsen, J.P., Mørk, A., 2006, Chronic corticosterone decreases brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA and protein in the hippocampus, but not in the frontal cortex, of the rat, *Brain Research* 1110(1), 221-225. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.077>.
- Kapczinski, F., Frey, B.N., Kauer-Sant'Anna, M., et al., 2008, Brain-derived neurotrophic factor and neuroplasticity in bipolar disorder, *Expert Review of Neurotherapeutics* 8(7), 1101-1113. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.7.1101>.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., et al., 2010, Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biology* 8(6), e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>.
- Kornstein, S.G., Schneider, R.K., 2001, Clinical features of treatment-resistant depression, *Journal of Clinical Psychiatry* 62, 18-25.
- Kunugi, H., Hori, H., Adachi, N., et al., 2010, Interface between hypothalamic-pituitary-adrenal axis and brain-derived neurotrophic factor in depression, *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 64(5), 447-459. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2010.02135.x>.
- Lam, R.W., Malhi, G.S., McIntyre, R.S., et al., 2013, Fatigue and occupational functioning in major depressive disorder, *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 47(11), 989-991. <https://doi.org/10.1177/0004867413488222>.
- Lapidus, K.A., Gabbay, V., Mao, X., et al., 2014, In vivo 1H MRS study of potential associations between glutathione, oxidative stress and anhedonia in major depressive disorder, *Neuroscience Letters* 569, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.03.056>.
- Lépine, J.-P., Briley, M., 2011, The increasing burden of depression, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 7(Suppl 1), 3. <https://doi.org/10.2147/NDT.S19617>.
- Lex, H., Ginsburg, Y., Sitzmann, A.F., et al., 2019, Quality of life across domains among individuals with treatment-resistant depression, *Journal of Affective Disorders* 243, 401-407. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2018.09.062>.
- Li, C.-T., 2023, Overview of treatment-resistant depression, *Progress in Brain Research* 278, 1-23. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2023.03.007>.
- Liebenberg, N., Harvey, B.H., Brand, L., et al., 2010a, Antidepressant-like properties of phosphodiesterase type 5 inhibitors and cholinergic dependency in a genetic rat model of depression, *Behavioural Pharmacology* 21(5-6), 540-547. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e32833befe5>.
- Liebenberg, N., Harvey, B.H., Brand, L., et al., 2012, Chronic treatment with the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil and tadalafil display anxiolytic effects in Flinders Sensitive Line rats, *Metabolic Brain Disease* 27(3), 337-340. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9284-z>.
- Liebenberg, N., Wegener, G., Harvey, B.H., et al., 2010b, Investigating the role of protein kinase-G in the antidepressant-like response of sildenafil in combination with muscarinic acetylcholine receptor antagonism, *Behavioural Brain Research* 209(1), 137-141. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.032>.
- Liu, T., Zhong, S., Liao, X., et al., 2015, A meta-analysis of oxidative stress markers in depression, *PLoS One* 10(10), e0138904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138904>.
- Lucchese, A.C., Sarin, L.M., Magalhães, E.J.M., et al., 2021, Repeated subcutaneous esketamine for treatment-resistant depression: impact of the degree of treatment resistance and anxiety comorbidity, *Journal of Psychopharmacology* 35(2), 142-149. <https://doi.org/10.1177/026988120978398>.
- Lucki, I., 1997, The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs, *Behavioural Pharmacology* 8(6), 523-532. <https://doi.org/10.1097/00008877-19971000-00010>.
- MA, Q., Wang, J., Chen, X., et al., 2008, Alterations in rat hippocampal norepinephrine and serotonin levels under physical exercise and psychological stress, *Chinese Journal of Pathophysiology* 12, 1549-1552.
- Malhi, G., Hitching, R., Berk, M., et al., 2013, Pharmacological management of unipolar depression, *Acta Psychiatrica Scandinavica* 127, 6-23. <https://doi.org/10.1111/acps.12122>.
- Markopoulou, K., 2013, HPA axis dysfunction in treatment resistant affective disorders, King's College London (University of London).
- Markopoulou, K., Papadopoulos, A., Juruena, M.F., et al., 2009, The ratio of cortisol/DHEA in treatment resistant depression, *Psychoneuroendocrinology* 34(1), 19-26. <https://doi.org/10.1016/j.psneuen.2008.08.004>.
