



Die Effekte von Testosteron und Dopamin auf depressions-ähnliche Verhaltensweisen männlicher Ratten

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tim Ernst Buddenberg

aus Hilden

Düsseldorf, November 2008

aus der Abteilung für Physiologische Psychologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. J.P. Huston
Koreferent: Prof. Dr. R. Pietrowsky

Tag der mündlichen Prüfung: 29.01.2009

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen jenen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zum Zustandekommen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Dr. Joseph P. Huston für die Ermöglichung dieser Arbeit, die hervorragende Hilfestellung und Unterstützung während der Durchführung der Studien, die großen Freiheiten und die angenehme Zusammenarbeit.

Insbesondere gilt mein Dank auch Frau Dr. Bianca Topic für ihre intensive Hilfe und ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit sowie für die Freiräume, die sie mir ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Angelica De Souza Silva für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung, für die fruchtbare Kooperation und Durchführung des Mikrodialyse-Experimentes im Rahmen dieses Projektes.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Pietrowsky möchte ich mich für die Übernahme des Koreferates bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biol. Sandra Schäble, Herrn Dr. Martin Pum und allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Physiologische Psychologie für die zahlreichen Diskussionen, die gute Zusammenarbeit und hilfreiche moralische und wissenschaftliche Unterstützung danken.

Meiner Frau gilt mein besonderer Dank für ihre moralische Unterstützung, das Korrekturlesen meiner Arbeit und ihrer großen Geduld während der Anfertigung dieser Dissertation.

Ein herzlicher Dank auch an meine Eltern, meinem Bruder und seiner Frau, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

Die Erforschung der neurobiologischen Grundlagen der Depression fokussierte sich lange auf die Rolle der präsynaptischen Freisetzung und der postsynaptischen Verfügbarkeit biogener Amine. Darauf basierend ist bis heute eine Vielzahl unterschiedlicher Antidepressiva entwickelt worden, die zum Teil sehr selektiv die serotonerge oder noradrenerge Neurotransmission modulieren. Allerdings erweisen sich eine nicht unerhebliche Anzahl von Patienten als therapieresistent gegenüber einer Behandlung mit herkömmlichen Antidepressiva. In den letzten Jahren mehrte sich die Evidenz, dass sowohl hormonelle Änderungen, wie ein reduzierter Testosteronspiegel, als auch eine Dysregulation in der dopaminergen Neurotransmission ergänzende neurobiologische Erklärungsansätze zur Depressionsgenese darstellen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob Testosteron und Dopamin (DA) in einem Tiermodell der Depression, dem „Forced Swimming Test“ (FST), potentiell antidepressive Eigenschaften bei intakten männlichen Ratten entfaltet. Ergänzend wurden als Kontrolluntersuchungen das Elevated Plus-Maze (EPM) und das Offenfeld durchgeführt, um auszuschließen, dass die im FST gefundenen Ergebnisse auf ein gesteigertes Angstverhalten oder eine Erhöhung der generellen Motorik zurückzuführen sind.

In einem weiterführenden Experiment sollte untersucht werden, ob Testosteron einen Einfluss auf monoaminerge Transmitterkonzentrationen in Gehirnregionen, welche eine entscheidende Rolle bei depressiven Symptomen spielen, ausübt. Die Methode der in vivo Mikrodialyse wurde genutzt, um Veränderungen in der Konzentration von DA und Serotonin (5-HT) im Neostriatum und Nucleus accumbens nach einer systemischen oder intranasalen Testosteronapplikation zu bestimmen. Des Weiteren sollte ermittelt werden, ob die intranasale Applikationsform von lipophilen Substanzen, wie Testosteron, effektiver ist als eine systemische Verabreichung.

Es zeigte sich, dass Testosteron dosisabhängig eine Reduktion von depressionsähnlichen Verhaltensweisen bei gesunden männlichen Ratten induziert, ohne dabei Lokomotion oder Angstverhalten zu modulieren. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass Testosteron die Konzentrationen von 5-HT und DA in Neostriatum und Nucleus accumbens erhöht. Dabei scheint die intranasale Applikationsform von Testosteron effektiver als eine systemische Verabreichung zu sein, da mittels dieser

Methode wesentlich geringere Dosierungen eine Konzentrationssteigerung der Monoamine bewirkten. Somit könnte das antidepressive Wirkpotential von Testosteron auf seine Interaktion mit monoaminergen Neurotransmittern zurückzuführen sein. Exogenes DA kann aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften bei einer systemischen Verabreichung die Bluthirnschranke (BHS) nur in sehr geringen Mengen passieren. Aufgründessen wurde im anschließenden Experiment die intranasale Applikationsform als alternative Verabreichungsform für DA gewählt. Intranasal verabreichtes DA zeigte ebenfalls je nach Dosierung antidepressive Eigenschaften im FST ohne Verhaltensänderungen in Kontrollversuchen wie dem EPM und einem Offenfeld ohne Habituation auszulösen. Allerdings steigerte DA die Lokomotion in einem Offenfeldversuch, bei dem zuvor eine Habituation der Tiere an die neuartige Umgebung erfolgt ist. Somit kann abschließend nicht geklärt werden, ob die Effekte von DA im FST nicht doch auf eine gesteigerte generelle Motorik zurückzuführen sind.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass Testosteron und DA an den neurobiologischen Mechanismen der Depression beteiligt sind. Auch kann die intranasale Applikationsform als gute Alternative zur herkömmlichen systemischen Verabreichung betrachtet werden. Dabei scheint der Vorteil dieser Verabreichungsform derart zu sein, dass aufgrund eines kürzeren Transportweges über die Regio olfactoria weniger Substanz im Körper metabolisiert wird und somit eine geringere Dosierung notwendig ist. Möglicherweise kann über die intranasale Applikation ein Substanztransport über die BHS ins Gehirn umgangen werden.

Summary

For a long time the research on neurobiological processes in depression focused on the presynaptic release and postsynaptic availability of the monoamines. Thus, a variety of different antidepressants have been developed, which selectively modulate the neurotransmission of either the serotonergic or noradrenergic system. Although clinical trials suggest a good efficacy of antidepressants in treating depression, there is also a high incidence of treatment resistance. In recent years, accumulating evidence suggests, that a reduction in levels of testosterone as well as a dysregulation of the dopaminergic system might be involved in the neurobiological mechanisms underlying depression.

Hence, we were interested to assess potential antidepressant-like effects of testosterone and dopamine (DA) in an animal model of depression the “Forced Swimming Test” (FST). Additionally, the elevated plus-maze (EPM) and the open-field test was used to examine whether potential effects on anxiety and general activity may have contributed to the results found in the FST.

In a follow up study, we asked whether monoaminergic neurotransmission in brain areas which play a critical role in depression is influenced by testosterone. The method of in vivo microdialysis was used to determine the changes in levels of DA and serotonin (5-HT) in the neostriatum and nucleus accumbens upon either subcutaneous (s.c.) or intranasal application of testosterone. Furthermore, we wished to examine whether the intranasal application of the lipophilic substance testosterone, is superior compared to systemic application. It was shown, that testosterone induced a dose-dependent decrease of depressive-like behaviour in male rats, without stimulating locomotor activity or modulating anxiety. Furthermore showed, that testosterone induced an increase in levels of 5-HT and DA in the neostriatum and nucleus accumbens. Since an increase in the concentration of 5-HT and DA was found with a lower dose applied intranasally, this application seemed to be more effective compared to the subcutaneous application. These results indicate, that the antidepressant-like effects of testosterone could be a result of its interaction with monoaminergic systems.

Transport of exogenous DA to the brain via the blood brain barrier is limited, due to its hydrophilic properties. Thus, in the subsequent study, the intranasal application was used as an alternative administration route for DA.

Intranasal DA exhibited antidepressant-like effects in the FST dose-dependently without affecting behaviour in the EPM or an unfamiliar open-field. However, DA enhanced locomotion in a familiar open-field. Thus, we can not rule out that the effects of the FST were influenced by a general increase in motor activity.

The results of this work indicate, that testosterone and DA may be involved in the neurobiological mechanism underlying depression. Moreover, it was shown that the intranasal application provides an alternative method to administer substances to the central nervous system. It may be that the benefit of this application method could be explained by the reduced metabolism, due to a fast transport over the regio olfactoria. It is suggested, that the intranasal application method is potentially a good way to circumvent the blood-brain-barrier.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	9
2. Einleitung	10
2.1. Depression	10
2.1.1. Depression im Tiermodell	12
2.1.2. Depression und Testosteron.....	14
2.1.3. Depression und Dopamin	16
2.2. Die intranasale Applikation	18
2.3. Fragestellungen.....	20
3. Überblick über die Methoden	21
3.1. „Forced Swimming“ Test	21
3.2. Das Offenfeld	23
3.3. Das Elevated Plus-Maze	24
3.4. Neurochemie.....	25
4. Durchgeführte Studien.....	27
4.1. Die Effekte von Testosteron auf depressions-ähnliche Verhaltensweisen bei gesunden männlichen Ratten im „Forced Swimming“ Test.....	27
4.2. Die neurochemischen Effekte von Testosteron auf das dopaminerge und serotonerge Transmittersystem im Neostriatum und Nucleus accumbens.	29
4.3. Die Effekte von intranasal verabreichten Dopamin auf das Verhalten im „Forced Swimming“ Test, Elevated Plus-Maze und Offenfeld.....	31
5. Zusammenfassende Diskussion	34
6. Literaturverzeichnis.....	41
7. Veröffentlichungen	52

1. Abkürzungsverzeichnis

BHS	- Bluthirnschranke
DA	- Dopamin
DAT	- Dopamintransporter
DOPAC	- L-3,4-Dihydroxyphenyllessigsäure
EKT	- Elektrokrampftherapie
EPM	- Elevated Plus-Maze
FST	- Forced Swimming Test
HHN	- Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HLPC	- Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
L-DOPA	- L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
NE	- Noradrenalin
MAO	- Monoaminoxidase
5-HT	- Serotonin
SNRI	- selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
SSRI	- selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer
s.c.	- subkutan
ZNS	- zentrale Nervensystem

2. Einleitung

Zunächst werden kurz die wichtigsten aktuellen neurobiologischen Befunde zur unipolaren Depression zusammengefasst und die ausgeprägte Varianz des Behandlungserfolges von konventionellen Antidepressiva aufgezeigt. Anschließend wird die Problematik, Depressionen im Tiermodell nachzustellen, erläutert. Weiterhin wird die potentielle Bedeutung von Testosteron und DA an den zugrunde liegenden neurobiologischen Mechanismen der Depression beschrieben. Abschließend wird die intranasale Applikationsform als gute Alternative diskutiert um Substanzen zu verabreichen, welche die BHS nicht passieren können oder einem schnellen Metabolismus im Körper unterliegen.

2.1. Depression

Die unipolare Depression gehört mit einem Erkrankungsrisiko von 12 bis 17 Prozent zu den häufigsten psychischen Erkrankungen (Blazer et al., 1994). Die durch die Depression beeinträchtigten physiologischen Vorgänge sind Gegenstand umfassender Forschungsbemühungen, da etwa 20 bis 30% der Patienten auf die zurzeit erhältlichen Pharmakotherapien nicht ansprechen (Holsboer-Trachsler 2006; Sackeim, 2001). Dies ist mitunter in dem mangelnden Verständnis der genauen Wirkmechanismen, der verfügbaren Antidepressiva sowie in der komplexen Pathophysiologie der Depression begründet. Während einer depressiven Episode, leidet der betroffene Patient u.a. unter einer gedrückten Stimmung und einer Verminderung von Antrieb und Aktivität. Die Fähigkeit zu Freude, das Interesse und die Konzentration sind vermindert. Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen sind fast immer beeinträchtigt. Häufig treten Schuldgefühle oder Gedanken über die eigene Wertlosigkeit auf. Die gedrückte Stimmung kann von somatischen Symptomen begleitet werden, wie Früherwachen, Morgentief, eine deutliche psychomotorische Hemmung, Agitiertheit, Appetit-, Gewichts- und Libidoverlust (Weltgesundheitsorganisation: ICD-10). Die Depression stellt sich somit sowohl klinisch als auch neurophysiologisch als äußerst heterogene Erkrankung dar. Für die Entstehung einer depressiven Episode scheint ein multifaktorielles Geschehen verantwortlich zu sein, da sowohl biologische Faktoren, wie z.B. genetische

Prädispositionen, als auch psychologische Faktoren, wie belastende Lebensereignisse oder chronische Stressoren, zur Erkrankung führen können (Akiskal 1985). Da an der Regulation von Affekten und Emotionen eine Vielzahl von Gehirnregionen beteiligt sind, scheinen die diversen Symptome der Depression durch unterschiedliche neuroanatomische Regionen vermittelt zu werden. Mit zunehmender Ausweitung der Forschungsmöglichkeiten in den Bereichen der Bildgebung, der Elektrophysiologie und der Mikrobiologie konnten in Zusammenhang mit depressiven Episoden Veränderungen in verschiedenen Systemen gefunden werden (Drevets, 2000; Foster und MacQueen, 2008; Kalia, 2005; Zhu et al. 1999). Dabei scheinen diese unterschiedlichen, gebietspezifischen Veränderungen für verschiedene depressive Symptome verantwortlich zu sein. So könnten die nachgewiesenen Veränderungen im präfrontalen/cingulären Kortex und Hippocampus eventuell mit den kognitiven Aspekten einer Depression in Zusammenhang stehen, während die Veränderungen in Striatum (speziell des Nucleus accumbens) und Amygdala eine reduzierte Motivation, anhedonische und ängstliche Symptome bewirken könnten. Für die neurovegetativen Symptome einer Depression, wie Schlafstörungen, Appetit und Energielosigkeit, scheinen Veränderungen des Hypothalamus ursächlich zu sein.

Verschiedene Befunde belegen zudem Dysregulationen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse), was die Depression als Ausdruck einer Fehlanpassung an chronischen Stress erscheinen lässt (Arborelius et al. 1999; Holsboer 2001; Sacher und Baron 1979). Chronischer Stress führt über eine andauernde Stimulation der HHN-Achse zu einer übermäßigen Ausschüttung von Glucocorticoiden ins Blut. Bei depressiven Patienten lassen sich erhöhte Mengen des Stresshormons Cortisol in Blut und Urin nachweisen (Holsboer 2001). Aus diesem Grund wurde schon früh ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Depressionen und Stress vermutet. Die erhöhte Ausschüttung von Glucocorticoiden scheint dabei sowohl für die deutliche „Ausdünnung“ von Dendriten in den Pyramidenneuronen des Hippocampus als auch für eine gestörte Neurogenese bzw. Neuroplastizität verantwortlich zu sein (Sapolsky 2000).

Die Grundzüge der pharmakologischen Therapie für die Depression basieren auf Beobachtungen aus den 60er Jahren, welche darauf hinweisen, dass bei depressiven Patienten ein Mangel an monoaminergen Neurotransmittern, wie 5-HT und Noradrenalin (NE), im synaptischen Spalt im Gehirn besteht (Aldenoff 1997;

Birkmayer & Rieder 1975; Coppen 1967; Schildkraut 1965). Vor diesem Hintergrund wurden die heutzutage wichtigsten Medikamente gegen depressive Erkrankungen entwickelt. Sowohl die selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) als auch die selektiven Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer (SNRI) und die trizyklischen Antidepressiva führen zu einer Wiederaufnahmehemmung der entsprechenden Monoamine aus dem synaptischen Spalt durch Blockade der Monoamintransporter, wodurch eine längere Transmitterwirkung entsteht. Die MAO-Hemmer hingegen wirken dem Transmittermangel durch eine Hemmung des Enzyms Monoaminoxidase (MAO) und damit dem enzymatischen Abbau entgegen (Stahl, 1998).

Obwohl viele Patienten gut auf diese gängigen Medikamente ansprechen, so gibt es doch einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an Erkrankten, welcher nicht auf diese Pharmaka reagiert und sich somit als resistent gegenüber den klassischen Antidepressiva erweist (Holsboer-Trachsler 2006). Gerade für diesen Teil der Patienten scheint es wichtig, andere Forschungsansätze und Behandlungsmethoden zu verfolgen. Ein weiterer Nachteil der gängigen Medikamente besteht in der verzögerten Wirklatenz von ca. 2-3 Wochen. Diese Beobachtungen untermauern den Bedarf nach neuen pharmakologischen Ansatzpunkten.

Zudem scheinen depressiven Erkrankungen trotz gemeinsamer klinischer Charakteristika unterschiedliche Ätiopathologien zugrunde zu liegen (Costello et al. 2002; Farvolden et al. 2003). Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Bildung von Subtypen, welche eine spezifischere Therapie mit Psychopharmaka sowie bessere Möglichkeiten zur Prognose der depressiven Erkrankungen ermöglichen könnten (Stahl, 2003).

2.1.1. Depression im Tiermodell

Bei der Depression handelt es sich um eine multifaktoriell bedingte und komplexe psychische Erkrankung. Das klinische Erscheinungsbild der Depression wird zudem von einer Vielzahl von psychomotorischen und somatischen Veränderungen begleitet. Diese Komplexität der Erkrankung in Tiermodellen nachzustellen, ist nur begrenzt möglich und äußerst schwierig zu standardisieren (O`Neil und Moore, 2003). Viele menschliche Symptome der Depression wie Gefühle der Wertlosigkeit, Schuldgefühle und Suizidgedanken können im Tiermodell nicht untersucht werden.

Dennoch stellen Tiermodelle ein unentbehrliches Werkzeug bei der Suche nach neuen pharmakologischen Ansatzpunkten der Depressionsbehandlung und der Erforschung der neurobiologischen Grundlagen der Depression dar. Um die pathophysiologischen Vorgänge der Depression tierexperimentell untersuchen zu können, bedarf es geeigneter, d.h. valider Tiermodelle. In der tierexperimentellen Forschung wird dabei davon ausgegangen, dass das Tier ein Verhaltensmuster aufweist, das dem klinischen Erscheinungsbild der Depression im Humanbereich sehr nahe kommt, so dass von einem „depressions-ähnlichen Verhalten“ gesprochen wird. Willner (1991a) formulierte konkrete Anforderungen an solche Tiermodelle. Demnach müssen zum einen die depressionserzeugenden Faktoren beim Tier denen beim Menschen ähneln und die hierdurch entstandenen Symptome eindeutig feststellbar sein. Zum anderen sollte eine Therapie mit Antidepressiva das „depressions-ähnliche Verhalten“ wirksam und vorhersagbar reduzieren. Am häufigsten werden derzeit Tiermodelle verwendet, die durch äußere Faktoren, wie z.B. aversive Erlebnisse, bei den Versuchstieren Stress auslösen und hierüber einen depressionen-ähnlichen Zustand induzieren. Als Stressoren fungieren in Tiermodellen unterschiedliche experimentelle Bedingungen, wie z.B. elektrische Fußschocks, soziale Isolation und Deprivation (Überblick bei: Heinrichs und Koob, 2006). Der Zusammenhang zwischen Stress und Depression basiert auf dem Prinzip der „gelernten Hilflosigkeit“ (Overmier und Seligman, 1967). Einen wichtigen Aspekt der gelernten Hilflosigkeit stellt die Erfahrung der Tiere dar, dass weder Flucht- noch Vermeidungsverhalten gegenüber aversiven Reizen, denen sie ausgesetzt sind, möglich ist. Die Tiere lernen in solchen Paradigmen, dass nichts von dem was sie tun eine vermeidende oder kontrollierende Wirkung auf die negativen Reize hat. Aus dieser Lernerfahrung resultiert eine Hilflosigkeitserwartung, die auf andere Situationen generalisiert wird, selbst wenn in diesen Situationen erfolgreiches Verhalten möglich wäre. Diese „gelernte Hilflosigkeit“ löst verschiedene passive Verhaltensänderungen aus, wie z.B. Immobilität, aus. Dabei ähneln die hervorgerufenen motivationalen und emotionalen Defizite der Versuchstiere einigen Symptomen der Depression (Rosellini und Seligman 1975; Seligman und Beagley 1975). Darüber hinaus ist der 5-HT-Spiegel im Frontakortex bei hilflosen Tieren vermindert (Hellhammer et al. 1984) und der Plasma-Corticosteron-Spiegel der gestressten Tiere ist im Vergleich zu nicht-gestressten Tieren in solchen Modellen langanhaltend erhöht (Itoh et al. 2004).

2.1.2. Depression und Testosteron

Testosteron stellt den bekanntesten Vertreter der Androgene dar. Bildungsorte der Androgene sind beim Mann die Leydigzellen des Hodens und die Nebennierenrinde. Bei der Frau werden sie in wesentlich geringeren Konzentrationen als beim Mann von den Ovarien und der Nebennierenrinde abgesondert und können weiter zu Östrogenen, den weiblichen Geschlechtshormonen, synthetisiert werden (Wilson, 1996). Betrachtet man das Auftreten der Depression geschlechterspezifisch, fällt auf, dass das Verhältnis erkrankter Frauen zu erkrankten Männer 2:1 beträgt. Zudem leiden Männer jenseits des 5. Lebensjahrzehnts häufiger unter Depressionen, was eventuell damit zusammenhängen könnte, dass die Konzentration von Testosteron im Alter deutlich abnimmt (Rohr 2002). In den letzten Jahren fanden sich vermehrt Hinweise, dass Testosteron nicht nur als Transkriptionsfaktor an der Regulation der Genexpression, sondern durch seine Interaktion mit spezifischen Neurotransmitterrezeptoren auch an der Regulation emotionaler und kognitiver Prozesse und damit assoziierte psychiatrischer Erkrankungen wie der Depression beteiligt ist (Überblick bei: Dubrovsky 2005; Rupprecht et al. 2001). Niedrige Level von Testosteron, wie sie altersbedingt oder beim Hypogonadismus vorkommen, sind verknüpft mit Symptomen wie sexueller Unlust, Dysphorie, Reizbarkeit, Erschöpfung und Verlust des Appetits (Mitchell et al. 1996; Nieschlag et al. 2004; Orengo et al. 2004; Sternbach 1998). Diese Symptome, die auch während einer depressiven Episode auftreten können, lassen sich durch die Gabe von Testosteron wieder reduzieren (Burriss et al. 1992; Pope et al. 2003; Wang et al. 1996). Die Rancho Bernardo Studie (N= 856 Männern zwischen 50-89 Jahren) zeigte den bisher wohl stärksten Zusammenhang zwischen einem niedrigen Testosteronlevel und Depressionen. Die in dieser Studie festgestellte Korrelation blieb auch unabhängig von weiteren möglichen Einflussfaktoren wie Alter, Gewichtsveränderungen oder körperliche Aktivität, bestehen. (Barrett-Connor et al. 1999). Eine weitere Studie konnte bei 22 männlichen depressiven Patienten, bei denen konventionelle Antidepressiva keine Stimmungsverbesserung erzielten, zeigen, dass deren Stimmung sich nach einer achtwöchigen Testosterongelbehandlung gegenüber einem Placebo deutlich verbesserte (Pope et al. 2003). Darüber hinaus werden androgene Anabolika, wie Testosteron, häufig auch in Form eines Substanzmißbrauchs verwendet. Es wird angenommen, dass diese missbräuchliche Einnahme sowohl auf eine stärkere Leistungsfähigkeit als auch auf positive Effekte

wie Euphorie zurückzuführen ist (Brower 2002). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Testosteron wahrscheinlich organisatorische und aktivierende Effekte auf die Stimmungslage hat. Bisher ist jedoch noch unbekannt, über welche Mechanismen Testosteron eine Stimmungsaufhellung bewirkt. Zur genaueren Untersuchung dieser Mechanismen könnten Tiermodelle einen entscheidenden Beitrag leisten. Es existieren jedoch lediglich Befunde, die unter Verwendung von kastrierten Tieren und damit einem defizitären Androgenspiegel erfolgten. In einem Tiermodell der Depression, dem FST, konnte gezeigt werden, dass Kastration bei männlichen Ratten die antidepressiven Eigenschaften von klassischen Antidepressiva, wie Clomipramin, Desipramin und Fluoxetin gänzlich blockiert. Dieser Effekt konnte durch chronische Gabe von Testosteron wieder aufgehoben werden (Martinez-Mota und Fernandez-Guasti 2004). Eine andere Studie mit kastrierten Mäusen im FST zeigte, dass eine 4-tägige Testosteronapplikation depressions-ähnliche Verhaltensweisen reduzierte. Zudem konnte die Testosterongabe die antidepressiven Effekte von Desipramin potenzieren (Bernardi et al. 1989). Tierexperimentelle Befunde von Testosteroneffekten auf depressions-ähnliches Verhalten bei intakten männlichen Tieren existieren bislang nicht. Diese Untersuchungen sind jedoch unersetzlich, da Kastration nicht nur einen defizitären Androgenspiegel zur Folge, sondern auch einen Einfluss auf die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern hat. Somit hat Kastration per se einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere (Bitar et al. 1991; Kizer et al. 1978; Putnam et al. 2001). Aus diesem Grund sind Studien, welche kastrierte Tiere verwenden, schwierig zu interpretieren, da die Effekte von Testosteron nicht von den Effekten der Kastration isoliert betrachtet werden können. Bei der Suche nach den möglichen Wirkmechanismen von Testosteron auf die Stimmungslage, finden sich Hinweise, dass eine Interaktion mit monoaminergen Neurotransmittersystemen eine Rolle spielen könnte. Nach einer Testosteronapplikation bei Ratten konnte eine Steigerung der Konzentration des Dopaminmetaboliten L-3,4-Dihydroxyphenylethylsäure (DOPAC) im Striatum und ein erhöhter 5-HT-Umsatz im Hippocampus nachgewiesen werden (Thiblin et al. 1999). Beiden Gehirnstrukturen wird eine wesentliche Beteiligung an der Regulation emotionaler Prozesse und damit auch depressiver Zustände zugesprochen (Drevets, 2000; Foster und MacQueen, 2008; Kalia, 2005). Eine Testosteronsupplementierung bei weiblichen Ratten führte zu einer erhöhten Expression der mRNA eines spezifischen 5-HT-Rezeptorsubtypes (5-HT_{2A}R) in verschiedenen Gehirnregionen,

welche in kognitive und emotionale Prozesse involviert sind (Sumner und Fink 1998). Bei kastrierten Ratten modulierte Testosteron den striatalen Dopaminwiederaufnahmemechanismus (Shemisa et al. 2006). Eine weitere Studie zeigt, dass Dopaminantagonisten (SCH 23390 und Sulpiride) bei Ratten eine konditionierte Platzpräferenz (verstärkender Effekte), die durch Testosteron induziert wurde, blockierte (Schroeder und Packard 2000).

2.1.3. Depression und Dopamin

Obwohl ein Zusammenhang zwischen Veränderungen in der dopaminergen Neurotransmission und depressiven Erkrankungen schon sehr früh diskutiert wurde (Randrup und Braestrup 1975), wurde anderen Monoaminen wie NA und 5-HT in der Folge ungleich mehr Aufmerksamkeit in der Depressionsforschung gewidmet (Reddy et al. 1992). Allerdings ist in den letzten Jahren ein starker Anstieg des Interesses zu bemerken, die Rolle von DA bei der Depression und der Wirkung antidepressiver Substanzen zu entschlüsseln (Überblick bei: D'Aquila et al. 2000). Das mesolimbische DA-System, welches limbische Strukturen wie Nucleus accumbens, Amygdala und Hippocampus innerviert, ist an eine Vielzahl von Verhaltensfunktionen, wie z.B. Motivation, Motorik und Verstärkung, involviert. Es stellt ein zentrales neuroanatomisches System bei der Vermittlung von Belohnung und hedonischen Eigenschaften dar (Fibiger 1995; Schultz et al. 1993). Die Bedeutung dieses neuroanatomischen Systems für die depressive Symptomatik erscheint offensichtlich, insbesondere, wenn Symptome wie Anhedonie, Appetitverlust, Libidoverlust und die gestörte Psychomotorik in Betracht gezogen werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass eine reduzierte DA-Transmission im mesolimbischen DA-System zumindest mit Teilen der depressiven Symptomatik verbunden ist. Erste Hinweise auf die Beteiligung des DA-Systems an der Depression waren Befunde über die Beeinflussung der intrakraniellen Selbststimulation durch das Tricyclikum Desipramin. Nach einer chronischen Gabe von Desipramin kam es bei Ratten zu einer erhöhten intrakraniellen Selbststimulation, was auf eine gesteigerte Funktion des mesolimbischen DA-Systems schließen lässt (Fibiger und Phillips 1981). Im FST wird die Dauer der gezeigten Immobilität nicht nur durch Antidepressiva, sondern auch durch die

intrakranielle Gabe eines D₂/D₃-Rezeptoragonisten in den Nucleus accumbens aufgehoben. Weitere Befunde in diesem Tiermodell zeigen, dass nach der Testung die Konzentration von extrazellulären DA-Metaboliten im Nucleus accumbens sinkt (Yadid et al. 2001) und die systemische Applikation von einer BHS gängigen Vorstufe von DA, dem L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), potente antidepressive Eigenschaften entfaltet (Mannisto et al. 1995). In einem anderen Tiermodell der Depression, dem „Chronic mild stress“, zeigten unter chronischen Stress gesetzte Tiere eine Verringerung in der Reaktion auf positive Stimuli. Die Tiere, welche keine gleichzeitige Antidepressivabehandlung erhielten, nahmen weniger Futterbelohnung auf, als Kontrolltiere mit Behandlung. Dieses Verhalten bezeichnet Katz (1982) als Anhedonie. Philips et al. (1983) führen diese Anhedonie auf eine Dysfunktion im dopaminergen Belohnungssystem zurück. Willner et al. (1992) spezifizieren die Ursache der Anhedonie auf Veränderungen der Sensitivität von DA-Rezeptoren im Nucleus accumbens.

Auch in der klinischen Forschung deuten verschiedene Befunde auf eine wesentliche Rolle von DA in Zusammenhang mit depressiven Symptomen hin. Die Elektrokrampftherapie (EKT) stellt eine wirksame Methode bei der Behandlung von schweren, chronischen Depressionen dar (Lisanby et al., 2003). Obwohl der genaue Wirkmechanismus dieser Methode bis heute nicht geklärt ist, scheint sie im Gegensatz zu allen anderen Antidepressiva den stärksten Einfluss auf das DA-System zu haben. So erhöht eine einzelne EKT im Tierversuch die zerebrale DA-Konzentration und eine EKT-Serie hebt den basalen DA-Spiegel, besonders in den mesolimbischen Regionen, an. Weiterhin wird eine erhöhte Stimulierbarkeit und Dichte des dopaminergen D₁-Rezeptors gefunden (Fochtmann et al., 1989). Dieser Effekt auf das DA-System spielt eventuell auch eine Rolle für die schnelle Stimmungsverbesserung bei EKT-behandelten Patienten im Gegensatz zur Behandlung mit herkömmlichen pharmakologischen Antidepressiva. Zudem werden Neuroleptika, welche die DA-Rezeptoren blockieren und somit die dopaminerge Übertragung hemmen, in Verbindung mit depressiven Symptomen gebracht, da sie Angst, Verstimmung und Antriebshemmung erzeugen (Belmaker und Wald 1977). Reserpin induziert eine irreversible Schädigung der DA-Speichervesikel in den Synapsen, was zu einem hypodopaminergen Zustand führt und eine medikamenten-induzierte Depression auslösen kann (Willner 1983). Darüber hinaus ist bekannt, dass DA-Agonisten, wie Amphetamine, Symptome der Manie provozieren können

und chronischer Amphetaminabusus nach Beendigung der Einnahme depressive Symptome auslösen kann (Jacobs und Silverstone 1986; Warneke 1990).

Zudem wurde eine verminderte Konzentration des DA-Metaboliten Homovanillinsäure im Liquor und im Blut depressiv Erkrankter als Indikator eines reduzierten DA-Umsatzes gefunden (Roy et al. 1985). Bei der Erkrankung Morbus Parkinson kommt es zu einem Absterben dopaminerger Nervenzellen und es treten signifikant häufiger depressive Symptome auf. Anti-Parkinson-Mittel wie Bromocriptin (D₂/D₃-Rezeptoragonist) können wiederum diese Symptomatik rasch verbessern (Wells und Marken 1989).

Insgesamt deuten die beschriebenen Befunde auf eine zentrale Rolle des mesolimbischen DA-Systems für Stimmung, Affekt und Motivation hin. Somit ist eine dopaminerge Dysfunktion als ein zugrunde liegender neurophysiologischer Mechanismus bei der Depression nicht auszuschließen. Allerdings sind Studien, welche diesen Zusammenhang untersucht haben im Vergleich zu Studien die NA und 5-HT fokussiert haben, nur spärlich vertreten.

2.2. Die intranasale Applikation

Die BHS ist eine Barriere, die bestimmte Substanzen am Übertritt durch die Kapillarwand vom Blut ins zentrale Nervensystem hindert. Die BHS zwischen dem Kapillarendothel und dem Extrazellulärraum des ZNS wird durch die Endothelzellen der Hirnkapillaren, die umgebenden Perizyten und die umgebende kontinuierliche Basalmembran gebildet. Die eigentliche Filterschicht stellt das innen liegende Endothel mit seinen „Tight Junctions“ dar, interzelluläre Verbindungen, die als Reisverschluss fungieren, um die interendothelischen Poren zu schließen. Auf diese Art und Weise wird eine Barriere für alle sonst kapillargängigen Stoffe gebildet, die so entweder selektiv durchgelassen oder an der Penetration in das Hirngewebe gehindert werden. Substanzen, die in das Gehirn aufgenommen werden sollen, müssen die Endothelzellen passieren. Ein parazellulärer Transport findet aufgrund der dichten „Tight junctions“ kaum statt. Lediglich sehr kleine hydrophile Moleküle (Sauerstoff, Kohlendioxid) können das Gehirn durch parazelluläre Diffusion erreichen. Alle anderen Substanzen müssen die Endothelzellen transzellulär passieren (Goldstein und Betz 1986; Pardridge 1988). Lipophile Substanzen mit Molekulargewichten <700 Da (z.B. Alkohol, Narkotika, Antikonvulsiva, Nicotin)

diffundieren dabei gut durch die BHS. Bislang stellte es oft ein Problem dar, hydrophile Substanzen zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken über den Systemkreislauf und die BHS in das Gehirn zu transportieren. Dies ist häufig nur mit Hilfe von spezifischen aktiven Transportern möglich. Eine Lösung zur Steigerung der Durchlässigkeit besteht darin, lipophilere Vorstufen der Substanz zu verabreichen, oftmals in Form einer „Prodrug“ (wie z.B. L-DOPA), die im Gehirn anschließend zur „Parent Drug“ konvertiert wird (Pavan et al., 2008).

Als viel versprechende alternative Applikationsform um hydrophile Substanzen systemisch dem Gehirn zuzufügen, wird die intranasale Verabreichung diskutiert, da hier die Blut-Hirnschrankengängigkeit wahrscheinlich keine Rolle spielt. Auch kann dabei ein Metabolismus der verabreichten Substanzen in der Peripherie weitestgehend umgangen werden (Überblick bei Illum 2004). Im Prinzip lassen sich drei verschiedene Transportwege über die Regio olfactoria beschreiben. Stoffe können sowohl transzellulär durch die Stützzellen des olfaktorischen Epithels als auch paracellulär durch die unterschiedlichen Zellverbindungen ins ZNS oder abermals transzellulär über die Riechneurone via axonalem Transport zum Bulbus olfactorius gelangen. Innerhalb welchen Zeitraumes die Substanzen, welche auf diesem Weg verabreicht werden, ins ZNS gelangen, ist abhängig von Größen wie Molekulargewicht, Lipophilie und Ionisation (Illum 2000). Mit Hilfe von Mikrodialyseexperimenten konnten De Souza Silva et al. (1997) zeigen, dass die intranasale Applikation von L-DOPA, D-Amphetamin und Kokain zu einer massiven Konzentrationssteigerung von DA und verschiedenen Metaboliten im Gehirn von Ratten führte. Im Falle von Kokain waren die gefundenen DA-Konzentrationen ipsilateral signifikant höher als auf der kontralateralen Seite, was einen Transport zum Wirkort über den systemischen Kreislauf ausschließt.

Studien am Menschen geben Evidenz, dass sogar große Moleküle wie Insulin schnell von der Nasenhöhle aus ins ZNS transportiert werden können, wo sie spezifische Effekte auf verschiedene Gehirnfunktionen auslösen können. Solche Effekte werden nicht bei systemischen Applikationsformen und bei Placebo-Kontrollgruppen beobachtet (Kern et al. 1999). Zudem konnten Pietrowsky et al. (1996a, b) zeigen, dass die nasale Verabreichung von Cholecystokinin und Vasopressin effektiver ist, als eine intravenöse Verabreichung dieser Substanzen. In vielen Fällen kann sowohl das Ausmaß als auch die Geschwindigkeit der nasalen Aufnahme durch den Zusatz

von Hilfsstoffen verbessert werden (Rajewski und Stella et al. 1996; Sayani und Chien, 1996).

Somit bietet sich die intranasale Applikationsform als gute alternative nicht-invasive Verabreichungsform an. Besonders hydrophile Substanzen wie z.B. DA, die bei systemischer Verabreichung nur bei einer sehr hohen Menge eine lediglich geringe Konzentrationssteigerung im Gehirn bewirken, könnten von dieser Applikationsform profitieren. Aber auch Substanzen wie z.B. Testosteron, welche zwar die BHS aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften passieren können, jedoch einem schnellen first-pass Metabolismus in der Leber und somit einer geringen Bioverfügbarkeit unterliegen (Hussain et al. 2002), könnten durch die nasale Route schneller und effektiver ins ZNS gelangen.

2.3. Fragestellungen

In diesem Promotionsvorhaben wurde zunächst untersucht, ob eine systemische Verabreichung von Testosteron Effekte auf depressions-ähnliche Verhaltensweisen im FST bei Ratten hat. Es wurden intakte Tiere verwendet, damit ein eventueller Einfluss der Kastration auf die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin wurde mit Hilfe eines Mikrodialyseexperiments sowie neurochemischer Analyse untersucht, ob Testosteron die serotonerge und dopaminerge Transmission im Neostriatum und Nucleus accumbens moduliert.

Abschließend wurde untersucht, ob die intranasale Applikation von DA depressions-ähnliches Verhalten bei Ratten verändert. Diese Applikationsform wurde verwendet, da bekannt ist, dass DA die BHS kaum passieren kann und bei einer systemischen Verabreichung wohl keine Effekte zu erwarten wären.

3. Überblick über die Methoden

In diesem Abschnitt werden die Methoden erläutert, die in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

3.1. „Forced Swimming“ Test

Der FST ist ein von Porsolt (Porsolt et al. 1977) entwickeltes Paradigma, das bei Ratten oder Mäusen einen depressions-ähnlichen Zustand induziert, indem die Tiere einer für sie höchst aversiven Situation, ein mit Wasser gefülltes Schwimmbecken, ausgesetzt werden, aus der keine Fluchtmöglichkeit besteht. Dieses Paradigma hat bei der Untersuchung von möglichen antidepressiv wirkenden Substanzen besondere Bedeutung erlangt. Das Testprinzip basiert darauf, die Tiere mit einer für sie ausweglosen Situation zu konfrontieren.

Dazu werden die Tiere am ersten Tag für 15 min. in einen transparenten, mit Wasser gefüllten Glaszylinder gesetzt, das keine Möglichkeit zur Flucht bietet. Anfänglich zeigen die Tiere bei diesem Paradigma aktive Schwimm- und Kletterbewegungen, die als aktive Copingstrategien interpretiert werden. Nach einiger Zeit geben die Tiere ihre erfolglosen Versuche und somit scheinbar die „Hoffnung auf eine Fluchtmöglichkeit“ auf und lassen sich in einer charakteristischen Haltung passiv treiben. In diesem Zustand bewegen sich die Tiere nur noch, um ihren Kopf über Wasser zu halten und machen lediglich Bewegungen mit den Vorderpfoten oder zeigen ein leichtes Schwanken des Gesamtkörpers, um das Gleichgewicht zu erhalten (Porsolt 1977). 24 h nach dem ersten Schwimmdurchgang wird die Wirkung von Substanzen auf die Dauer der Immobilität getestet und die Tiere werden erneut für 5 min. in die Testapparatur gesetzt (Willner 1984). In dieser Testphase beginnen die Tiere sehr früh ein passives, bewegungsloses Verhalten zu zeigen. Ein Anstieg der Immobilität an Tag 2 im Vergleich zu Tag 1, kann dahingehend gedeutet werden, dass ein Tier eine „gelernte Hilflosigkeit“ entwickelt hat, wohingegen eine Reduktion in der Dauer der Immobilität, auch im Vergleich zu Kontrolltieren, als Maß für die antidepressive Wirkpotenz der Testsubstanz genommen wird. Daneben kann auch die Frequenz und der Beginn des Immobilitätsverhaltens erhoben und interpretiert werden.

Der FST erweist sich insofern als valides Testinstrument, da sich das durch den Test induzierte Verhalten, durch Gabe von antidepressiv wirkenden Pharmaka verändert. So reduzieren klassische Antidepressiva wie Imipramin, Amitriptylin, Deprenyl und Mianserin die Dauer der Immobilität. Eine Verringerung der Immobilitätszeit durch eine Substanz kann jedoch auch durch lokomotorische Effekte ausgelöst werden, wie z.B. bei Amphetaminen. Von daher sollten zusätzlich zum FST, Verhaltenstests eingesetzt werden, welche die Wirkung der Testsubstanz auf die generelle motorische Aktivität untersuchen. Antidepressiva mit selektivem Einfluss auf das NA-System erhöhen bei der Ratte das Kletterverhalten, bei dem die Tiere am Rand des Glaszylinders hochzuklettern versuchen (Cryan et al. 2002; Page et al. 1999). Substanzen wie Fluoxetin, die selektiv das 5-HT-System modulieren induzieren hingegen eine Steigerung der aktiven Schwimmbewegungen (Page et al. 1999). Um diesen Ergebnissen Rechnung zu tragen und auch neuere Substanzen mit antidepressiven Eigenschaften in diesem Modell zu detektieren, wurde der ursprüngliche Porsolt-Test für Ratten modifiziert. In dem modifizierten FST werden neben der Dauer der Immobilität auch die aktive Schwimmzeit und das Kletterverhalten der Ratten erhoben (Detke et al. 1995). Ein Anstieg des aktiven Kletterverhaltens deutet ebenfalls auf eine Reduktion von depressions-ähnlichen Verhalten hin, da dieses Verhalten als versuchtes, aktives Fluchtverhalten interpretiert werden kann.

Obwohl der FST als „drug screening“ Verfahren in der Forschung sehr beliebt und vielfach verwendet wird, so ist kritisch anzumerken, dass die Frage ungeklärt bleibt, warum bereits nach akuter Gabe das depressions-ähnliche Verhalten reduziert wird, während beim Menschen eine längere Behandlungsdauer nötig ist (ca. 2-3 Wochen), um eine antidepressive Wirkung zu erzielen. Hierdurch erscheint fraglich, ob der neurobiologische Hintergrund der im Test evaluierten Parameter dem klinischen Bild tatsächlich entspricht (Borsini und Meli 1988). Dennoch hat der Test einen festen Platz in der Verhaltenspharmakologie.

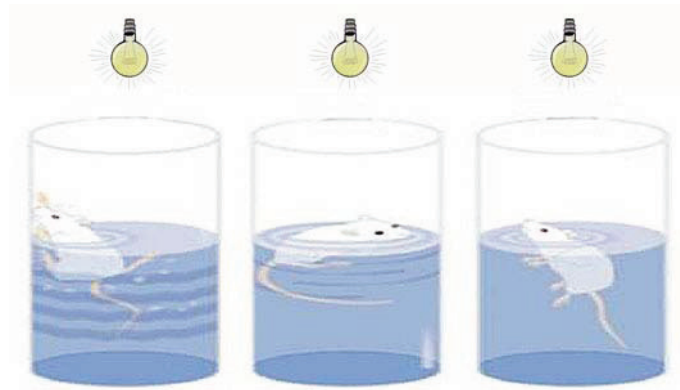


Abb.1: Darstellung der drei möglichen Verhaltensweisen im FST: Kletterverhalten (links), Schwimmverhalten (Mitte) und Immobilität (rechts)

3.2. Das Offenfeld

Das Offenfeld ist ein Verhaltenstest, um die motorische Aktivität und Exploration von Ratten zu messen. Es gehört zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Methoden der tierexperimentellen Verhaltensforschung (Prut und Belzung 2003). Es besteht aus einer Arena, in welche das Tier ausgesetzt und beobachtet wird. Größe, Form, Beleuchtung und Material der Offenfelder variieren – über Studien hinweg – sehr stark und sind teilweise auch vom spezifischen Untersuchungsziel abhängig. Das Versuchstier kann die Versuchsaapparatur für eine definierte Zeit, in der Regel 10 min., frei explorieren. Das Offenfeld findet dabei für eine Reihe unterschiedlicher Fragestellungen Anwendung: Zum einen stellt es eine relativ neutrale Umgebung dar, um die allgemeine Bewegung und Erkundungsaktivität (Aufrichtverhalten und gelaufene Wegstrecke) von Ratten zu erfassen. Viele Arten von Interventionen, z.B. Pharmaka, genetische Manipulationen oder Veränderungen der experimentellen Bedingungen, können dieses allgemeine Aktivitätsniveau verändern. Allerdings induziert die neue und für das Tier unbekannte Umgebung einen Annäherungs-Vermeidungskonflikt im Tier (Montgomery, 1955), der emotionale Prozesse involviert. Eine Analyse des räumlichen Aufenthaltsmusters, neben der motorischen Aktivität, wird als Mass für Ängstlichkeit verwendet. Dies ist in der Beobachtung begründet, dass Ratten dazu tendieren, offene Plätze zu meiden und ihre Lokomotion auf das

periphere Gebiet, wo sie die Wände berühren können (thigmotaxisches Verhalten), konzentrieren (Ramos und Mormède 1998). Zum dritten kann das Offenfeld zur Testung einer sehr basalen Lernform, dem Habituationlernen, eingesetzt werden. Habituation wird verstanden als die Abnahme der Häufigkeit eines Verhaltens als Ausdruck der Gewöhnung an die verhaltensauslösenden Reize. Der Neuheitsgehalt der Testumgebung verringert sich bei wiederholter Darbietung, so dass bereits im zeitlichen Verlauf eines einzigen Testdurchgangs die Aktivität nachlässt oder bei einer erneuten Exposition des Tieres (Testwiederholung) die Aktivität geringer ist.