- Martinez, J.M., Garakani, A., Yehuda, R., et al., 2012, Proinflammatory and "resiliency" proteins in the CSF of patients with major depression, *Depression and Anxiety* 29(1), 32-38. <https://doi.org/10.1002/da.20876>.
- Matsumita, H., Matsuzaki, M., Han, X.-J., et al., 2012, Antidepressant-like effect of sildenafil through oxytocin-dependent cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation, *Neuroscience* 200, 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.001>.
- McCrone, P., Rost, F., Koeser, L., et al., 2018, The economic cost of treatment-resistant depression in patients referred to a specialist service, *Journal of Mental Health* 27(6), 567-573. <https://doi.org/10.1080/09638237.2017.1417562>.
- Misslin, R., Cigrang, M., 1986, Does neophobia necessarily imply fear or anxiety? *Behavioural processes* 12(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(86\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0376-6357(86)90069-0).
- Mncube, K., Harvey, B., 2022, Bio-behavioural changes in treatment-resistant socially isolated FSL rats show variable or improved response to combined fluoxetine-olanzapine versus olanzapine treatment, *IBRO Neuroscience Reports* 13, 284-298. <https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2022.08.009>.
- Mncube, K., Möller, M., Harvey, B.H., 2021, Post-weaning social isolated flinders sensitive line rats display bio-behavioural manifestations resistant to fluoxetine: a model of treatment-resistant depression, *Frontiers in Psychiatry* 12, 688150. <https://doi.org/10.3389/fpsyt.2021.688150>.
- Mokoena, M.L., Harvey, B.H., Oliver, D.W., et al., 2010, Ozone modulates the effects of imipramine on immobility in the forced swim test, and nonspecific parameters of hippocampal oxidative stress in the rat, *Metabolic Brain Disease* 25, 125-133. <https://doi.org/10.1007/s11011-010-9189-7>.
- Mokoena, M.L., Harvey, B.H., Viljoen, F., et al., 2015, Ozone exposure of Flinders Sensitive Line rats is a rodent translational model of neurobiological oxidative stress with relevance for depression and antidepressant response, *Psychopharmacology* 232, 2921-2938. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3928-8>.
- Möller, M., Du Preez, J.L., Viljoen, F.P., et al., 2013, N-acetyl cysteine reverses social isolation rearing induced changes in cortico-striatal monoamines in rats, *Metabolic Brain Disease* 28, 687-696. <https://doi.org/10.1007/s11011-013-9433-z>.
- Mondal, A.C., Fatima, M., 2019, Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment, *International Journal of Neuroscience* 129(3), 283-296. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1527328>.
- Moriarty, M., Lee, A., O'Connell, B., et al., 2011, Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic disorder, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 401, 2481-2493. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5322-7>.

- National Institute of Mental Health. 2023. Depression. What is Depression? Available from: <https://www.nimh.nih.gov/health/topics/depression>. Accessed 23 September 2023.
- Nierenberg, A.A., DeCecco, L.M., 2001, Definitions of antidepressant treatment response, remission, nonresponse, partial response, and other relevant outcomes: a focus on treatment-resistant depression, *Journal of Clinical Psychiatry* 62, 5-9.
- Overstreet, D.H., Friedman, E., Mathé, A.A., et al., 2005, The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29(4-5), 739-759. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.015>.
- Papakostas, G.I., Petersen, T., Mahal, Y., et al., 2004, Quality of life assessments in major depressive disorder: a review of the literature, *General Hospital Psychiatry* 26(1), 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.genhosppsych.2003.07.004>.
- Pariente, C.M., Lightman, S.L., 2008, The HPA axis in major depression: classical theories and new developments, *Trends in Neurosciences* 31(9), 464-468. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.06.006>.
- Pereira, V.S., Joca, S.R., Harvey, B.H., et al., 2019, Esketamine and rapastinel, but not imipramine, have antidepressant-like effect in a treatment-resistant animal model of depression, *Acta Neuropsychiatrica* 31(5), 258-265. <https://doi.org/10.1017/neu.2019.25>.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., Bourin, M., 2005, Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity, *Psychopharmacology* 177(3), 245-255. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-2048-7>.