3.3. Das Elevated Plus-Maze

Das EPM ist eines der am weitesten verbreiteten Paradigmen zur Messung von Angstverhalten bei Nagetieren (Korte und De Boer 2003; Lister 1987). Das EPM basiert auf dem „Y-Maze“ von Montgomery (1955), wurde jedoch erst später validiert (Handley und Mithani 1984; Pellow et al. 1985). Das EPM ist vom Boden erhöht und besteht aus einer kreuzförmigen horizontalen Lauffläche. An zwei Armen dieses Laufkreuzes sind Wände angebracht, so dass diese als geschlossene Arme bezeichnet werden. Die anderen beiden Arme haben keine Wände und werden daher offene Arme genannt. Nagetiere halten sich bevorzugt in den geschlossenen Armen der Apparatur auf, wohingegen die offenen Arme für die Tiere aufgrund der fehlenden thigmotaktischen Stimulation, der Helligkeit und der Höhe einen aversiven Reiz darstellen. In der Mitte befindet sich eine zentrale Plattform, von der aus das Tier in jeden der vier Arme gelangen kann. Die Tiere werden zu Beginn des Tests in das Zentrum der Apparatur gesetzt, die sie dann anschließend für 5 min. frei erkunden können. Der Verhaltenstest basiert auf einem Konflikt zwischen Explorationsverhalten und Furcht vor offenen und erhöhten Gängen. Nagetiere zeigen ein stärkeres Vermeidungsverhalten und eine geringere Exploration der offenen gegenüber den geschlossenen Armen (Montgomery 1955; Pellow und File, 1986). Zusätzlich wird in den offenen Armen mehr angstkorreliertes Verhalten, wie z.B. „Freezing“ (Angststarre) oder Defäkation, gezeigt. Als Maß für die Angst dient sowohl die relative Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen als auch die Häufigkeit der Eintritte in die offenen Arme. Die Gesamteintritte in offene und geschlossene Arme sind ein Maß für die allgemeine Aktivität und werden mit den Eintritten in die offenen Arme in Beziehung gesetzt, um eine reduzierte Lokomotion nicht

fälschlicherweise als anxiogene Wirkung zu interpretieren. Der Test wird zur Charakterisierung anxiolytischer/anxiogener Substanzen und zur Erforschung der neurophysiologischen Grundlagen der Angst genutzt (Setem et al. 1999). Der EPM-Test besitzt eine gute Sensitivität gegenüber Pharmaka, die am GABA_A-Benzodiazepin-Rezeptor-Komplex angreifen. So erhöhen Benzodiazepine die Aufenthaltszeiten auf den offenen Armen und vermindern die Häufigkeit anderer Indikatoren von Furcht wie Defäkation oder „Freezing“ (Davis 1992). Der Vorteil des EPM-Paradigma gegenüber anderen Paradigmen besteht in seiner leichten Durchführung. Zudem basiert das EPM auf spontanen Verhaltensweisen der Tiere, so dass weder Training noch aversive Motivation (wie Elektroschock oder Nahrungsdeprivation) nötig sind.

3.4. Neurochemie

Zur Bestimmung der extrazellulären 5-HT- und DA-Konzentrationen nach Applikation von Testosteron wurde die Methode der in vivo Mikrodialyse in Kombination mit der Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit elektrochemischer Detektion verwendet. Bei der Mikrodialyse wird eine dünne tubuläre Membran, welche aus organischen Polymeren besteht, die das Passieren von Wasser und kleinen Molekülen ermöglichen, im Gewebe implantiert. Diese Membran wird dann mit einer physiologischen Ringer-Lösung durchspült, welche in ihrer Zusammensetzung der des extrazellulären Raumes ähnelt. Dadurch entsteht zwischen dem Inneren der Sonde und dem umgebenden Hirngewebe ein Konzentrationsgefälle bzgl. der Neurotransmitter. Diese diffundieren in die Sonde und werden im Perfusat nach außen gepumpt. Man nimmt an, dass die Konzentration der einzelnen Bestandteile des Perfusats die Zusammensetzung des Extrazellulärspaces widerspiegelt. Das Ausmaß der letztlich gemessenen Neurotransmitterkonzentration entspricht dabei 15-20% der Konzentration im extrazellulären Raum. Anschließend erfolgt die Analyse der Monoamin-Konzentrationen in der Probe mittels HPLC und elektrochemischer Detektion. Das Verfahren der HPLC-Analyse setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen, der Chromatographie und der eigentlichen Substanzanalyse. Bei der Chromatographie wird ein Stoffgemisch zwischen zwei Phasen, der mobilen und der stationären Phase, in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt. Die Verweildauer der einzelnen

Probenbestandteile in der stationären Phase ist methodenspezifisch abhängig von Faktoren, wie z.B. Molekülgröße, Ladung oder Wechselwirkungen, und führt so zur Trennung der einzelnen Substanzen. In der anschließenden Analyse wird die Konzentration der jeweiligen isolierten Substanzen durch einen Detektor erhoben. Der elektrochemische Detektor misst die Änderung eines angelegten Stromflusses, die durch Oxidation oder Reduktion der zu messenden Stoffe verursacht wird. Die quantitative Substanzmenge in der Probe wird mit Hilfe einer Standardlösung, welche eine definierte Menge der einzelnen Substanzen enthält, bestimmt, da die Veränderung des Stromflusses proportional zur Menge der oxidierten oder reduzierten Substanz ist.

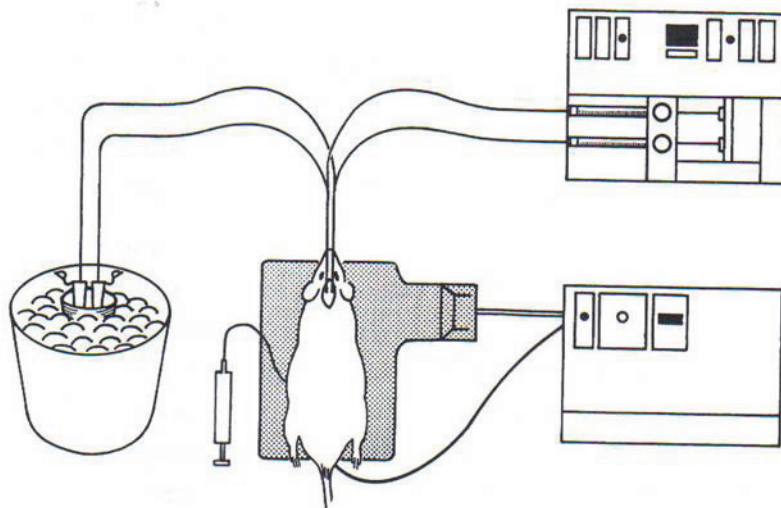


Abb.2.: Schematische Darstellung der Mikrodialyse-Versuchsanordnung am anästhesierten Tier

4. Durchgeführte Studien

Die vollständigen veröffentlichten Studien, bzw. das zur Veröffentlichung eingereichte Manuskript sind im Anhang dieser Arbeit eingebunden.

4.1. Die Effekte von Testosteron auf depressions-ähnliche Verhaltensweisen bei gesunden männlichen Ratten im „Forced Swimming“ Test.

Verschiedene Befunde deuten darauf hin, dass Testosteron eine modulatorische Rolle in der Regulation von emotionalen Prozessen hat und somit auch in Verbindung mit psychischen Störungen wie der Depression stehen könnte (Burris et al. 1992; Dubrovsky 2005; Mitchel et al. 1996; Nieschlag et al. 2004; Pope et al. 2003; Wang et al. 1996). Der potentielle Wirkmechanismus ist allerdings noch unbekannt. Zudem wurden in bisherigen tierexperimentellen Studien ausschließlich Tiere mit einem defizitären Testosteronspiegel verwendet. Aus diesen Gründen untersuchten wir in dem vorliegenden Experiment den Einfluss von Testosteron auf emotionale und lokomotorische Verhaltensvariablen bei gesunden männlichen Ratten.

Zu diesem Zweck wurde den Tieren das Androgen Testosteron (0; 1.0; 2.0 und 4.0 mg/kg) subkutan (s.c.) appliziert und sowohl auf potentiell antidepressive Eigenschaften im FST als auch auf lokomotorische Effekte im Offenfeld und anxiolytische/anxiogene Effekte im EPM getestet. Alle Tiere durchliefen jedes Experiment und erhielten jeweils 15 min. vor jedem Testdurchgang Testosteron appliziert.

Die FST-Apparatur (Glaszylinder mit den Maßen: 46 cm Höhe x 20 cm Durchmesser) war in einer Höhe von 20 ± 2 cm mit 25° C warmen Wasser gefüllt. Die Tiere wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen in die Apparatur gesetzt. Am ersten Tag erfolgte klassischerweise keine pharmakologische Applikation, da die Tiere die Erfahrung machen sollten, dass sie den aversiven Bedingungen hilflos ausgesetzt sind und nicht entfliehen können. Die Aufenthaltszeit in der Apparatur betrug dabei 15 min. Am Testtag, 24 h später, erhielten die Tiere vor dem erneuten Einsetzen ihre jeweilige pharmakologische Behandlung und wurden anschließend für 5 min. in die Apparatur gesetzt und auf depressions-ähnliche Verhaltensvariablen getestet.

Dabei zeigte sich, dass Testosteron in den Dosierungen von 2.0 und 4.0 mg/kg eine Reduktion im depressions-ähnlichen Verhalten induzierte. So reduzierten diese Dosierungen signifikant die Dauer der Immobilität und erhöhten die Schwimmzeit im Vergleich zum ersten Tag. Auch bei einem Zwischengruppenvergleich zur Kontrollgruppe unterschied sich die 2.0 mg/kg Dosierung bei diesen Verhaltensvariablen signifikant. Die 4.0 mg/kg Dosierung zeigte einen statistischen Trend zur Reduktion der Dauer der Immobilität. In der Kontrollgruppe und der 1.0 mg/kg Testosterondosierung erhöhten sich hingegen die Immobilitätszeiten im Vergleich zum ersten Tag, womit diese Tiere einen Anstieg des depressions-ähnlichen Verhaltens zeigten. Bezüglich des Kletterverhaltens, welches als aktives versuchtes Fluchtverhalten interpretiert wird, konnten keine Veränderungen nach einer Testosteronapplikation festgestellt werden.

Im Offenfeld-Test wurden die Tiere für 30 min in die Offenfeld-Apparatur (60 x 60 cm x 40 cm) gesetzt und es wurden die zurückgelegte Wegstrecke und das Aufrichteverhalten erhoben. Allerdings konnten keine Veränderungen in den erhobenen Verhaltensparametern nach Gabe von Testosteron, und somit der generellen motorischen Aktivität, nachgewiesen werden. Dies schließt die Möglichkeit aus, dass der immobilitätsverringende Effekt im FST auf eine generelle Steigerung der Lokomotion durch Testosteron zurückzuführen ist.

Das Offenfeld stellt auch ein Verfahren zur Messung von Ängstlichkeit dar, da Ratten das Zentrum der Apparatur (30 x 30 cm) aus Angst vor offenen Flächen generell meiden. Bei unserem Experiment unterschieden sich die Tiere nach Testosteronapplikation nicht von den Kontrolltieren bezüglich der Aufenthaltszeiten und der Eintritte in das Zentrum der Apparatur. Dies deutet darauf hin, dass Testosteron keinen Einfluss auf das Angstverhalten der Tiere hat.

Die in unserem Experiment verwendete EPM-Apparatur, die als klassisches Paradigma zur Messung von Angstverhalten bei Nagern gilt, bestand aus zwei offenen Armen (50 cm Länge x 10 cm Breite) und zwei geschlossenen Armen (50 cm Länge x 10 cm Breite x 38.5 cm Höhe). Ebenso wie in der Offenfeld-Testung konnte auch hier kein Einfluss von Testosteron auf das Angstverhalten beobachtet werden. Weder in den Eintritten noch in der Aufenthaltszeit auf den offenen Armen, zeigte sich ein Unterschied zur Kontrollgruppe.

Diese Ergebnisse zeigen insgesamt, dass Testosteron dosisabhängig antidepressive Eigenschaften bei gesunden männlichen Ratten besitzt, ohne dabei Lokomotion oder

Angstverhalten zu modulieren. Dies bekräftigt die Vermutung, dass Testosteron an den neurobiologischen Mechanismen, die der Depression zugrunde liegen, beteiligt sein könnte. Die bisherigen tierexperimentellen Versuche, die diesen Einfluss untersuchten, sind mit den vorliegenden Experimenten nicht vergleichbar. So wurden bislang ausschließlich Tiere mit einem durch Kastration bedingten defizitären Testosteronspiegel verwendet und es konnte nur ein potenzierender Effekt von Testosteron auf die Wirkung von Antidepressiva gezeigt werden. Dass unsere gesunden Tiere nach einer Testosteron-Applikation im FST die Dauer der Immobilität reduzierten und die Schwimmzeit erhöhten, kann auf einen Zusammenhang mit motivationalen und/oder verstärkenden Effekten von Testosteron hinweisen. Generell werden solche Effekte durch das mesolimbische DA-System mediiert, so dass sich die Frage stellt, ob Testosteron einen Einfluss auf das dopaminerge Transmittersystem ausübt.

4.2. Die neurochemischen Effekte von Testosteron auf das dopaminerge und serotonerge Transmittersystem im Neostriatum und Nucleus accumbens.

Ausgehend von den Befunden aus Experiment I, sollte im folgenden Experiment mittels in vivo Mikrodialyse der Effekt von Testosteron auf die dopaminerge und serotonerge Neurotransmission in Neostriatum und Nucleus accumbens untersucht werden. Zudem sollte die Effektivität verschiedener Applikationsformen von Testosteron evaluiert werden. Dies sollte durch den Vergleich einer intranasalen Applikation von Testosteron (0, 0.5, 1.0 und 2.0 mg/kg) mit einer systemischen (s.c.) Testosteronapplikation (0, 2.0, 4.0 und 8.0 mg/kg) erfolgen. Die intranasale Applikationsform wird bei Substanzen wie Testosteron, welche einen hohen „first-pass“ Metabolismus und somit eine niedrige Bioverfügbarkeit aufweisen, als gute alternative Applikationsform zur systemischen Applikation diskutiert, da auf diesem Wege Substanzen schnell ins ZNS gelangen können, ohne Metabolisierungsprozessen zu unterliegen. Zu diesem Zweck wurde bei männlichen Ratten eine Führungskanüle in das Neostriatum und den Nucleus accumbens implantiert, um das Einführen der Mikrodialysesonde am Tag der Probeentnahme zu realisieren (Abb. 2). Am Experimentaltag, welcher fünf Tage nach der Operation

stattfand, wurden die Tiere mit Urethan (1,25 mg/kg) anästhesiert und die Mikrodialysesonden in die über dem Neostriatum und dem Nucleus accumbens platzierten Führungskanülen eingesetzt. Nach einer Stabilisierungsphase von zwei Std. wurden bei jedem Tier die basalen Konzentrationen von DA und 5-HT gemessen (vier Proben; 30 min. Probenintervall). Anschließend erfolgte je nach Versuchsgruppe die intranasale bzw. systemische Applikation von Testosteron und die Messung wurde für fünf weitere Stunden im 30 min. Intervall fortgesetzt.

Hierbei zeigte sich, dass 2.0 mg/kg intranasal verabreichtes Testosteron die Konzentration von DA im Neostriatum im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte, während 1.0 mg/kg intranasal verabreichtes Testosteron die Konzentration von 5-HT in diesem Hirnareal erhöhte. Im Nucleus accumbens erhöhten diese beiden intranasal verabreichten Dosierungen sowohl die DA- als auch die 5-HT-Konzentrationen. Interessanterweise konnten diese Konzentrationssteigerungen unmittelbar in der ersten Probe nach einem 30 min. Zeitintervall festgestellt werden, so dass davon auszugehen ist, dass der intranasale Transportweg ins ZNS rasch erfolgt sein muss. Die geringere Dosierung von intranasal verabreichtem Testosteron (0.5 mg/kg) hatte keinen Einfluss auf die getesteten Neurotransmitterkonzentrationen.

Im Vergleich zur intranasalen Applikation war die systemische Applikation von Testosteron weniger effektiv. Lediglich die höchste Dosierung von 8.0 mg/kg bewirkte eine signifikante Konzentrationssteigerung von DA und 5-HT im Neostriatum im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieser Effekt war erst nach 60 min. feststellbar. Im Nucleus accumbens hingegen konnte nach subkutaner Testosteronapplikation kein Einfluss auf die serotonerge und dopaminerge Neurotransmission beobachtet werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Testosteron in Gehirngebieten, wie dem Neostriatum und dem Nucleus accumbens einen Einfluss auf das dopaminerge und serotonerge Transmittersystem ausübt. Diesen Gehirngebieten wird, wie bereits beschrieben, eine funktionelle Bedeutung bei depressiven Störungen zugewiesen.

Weiterhin wurde mit diesem Experiment deutlich, dass eine intranasale Testosteronapplikation effektiver zu sein scheint als eine systemische Verabreichung. So erzielten selbst die geringen 1.0 und 2.0 mg/kg Testosterondosierungen starke Effekte, während bei der subkutanen Applikationsform erst bei einem Dosierungsbereich von 8.0 mg/kg Testosteron ein

Anstieg der Monoaminkonzentrationen zu erkennen war. Eventuell wird bei der intranasalen Applikationsmethode weniger Testosteron im Körper metabolisiert, bevor es im Gehirn seinen Einfluss auf die monoaminerge Neurotransmission ausüben kann. Zudem hatte die intranasale Applikationsmethode eine schnellere Wirklatenz im Gehirn zur Folge. Somit deuten die vorliegenden Befunde darauf hin, dass die intranasale Applikationsform eine gute nicht-invasive Methode bei der Verabreichung von psychopharmakologisch wirksamen Substanzen darstellt.

4.3. Die Effekte von intranasal verabreichten Dopamin auf das Verhalten im „Forced Swimming“ Test, Elevated Plus-Maze und Offenfeld.

Die beschriebenen Befunde zeigen, dass Testosteron eine modulatorische Funktion bei der dopaminergen Neurotransmission ausübt. Daraus leitet sich ab, dass die antidepressiven Eigenschaften von Testosteron aus Experiment I möglicherweise durch eine Steigerung der DA-Konzentration in mesolimbischen Gehirngebieten erklärt werden könnte. Aufgrund dessen sollte im folgenden Experiment untersucht werden, ob DA bei einer Testung im FST depressions-ähnliches Verhalten bei männlichen Ratten reduzieren kann. Damit auch potentiell antidepressive Eigenschaften von DA nicht auf eine generell gesteigerte Motorik oder auf verändertes Angstverhalten zurückzuführen sind, wurden erneut das Offenfeld und der EPM-Test als Kontrollparadigmen durchgeführt. Soweit nichts anderes angegeben, sind bei diesem Experiment das Versuchsdesign und die Versuchsaapparaturen analog zu dem Versuchsdesign aus Experiment I.

Bedingt durch die Tatsache, dass DA die BHS aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaft nur in einem sehr hohen Dosierungsbereich passieren kann, wurde erneut die intranasale Applikation als alternative Applikationsform gewählt. Da nicht bekannt ist, in welchem Dosierungsbereich DA einen Einfluss auf Verhaltensvariablen ausüben könnte, wurde das Dosierungsspektrum von DA in einem weiten Bereich gehalten (0, 0.03, 0.3 und 3.0 mg/kg).

Die Tiere erhielten vor dem zweiten Durchgang (Tag 2) des FST die Testsubstanzen subchronisch (17 h; 5 h und 15 min. vor der Testung) verabreicht.

Hierbei zeigte der Zwischengruppenvergleich an Tag 2, dass die mittlere 0.3 mg/kg DA-Dosierung die Dauer der Immobilität im Vergleich zur Kontrollgruppe verringerte.

Gleichzeitig setzte die in dieser Gruppe gezeigte Immobilität an Tag 2 später ein als bei den Kontrolltieren. Alle anderen DA-Dosierungen hatten keinen Einfluss auf die Variable „Immobilität“. Die Variablen „Kletterverhalten“ und „Schwimmverhalten“ blieben durch alle DA-Dosierungen bei einem Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 2 unbeeinflusst.

Bei einem Innergruppenvergleich der 5 min. Messung des zweiten Tages mit den ersten 5 min. des ersten Tages, zeigte sich erneut, dass die 0.3 mg/kg DA-Dosierung die Dauer der Immobilität signifikant verringerte. In der niedrigeren 0.03 mg/kg Dosierung war dieser Effekt nicht zu beobachten, wogegen die hohe 3.0 mg/kg Dosierung einen statistischen Trend zeigte. Das Kletterverhalten reduzierte sich bei allen Gruppen an Tag 2. Dabei zeigten alle Gruppen mit Ausnahme der 0.3 mg/kg DA-Dosierung eine signifikante Abnahme. Dies deutet darauf hin, dass DA dosisabhängig antidepressive Eigenschaften im FST aufweist.

Im Kontrollparadigma Offenfeld wurde der Einfluss von DA auf lokomotorisches Verhalten untersucht. Da jedoch diskutiert wird, dass eine neue Umgebung die dopaminerge Transmission steigert und speziell das Explorationsverhalten beeinflusst (Feenstra et al. 2000; Pastor et al. 2005), wurden zur Kontrolle dieser möglichen Einflussvariable zwei verschiedene Versuchsbedingungen im Offenfeld mit unterschiedlichen Tieren untersucht. In der ersten Versuchsbedingung wurden die Tiere einen Tag vorher für 30 min. an das Offenfeld habituiert. Zudem bekamen die Tiere eine akute Verabreichung der Testsubstanz unmittelbar vor der Testung appliziert. In der zweiten Versuchsbedingung wurden die Tiere im Vorfeld nicht an das Offenfeld habituiert und bekamen die Testsubstanz, analog zum FST, subchronisch verabreicht.