- Piccini, A., Veltri, A., Costanzo, D., et al., 2015, Decreased plasma levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) during mixed episodes of bipolar disorder, *Journal of Affective Disorders* 171, 167-170. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.08.058>.
- Plotsky, P.M., Owens, M.J., Nemeroff, C.B., 1998, Psychoneuroendocrinology of depression: hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Psychiatric Clinics of North America* 21(2), 293-307. [https://doi.org/10.1016/S0193-953X\(05\)70006-X](https://doi.org/10.1016/S0193-953X(05)70006-X).
- Polyakova, M., Stuke, K., Schuemberg, K., et al., 2015, BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis, *Journal of Affective Disorders* 174, 432-440. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2014.11.044>.
- Porolt, R., 1979, Animal model of depression, *Biomedicine [publiee pour l'AAICG]* 30(3), 139-140.
- Porolt, R., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature* 266(5604), 730. <https://doi.org/10.1038/266730a0>.
- Prchal, J., Srivastava, S., Beutler, E., 1975, Active transport of GSSG from reconstituted erythrocyte ghosts, *Blood* 46(1), 111-117. <https://doi.org/10.1182/blood.V46.1.111.111>.
- Prebth, M., 2000, Clinical review of recent findings on the awareness, diagnosis and treatment of depression, *American Family Physician* 61(10), 3158-3168.
- Prut, L., Belzung, C., 2003, The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review, *European Journal of Pharmacology* 463(1-3), 3-33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X).
- Puzzo, D., Sapienza, S., Arancio, O., et al., 2008, Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 4(2), 371. <https://doi.org/10.2147/NDT.S2447>.
- Ramirez, K., Sheridan, J.F., 2016, Antidepressant imipramine diminishes stress-induced inflammation in the periphery and central nervous system and related anxiety-and depressive-like behaviors, *Brain, Behavior, and Immunity* 57, 293-303. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.05.008>.
- Ramos, A., Berton, O., Mormède, P., et al., 1997, A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains, *Behavioural Brain Research* 85(1), 57-69. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(96\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(96)00164-7).
- Reay, R., 2010, The effects of sildenafil on neuroplasticity in human neuroblastoma cells. North-West University.
- Reiersen, G.W., Guo, S., Mastronardi, C., et al., 2011, cGMP signaling, phosphodiesterases and major depressive disorder, *Current Neuropharmacology* 9(4), 715-727. <https://doi.org/10.2174/157015911798376271>.
- Réus, G.Z., Stringari, R.B., Ribeiro, K.F., et al., 2011, Ketamine plus imipramine treatment induces antidepressant-like behavior and increases CREB and BDNF protein levels and PKA and PKC phosphorylation in rat brain, *Behavioural Brain Research* 221(1), 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.02.024>.
- Rickels, K., Downing, R., Schweizer, E., et al., 1993, Antidepressants for the treatment of generalized anxiety disorder: a placebo-controlled comparison of imipramine, trazodone, and diazepam, *Archives of General Psychiatry* 50(11), 884-895. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1993.01820230054005>.
- Rosenblatt, J.D., McIntyre, R.S., Alves, G.S., et al., 2015, Beyond monoamines: novel targets for treatment-resistant depression: a comprehensive review, *Current Neuropharmacology* 13(5), 636-655. <https://doi.org/10.2174/1570159X13666150630175044>.
- Rosenzweig-Lipson, S., Beyer, C.E., Hughes, Z.A., et al., 2007, Differentiating antidepressants of the future: efficacy and safety, *Pharmacology & Therapeutics* 113(1), 134-153. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.07.002>.
- Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., et al., 2006, Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report, *American Journal of Psychiatry* 163(11), 1905-1917. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.1905>.
- Rush, A.J., Trivedi, M.H., Wisniewski, S.R., et al., 2008, Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report, *Focus* 6(1), 128-142. <https://doi.org/10.1176/foc.6.1.foc128>.
- Saayman, J.L.B., Harvey, B.H., Wegener, G., et al., 2024, Sildenafil, alone and in combination with imipramine or escitalopram, display antidepressant-like effects in an adrenocorticotrophic hormone-induced (ACTH) rodent model of treatment-resistant depression, *European Journal of Pharmacology* 969, 176434. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176434>.