Die akute intranasale Applikation von DA bewirkte bei den habituierten Tieren in der 0.3 mg/kg Dosierung eine signifikante Erhöhung der gelaufenen Wegstrecke im Vergleich zu den Kontrolltieren, was auf eine gesteigerte Motorik hinweist. Zudem verringerte diese Dosierung die Anzahl des Ruheverhaltens im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings konnte bei dieser Dosierung keine Veränderung des Explorationsverhaltens im Zentrum der Apparatur gefunden werden, was einen Effekt auf das Angstverhalten ausschließt. Die anderen DA-Dosierungen (0.03 und 3.0 mg/kg DA) generierten bei diesem Versuchsdesign im Offenfeld keine Verhaltenseffekte.

Bei der Testung ohne vorherige Habituation an das Offenfeld wurden lediglich die 0.3 und 3.0 mg/kg DA-Dosierungen getestet. Auf die 0.03 mg/kg Dosierung wurde verzichtet, da sie schon im FST keine Effekte auf das Verhalten induzierte und somit auch nicht auf lokomotorische Effekte untersucht werden musste. Allerdings konnte in diesem Versuchsdesign bei keiner DA-Dosierung statistische relevante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die beiden Offenfeldversuche lassen darauf schließen, dass der Faktor „Neuheit der Umgebung“ einen Einfluss auf die dopaminerge Transmission ausübt und dieser Umstand bei einer Testung von DA auf Explorationsverhalten berücksichtigt werden sollte.

In der EPM-Apparatur konnte kein Einfluss von DA auf angstkorrelierte Verhaltensvariablen beobachtet werden. Die akute Verabreichung von DA 15 min. vor der Testung führte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht zu einer Steigerung des Explorationsverhaltens in den offenen Armen.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass eine intranasale Applikation von DA behaviorale Effekte bewirkt. Somit ist diese Applikationsform auch für Substanzen geeignet, welche auf Grund ihrer hydrophilen Eigenschaften das ZNS nur sehr begrenzt erreichen können. Auch deuten die Ergebnisse des FST auf potentiell antidepressive Wirkeigenschaften von DA in der mittleren DA-Dosierung hin. Ob dieser Befund auf einer gesteigerten generellen Motorik basiert, kann jedoch abschließend nur schwer beurteilt werden und bedarf weiterer Experimente. Im EPM-Test und dem Offenfeld ohne vorherige Habituation wurden keine Effekte auf die generelle Motorik gefunden. Es zeigten sich jedoch Steigerungen in der Lokomotion in dem Offenfeld mit vorheriger Habituation.

Interessant erscheint zudem das Ergebnis, dass nur die mittlere 0.3 mg/kg DA-Dosierung einen Einfluss auf das Verhalten der Versuchstiere hatte, was auf einen engen Dosis-Wirkungsbereich von exogenem DA hinweist.

5. Zusammenfassende Diskussion

Die in dieser Dissertation durchgeführten Studien sollten einen Beitrag leisten zum besseren Verständnis der komplexen pathophysiologischen Grundlagen der Depression.

Mit wachsendem Verständnis des Krankheitsbildes der Depression traten auch zunehmend die komplexen zugrunde liegenden neurophysiologischen Ursachen der Depression in den Blickpunkt. Dabei fokussierte sich die Erforschung der neurophysiologischen Grundlagen lange Zeit auf die Monoamin-Hypothese und somit auf monoaminerge Transmittersysteme, wie NE und 5-HT (Schildkraut 1965). Auf Basis der hierdurch erreichten Forschungsergebnisse konnten psychopharmakologisch wirksame Substanzen entwickelt werden, die bei einem Großteil der betroffenen Patienten eine deutliche Symptomreduzierung bewirkten. Trotz dieser wesentlichen Fortschritte in der Erforschung und Behandlung der Depression gibt es eine Vielzahl ungeklärter Fragen. Hierzu gehört u.a. auch die Tatsache, dass eine nicht unerhebliche Anzahl depressiver Patienten resistent gegenüber der Behandlung mit herkömmlicher noradrenergen oder serotonergen Antidepressiva zu sein scheint. Es scheint, dass neben NE und 5-HT auch andere Systeme an den neurobiologischen Mechanismen, die einer Depression zugrunde liegen beteiligt sein könnten. Eine Möglichkeit diese Wirkungsunterschiede zu erklären, könnte darin bestehen, dass den depressiven Erkrankungen trotz gemeinsamer klinischer Charakteristika unterschiedliche neurophysiologische Ätiopathologien zugrunde liegen könnten. Seit geraumer Zeit wird auch ein etwaiger hormoneller Einfluss diskutiert, da epidemiologisch und altersbedingt unterschiedliche Verteilungsverhältnisse depressiver Erkrankungen existieren. Zudem konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass Stress, welcher bekanntermaßen bei langer Dauer zu Depressionen führen kann, den Testosteronspiegel bei Ratten reduziert (Macho et al., 2008). Aufgrund dessen wird Testosteron als ein möglicher hormoneller Einflussfaktor in Betracht gezogen, so dass sich eine wachsende Zahl von Untersuchungen mit der Rolle von Neurosteroiden sowie ihrer neuroaktiven Metaboliten als Modulatoren der neuronalen Funktion und behavioraler Prozesse befasst.

Die Ergebnisse der ersten Studie, in der systemisch verabreichtes Testosteron bei gesunden männlichen Ratten appliziert und auf antidepressive Eigenschaften im FST

getestet wurde, unterstreichen diese Vermutung. Aus unserer Untersuchung ging hervor, dass Testosteron zu einer Reduktion von immobilen Verhalten im FST führte und somit scheinbar ein antidepressives Wirkpotential bei Ratten entfaltet. Dieser Effekt war weder durch eine gesteigerte generelle Lokomotion oder ein verändertes Angstverhalten bedingt, da diese Parameter mit Hilfe des Offenfeldes und des EPM kontrolliert wurden. Das Ergebnis, dass Testosteron in der mittleren 2.0 mg/kg Dosierung die stärksten Effekte im FST zeigte, überrascht nicht, da dosisabhängige Effekte von Neurotransmittern und Hormonen oft nicht linear erfolgen und höhere Dosierungen eine überschießende Verhaltensreaktion auslösen können (Calabrese und Baldwin, 2003; De Souza Silva et al., 2000; Giraldo et al., 2002). Somit ist unser Ergebnis konsistent mit klinischen Studien, welche männlichen Steroiden eine entscheidende Rolle bei affektiven Erkrankungen zusprechen (Wang et al., 1996). Weiterhin stimmen unsere Befunde mit einer tierexperimentellen Studie von Frye et al. (2008) überein, die zeigen konnte, dass Testosteron depressions-ähnliches Verhalten bei Mäusen medierte, aber keine Einflüsse auf Angstparameter hatte. Andere tierexperimentelle Studien, welche den Einfluss von Testosteron auf depressions-ähnliches Verhalten bei Nagern untersuchten, sind mit unserer Studie schwer vergleichbar, da diese ausschließlich kastrierte Tiere verwendeten um einen defizitären Testosteronspiegel zu erhalten (Bernadi et al., 1989; Martinez-Mota und Fernandez-Guasti, 2004). Kastration bewirkt die Reduktion von Monoaminen im Gehirn und ist aus diesem Grund als Paradigma nicht geeignet, um die Rolle von Testosteron bei depressiven Erkrankungen zu untersuchen (Thiblin et al., 1999). Da unsere gesunden testosteronbehandelten Tiere eine Reduktion der Immobilität und eine Erhöhung des Schwimmverhaltens während des zweiten Durchganges im Vergleich zum ersten Durchgang des FST aufwiesen, stellt sich die Frage, ob Testosteron eventuell einen Einfluss auf motivationale und verstärkende Systeme im Gehirn ausübt. Auch andere Studien konnten zeigen, dass Testosteron verstärkende Eigenschaften besitzt und mit dem mesolimbischen DA-System interagiert (Packard et al. 1998; Rosellini et al., 2001). Insofern könnte Testosteron seine Wirkung auf depressions-ähnliches Verhalten über eine Modulation der dopaminergen und serotonergen Neurotransmission im mesolimbischen Belohnungssystem entfaltet haben. Bisher war wenig über den Einfluss von Testosteron auf diese monoaminergen Transmittersysteme bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Testosteron sowohl die Verfügbarkeit des serotonergen Vorläufermoleküls

Tryptophan (Giltay et al., 2008) als auch die Feuerrate von 5-HT-Neuronen im dorsalen Raphekern erhöhte (Robichaud und Debonnel, 2005). Bei kastrierten Mäusen modulierte eine Testosteronbehandlung den striatalen DA-Speicher- und Wiederaufnahmemechanismus (Shemisa et al., 2006). Unser zweites Experiment liefert einen entscheidenden Hinweis darauf, dass Testosteron einen direkten Einfluss auf die serotonergen und dopaminergen Transmittersysteme ausübt. Da wir mittels der in vivo Mikrodialyse zeigen konnten, dass Testosteron die Konzentration von DA und 5-HT im Nucleus accumbens und Neostriatum steigert, ist der Beweis erbracht, dass Testosteron mit diesen Transmittersystemen in Interaktion steht. Zudem handelt es sich bei den getesteten Gehirnarealen um Bereiche, welchen eine zentrale Bedeutung im mesolimbischen Belohnungssystem zugesprochen wird. Dies könnte eine Erklärung für die verstärkenden Eigenschaften von Testosteron sein.

Ein weiterer entscheidender Befund aus Experiment II ist das Ergebnis, dass eine intranasale Applikation von Testosteron stärkere neurochemische Effekte induziert als eine systemische Applikation. Dieser Umstand sollte bei Hormonersatztherapien zukünftig stärker berücksichtigt werden. Durch seine lipophilen Eigenschaften kann Testosteron zwar problemlos die BHS passieren, allerdings ist eine systemische Applikation bei Testosteron nicht unproblematisch und hat teilweise erhebliche Nebenwirkungen zur Folge. Oral verabreichtes Testosteron unterliegt einem hohen „first-pass“ Metabolismus bevor es den Blutkreislauf erreicht und besitzt deshalb eine niedrige Bioverfügbarkeit. Eine intramuskuläre Verabreichung ist hingegen schmerzhaft und bei transdermalen Methoden kann es zu Hautirritationen kommen (Hussain et al., 2002; Nieschlag et al., 2004; Nieschlag, 2006). Im Gegensatz dazu ist eine intranasale Verabreichung weniger invasiv und ein hoher „first-pass“ Metabolismus kann durch den schnellen Transport via Regio olfactoria umgangen werden (Costantino et al., 2007; Illum, 2004; Illum, 2007). Nur wenige Studien haben bislang die Bioverfügbarkeit von Testosteron nach verschiedenen Applikationsformen untersucht. Bislang konnte gezeigt werden, dass nach einer intranasalen Applikation die gleiche Bioverfügbarkeit von Testosteron vorliegt (Bioverfügbarkeit von 90-100%) wie nach einer intravenösen Applikation. Eine intraduodenale Applikation hatte im Vergleich lediglich nur eine Bioverfügbarkeit von 1% zur Folge (Hussain et al., 1984; Hussain et al., 2002).

Eine Humanstudie von Pietrowsky et al. (1996) zeigte, dass eine nasale Verabreichung von Arginin-Vasopressin effektiver als eine intravenöse

Verabreichung ist. Nur nasal verabreichtes Arginin-Vasopressin veränderte die P3-Komponente der ereignis-korrelierten Potentiale. Intravenös verabreicht hatte die Substanz keine Konsequenzen. Somit können Substanzen scheinbar sehr schnell durch die nasalen Schleimhäute absorbiert werden, was eine kurze Wirklatenz zur Folge hat. Da die olfaktorischen Rezeptorzellen gleichzeitig mit der Umwelt und dem ZNS in einem direktem Kontakt stehen, bietet sich die nasale Verabreichungsform als guter Ansatz bei der Entwicklung von neuen therapeutischen Verabreichungsformen an.

Unser drittes Experiment belegte zudem, dass sogar hydrophiles DA bei einer intranasalen Verabreichung behaviorale Veränderungen induziert und somit das ZNS erreicht haben muss. Zuvor untersuchten nur Dahlin et al. (2000 und 2001) eine intranasale DA-Applikation. Ihren Studien zufolge erhöhte diese Applikationsmethode die Bioverfügbarkeit von DA signifikant im Vergleich zu einer intravenösen Applikation. Zusätzlich zeigen Resultate aus unserem Labor, dass intranasal verabreichtes DA die dopaminerge Aktivität im Neostriatum und Nucleus accumbens steigert (De Souza-Silva et al., 2008). Eventuell sind DA-Transporter (DAT) für diesen schnellen Transport in das ZNS verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass Teile des nasalen Schleimhäute durch olfaktorische Neurone innerviert werden, welche DAT exprimieren (Chemuturi et al., 2006). Allerdings war es nicht Sinn und Zweck unserer Studie herauszufinden, über welchen genauen Mechanismus exogenes DA das ZNS erreicht. Dies sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden. Die in unserer Studie gefundenen unmittelbaren Effekte auf das Verhalten deuten jedoch auf einen schnellen Transportmechanismus von DA hin. Ein langsamer axonaler Transport durch olfaktorische Nervenzellen scheint eher unwahrscheinlich; vielmehr ist denkbar, dass DA durch Lücken im olfaktorischen Epithel das ZNS erreicht haben muss.

Bei Experiment III galt unser Interesse primär den resultierenden Effekten auf das Verhalten von intranasal verabreichtem DA. Vor dem Hintergrund unseres Befundes, dass Testosteron einen Einfluss auf monoaminerge Transmittersysteme in mesolimbischen Regionen hat und der Vermutung, dass seine potentiellen antidepressiven Eigenschaften eventuell hierüber mediiert werden, wollten wir die Rolle von DA bei depressiven Störungen näher untersuchen. Die Rolle von 5-HT bei der Depression ist hinreichend bekannt und brauchte deshalb nicht weiter untersucht werden. Allerdings ist heutzutage immer noch wenig über die Rolle des

Neurotransmitters DA bei depressiven Erkrankungen bekannt, nicht zuletzt durch den Umstand, dass dieser Transmitter nicht systemisch verabreicht werden kann. Das mesolimbische DA-System projiziert jedoch vom tegmentalen Areal des Mittelhirns zum Nucleus accumbens und spielt eine kritische Rolle bei der Kontrolle von Verstärkung und Motivation, und bei der Depression scheint eine Veränderung dieser Systeme vorzuliegen (Phillips et al., 1989; Willner et al., 1991b; Tremblay et al., 2002 und 2005). Zudem haben D₂- oder D₂/D₃- Rezeptoragonisten antidepressive Eigenschaften in verschiedenen Tiermodellen der Depression gezeigt (Muscat et al., 1992; Millan et al., 2004) und sind teilweise sehr effektiv bei der Behandlung von therapieresistenten Patienten (Inoue et al., 1996; Perugi et al., 2001; Goldberg et al., 2004). Die dosisabhängigen Effekte von DA auf depressions-ähnliche Verhaltensweisen bei männlichen Ratten aus Experiment III bestätigten somit, dass DA an den neurophysiologischen Grundlagen depressiver Symptomen involviert ist. Auch wenn wir nicht den genauen Mechanismus untersuchen konnten, durch welchen DA seinen Einfluss auf eine verminderte Immobilität bei den Tieren ausübte, findet man in der Literatur Anzeichen dafür, dass dies über D₂-Rezeptoren geschehen sein könnte (Gershon et al., 2007). Einige Studien wiesen eine erhöhte D₂- aber auch D₃- Rezeptorbindungsaktivität im Nucleus accumbens nach chronischer Applikation herkömmlicher Antidepressiva nach (Dziedzicka-Waslewska et al., 1997; Maj et al., 2000; Lammers et al., 2000a/b), während eine reduzierte Bindungsaktivität des D₁-Rezeptors gefunden wurde (Klimek und Nielsen., 1987). Zudem konnte gezeigt werden, dass gemischte D_{2/3}-Agonisten die Immobilität im FST reduzierten (Brocco et al., 2006; Borsini et al., 1988), so kann spekuliert werden, ob DA bei unserem Experiment seine Effekte auf depressions-ähnliches Verhalten über die D₂ und/oder D₃-Rezeptoren mediierte.

Intranasal appliziertes DA hatte keinen Einfluss auf das Angstverhalten im EPM. Ebenso wurden keine lokomotorischen Effekte im Offenfeld, ohne vorherigen Habitationsdurchgang, gefunden. Dies spricht dafür, dass die durch DA bedingte reduzierte Immobilität im FST als potentiell antidepressiv interpretiert werden kann. Aufgrund der Befunde in den Kontrollexperimenten kann dieser Effekt nicht durch eine gesteigerte generelle Motorik oder vermindertes Angstverhalten erklärt werden. Allerdings erhöhte DA die Lokomotion in dem Offenfeld mit vorheriger Habituation, was bei der Interpretation der Ergebnisse von DA im FST berücksichtigt werden sollte. Es ist bekannt, dass neue Stimuli, wie z.B. eine neue Umgebung, die

dopaminerge Neurotransmission in striatalen Gehirnregionen erhöhen (Feenstra et al., 2000; Horvitz, 2000; Legault und Wise, 2001). Somit konfundieren bei Paradigmen ohne vorherige Habituation diese Einflüsse auf das dopaminerge System. Daher erscheint es sinnvoll, dass verstärkt auch Ergebnisse aus dem Offenfeld mit Habituation als Kontrolle von etwaigen lokomotorischen Effekten von DA herangezogen werden sollte. Zudem ähnelt dieses Versuchsdesign dem des FST, da vor dem eigentlichen Testtag ein Durchgang existiert, an dem die Tiere die Apparaturen kennen lernen, so dass am eigentlichen Testtag kein zusätzlicher Einfluss auf das dopaminerge System vorliegt. Die Steigerung der Lokomotion nach DA-Applikation aus dem habituierten Offenfeld sind demnach mit anderen Studien konsistent sein, welche belegen, dass D₂-Rezeptoragonisten in höheren Dosierungen die Lokomotion bei Mäusen in einer für die Tiere bekannten Umgebung steigerte (Maj et al. 1997; Siuciak und Fujiwara, 2004). Damit wird wiederum die Vermutung unterstrichen, dass exogenes DA seine Effekte auf das Verhalten über eine Aktivitätssteigerung des D₂-Rezeptors mediiert, wobei eine Beteiligung der D₁- und D₃-Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann. Andererseits ist das striatale System primär in extrapyramidale motorische Funktionen involviert. So könnte spekuliert werden, dass ein defizitärer DA-Spiegel eventuell spezifische Symptome der Depression moduliert, wie z.B. eine herabgesetzte Motorik. Humanstudien, welche einen herabgesetzten striatalen DA-Spiegel bei depressiven Patienten mit reduzierter Motorik gefunden haben, untermauern diesen Verdacht (Ebert et al., 1996). Weitere Studien sind notwendig, um die genaue Rolle von DA auf depressive Symptome zu entschlüsseln. Die behavioralen Effekte von intranasal applizierten DA weisen ein ähnliches Profil auf, wie es auch Medikamente gegen Morbus Parkinson haben (Inoue et al., 1996; Bertaina-Anglade et al., 2006). Da bei Morbus Parkinson eine Störung des dopaminergen Systems vorliegt, könnte eine intranasale Verabreichung von DA eventuell eine Alternative bei der Therapie dieser Erkrankung sein. Dies sollte in Tiermodellstudien mit einem Vergleich zu herkömmlichen Antiparkinsonmitteln untersucht werden. Bei der bisherigen medikamentösen Therapie von Morbus Parkinson besteht ein großer Bedarf an neuen therapeutischen Ansatzpunkten, da das bislang hauptsächlich eingesetzte L-DOPA eine Reihe von Nebenwirkungen verursacht (Katzenschlager und Lees, 2002).

Insgesamt sind die zerebralen Mechanismen, die an der depressiven Symptomatik beteiligt sind, sehr komplex. Damit depressive Symptome gezielter behandelt werden

können, müssen weiterhin die der Depression zugrunde liegenden und beteiligten Neurotransmittersysteme und Hirnstrukturen auf ihre Wirkweise und ihr Zusammenspiel untersucht werden. Die Ergebnisse unserer Studie veranschaulichen zum einen, dass Testosteron und DA hierbei zukünftig ein besonderes Interesse auf sich ziehen sollten. Zum anderen zeigen sie, dass die intranasale Applikationsform eine gute Alternative sein kann, um Substanzen dem ZNS zuzuführen.

6. Literaturverzeichnis

- Akiskal HS. Interaction of biologic and psychologic factors in the origin of depressive disorders. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl* 319:131-139, 1985.
- Aldenhoff J. [Reflections on the psychobiology of depression]. *Nervenarzt* 68 (5):379-389, 1997.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, and Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J.Endocrinol.* 160 (1):1-12, 1999.
- Barrett-Connor E, Von Muhlen DG, and Kritz-Silverstein D. Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 84 (2):573-577, 1999.
- Belmaker RH and Wald D. Haloperidol in normals. *Br.J.Psychiatry* 131:222-223, 1977.
- Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, and Bertolini A. Effect of castration and testosterone in experimental models of depression in mice. *Behav.Neurosci.* 103 (5):1148-1150, 1989.
- Bertaina-Anglade V, La Rochelle CD, and Scheller DK. Antidepressant properties of rotigotine in experimental models of depression. *Eur.J.Pharmacol.* 548 (1-3):106-114, 2006.
- Birkmayer W and Riederer P. Biochemical post-mortem findings in depressed patients. *J.Neural Transm.* 37 (2):95-109, 1975.
- Bitar MS, Ota M, Linnoila M, and Shapiro BH. Modification of gonadectomy-induced increases in brain monoamine metabolism by steroid hormones in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology* 16 (6):547-557, 1991.
- Blazer DG, Kessler RC, McGonagle KA, and Swartz MS. The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. *Am.J.Psychiatry* 151 (7):979-986, 1994.
- Borsini F, Lecci A, Mancinelli A, D'Aranno V, and Meli A. Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. *Eur.J.Pharmacol.* 148 (3):301-307, 1988.
- Brocco M, Dekeyne A, Papp M, and Millan MJ. Antidepressant-like properties of the anti-Parkinson agent, piribedil, in rodents: mediation by dopamine D2 receptors. *Behav.Pharmacol.* 17 (7):559-572, 2006.
- Brower KJ. Anabolic steroid abuse and dependence. *Curr.Psychiatry Rep.* 4 (5):377-387, 2002.

- Burris AS, Banks SM, Carter CS, Davidson JM, and Sherins RJ. A long-term, prospective study of the physiologic and behavioral effects of hormone replacement in untreated hypogonadal men. *J.Androl* 13 (4):297-304, 1992.
- Calabrese EJ and Baldwin LA. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 43:175-197, 2003.
- Chemuturi NV, Haraldsson JE, Prisinzano T, and Donovan M. Role of dopamine transporter (DAT) in dopamine transport across the nasal mucosa. *Life Sci.* 79 (14):1391-1398, 2006.
- Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br.J.Psychiatry* 113 (504):1237-1264, 1967.
- Costello EJ, Pine DS, Hammen C, March JS, Plotsky PM, Weissman MM, Biederman J, Goldsmith HH, Kaufman J, Lewinsohn PM, Hellander M, Hoagwood K, Koretz DS, Nelson CA, and Leckman JF. Development and natural history of mood disorders. *Biol.Psychiatry* 52 (6):529-542, 2002.
- Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, and Quay SC. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int.J.Pharm.* 337 (1-2):1-24, 2007.
- Cryan JF, Page ME, and Lucki I. Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur.J.Pharmacol.* 436 (3):197-205, 2002.
- D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, and Serra G. The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur.J.Pharmacol.* 405 (1-3):365-373, 2000.
- Dahlin M, Bergman U, Jansson B, Bjork E, and Brittebo E. Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice. *Pharm.Res.* 17 (6):737-742, 2000.
- Dahlin M, Jansson B, and Bjork E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur.J.Pharm.Sci.* 14 (1):75-80, 2001.
- Davis M. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol.Sci.* 13 (1):35-41, 1992.
- De Souza Silva MA, Mattern C, Hacker R, Nogueira PJ, Huston JP, and Schwarting RK. Intranasal administration of the dopaminergic agonists L-DOPA, amphetamine, and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: a microdialysis study in the rat. *J.Neurochem.* 68 (1):233-239, 1997.
- De Souza Silva MA, Hasenohrl RU, Tomaz C, Schwarting RK, and Huston JP. Differential modulation of frontal cortex acetylcholine by injection of substance P into the nucleus basalis magnocellularis region in the freely-moving vs. the anesthetized preparation. *Synapse* 38 (3):243-253, 2000.

- De Souza Silva MA, Topic B, Huston JP, and Mattern C. Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse* 62 (3):176-184, 2008.
- Detke MJ, Rickels M, and Lucki I. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121 (1):66-72, 1995.
- Drevets WC. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog.Brain Res.* 126:413-431, 2000.
- Dubrovsy BO. Steroids, neuroactive steroids and neurosteroids in psychopathology. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 29 (2):169-192, 2005.
- Dziedzicka-Wasylewska M, Rogoz R, Klimek V, and Maj J. Repeated administration of antidepressant drugs affects the levels of mRNA coding for D1 and D2 dopamine receptors in the rat brain. *J.Neural Transm.* 104 (4-5):515-524, 1997.
- Ebert D, Feistel H, Loew T, and Pirner A. Dopamine and depression--striatal dopamine D2 receptor SPECT before and after antidepressant therapy. *Psychopharmacology (Berl)* 126 (1):91-94, 1996.
- Farvolden P, Kennedy SH, and Lam RW. Recent developments in the psychobiology and pharmacotherapy of depression: optimising existing treatments and novel approaches for the future. *Expert Opin.Investig.Drugs* 12 (1):65-86, 2003.
- Feenstra MG, Botterblom MH, and Mastebroek S. Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 100 (4):741-748, 2000.
- Fibiger HC and Phillips AG. Increased intracranial self-stimulation in rats after long-term administration of desipramine. *Science* 214 (4521):683-685, 1981.
- Fibiger HC. Neurobiology of depression: focus on dopamine. *Adv.Biochem.Psychopharmacol.* 49:1-17, 1995.
- Fochtman LJ, Cruciani R, Aiso M, and Potter WZ. Chronic electroconvulsive shock increases D-1 receptor binding in rat substantia nigra. *Eur.J.Pharmacol.* 167 (2):305-306, 1989.
- Foster JA and MacQueen G. Neurobiological factors linking personality traits and major depression. *Can.J.Psychiatry* 53 (1):6-13, 2008.
- Frye CA, Edinger K, and Sumida K. Androgen administration to aged male mice increases anti-anxiety behavior and enhances cognitive performance. *Neuropsychopharmacology* 33 (5):1049-1061, 2008.
- Gershon AA, Vishne T, and Grunhaus L. Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol.Psychiatry* 61 (2):145-153, 2007.

- Giltay EJ, Bunck MC, Gooren LJ, Zitman EG, Diamant M, and Teerlink T. Effects of sex steroids on the neurotransmitter-specific aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan in transsexual subjects. *Neuroendocrinology* 88 (2):103-110, 2008.
- Giraldo J, Vivas NM, Vila E, and Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. *Pharmacol. Ther.* 95 (1):21-45, 2002.
- Goldberg JF, Burdick KE, and Endick CJ. Preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole added to mood stabilizers for treatment-resistant bipolar depression. *Am.J.Psychiatry* 161 (3):564-566, 2004.
- Goldstein GW and Betz AL. The blood-brain barrier. *Sci.Am.* 255 (3):74-83, 1986.
- Handley SL and Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 327 (1):1-5, 1984.
- Heinrichs SC and Koob GF. Application of experimental stressors in laboratory rodents. *Curr.Protoc.Neurosci.* Chapter 8:Unit8, 2006.
- Hellhammer DH, Rea MA, Bell M, Belkien L, and Ludwig M. Learned helplessness: effects on brain monoamines and the pituitary-gonadal axis. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 21 (4):481-485, 1984.
- Holsboer F. Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J.Affect.Disord.* 62 (1-2):77-91, 2001.
- Holsboer-Trachsler E. Therapieresistente Depression: *J. Neurol. Neurochir. Psychiatr.* 7 (1): 43-46, 2006
- Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 96 (4):651-656, 2000.
- Hussain AA, Kimura R, and Huang CH. Nasal absorption of testosterone in rats. *J.Pharm.Sci.* 73 (9):1300-1301, 1984.
- Hussain AA, Al Bayatti AA, Dakkuri A, Okochi K, and Hussain MA. Testosterone 17beta-N,N-dimethylglycinate hydrochloride: A prodrug with a potential for nasal delivery of testosterone. *J.Pharm.Sci.* 91 (3):785-789, 2002.
- Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur.J.Pharm.Sci.* 11 (1):1-18, 2000.
- Illum L. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J.Pharm.Pharmacol.* 56 (1):3-17, 2004.
- Illum L. Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems? *J.Pharm.Sci.* 96 (3):473-483, 2007.

- Inoue T, Tsuchiya K, Miura J, Sakakibara S, Denda K, Kasahara T, and Koyama T. Bromocriptine treatment of tricyclic and heterocyclic antidepressant-resistant depression. *Biol.Psychiatry* 40 (2):151-153, 1996.
- Itoh T, Tokumura M, and Abe K. Effects of rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor, in combination with imipramine on depressive behavior, CRE-binding activity and BDNF level in learned helplessness rats. *Eur.J.Pharmacol.* 498 (1-3):135-142, 2004.
- Jacobs D and Silverstone T. Dextroamphetamine-induced arousal in human subjects as a model for mania. *Psychol.Med.* 16 (2):323-329, 1986.
- Kalia M. Neurobiological basis of depression: an update. *Metabolism* 54 (5 Suppl 1):24-27, 2005.
- Katz RJ. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 16 (6):965-968, 1982.
- Katzenschlager R and Lees AJ. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. *J.Neurol.* 249 Suppl 2:II19-II24, 2002.
- Kern W, Born J, Schreiber H, and Fehm HL. Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes* 48 (3):557-563, 1999.
- Kizer JS, Humm J, Nicholson G, Greeley G, and Youngblood W. The effect of castration, thyroidectomy and haloperidol upon the turnover rates of dopamine and norepinephrine and the kinetic properties of tyrosine hydroxylase in discrete hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Res.* 146 (1):95-107, 1978.
- Klimek V and Nielsen M. Chronic treatment with antidepressants decreases the number of [3H]SCH 23390 binding sites in the rat striatum and limbic system. *Eur.J.Pharmacol.* 139 (2):163-169, 1987.
- Korte SM and De Boer SF. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur.J.Pharmacol.* 463 (1-3):163-175, 2003.
- Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, and Sokoloff P. Selective increase of dopamine D3 receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol.Psychiatry* 5 (4):378-388, 2000.
- Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, and Sokoloff P. Dopamine D3 receptor gene expression in the shell of nucleus accumbens is increased by chronic antidepressant treatment. *Mol.Psychiatry* 5 (3):229, 2000.
- Legault M and Wise RA. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur.J.Neurosci.* 13 (4):819-828, 2001.

- Lisanby SH, Morales O, Payne N, Kwon E, Fitzsimons L, Luber B, Nobler MS, and Sackeim HM. New developments in electroconvulsive therapy and magnetic seizure therapy. *CNS Spectr.* 8 (7):529-536, 2003.
- Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92 (2):180-185, 1987.
- Macho L, Rovensky J, Kvetnansky R, Radikova Z, Fickova M, and Zorad S. Hormone response to stress in rat strains of different susceptibility to immunologic challenge. *Endocr.Regul.* 42 (1):23-28, 2008.
- Maj J, Rogoz Z, Skuza G, and Kolodziejczyk K. The behavioural effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Eur.J.Pharmacol.* 324 (1):31-37, 1997.
- Maj J, Rogoi Z, Margas W, Kata M, and Dziedzicka-Wasylewska M. The effect of repeated treatment with pramipexole on the central dopamine D3 system. *J.Neural Transm.* 107 (12):1369-1379, 2000.
- Mannisto PT, Lang A, Rauhala P, and Vasar E. Beneficial effects of co-administration of catechol-O-methyltransferase inhibitors and L-dihydroxyphenylalanine in rat models of depression. *Eur.J.Pharmacol.* 274 (1-3):229-233, 1995.
- Martinez-Mota L and Fernandez-Guasti A. Testosterone-dependent antidepressant-like effect of noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 78 (4):711-718, 2004.
- Millan MJ, Brocco M, Papp M, Serres F, La Rochelle CD, Sharp T, Peglion JL, and Dekeyne A. S32504, a novel naphthoxazine agonist at dopamine D3/D2 receptors: III. Actions in models of potential antidepressive and anxiolytic activity in comparison with ropinirole. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 309 (3):936-950, 2004.
- Mitchell DH and Owens B. Replacement therapy: arginine vasopressin (AVP), growth hormone (GH), cortisol, thyroxine, testosterone and estrogen. *J.Neurosci.Nurs.* 28 (3):140-152, 1996.
- Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J.Comp Physiol Psychol.* 48 (4):254-260, 1955.
- Muscat R, Papp M, and Willner P. Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal model of depression. *Biol.Psychiatry* 31 (9):937-946, 1992.
- Nieschlag E, Behre HM, Bouchard P, Corrales JJ, Jones TH, Stalla GK, Webb SM, and Wu FU. Testosterone replacement therapy: current trends and future directions. *Hum.Reprod.Update.* 10 (5):409-419, 2004.
- Nieschlag E. Testosterone treatment comes of age: new options for hypogonadal men. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 65 (3):275-281, 2006.
- O'Neil MF and Moore NA. Animal models of depression: are there any? *Hum.Psychopharmacol.* 18 (4):239-254, 2003.

- Orengo CA, Fullerton G, and Tan R. Male depression: a review of gender concerns and testosterone therapy. *Geriatrics* 59 (10):24-30, 2004.
- Overmier JB and Seligman ME. Effects of inescapable shock upon subsequent escape and avoidance responding. *J.Comp Physiol Psychol.* 63 (1):28-33, 1967.
- Packard MG, Schroeder JP, and Alexander GM. Expression of testosterone conditioned place preference is blocked by peripheral or intra-accumbens injection of alpha-flupenthixol. *Horm.Behav.* 34 (1):39-47, 1998.
- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, and Lucki I. Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* 147 (2):162-167, 1999.
- Pardridge WM. Recent advances in blood-brain barrier transport. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 28:25-39, 1988.
- Pastor R, Miquel M, and Aragon CM. Habituation to test procedure modulates the involvement of dopamine D2- but not D1-receptors in ethanol-induced locomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 182 (3):436-446, 2005.
- Pavan B, Dalpiaz A, Ciliberti N, Biondi C, Manfredini S and Vertuani S. Progress in drug delivery to the central nervous system by the prodrug approach. *Molecules.* 13 (5):1035-1065, 2008.
- Pellow S, Chopin P, File SE, and Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J.Neurosci.Methods* 14 (3):149-167, 1985.
- Pellow S and File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 24 (3):525-529, 1986.
- Perugi G, Toni C, Ruffolo G, Frare F, and Akiskal H. Adjunctive dopamine agonists in treatment-resistant bipolar II depression: an open case series. *Pharmacopsychiatry* 34 (4):137-141, 2001.
- Philips SR and Robson AM. Amphetamine-stimulated release of endogenous dopamine from the rat caudate nucleus in vivo. *Neurochem.Res.* 8 (6):731-741, 1983.
- Phillips AG, Blaha CD, and Fibiger HC. Neurochemical correlates of brain-stimulation reward measured by ex vivo and in vivo analyses. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 13 (2-3):99-104, 1989.
- Pietrowsky R, Thiemann A, Kern W, Fehm HL, and Born J. A nose-brain pathway for psychotropic peptides: evidence from a brain evoked potential study with cholecystokinin. *Psychoneuroendocrinology* 21 (6):559-572, 1996.
- Pietrowsky R, Struben C, Molle M, Fehm HL, and Born J. Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct

- nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biol.Psychiatry* 39 (5):332-340, 1996.
- Pope HG Jr., Cohane GH, Kanayama G, Siegel AJ, and Hudson JI. Testosterone gel supplementation for men with refractory depression: a randomized, placebo-controlled trial. *Am.J.Psychiatry* 160 (1):105-111, 2003.
- Porsolt RD, Le Pichon M, and Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266 (5604):730-732, 1977.
- Prut L and Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur.J.Pharmacol.* 463 (1-3):3-33, 2003.
- Putnam SK, Du J, Sato S, and Hull EM. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm.Behav.* 39 (3):216-224, 2001.
- Rajewski RA and Stella VJ. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 2. In vivo drug delivery. *J.Pharm.Sci.* 85 (11):1142-1169, 1996.
- Ramos A and Mormede P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 22 (1):33-57, 1998.
- Randrup A and Braestrup C. Uptake inhibition of biogenic amines by newer antidepressant drugs: relevance to the dopamine hypothesis of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 53 (3):309-314, 1977.
- Reddy PL, Khanna S, Subhash MN, Channabasavanna SM, and Rao BS. CSF amine metabolites in depression. *Biol.Psychiatry* 31 (2):112-118, 1992.
- Robichaud M and Debonnel G. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J.Neuroendocrinol.* 17 (3):179-185, 2005.
- Rohr UD. The impact of testosterone imbalance on depression and women's health. *Maturitas* 41 Suppl 1:S25-S46, 2002.
- Rosellini RA and Seligman ME. Frustration and learned helplessness. *J.Exp.Psychol.Anim Behav.Process* 1 (2):149-157, 1975.
- Rosellini RA, Svare BB, Rhodes ME, and Frye CA. The testosterone metabolite and neurosteroid 3alpha-androstanediol may mediate the effects of testosterone on conditioned place preference. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 37 (1-3):162-171, 2001.
- Roy A, Pickar D, Linnoila M, Doran AR, Ninan P, and Paul SM. Cerebrospinal fluid monoamine and monoamine metabolite concentrations in melancholia. *Psychiatry Res.* 15 (4):281-292, 1985.
- Rupprecht R, di Michele F, Hermann B, Strohle A, Lancel M, Romeo E, and Holsboer F. Neuroactive steroids: molecular mechanisms of action and implications for neuropsychopharmacology. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 37 (1-3):59-67, 2001.

- Sachar EJ and Baron M. The biology of affective disorders. *Annu.Rev.Neurosci.* 2:505-517, 1979.
- Sackeim HA. The definition and meaning of treatment-resistant depression. *J.Clin.Psychiatry* 62 Suppl 16:10-17, 2001.
- Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol.Psychiatry* 48 (8):755-765, 2000.
- Sayani AP and Chien YW. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13 (1-2):85-184, 1996.
- Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am.J.Psychiatry* 122 (5):509-522, 1965.
- Schroeder JP and Packard MG. Role of dopamine receptor subtypes in the acquisition of a testosterone conditioned place preference in rats. *Neurosci.Lett.* 282 (1-2):17-20, 2000.
- Schultz W, Apicella P, and Ljungberg T. Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J.Neurosci.* 13 (3):900-913, 1993.
- Seligman ME and Beagley G. Learned helplessness in the rat. *J.Comp Physiol Psychol.* 88 (2):534-541, 1975.
- Setem J, Pinheiro AP, Motta VA, Morato S, and Cruz AP. Ethopharmacological analysis of 5-HT ligands on the rat elevated plus-maze. *Pharmacol.Biochem.Behav.* 62 (3):515-521, 1999.
- Shemisa K, Kunnathur V, Liu B, Salvaterra TJ, and Dluzen DE. Testosterone modulation of striatal dopamine output in orchidectomized mice. *Synapse* 60 (5):347-353, 2006.
- Siuciak JA and Fujiwara RA. The activity of pramipexole in the mouse forced swim test is mediated by D2 rather than D3 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 175 (2):163-169, 2004.
- Stahl SM. Selecting an antidepressant by using mechanism of action to enhance efficacy and avoid side effects. *J.Clin.Psychiatry* 59 Suppl 18:23-29, 1998.
- Stahl SM. Symptoms and circuits, part 1: major depressive disorder. *J.Clin.Psychiatry* 64 (11):1282-1283, 2003.
- Sternbach H. Age-associated testosterone decline in men: clinical issues for psychiatry. *Am.J.Psychiatry* 155 (10):1310-1318, 1998.
- Sumner BE and Fink G. Testosterone as well as estrogen increases serotonin2A receptor mRNA and binding site densities in the male rat brain. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 59 (2):205-214, 1998.

- Thiblin J, Finn A, Ross SB, and Stenfors C. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Br.J.Pharmacol.* 126 (6):1301-1306, 1999.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Cardenas L, Herrmann N, and Busto UE. Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. *Arch.Gen.Psychiatry* 59 (5):409-416, 2002.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, and Busto UE. Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. *Arch.Gen.Psychiatry* 62 (11):1228-1236, 2005.
- Wang OC, Alexander G, Berman N, Salehian B, Davidson T, McDonald V, Steiner B, Hull L, Callegari L, and Swerdloff RS. Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men--a clinical research center study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81 (10):3578-3583, 1996.
- Warneke L. Psychostimulants in psychiatry. *Can.J.Psychiatry* 35 (1):3-10, 1990.
- Wells BG and Marken PA. Bromocriptine in treatment of depression. *DICP.* 23 (7-8):600-602, 1989.
- Weltgesundheitsorganisation, Dilling H et al. Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10 Kapitel (F) Klinisch-diagnostische Leitlinie. Hans Huber: Bern, 2008-11-11
- Willner P. Dopamine and depression: a review of recent evidence. I. Empirical studies. *Brain Res.* 287 (3):211-224, 1983.
- Willner P. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83 (1):1-16, 1984.
- Willner P. Animal models as simulations of depression. *Trends Pharmacol.Sci.* 12 (4):131-136, 1991.
- Willner P, Muscat R, and Phillips G. The role of dopamine in rewarded behavior: ability, insight, drive or incentive? *Pol.J.Pharmacol.Pharm.* 43 (4):291-300, 1991.
- Willner P, Muscat R, and Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci.Biobehav.Rev.* 16 (4):525-534, 1992.
- Wilson JD. Androgens. In *Gilman's The Pharmacologic Basis of Therapeutics*, Ninth edition. JG Hardman and others, eds. McGraw-Hill Inc, New York. Chapter 58. 1996.
- Yadid G, Overstreet DH, and Zangen A. Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. *Brain Res.* 896 (1-2):43-47, 2001.

Zhu MY, Klimek V, Dilley GE, Haycock JW, Stockmeier C, Overholser JC, Meltzer HY, and Ordway GA. Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression. *Biol.Psychiatry* 46 (9):1275-1286, 1999.

7. Veröffentlichungen

Nachfolgen sind die Veröffentlichungen aufgeführt, auf denen diese Arbeit basiert. Die darin zitierte Literatur ist am Anhang der jeweiligen Arbeit aufgeführt.

Buddenberg TE, Ruocco LA, de Souza Silva MA, Topic B. Attenuating effects of testosterone on immobility in the forced swim test in healthy male rats. Submitted 2008

Souza Silva MA, Mattern C, Topic B, Buddenberg TE, and Huston JP. Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, (in press) 2008.

Buddenberg TE, Topic B, Mahlberg ED, Souza Silva MA, Huston JP, and Mattern C. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. *Neuropsychobiology* 57 (1-2):70-79, 2008.