- Saayman, J.L.B., Steyn, S.F., Brink, C.B., 2021, The long-term bio-behavioural effects of juvenile sildenafil treatment in Sprague-Dawley versus flinders sensitive line rats, *Acta Neuropsychiatrica* 33(4), 200-205. <https://doi.org/10.1017/neu.2021.4>.
- Sales, M., Biojone, C., Terceti, M.S., et al., 2011, Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal administration of DNA methylation inhibitors, *British Journal of Pharmacology* 164(6), 1711-1721. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01489.x>.
- Savas, M., Yeni, E., Verit, A., et al., 2010, Acute effect of phosphodiesterase type 5 inhibitor on serum oxidative status and prolidase activities in men with erectile dysfunction, *Clinics* 65, 1311-1314. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322010001200014>.
- Schildkraut, J.J., 1965, The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence, *American Journal of Psychiatry* 122(5), 509-522. <https://doi.org/10.1176/ajp.122.5.509>.
- Schoeman, J.C., Steyn, S.F., Harvey, B.H., et al., 2017, Long-lasting effects of fluoxetine and/or exercise augmentation on bio-behavioural markers of depression in pre-pubertal stress sensitive rats, *Behavioural Brain Research* 323, 86-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.01.043>.
- Sheffler, Z.M., Patel, P., Abdijadid, S., 2019, Antidepressants. StatPearls [Internet].
- Sheldrick, A., Camara, S., Ilieva, M., et al., 2017, Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT3) levels in post-mortem brain tissue from patients with depression compared to healthy individuals-a proof of concept study, *European Psychiatry* 46, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2017.06.009>.
- Sikandner, H.E., Park, S.Y., Kim, M.J., et al., 2017, Neuroprotective effects of sildenafil against oxidative stress and memory dysfunction in mice exposed to noise stress, *Behavioural Brain Research* 319, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.10.046>.
- Smith, A.J., Clutton, R.E., Lilley, E., et al., 2018, PREPARE: guidelines for planning animal research and testing, *Laboratory Animals* 52(2), 135-141. <https://doi.org/10.1177/0023677217724823>.
- Socala, K., Nieoczym, D., Pieróg, M., et al., 2016, Antidepressant-like activity of sildenafil following acute and subchronic treatment in the forced swim test in mice: effects of restraint stress and monoamine depletion, *Metabolic Brain Disease* 31(5), 1095-1104. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9852-8>.
- Squellero, I., Caruso, D., Porro, B., et al., 2012, Direct glutathione quantification in human blood by LC-MS/MS: comparison with HPLC with electrochemical detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 71, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.013>.
- Steyn, S.F., Harvey, B.H., Brink, C.B., 2018, Immediate and long-term antidepressant-like effects of pre-pubertal escitalopram and omega-3 supplementation combination in young adult stress-sensitive rats, *Behavioural Brain Research* 351, 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.021>.
- Swiecicka, A., 2023, The efficacy of PDE5 inhibitors in diabetic patients, *Andrology* 11(2), 245-256. <https://doi.org/10.1111/andr.13328>.
- Taylor, C., Fricker, A.D., Devi, L.A., et al., 2005, Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways, *Cellular Signalling* 17(5), 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.12.007>.
- Ten Have, M., De Graaf, R., Van Dorsselaer, S., et al., 2018, Recurrence and chronicity of major depressive disorder and their risk indicators in a population cohort, *Acta Psychiatrica Scandinavica* 137(6), 503-515. <https://doi.org/10.1111/acps.12874>.
- Thakur, T., Sharma, S., Kumar, K., et al., 2013, Neuroprotective role of PDE4 and PDE5 inhibitors in 3-nitropropionic acid induced behavioral and biochemical toxicities in rats, *European Journal of Pharmacology* 714(1-3), 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.06.035>.
- Tomaz, V., Cordeiro, R., Costa, A., et al., 2014, Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice, *Neuroscience* 268, 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.03.025>.
- Varghese, F.P., Brown, E.S., 2001, The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in major depressive disorder: a brief primer for primary care physicians, *Primary Care Companion to the Journal of Clinical Psychiatry* 3(4), 151. <https://doi.org/10.4088/PCC.v03n0401>

- Verhoeven, F.E., Wardenaar, K.J., Ruhe, H.G., et al., 2018, Seeing the signs: Using the course of residual depressive symptomatology to predict patterns of relapse and recurrence of major depressive disorder, *Depression and Anxiety* 35(2), 148-159. <https://doi.org/10.1002/da.22695>.