1
2
3
4 **Attenuating effects of testosterone on immobility in the forced swim test in**
5
6 **healthy male rats**
7
8

9
10
11 **T. E. Buddenberg¹, L. A. Ruocco², M. A. de Souza Silva¹, B. Topic^{1*}**
12
13

14
15
16 ¹Institute of Physiological Psychology and Center for Biological and Medical Research,
17 University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany
18

19
20
21 ²Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, II University of Naples, Naples,
22 Italy
23
24

25
26
27 **Running title:** Testosterone and forced swimming
28
29

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42 **Keywords:** testosterone, emotionality, depression, motor activity, anxiety
43
44

45
46 ***Corresponding author:**

47 Bianca Topic, PhD
48 Institute of Physiological Psychology
49 University of Düsseldorf
50 Universitätsstr. 1
51 D-40225 Düsseldorf
52 Germany
53 Tel.: +49-211/81-14296
54 Fax: +49-211/81-12024
55 e-mail: topic@uni-duesseldorf.de
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ABSTRACT

1
2 The androgenic steroid testosterone is well known for its function in reproduction, sexual
3 differentiation and sexual behavior. A growing number of human and animal studies suggest
4 a modulatory role of testosterone in the regulation of emotionality and associated psychiatric
5 disorders, including depressive-like disorders. However, most of the studies have been
6 carried out in subjects deficient in androgenic steroid levels. Here, we tested potential
7 beneficial effects of subcutaneously applied testosterone on emotionality and depressive-like
8 behavior in healthy male rats. For this purpose, male Wistar rats (3-4 months) received either
9 vehicle or testosterone (1.0, 2.0, 4.0 mg/kg) subcutaneously and were tested for potential
10 effects on motor activity and anxiety-like behavior in a novel open field and elevated plus-
11 maze. The forced swim test was used for assessing potential beneficial effects of
12 testosterone on depressive-like behavior. The results show, that, while subcutaneous
13 application of testosterone failed to influence spontaneous motor activity as well as anxiety-
14 like behavior in the open field and elevated plus-maze, its application induced a dose-
15 dependent reduction of immobility in the forced swim test, indicating antidepressant-like
16 action of testosterone in healthy animals.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Keywords:** anabolic androgenic steroids, depression, anxiety, emotionality
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

1
2 The endogenous anabolic androgenic steroid, testosterone, is the primary male sex,
3 hence masculinizing, hormone and well known for its actions in reproduction, sexual
4 differentiation (Negri-Cesi et al., 2004) and sexual behavior (Farbe-Nys, 1998, Tavares et al.,
5 2008; Topic et al., 2008). Besides these well known functions, a growing body of evidence
6 also suggest a modulatory role of testosterone in the regulation of emotionality,
7 reinforcement and memory processes (Frye, 2008; Janowsky, 2006; Pope et al. 2003).
8 During aging, levels of testosterone gradually decline in men and low levels of testosterone
9 in aged men are accompanied by impairments in spatial learning and an increased incidence
10 of depressive and anxiety disorders (Orengo et al., 2004; Seidmann, 2003). The loss of
11 libido, dysphoria, irritability, fatigue and loss of appetite have been linked to an age-related
12 decline in testosterone levels or hypogonadism (Mitchell et al., 1995; Orengo et al., 2004;
13 Sternbach 1998), indicating that testosterone may have potent effects on mood in the
14 human. Such symptoms are also implicated in depressive-like disorders and can be
15 alleviated by testosterone supplementation or replacement therapy (Barrett-Connor et al.,
16 1999; Burriss et al., 1992; Pope et al 2003; Wang et al. 1996), but clinical placebo-controlled
17 studies are still lacking (Amiaz and Seidman, 2008). On the other hand, clinically effective
18 antidepressants restore imbalances in monoaminergic neurotransmission and there is
19 evidence that testosterone has a modulatory role in monoaminergic neural activity in the
20 brain (Fabre-Nys, 1998; Flügge, 2000). Together, these findings suggest that testosterone
21 may play a role with respect to organizational and/or activational effects on mood and
22 emotionality. To date, beneficial effects of testosterone and its derivatives on anxiety-like
23 behavior in rodents are generally well accepted (Bitran et al., 1993; Bing et al., 1998; Frye
24 and Edinger, 2004; Rojas-Ortiz et al., 2006), but animal studies examining potential
25 antidepressant-like actions of testosterone are sparse with contradictory results. For
26 instance, beneficial effects of daily testosterone administration on immobility behavior in the
27 forced swim and tail suspensions test, two animal models of depression, were found in
28 castrated male mice (Bernadi et al., 1989). Chronic application of testosterone failed to have
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 antidepressant-like action in orchidectomized male rats, but restored the antidepressant
2 effects of clinically effective antidepressants, which were completely blocked by
3 orchidectomy (Martinez-Mota and Fernandez-Guasti, 2004). However, since orchidectomy
4 mediates the regulation of the synthesis and release of neurotransmitters (Bitar et al., 1991;
5 Kizer et al., 1978), generalization of these results is limited and pre-clinical studies assessing
6 the effects of testosterone on depression in naïve intact animals are necessary. We are
7 aware of only one study examining potential antidepressant-like action of testosterone after
8 acute drug administration, but this was in C57/BL6 mice (Frye et al., 2008). We, therefore,
9 examined the behavioral effects of subcutaneously applied testosterone on depressive-like
10 behavior in the forced swim test in rats. Potential effects of testosterone on anxiety and
11 motor activity were also assessed using the elevated plus-maze and open field paradigm.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 **Materials and methods**

27 *Animals*

28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Fourty male, 3-4 months old Wistar rats (weight: 296,187 ± 17,342g SEM, Tierversuchsanlage University of Düsseldorf) were used. All animals were housed in standard Macrolon cages (Typ IV) in groups of 4 each and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on: 7:00 p.m.) in a temperature (21°C) and humidity-controlled colony. Behavioral studies were carried out between 10 a.m. and 6 p.m. The animals were given free access to food and water throughout the experiments. The animals were tail-marked and handled for 4-5 days prior to behavioral testing. The experiments were carried out in accordance with the German Animal Protection Law and approved by Bezirksregierung Düsseldorf.

53 *Drug treatment*

54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Animals were randomly divided into 4 groups (n=10 per group), receiving either vehicle or testosterone (Sigma-Aldrich, USA) in a dosage of either 1 mg/kg; 2 mg/kg or 4 mg/kg body weight. Testosterone was dissolved in the respective vehicle gel, consisting of a

viscous galenic castor oil formulation (Mattern Pharmaceuticals AG, Switzerland).

Testosterone or vehicle was applied subcutaneously 15 min before testing.

Elevated plus-maze (EPM)

Animals were tested in the EPM to assess the effects of testosterone on anxiety-related behaviour. The elevated-plus maze consisted of two open (50 cm long x 10 cm wide) and two walled arms (50 cm long x 10 cm wide x 38.5 cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 x 10 cm), with the two arms of each type placed opposite to each other. Illumination (0.3 and 48 lux on the closed and open arms, respectively) was provided by diffuse ceiling lighting. A camera (SONY CCD-IRIS) was mounted ca. 1.5 m above the maze. Testosterone or vehicle was acutely administered 15 min before the animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animal was allowed to explore the maze for 5 min. The following variables were measured: Time (s) spent in the open and closed arms, number of entries into the open and closed arms (an entry was counted when the animal entered an arm with all four paws).

Open field test (OFT)

After a washout period of 2 days, animals from the EPM test underwent testing in the OFT to assess effects of testosterone on locomotion and anxiety-related behavior. All rats received one application, as described for the EPM, and were individually placed into the center of the OFT, and allowed to explore the field for 30 min. The open field apparatus consisted of a grey quadratic box (60 x 60 cm x 40 cm) made of Plexiglass, which was dimly illuminated (corner: 6 Lux; center: 12 Lux). The rats' behavior was recorded by means of a video camera mounted 100 cm above the maze, and was analysed post-hoc using a video tracking system (EthoVision 3.0, Noldus, The Netherlands). Overall motor activity was quantified as the distance (cm) travelled in the field. Furthermore, the number and duration (s) of rearings (raising up on hind legs with the forelegs in the air or against the wall) were quantified. In order to derive also some measures of emotionality, the number of entries into

1
2 and time spent (s) in the center (30 x 30 cm) were analyzed post-hoc by using the event
3 recorder of EthoVision (Noldus, The Netherlands). The arena was cleaned with an ethanol
4 solution between animals. A broad spectrum generator emitted noise at 60 dB.
5
6

7 *Forced swim test (FST)*

8
9
10 Twenty-four hours after the OFT, the animals were exposed to the FST to assess
11 effects of testosterone on depressive-like behavior. The procedure consisted of placing the
12 rats into a Plexiglas cylinder (46 cm tall x 20 cm in diameter) that had been filled with water
13 (25°C) up to 20 ± 2 cm from bottom. On the first day, rats were placed into the water for a 15-
14 min period (pre-test phase). At the end of this pre-test phase, each rat was removed from the
15 water, and placed in a plastic cage under a red light heating lamp for about 15 min to allow
16 drying. Twenty-four hours later, the animals were exposed to the same experimental
17 conditions and were placed into the water for a 15-min period again (test-phase). The water
18 was changed and replaced by fresh water after each animal testing. All test sessions were
19 recorded on video via a camera (Sony, model: SSC-M388CE) located so as to provide a
20 front view of the whole cylinder. Applications were performed 15 min prior to the start of the
21 test phase (n = 10 per group). In pilot studies, rats treated with conventional antidepressants
22 exhibited a reduction in the duration of immobility compared to vehicle treated controls on the
23 second exposure to the FST, in line with the vast literature.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 The duration of *immobility* (defined by a lack of motion of the animal, except for
42 movements required to keep its head above the water), *swimming* and *climbing* (vigorous
43 movements with forepaws in and out of the water, usually in contact to the walls) were
44 recorded post-hoc by using the event recorder of EthoVision (Noldus, The Netherlands) and
45 an experimenter blind to treatment conditions.
46
47
48
49
50
51
52
53

54 *Statistical analysis*

55 Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Between group
56 comparisons were done using one-way ANOVA (group as between-group factor), followed
57 by a priori pre-planned comparisons of treatment groups against the control group via post-
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

hoc Dunnett's T-tests. For the forced swim test, within-group comparisons between the first and second FST exposure were carried out using the paired T-test. Since, potential individual reactivity in behaviour during day 1 in the forced swim test has an impact on the behaviour shown during the second exposure of the test (Ho et al., 2002, Taghzouti et al., 1999). Data are also expressed as percentage of day 1.

Results were calculated on the basis of two-tailed statistics. The level for statistical significance was set at $p < 0.05$ (a trend was considered at $p < 0.10$).

Results

Open field and elevated plus-maze

The group means (\pm SEM) of the behavioural parameters assessed in the present experiment are depicted in table 1. One-way ANOVA failed to reveal any differences in exploratory behaviour between vehicle- and testosterone-treated groups on motor activity and rearing in the novel open field ($F_{(3,39)} \leq 1.062$, $p \geq 0.377$). Also, no group differences were found for the number of center entries in the open field ($F_{(3,38)} = 0.766$, $p = 0.52$). In the elevated plus-maze, no significant main group effect for number of entries ($F_{(3,39)} = 0.785$, $p = 0.51$) and time spent on the enclosed arms ($F_{(3,39)} = 1.33$, $p = 0.28$) was found by the ANOVA. Similarly, testosterone treated animals did not differ from the control group with respect to the number of open-arm visits ($F_{(3,39)} = 0.944$, $p = 0.429$). However, one-way ANOVA revealed a trend for a main group effect for the time spent on the open arms ($F_{(3,39)} = 2.804$, $p = 0.05$). Post-hoc analysis revealed that animals treated with testosterone in a dose of 4 mg/kg tended to spend more time on the open arms compared to the vehicle treated control group ($p = 0.06$, Dunnett-T test). While vehicle-treated controls spent on the average 80.70 s on the open arms in the elevated plus maze, animals treated with 4 mg/kg testosterone visited the open arms with an average duration 148.30 s and, thus, exhibited a 67.19% longer sojourn time on the open arms than control animals.

Forced swim test

1
2 One-way ANOVA failed to reveal any main group effect in the behaviors assessed
3 during the first exposure to the FST ($F_{(3,39)} \leq 2.104$, $p \geq 0.12$), indicating, that animals did not
4 differ in behavior during the pre-test phase of the FST. The statistical analysis on the
5 behavioral raw data, collected during the second exposure of the forced swim test, also failed
6 to reveal a main group effect for immobility ($F_{(3,39)} = 0.185$, $p = 0.91$), climbing ($F_{(3,39)} = 0.581$,
7 $p = 0.63$) or swimming ($F_{(3,39)} = 0.326$, $p = 0.81$). However, on the second exposure, the
8 animals treated with testosterone in a dose of either 2 mg/kg or 4 mg/kg exhibited a
9 significant reduction in the duration of immobility (2 mg/kg: $t_{(9)} = 2.747$, $p = 0.023$; 4 mg/kg: $t_{(9)}$
10 $= 2.491$, $p = 0.034$) as well as a significant increase in the duration of swimming (2 mg/kg: $t_{(9)}$
11 $= -2.538$, $p = 0.032$; 4 mg/kg: $t_{(9)} = -2.864$, $p = 0.019$) compared to the drug-free first
12 exposure (paired t-test). Such an effect was not found for rats treated with vehicle or
13 testosterone in a dosage of 1 mg/kg. Similarly, animals treated with 2 mg/kg or 4 mg/kg
14 testosterone, showed, respectively, a decrease of 31.21% and 21.69% in the duration of
15 immobility from the first to the second exposure of the forced swim test, while animals that
16 received vehicle or 1 mg/kg testosterone exhibited an increase of, respectively, 53.63% and
17 5.23% in the duration of immobility. Here, one-way ANOVA revealed a trend for a main group
18 effect in immobility ($F_{(3,39)} = 2.721$; $p = 0.059$). Pre-planned comparisons, using post-hoc
19 Dunnett-T tests, revealed that the group treated with 2 m/kg testosterone differed
20 significantly from vehicle treated controls ($p = 0.035$, Fig. 1A) and revealed a trend also for
21 the group treated with 4 mg/kg testosterone ($p = 0.071$, Fig. 1A), pointing to an
22 antidepressant-like effect. With respect to the percent change in the duration of swimming
23 (Fig. 1B) and climbing (Fig. 1C), one-way ANOVA failed to reveal a main group effect ($F_{(3,39)}$
24 ≤ 2.183 , $p \geq 0.107$), but a trend for a stronger increase in the duration of swimming in the
25 group treated with 4 mg/kg testosterone compared to vehicle treated controls was found by
26 post-hoc Dunnett comparisons ($p=0.063$). All other comparisons revealed p-values above
27 0.10.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

1
2 In this study, we tested the hypothesis that testosterone exerts an antidepressant-like
3 action in healthy male rats and examined also its effects on spontaneous motor activity and
4 anxiety-like behavior. To our knowledge, this is the first study assessing the influence of
5 systemic testosterone application on depressive-like behavior in intact rats. We found that
6 subcutaneously administered testosterone induced a dose-dependent reduction in the
7 duration of immobility, which points to an antidepressant-like action of testosterone in healthy
8 rats. Furthermore, neither clear anxiolytic- nor anxiogenic-like effects in the elevated plus-
9 maze or open field were found. These results are in line with a recent study in mice, showing
10 that testosterone attenuated immobility, but failed to have anti-anxiety effects in healthy male
11 mice (Frye et al., 2008).
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Testosterone did not stimulate motor activity in the open field, which might rule out
25 the possibility that the immobility-attenuating effects could be due to an increase in general
26 motor activation (Wieland and Lucki, 1990). These results suggest that the suppressive
27 effects on immobility can be interpreted in terms of antidepressant-like activity rather than
28 stimulating general motor activity. The result, that 2 mg/kg testosterone significantly
29 decreased the duration of immobility, whereas the higher 4 mg/kg dosage of testosterone
30 showed only a trend, is interesting but not unexpected, because dose-response relationships
31 of neurotransmitters and hormones are often nonlinear and higher dosages are able to
32 produce overshoot reactions (Calabrese and Baldwin, 2003; De Souza Silva et al., 2000;
33 Giraldo et al., 2002). Our results are in line with clinical reports indicating a decisive role of
34 male gonadal steroids in affective disorders (Wang et al., 1996). The first clinical
35 observations in humans of a correlation between testosterone level and depression stems
36 from Danziger et al. (1944). The literature on animal studies of this link is sparse and is not
37 directly comparable, because of the exclusive use of animals deficient in peripheral androgen
38 levels, and the results have only shown that testosterone potentiated the antidepressant-like
39 effects of antidepressants (Bernadi et al., 1989; Martinez-Mota and Fernandez-Guasti,
40 2004). Such studies have their basis on the assumption that dysregulations or disease-
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 related disruptions in gonadal steroid transmission or an age-related decline in gonadal sex
2 steroid hormones is related to changes in affective and cognitive behavior in humans and
3 animals, which can be restored by testosterone supplementation or replacement (for review
4 see: Zitzmann, 2006). However, in rodent studies, orchidectomy is known to decrease the
5 content of all monoamines in the brain (Bitar, 1991; Putnam et al. 2001) and favors an
6 inactive behavior, per se (Bernadi et al., 1989). Also, castration (Guivarch et al., 1995;
7 Sumner and Fink, 1998) and gonadectomy (Mitsushima et al., 2008) interact with
8 monoaminergic neurotransmission in several brain regions, while testosterone increased
9 central dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic metabolism in the intact male rat (Thiblin
10 et al., 1999). This is in line with our recent in vivo microdialysis results, showing a long-
11 lasting increase in extracellular dopamine and serotonin levels in striatal subregions upon
12 application of testosterone in intact male rats, especially in the nucleus accumbens (De
13 Souza Silva et al., 2008), which is a particular brain region of the mesolimbic dopamine
14 reward circuit and seems to mediate core symptoms of depressive-like disorders, such as
15 anhedonia and reduced motivation (for review see: Nestler and Carlezon, 2006). The
16 intranasal application of dopamin was shown to enhance extracellular levels of dopamine in
17 striatal subregions accompanied by changes in motor activity (De Souza Silva et al., 2008b)
18 and antidepressant-like activity in the FST without effects on anxiety-like behavior
19 (Buddenberg et al., 2008). These results resemble those found in the present study with
20 testosterone. Thus, it is tempting to speculate, that testosterone exerted its effects upon
21 depressive-like behavior by acting on dopaminergic and/or serotonergic neurotransmission
22 within the mesolimbic dopamine reward system in intact rats. Furthermore, it was recently
23 shown that stress exposure induced a decline in testosterone levels in intact male rats
24 (Andersen et al., 2004; Macho et al., 2008). Since our healthy testosterone treated rats
25 exhibited a reduction in immobility and an increase in swimming behavior during the second
26 FST exposure compared to the pre-test phase, testosterone possibly attenuated effects upon
27 motivational and/or reward aspects of the task, thus preventing changes in emotionality that
28 are accompanied with reduced testosterone levels. This assumption is further supported by
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
other studies, indicating that the rewarding affective properties of testosterone are mediated in part by interaction with the mesolimbic dopamine system (Packard et al., 1998; for review see Rosellini et al., 2001).

On the other hand, testosterone failed to modulate anxiety-like behavior in healthy male rats, which is in line with another recent study in mice (Frye et al., 2008). However, it was shown to exert beneficial effects on anxiety-like behavior in rodents exhibiting reductions in testosterone levels, either due to age-related processes or surgical interventions (Frye et al., 2008, for review see: Nyby 2008). The reason for this is still a matter of investigation, but may be related to interactions and/or compensatory mechanisms accompanied by disruptions in testosterone neurotransmission. Also, differences in brain circuits mediating depressive- and anxiety-like behavior in intact rodents could contribute to such effects. With respect to this, antidepressants seldom exert anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze (Borsini et al., 2002), and it is generally well accepted that, while depressive-like behavior is particularly mediated via fronto-cortical structures, anxiety-like behavior is mediated mainly via the hippocampus.

Nevertheless, the present data indicate that acute testosterone administration in intact rats exerts beneficial effects on depressive-like behavior, and suggest a modulatory role for testosterone in the pathophysiology of depression. Thus, testosterone might be an interesting alternative therapeutic target, especially for the high incidence of treatment-resistant depression.

References:

- 1
2 Amiaz R, Seidman SN. Testosterone and depression in men. *Cur Opin Endocrinol Diabetes Obesity* 2008; 15:278-83.
3
4
5 Andersen ML, Bignotto M, Machado RB, Tufik S. Different stress modalities result in distinct steroid
6 hormone responses by male rats. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:791-7.
7
8 Barrett-Connor E, von Mühlen DG, Kritz-Silverstein D. Bioavailable testosterone and depressed mood
9 in older men: The Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:573-7.
10
11 Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, Bertolini A. Effect of castration and testosterone in experimental
12 models of depression in mice. *Behav Neurosci* 1989; 103:1148-50.
13
14 Bing O, Heilig M, Kakalouidis P, Sundblad C, Wikland L, Eriksson E. High doses of testosterone
15 increase anti-conflict behavior in rat. *Eur Neuropsychopharm* 1998; 8:321-3.
16
17 Bitar MS, Ota M, Linnoila M, Shapiro BH. Modification of gonadectomy-induced increases in brain
18 monoamine metabolism by steroid hormones in male and female rats. *Psychoneuroendocrinology*
19 1991; 16:547-57.
20
21 Bitran D, Kellogg CK, Hilvers JR. Treatment with an anabolic-androgenic steroid affects anxiety-like
22 behavior and alters the sensitivity of cortical GABAA receptors in the rat. *Horm Behav* 1993; 27:568-
23 83.
24
25 Borsini F, Podhorna J, Marraziti D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of
26 antidepressants? *Psychopharmacology* 2002; 163: 121-41.
27
28 Buddenberg TE, Topic B, Mahlberg ED, De Souza Silva MA, Huston JP, Mattern C. Behavioral actions
29 of intranasal application of dopamine. Effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field
30 parameters. *Neuropsychobiol* 2008; 57:70-9.
31
32 Burris AS, Banks SM, Carter CS, Davidson JM, Sherins RJ. A long-term, prospective study of the
33 physiologic and behavioral effects of hormone replacement in untreated hypogonadal men. *J Androl*
34 1992; 13:297-304.
35
36 Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: the dose-response revolution. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*
37 2003; 43:175-97.
38
39 Danziger L, Schroeder HT, Unger AA. Androgen therapy for involutional melancholia. *Arch Neurol*
40 *Psychiat* 1944; 51:457-61.
41
42 De Souza Silva MA, Hasenöhr RU, Tomaz C, Schwarting RKW, Huston JP. Differential modulation of
43 frontal cortex acetylcholine and behavior by injection of substance P into the nucleus basalis
44 magnocellularis region in the freely-moving vs. anesthetized preparation. *Synapse* 2000; 38:243-53.
45
46 De Souza Silva MA., Mattern C, Topic B, Buddenberg TE, Huston JP. Dopaminergic and serotonergic
47 activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone.
48 *Eur Neuropsychopharm* 2008a; doi:10.1016/j.euroneuro.2008.08.003
49
50 De Souza Silva MA, Topic B, Huston JP, Mattern C. Intranasal dopamine application increases
51 dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the
52 open field. *Synapse* 2008b; 62: 176-84.
53
54 Fabre-Nys C. Steroid control of monoamines in relation to sexual behavior. *Rev Reprod* 1998, 3:31-
55 41.
56
57 Flügge G. Regulation of monoamine receptors in the brain: dynamic changes during stress. *Int Rev*
58 *Cytol* 2000; 195:145-213.
59
60
61
62
63
64
65

1 Frye CA, Edinger K. Testosterone's metabolism in the hippocampus may mediate its anti-anxiety
2 effects in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 78:473-481.

3 Frye CA, Edinger K, Sumida K. Androgen administration to aged male mice increases anti-anxiety
4 behavior and enhances cognitive performance. *Neuropsychopharm* 2008; 33:1049-61.

5 Giraldo J, Vivas NM, Vila E, Badia A. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves:
6 empirical versus mechanistic models. *Pharmacol Ther* 2002; 95:21-45.

7 Giuvarch D, Vernier P, Vincent JD. Sex steroid hormones change the differential distribution of the
8 isoforms of the D2 dopamine receptor messenger RNA in the rat brain. *Neuroscience* 1995; 69: 159-
9 66.

10 Ho YJ, Eichendorff J, Schwarting RKW. Individual response profiles of male Wistar rats in animal
11 models for anxiety and depression. *Behav Brain Res* 2002; 136: 1-12.

12 Janowsky JS. The role of androgens in cognition and brain aging in men. *Neuroscience* 2006;
13 138:1015-20.

14 Kizer JS, Humm J, Nicholson G, Greeley G, Youngblood W. The effect of castration, thyroidectomy
15 and haloperidol upon the turnover rates of dopamine and norepinephrine and the kinetic properties of
16 tyrosine hydroxylase in discrete hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Res* 1978; 146:95-107.

17 Macho L, Rovensky J, Kvetnansky R, Radikova Z, Fickova M, Zorad S. Hormone response to stress in
18 rat strains of different susceptibility to immunologic challenge. *Endor Regul* 2008; 42:23-8.

19 Martínez-Mota L, Fernández-Guasti A. Testosterone-dependent antidepressant-like effects of
20 noradrenergic but not of serotonergic drugs. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 78:711-8.

21 McArthur R, Borsini F. Animal models of depression in drug discovery: a historical perspective.
22 *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84:436-52.

23 Mitchell R, Hollis S, Rothwell C, Robertson WR Age related changes in the pituitary-testicular axis in
24 normal men; lower serum testosterone results from decreases bioactive LH drive. *Clin Endocrinol*
25 (Oxf.) 1995; 42:501-7.

26 Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F. Gonadal steroid hormones maintain the stress-
27 induced acetylcholine release in the hippocampus: Simultaneous measurements of the extracellular
28 acetylcholine and serum corticosterone levels in the same subjects. *Endocrinology* 2008; 149: 802-11.

29 Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Motta M. Sexual differentiation of the brain: role of testosterone
30 and its active metabolites. *J Endocrinol Invest* 2004; 27:120-7.

31 Nestler EJ, Carlezon WA Jr. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry*
32 2006; 59: 1151-9.

33 Nyby JG. Reflexive testosterone release: A model system for studying the nongenomic effects of
34 testosterone upon male behavior . *Front NEuroendocrinol* 2008; 20:489-96.

35 Orengo CA, Fullerton G, Tan R. Male depression: A review of gender concerns and testosterone
36 therapy. *Geriatrics* 2004; 59:24-30.

37 Packard MG, Schroeder JP, Alexander GM. Expression of testosterone conditioned place preference
38 is blocked by peripheral or intra-accumbens injection of α -flupenthixol. *Horm Behav* 1998; 34: 39-47.

39 Pope HG, Cohane GH, Kanayama G, Siegel AJ, Hudson JI Testosterone gel supplementation for men
40 with refractory depression: a randomized, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 2003; 160:105-11.

41 Putnam SK, Du J, Sato S, Hull EM. Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with
42 medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm Behav* 2001; 36:216-24.

1 Rijas-Ortiz YA, Rundle-Gonzalez V, Rivera-Ramos I, Jorge JC. Modulation of elevated plus maze
2 behavior after chronic exposure to the anabolic steroid 17alpha-methyltestosterone in adult mice.
3 *Horm Behav* 2006; 49:123-8.

4 Rosellini RA, Svare BB, Rhodes ME, Frye CA. The testosterone metabolite and neurosteroid 3 α -
5 androstenediol may mediate the effects of testosterone on conditioned place preference. *Brain Res*
6 *Rev* 2001; 37: 162-71.

7
8 Seidman SN. Testosterone deficiency and mood in aging men: pathogenic and therapeutic
9 interactions. *World J Biol Psychiatry* 2003; 4:14-20.

10
11 Sternbach H. Age-associated testosterone decline in men: Clinical issues for psychiatry. *Am J*
12 *Psychiatry* 1998; 155:1310-8.

13
14 Sumner BEH, Fink G. Testosterone as well as estrogen increases serotonin2A receptor mRNA and
15 binding densities in the male rat brain. *Mol Brain Res* 1998; 59: 205-14.

16
17 Taghzouti K, Lamarque S, Kharouby M, Simon H. Interindividual differences in active and passive
18 behaviors in the forced-swimming test: implications for animal models of psychopathology. *Biol*
19 *Psychiatry* 1999; 45: 750-8.

20
21 Tavares MC, Topic B, Abreu C, Waga I, Gomez U, Tomaz C, Mattern C. Effects of intra-nasally
22 administered testosterone on sexual proceptive behavior in female capuchin monkeys (*Cebus apella*).
23 *Behav Brain Res* 2007; 179:33-42.

24
25 Thiblin I, Finn A, Ross SB, Stenfors C. Increased dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic activities
26 in male rat brain following long-term treatment with anabolic androgenic steroids. *Brit J Pharmacol*
27 1999; 126:1301-6.

28
29 Topic B, Tavares MC, Tomaz C, Mattern C. Prolonged effects of intra-nasally administered
30 testosterone on proceptive behaviour in female capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Behav Brain Res*
31 2007; 179:60-8.

32
33 Wang C, Alexander G, Berman N, Salehian B, Davidson T, McDonald V, Steiner B, Hull L, Callegari C,
34 Swerdloff RS. Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men – A clinical
35 research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3578-83.

36
37 Wieland S, Lucki I. Antidepressant-like activity of 5-HT1A agonists measured with the forced swim
38 test. *Psychopharmacology (Berl.)* 1990; 101:497-504.

39
40 Zitzmann M. Testosterone and the brain. *The Aging Male* 2006; 9: 195-9.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure Legends:

1
2 **Fig. 1:** Antidepressant-like activity of subcutaneously applied testosterone examined in the
3 forced swim test (FST) in healthy rats. Mean (\pm SEM) percent change of duration of
4 immobility (A), swimming (B) and climbing (C) from the first to the second exposure to the
5 forced swim test (duration of behavior on day 1 = 100%) in response to vehicle or
6 subcutaneously applied testosterone (1.0, 2.0 and 4.0 mg/kg; n = 10 rats per group). The
7 application of testosterone induced a significant decrease in the duration of immobility in the
8 group treated with 2.0 mg/kg testosterone. * $p < 0.05$, compared to vehicle-treated controls
9 (Dunnett's test); #: indicates a trend ($p < 0.1$)
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 1: Behavior of rats in the elevated plus maze, open field and forced swim test. Depicted are the group means (\pm SEM) of each behavior assessed for animals treated either with vehicle or testosterone (1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg).

	vehicle	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg	4.0 mg/kg
<u>Elevated plus maze</u>				
Nr. of open arm entries	3.10 \pm 1.00	2.20 \pm 0.42	2.50 \pm 0.56	3.80 \pm 0.79
Time on open arms (s)	80.70 \pm 16.84	88.20 \pm 18.53	73.30 \pm 17.13	148.30 \pm 27.58
Nr. of closed arm entries	4.20 \pm 0.57	4.00 \pm 0.60	5.00 \pm 0.58	3.70 \pm 0.75
Time in closed arms (s)	158.30 \pm 27.14	142.60 \pm 27.32	172.70 \pm 22.82	104.10 \pm 24.91
<u>Open field</u>				
Distance moved (cm)	5143.59 \pm 603.63	5784.89 \pm 432.2	5402.91 \pm 488.55	6351.94 \pm 497.64
Nr. of rearings	66.50 \pm 11.42	61.00 \pm 8.98	60.70 \pm 8.81	68.90 \pm 7.42
Duration of rearing (s)	166.94 \pm 28.70	147.78 \pm 21.90	155.56 \pm 23.64	163.82 \pm 18.99
Center entries	7.50 \pm 2.04	8.30 \pm 1.80	5.00 \pm 1.15	7.20 \pm 0.96
<u>Forced swim test</u>				
Duration of immobility (s)				
Day 1	113.20 \pm 17.01	146.34 \pm 23.85	210.45 \pm 40.20	200.40 \pm 38.79
Day 2	155.10 \pm 31.83	125.94 \pm 22.99	153.98 \pm 42.61*	153.24 \pm 30.78*
Duration of climbing (s)				
Day 1	126.36 \pm 13.77	101.10 \pm 12.87	115.10 \pm 9.62	112.04 \pm 16.26
Day 2	101.70 \pm 17.02	97.34 \pm 18.22	119.64 \pm 16.12	90.14 \pm 14.33
Duration of swimming (s)				
Day 1	659.20 \pm 27.96	650.86 \pm 22.13	570.88 \pm 44.59	586.30 \pm 32.60
Day 2	641.84 \pm 40.84	675.62 \pm 30.23	623.28 \pm 46.88*	655.28 \pm 34.60*

*: p < 0.05 compared to day 1 (paired T-test)

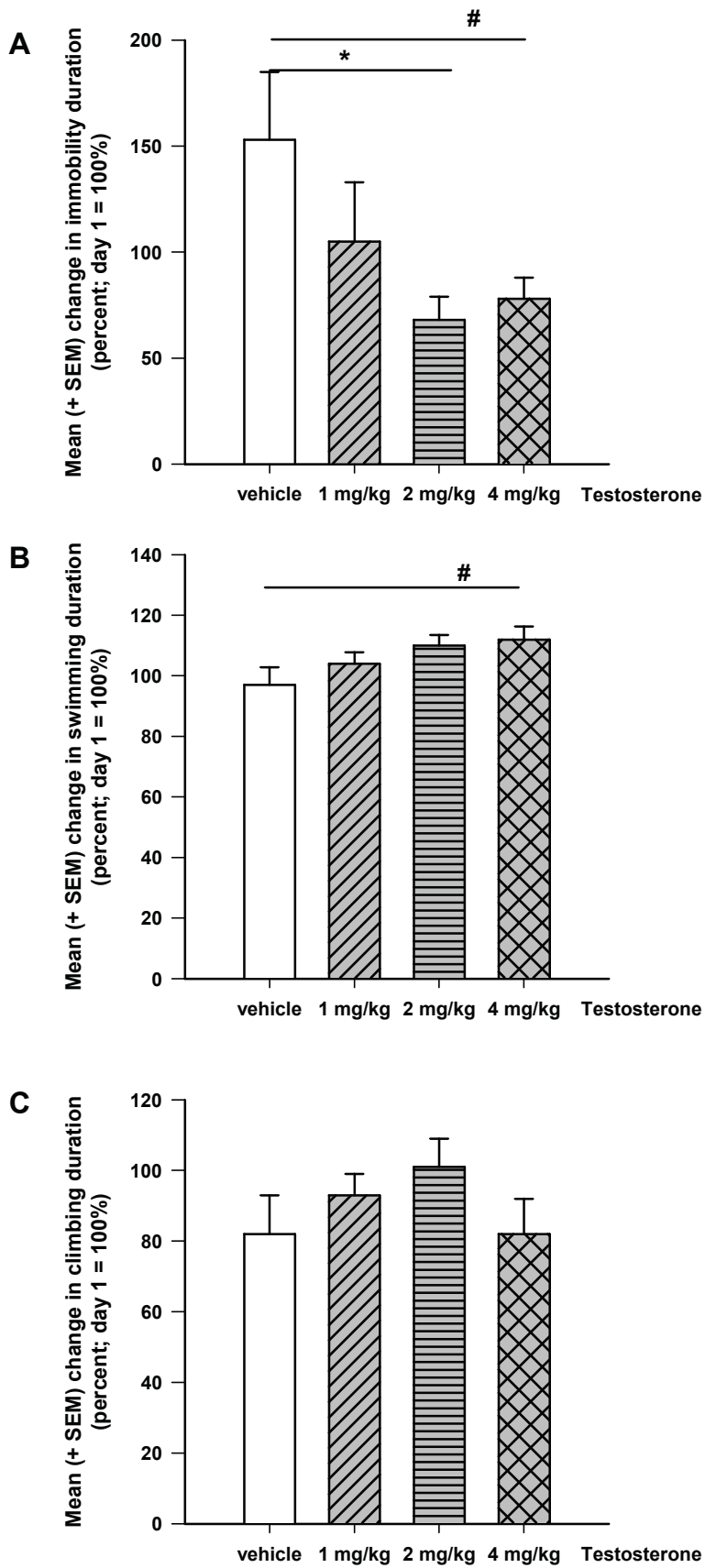
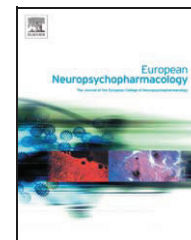


Fig. 1; Buddenberg et al.



Dopaminergic and serotonergic activity in neostriatum and nucleus accumbens enhanced by intranasal administration of testosterone

M.A. de Souza Silva^{a,*}, C. Mattern^b, B. Topic^a, T.E. Buddenberg^a, J.P. Huston^a

^a *Institute of Physiological Psychology and Center for Biological and Medical Research, University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany*

^b *M et P Pharma AG, Stans, Switzerland*

Received 11 July 2008; received in revised form 1 August 2008; accepted 12 August 2008

KEYWORDS

Dopamine;
Serotonin;
Testosterone;
Nucleus accumbens;
Neostriatum;
Intranasal;
Microdialysis

Abstract

Testosterone was administered intranasally in anesthetized male rats, and its effects on the activity of dopaminergic and serotonergic neurons in the neostriatum and nucleus accumbens were assessed by means of microdialysis and HPLC. The treatment (0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg of testosterone or vehicle, 10 μ l volume) was applied in both nostrils, half (5 μ l) into each. Subcutaneous injections of testosterone (2.0, 4.0 or 8.0 mg/kg) or vehicle were tested in other subjects. Samples were collected for 5 h. In the neostriatum, an increase of dopamine occurred after 2.0 mg/kg. Serotonin levels increased after 1.0 mg/kg dose. In the nucleus accumbens, dopamine and serotonin increased after 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg doses. Subcutaneous administration of 8.0 mg/kg testosterone increased dopamine and serotonin in the neostriatum only. We conclude that intranasal administration of testosterone is a more efficacious way for targeting the brain than the subcutaneous route, and may be considered as a means to activate central dopaminergic and serotonergic systems.

© 2008 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

1. Introduction

Testosterone (TE) is primarily produced in the testes and the ovaries, although small amounts are also produced by the adrenal glands. It is the main male sex hormone and an anabolic steroid. The brain is an important site of action for TE (Rommerts, 2004).

Neurosteroids are synthesized in the brain from endogenous precursors by enzymes that are present in neuronal tissue (Schumacher et al., 2003; Stoffel-Wagner, 2001). Neurosteroids can affect multiple brain functions (e.g. neuroendocrine and behavioral functions) via intracellular receptors (transcriptional changes in protein synthesis, which generally occur within hours or days), or by binding to neurotransmitter-gated ion channels, being active within seconds or milliseconds. There are indications that TE, like other neurosteroids, can be synthesized and reduced to 5 α -dihydrotestosterone in the brain, since enzymes involved in TE synthesis and metabolism (3- β -hydroxysteroid

* Corresponding author. Tel.: +49 211 81 14296; fax: +49 211 81 12024.
E-mail address: desouza@uni-duesseldorf.de
(M.A. de Souza Silva).

dehydrogenase and 5- α -reductase) are found in the brain (Martini et al., 1996; Mukai et al., 2006; Stoffel-Wagner, 2003; Tsutsui et al., 2006).

Besides its well known actions in reproduction, sexual differentiation and sexual behavior, other functions such as attention, memory, and spatial ability are suggested to be affected by TE in humans. Although a decrease in TE levels is a normal consequence of the aging processes in men, low-normal to subnormal levels of TE are indicated for hormone replacement therapy (HRT) (Cunningham, 2006). Decreased levels of TE are associated with an increased risk for the development of Alzheimer's disease, osteoporosis, type 2 diabetes, cardiovascular disease, obesity, depression and anxiety, and the increased risk of early mortality (Gold and Voskuhl, 2006; Hogervorst et al., 2005; Howell and Shalet, 2001; Hussain et al., 2002; Nieschlag et al., 2004; Nieschlag, 2006; Rosario and Pike, 2008; Zitzmann, 2006).

Although TE can easily cross the blood–brain barrier due to its lipophilic properties, systemic administration of TE for HRT has been shown to be problematic: Orally administered TE undergoes a high degree of first-pass metabolism before reaching the bloodstream, and therefore, has low bioavailability. Intramuscular injections are painful, and transdermal patches can cause skin irritation (Gold and Voskuhl, 2006; Howell and Shalet, 2001; Nieschlag, 2006). Alternative routes of administration for TE administration have been investigated, such as transdermal gels, mucoadhesive buccal tablets and intranasal preparations, aiming to improve the quality of HRT (Hussain et al., 2002; Nieschlag et al., 2004; Nieschlag, 2006). The intranasal route would seem to be advantageous for TE administration, since it is non-invasive, offers the possibility of bypassing the first-pass metabolism due to its rapid onset of drug action, and potentially provides a direct delivery of the drug to the central nervous system (Costantino et al., 2007; Illum, 2004, 2007).

There is evidence that dopaminergic as well as serotonergic activities in the brain are influenced by TE. In young male rats, gonadectomy and TE supplementation increased levels of serotonin (5-HT) and decreased its metabolite, 5-hydroxyindole-acetic acid (5-HIAA), in the brain (Martinez-Conde et al., 1985), while gonadectomy increased 5-HT_{1A} receptor messenger RNA content throughout the brain, and this effect was reversed by TE replacement (Zhang et al., 1999). Also, in female rats, post-natal acute and chronic TE administration reduced 5-HT levels in the amygdala (Sundblad and Eriksson, 1997). Such findings suggest a relationship between TE and 5-HT activity in the brain. Moreover, in gonadectomized mice, TE replacement modulated striatal dopamine storage/uptake mechanisms (Shemisa et al., 2006). Both D₁ and D₂ receptor antagonist (SCH 23390 and sulpiride, respectively) blocked the conditioned place preference (reinforcing) effects of chronic TE treatments in rats (Schroeder and Packard, 2000). A positive correlation was obtained between DA content in the right caudate/putamen (corresponding to the striatum in rodents) and plasma TE levels in marmosets (de Souza Silva et al., 2007).

Based on evidence for an involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the effects of TE, in the present study we investigated the effects of intranasally administered TE on dopamine and serotonin levels in the neostriatum and nucleus accumbens of male rats using microdialysis. For comparison purposes, we also assessed the effects of

subcutaneous TE administration on the same neurochemical parameters. Intranasal administration of dopamine, as well as of progesterone, has been shown to be more effective in enhancing mesolimbic and mesostriatal dopaminergic activity than the systemic route (de Souza Silva et al., 2008; de Souza Silva et al., in press). We, therefore, also expected to find a higher effectiveness of intranasal administration of TE as compared to subcutaneous injection.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Adult male Wistar rats were purchased from the local breeding facility, Tierversuchsanlage, University of Düsseldorf. Thirty-six animals were used for the intranasal TE administration experiment (weight: 352.5 ± 5.8 g mean ± SEM), and 29 for the subcutaneous TE administration (weight: 346.4 ± 6.3 g, mean ± SEM). All animals were kept in standard Macrolon cages (Type IV) in groups of 5 per cage. Animals undergoing microdialysis experimentation were housed individually after implantation of guide cannulae. They were maintained under a reversed 12 h light–dark cycle (lights on: 7:00 am) in a temperature (21 °C) and humidity-controlled room with food and water available *ad libitum*. All experiments were carried out according to the German Law of Animal Protection of 1998.

2.2. Drug

TE (Proquina S.A., Mexico) was used. For intranasal administration, TE was suspended in 10 μ l of gel (composed of a viscous castor oil mixture [Met P Pharma AG, Stans, Switzerland]), and applied into both nostrils (5 μ l each) employing a micropipette for viscous media (Transferpette, Brand GMBH + CO KG, Wertheim, Germany). The gel mixture was pushed into the nasal cavity by the pressure produced by the pipette, without introducing the pipette tip directly into the nasal cavity. For subcutaneous injections, TE was dissolved in sesame oil (Sigma-Aldrich, USA) and injected in a volume of 1 ml/kg.

2.3. Surgery

Animals were deeply anaesthetised with a mixture of ketaminhydrochloride (90.0 mg/kg, Ketavet, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Germany) and xylazinhydrochloride (8.0 mg/kg, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany) and fixed in a Kopf stereotactic frame. Two guide cannulae with a thread on the top (15 mm, 22 G, stainless steel) were implanted at the dorsal border of the neostriatum (NS; AP: 0.0 mm, ML: ±3.0 mm, DV: –3.0 mm), and the nucleus accumbens (NAc; AP: +1.6 mm, ML: ±2.6 mm, DV: –5.8 mm, 10° angle tilted laterally) in the right and left hemispheres, alternately. All coordinates were taken relative to bregma, according to the atlas of Paxinos and Watson (1986). They were fixed to the skull with two screws (stainless steel, $d=1.4$ mm) and dental cement. In the 24 h period after surgery the animals were given 100 μ l Novalgin (containing 500 mg/ml metamizol sodium, Aventis Pharma, Frankfurt, Germany) orally at 6 h intervals. Animals were allowed to recover for at least 6 days before the beginning of the microdialysis experimentation.

2.4. Microdialysis procedure

Experiments were conducted between 9:00 am and 6:00 pm, during their lights-off, active period. The animals were anaesthetized with 1.25 g/kg urethane (Sigma-Aldrich, USA) i.p. and placed on a heating pad in an acrylic box (45×25×22 cm). Body temperature was maintained during the experiment between 36.5–37.5 °C by a temperature controller (CMA 150, Carnegie, Sweden). A catheter was inserted into the i.p. cavity to allow application of water and ions during the course of the experiment, without touching the animal. The dialysis probes (4.0 and 2.0 mm active membrane length for the neostriatum and nucleus accumbens, respectively) of a concentric design (for construction details see: Boix et al., 1995) were inserted through the guide cannulae and fixed to the thread. Next, they were connected to syringes attached to a microdialysis pump (CMA 100, Carnegie, Sweden) and perfused, at a flow rate of 2 µl/min, with artificial cerebrospinal fluid, containing Na⁺ 146 mM, K⁺ 4 mM, Ca²⁺ 2.2 mM and Cl⁻ 156 mM. After a stabilization period of 2 h, the samples were collected every 10 min into vials containing 10 µl of 0.05 M HClO₄, in which 100 pg of deoxyepinephrine (internal standard) was dissolved. After six baseline samples were collected, one of the treatments was applied: For the intranasal administration experiment, TE (0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg) or its vehicle was applied; for the subcutaneous administration experiment, TE (2.0, 4.0 or 8.0 mg/kg) or its vehicle was injected. Thereafter, sampling continued for an additional 4 h.

2.5. Analysis

Immediately after collection, the samples were analyzed for the content of dopamine and serotonin, using high performance liquid chromatography. For the separation, we used a 125×2 mm reversed-phase column (120-5 C18, Macherey Nagel, Düren, Germany), perfused with a mobile phase, composed of 75 mM NaH₂PO₄, 4 mM KCl, 1.5 mM sodium dodecyl sulfate, 20 µM ethylenediamine tetraacetic acid, 12% v/v acetonitrile and 12% v/v methanol, with pH=6 adjusted with phosphoric acid (modified from Chen and Reith, 1994). Quantification was performed by amperometric detection (Intro, Antec, Leyden, Netherlands) with the potential set at +500 mV vs. an ISAAC reference electrode (Antec, Leyden, Netherlands) at 30 °C. The limit of detection was 0.1 pg per sample for dopamine and serotonin, at a signal-to-noise ratio of 2:1.