- Verit, A., Savas, M., Ciftci, H., et al., 2010, Assessment of the acute effects of tadalafil on the cardiovascular system based on examination of serum oxidative status and paraoxonase activity in men with erectile dysfunction: a preliminary study, *International Journal of Impotence Research* 22(2), 115-119. <https://doi.org/10.1038/ijir.2009.58>.
- Vidal, R., Pilar-Cuellar, F., dos Anjos, S., et al., 2011, New strategies in the development of antidepressants: towards the modulation of neuroplasticity pathways, *Current Pharmaceutical Design* 17(5), 521-533. <https://doi.org/10.2174/138161211795164086>.
- Voineskos, D., Daskalakis, Z.J., Blumberger, D.M., 2020, Management of treatment-resistant depression: challenges and strategies, *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 16, 221-234. <https://doi.org/10.2147/NDT.S198774>.
- Vos, T., Abajobir, A.A., Abate, K.H., et al., 2017, Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016, *The Lancet* 390(10100), 1211-1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).
- Wang, C., Zhang, J., Lu, Y., et al., 2014, Antidepressant-like effects of the phosphodiesterase-4 inhibitor etazolate and phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil via cyclic AMP or cyclic GMP signaling in mice, *Metabolic Brain Disease* 29(3), 673-682. <https://doi.org/10.1007/s11011-014-9533-4>.
- Wang, L.-S., Zhang, M.-D., Tao, X., et al., 2019, LC-MS/MS-based quantification of tryptophan metabolites and neurotransmitters in the serum and brain of mice, *Journal of Chromatography B* 1112, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.02.021>.
- Warner-Schmidt, J.L., Duman, R.S., 2006, Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment, *Hippocampus* 16(3), 239-249. <https://doi.org/10.1002/hipo.20156>.
- Williams, S.Z., Chung, G.S., Muennig, P.A., 2017, Undiagnosed depression: A community diagnosis, *SSM-Population Health* 3, 633-638. <https://doi.org/10.1016/j.ssmph.2017.07.012>.
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., Belzung, C., 2013, The neurobiology of depression and antidepressant action, *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 37(10), 2331-2371. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>.
- Wojnicz, A., Ortiz, J.A., Casas, A.I., et al., 2016, Data supporting the rat brain sample preparation and validation assays for simultaneous determination of 8 neurotransmitters and their metabolites using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Data in Brief* 7, 714-720. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2016.03.025>.
- World Health Organization, 2017, Depression and other common mental disorders, *Global Health Estimates*. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254610/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Accessed 23 August 2023.
- World Health Organization, 2023a, Depression, impact. Available from: <https://www.who.int/health-topics/depression>. Accessed 12 August 2023.
- World Health Organization, 2023b, Depression, overview. Available from: <https://www.who.int/health-topics/depression>. Accessed 12 August 2023.
- World Health Organization, 2023c, Depression, overview. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Accessed 13 August 2023.
- World Health Organization, 2023d, Depression, symptoms and patterns. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>. Accessed 12 August 2023.
- Yehuda, R., Antelman, S.M., 1993, Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder, *Biological Psychiatry* 33(7), 479-486. [https://doi.org/10.1016/0006-3223\(93\)90001-T](https://doi.org/10.1016/0006-3223(93)90001-T).
- Zangen, A., Overstreet, D.H., Yadid, G., 1997, High serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid levels in limbic brain regions in a rat model of depression; Normalization by chronic antidepressant treatment, *Journal of Neurochemistry* 69(6), 2477-2483. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062477.x>.
- Zangen, A., Overstreet, D.H., Yadid, G., 1999, Increased catecholamine levels in specific brain regions of a rat model of depression: normalization by chronic antidepressant treatment, *Brain Research* 824(2), 243-250. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01214-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01214-7).
- Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., et al., 2012, Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients, *Oncology Letters* 4(6), 1247-1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>.
- Zorumski, C.F., Nagele, P., Mennerick, S., et al., 2015, Treatment-resistant major depression: rationale for NMDA receptors as targets and nitrous oxide as therapy, *Frontiers in Psychiatry* 6, 172. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2015.00172>.