2.6. Histology

After completion of the last sampling interval, the animals were administered an overdose of pentobarbital (Nembutal, Sanofi Ceva, Libourne, France) and transcardially perfused with phosphate-buffered saline, followed by 10% phosphate-buffered formalin. The brains were removed and stored in formalin (10%) until they were sliced on a cryotome, stained with cresyl violet and examined under a light microscope for probe localization, by comparing the slices to plates of a rat

brain atlas (Paxinos and Watson, 1986). Only animals with probes that were placed within the boundaries of the neostriatum and nucleus accumbens were considered for data analysis.

2.7. Statistical analysis

The neurochemical data were expressed as a percentage of the mean of the four baseline samples, taken as 100%. Two-way ANOVAs with repeated measures were calculated with the factors, TIME (14 time points) and GROUP (4 groups). When appropriate, this was followed by one-way ANOVA and post hoc Dunnett tests to analyze group differences with pre-planned comparisons against the control group. All statistical tests were two-tailed.

3. Results

3.1. Histology

After the histological screening for correct probe placement, or due to leakage of dialysis probes during the course of experimentation, 65 animals were considered for statistical analysis. In 14 animals only the data from neostriatum or nucleus accumbens were considered. The sample sizes are as follows: intranasal administration: $n=7$ for all the groups, both for neostriatum and nucleus accumbens. Subcutaneous administration: $n=6$ for all the groups, both for neostriatum and nucleus accumbens. Fig. 1 shows the localization of the dialysis membrane in the neostriatum and nucleus accumbens of the animals submitted to intranasal or subcutaneous administration of TE. In the animals submitted to intranasal administration, the basal levels of dopamine and serotonin per sample were 412.76 ± 26.36 pg and 60.12 ± 2.09 pg in the neostriatum and, 175.28 ± 22.05 pg and 91.81 ± 14.13 pg in the nucleus accumbens, respectively (mean±SEM, $n=28$). In the animals submitted to subcutaneous administration, the basal levels of dopamine and serotonin per sample were 445.63 ± 38.21 pg and 56.38 ± 3.41 pg in the neostriatum and, 148.27 ± 19.36 pg and 114.17 ± 15.42 pg in the nucleus accumbens, respectively. Basal values of dopamine and serotonin did not differ between groups ($p>0.05$, one-way ANOVAs).

3.2. Neurochemical effects after intranasal administration

3.2.1. Neostriatum

Intranasal administration of TE significantly increased levels of DA and 5-HT in the neostriatum (Fig. 2). For dopamine, two-way ANOVA yielded a main effect of TIME ($F_{13,312}=12.270$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,24}=8.484$, $p=0.001$) and a TIME×GROUP interaction ($F_{39,312}=6.715$, $p<0.001$). Post hoc tests indicated that only the highest dose (2.0 mg/kg) significantly increased levels of DA in comparison to VE ($p=0.001$). One-way ANOVAs, followed by post hoc tests, showed that the increase in DA levels was significant in the first sample after injection ($p=0.008$), and from the 5th to 10th samples ($p\leq 0.01$). For serotonin, two-way ANOVA yielded a main effect of TIME ($F_{13,312}=9.636$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,24}=5.180$, $p=0.001$) and a TIME×GROUP interaction ($F_{39,312}=3.230$, $p<0.001$). Post hoc tests indicated that

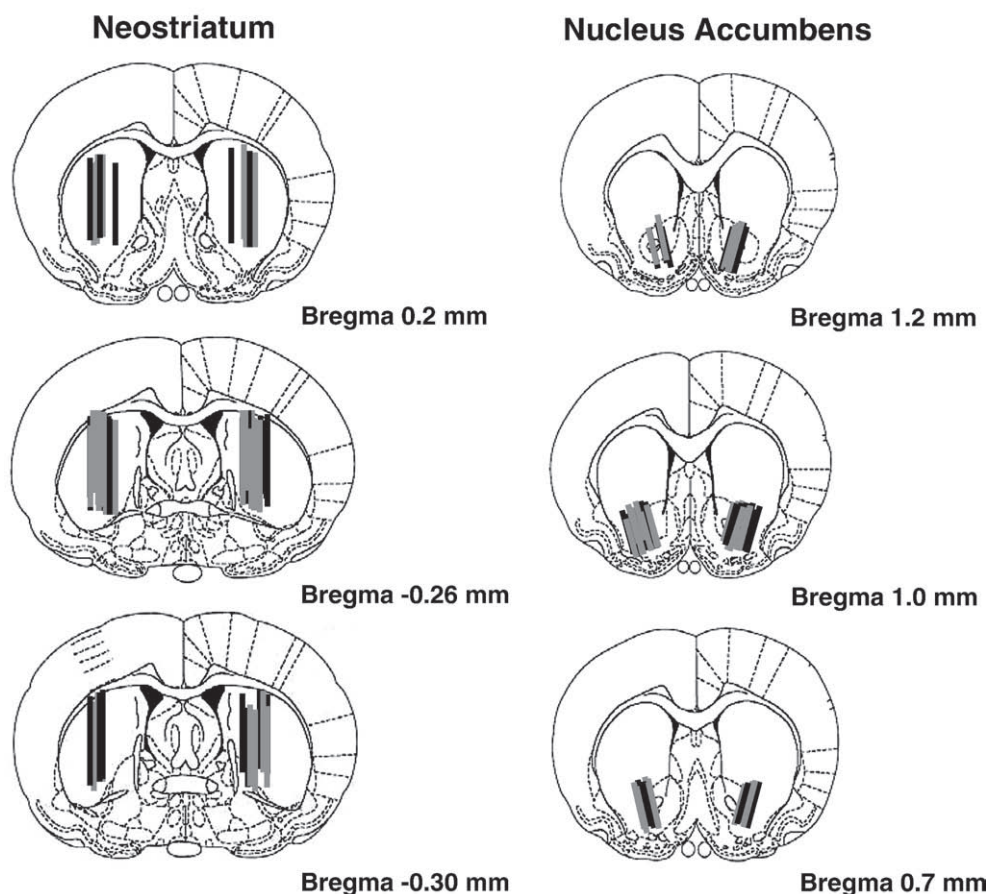


Figure 1 Schematic representation of the placement of the dialysis probes in the neostriatum and nucleus accumbens. The black bars represent the localization of the dialysis membranes for the animals that received intranasal administration of testosterone, and the gray, for the ones that received subcutaneous administration of testosterone. Plates adapted from the atlas of Paxinos and Watson (1986).

only the dose of 1.0 mg/kg significantly increased levels of 5-HT in comparison to VE ($p=0.003$). One-way ANOVAs, followed by post hoc tests, showed that the increase in DA levels was significant in the 2nd to 6th samples after injection ($ps \leq 0.023$), and from the 8th to 10th samples ($ps \leq 0.038$).

3.2.2. Nucleus accumbens

Intranasal administration of TE significantly increased levels of DA and 5-HT in the nucleus accumbens (Fig. 3). For DA, two-way ANOVA yielded a main effect of TIME ($F_{13,312}=8.342$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,24}=3.746$, $p=0.024$) and a TIME×GROUP interaction ($F_{39,312}=3.319$, $p<0.001$). Post hoc tests indicated that the 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg doses significantly increased levels of DA in comparison to VE ($p=0.014$ and $0=0.047$, respectively). After the treatment with 1.0 mg/kg of TE the increase in DA levels was significant in the 2nd to 6th samples and the 8th sample ($ps \leq 0.029$, one-way ANOVAs followed by Dunnett). After the treatment with 2.0 mg/kg of TE the increase in DA levels was significant in the 1st to 4th samples and the 6th sample ($ps \leq 0.037$, one-way ANOVAs, followed by Dunnett). For 5-HT, two-way ANOVA yielded a main effect of TIME ($F_{13,312}=15.878$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,24}=5.902$, $p=0.004$) and a TIME×GROUP interaction

($F_{39,312}=2.463$, $p<0.001$). Post hoc tests indicated that the 1.0 mg/kg and 2.0 mg/kg doses significantly increased levels of 5-HT in comparison to VE ($p=0.008$ and $0=0.002$, respectively). After the treatment with 1.0 mg/kg of TE the increase in DA levels was significant in the 8th to 10th samples ($ps \leq 0.005$, one-way ANOVAs followed by Dunnett). After the treatment with 2.0 mg/kg of TE the increase in 5-HT levels was significant in the 1st and 2nd samples and the 5th to 8th samples ($ps \leq 0.043$, one-way ANOVAs followed by Dunnett).

3.3. Neurochemical effects after subcutaneous administration

3.3.1. Neostriatum

Subcutaneous administration of TE significantly increased levels of DA and 5-HT in the neostriatum only after the highest dose of 8.0 mg/kg. For dopamine (Fig. 4), there was a main effect of TIME ($F_{13,260}=4.64$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,20}=3.882$, $p=0.024$) and a TIME×GROUP interaction ($F_{39,260}=2.897$, $p<0.001$; two-way ANOVA followed by Dunnett, $p=0.021$). The increase in DA levels was significant in the 2nd to 7th samples after injection ($ps \leq 0.037$, one-way ANOVA followed by Dun-

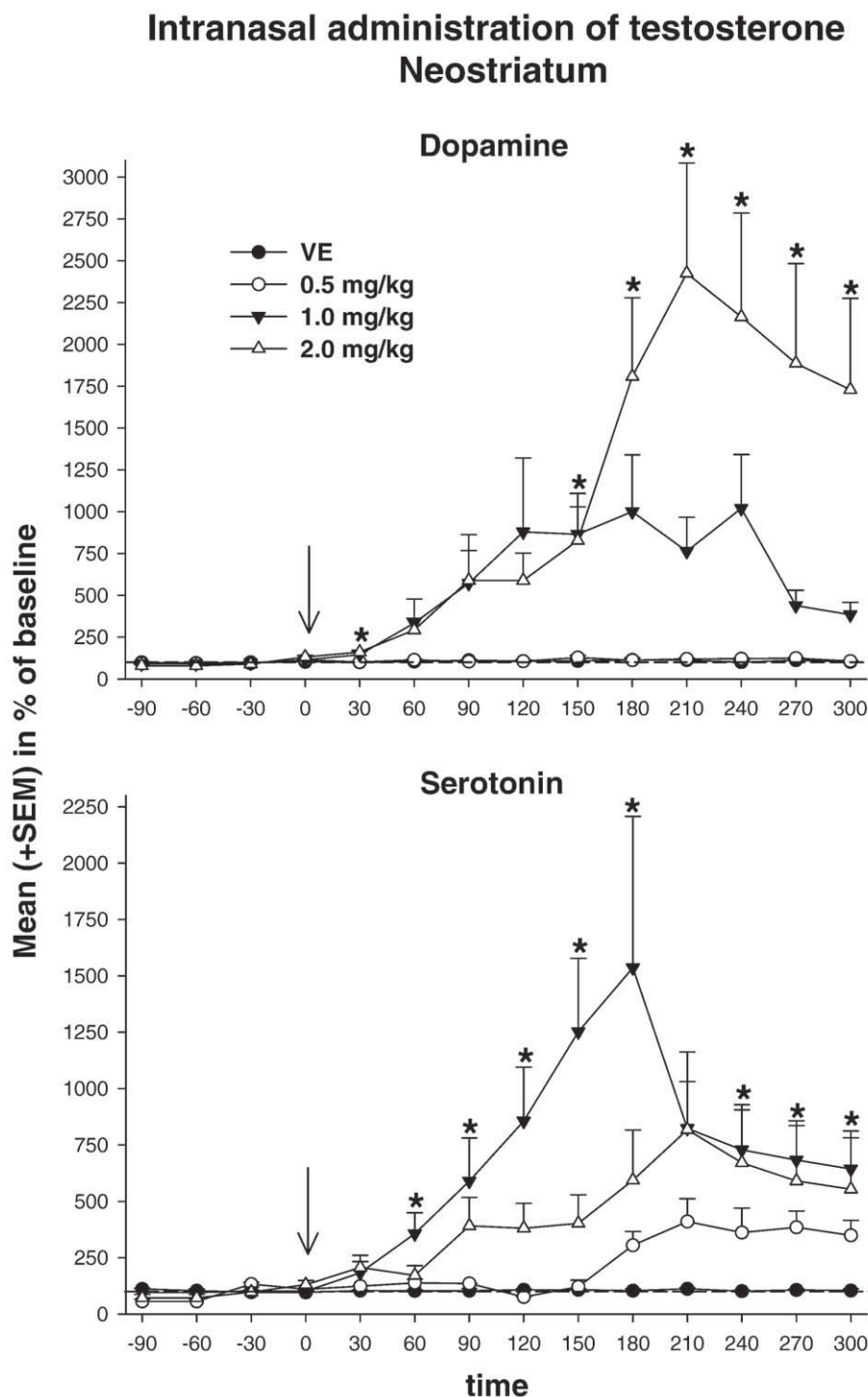


Figure 2 Effect of the intranasal administration of testosterone (0.5, 1.0 or 2.0 mg/kg) or vehicle on extracellular levels of dopamine and serotonin in the neostriatum. Values are expressed as mean (\pm SEM) percent of baseline, with the mean of the four baseline samples taken as 100%. The arrow indicates the time points of the administration. Sample sizes are $n=7$ for all the groups. * indicates a significant difference from the vehicle group, $p<0.05$, Dunnett.

net), and the 9th and 10th samples ($ps \leq 0.043$). For serotonin, there was a main effect of TIME ($F_{13,260}=8.916$, $p<0.001$), of GROUP ($F_{3,20}=5.133$, $p=0.009$) and a TIME \times GROUP interaction ($F_{39,260}=4.110$, $p<0.001$; two-way ANOVA followed by Dunnett, $p=0.021$). The increase in DA levels was significant in the 3rd to 5th samples after injection ($ps \leq 0.047$, one-way ANOVA

followed by Dunnett), and from the 7th to 10th samples ($ps \leq 0.026$).

3.3.2. Nucleus accumbens

After subcutaneous administration of TE, there was no significant increase in DA or 5-HT in the nucleus accumbens.

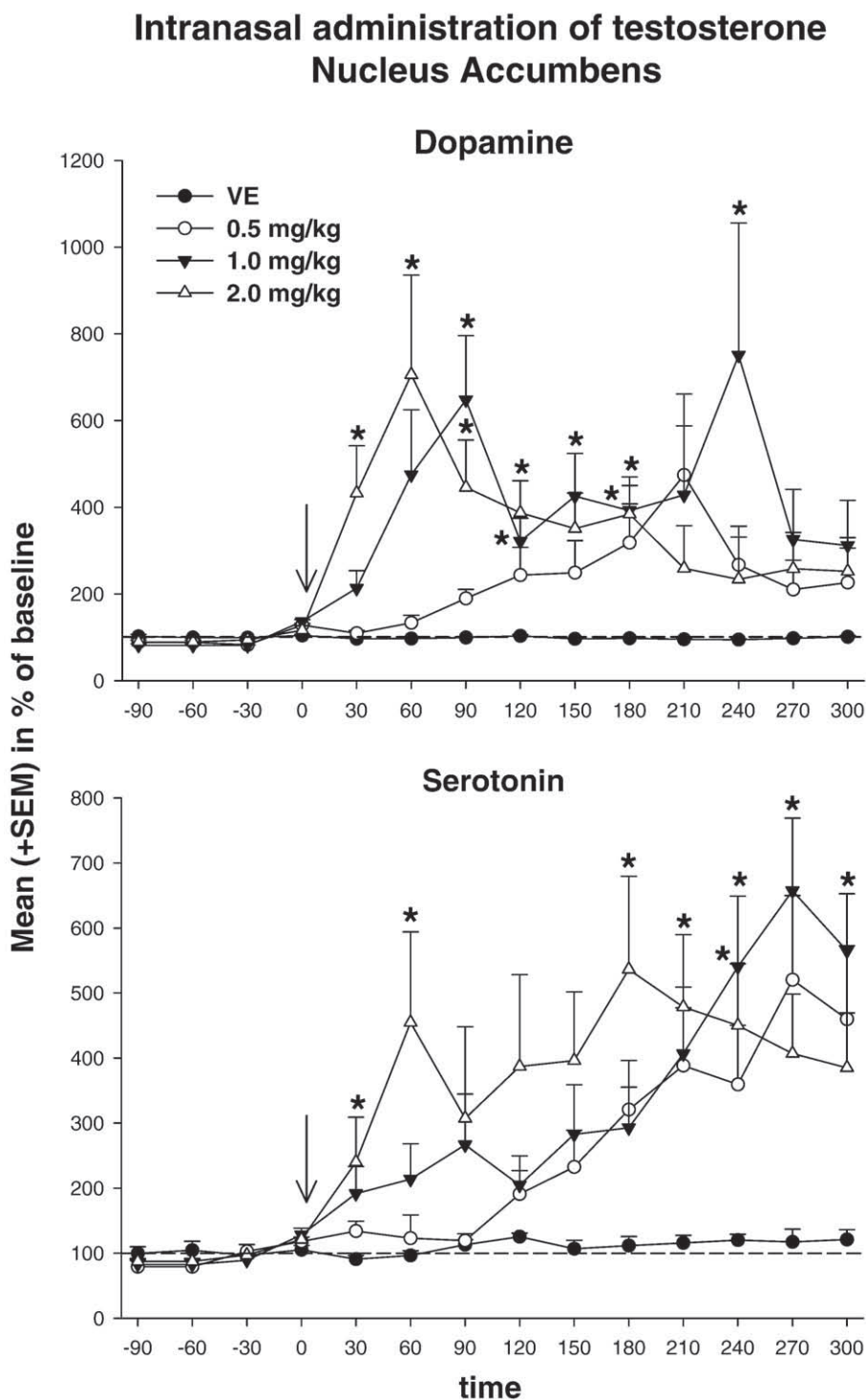


Figure 3 Effect of the subcutaneous administration of testosterone (1.0, 2.0 or 4.0 mg/kg) or vehicle on extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. Values are expressed as mean (\pm SEM) percent of baseline, with the mean of the four baseline samples taken as 100%. The arrow indicates the time points of the administration. Sample sizes are $n=7$ for all the groups. * indicates a significant difference from the vehicle group, $p<0.05$, Dunnett.

Two-way ANOVA yielded a main effect of TIME ($F_{13,360}=2.6$, $p<0.002$) for DA, but no GROUP or a TIME \times GROUP interaction ($ps>0.05$). For serotonin (Fig. 5), two-way ANOVA yielded no main effects or interaction ($ps>0.05$).

4. Discussion

The present study addressed the effects of intranasal and subcutaneous administration of TE on dopaminergic and

Subcutaneous administration of testosterone Neostriatum

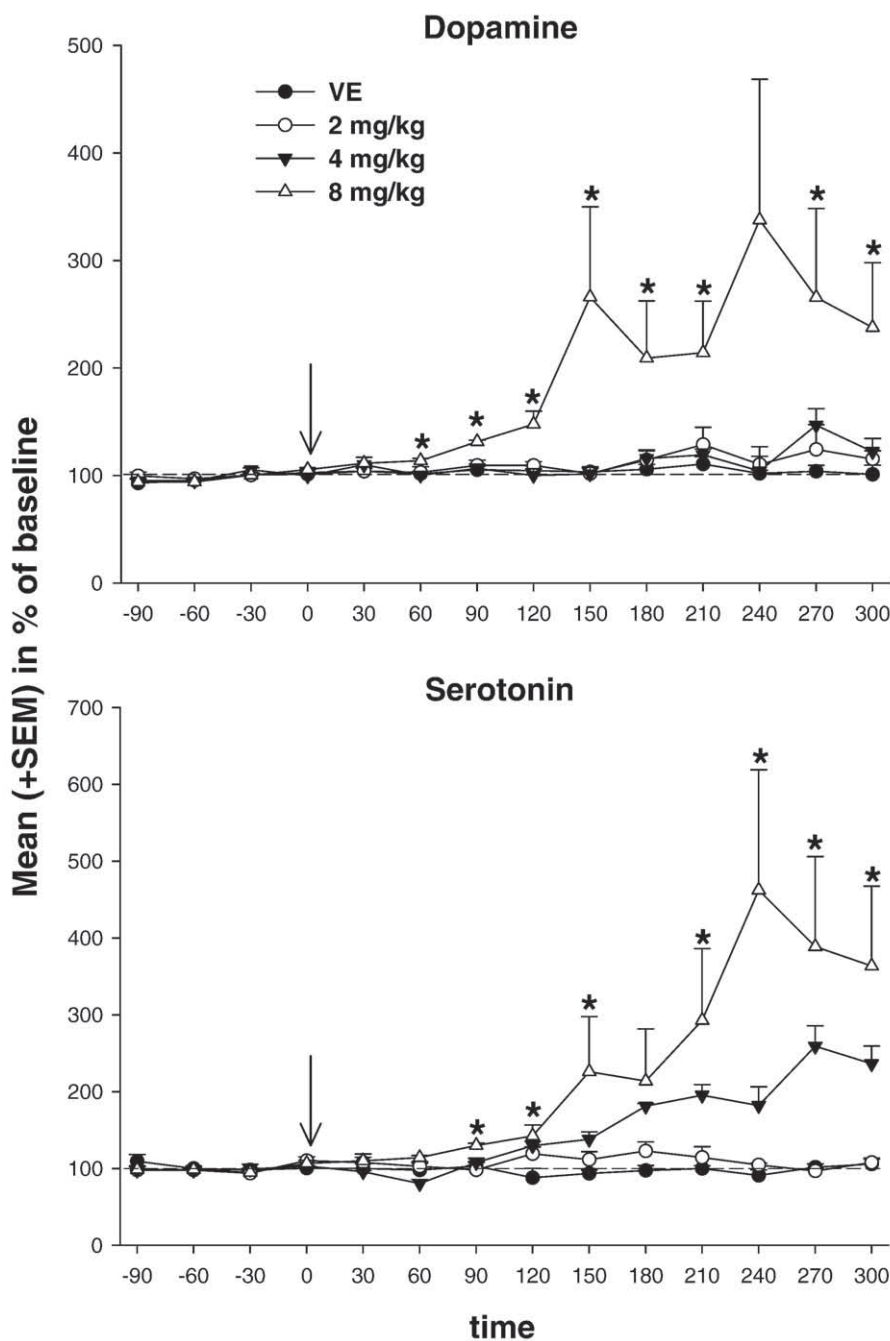


Figure 4 Effect of the subcutaneous administration of testosterone (2.0, 4.0 or 8.0 mg/kg) or vehicle on levels of dopamine and serotonin in the neostriatum. Values are expressed as mean (\pm SEM) percent of baseline, with the mean of the four baseline samples taken as 100%. The arrow indicates the time points of the administration. Sample sizes are $n=6$ for all the groups. * indicates a significant difference from the vehicle group, $p<0.05$, Dunnett.

serotonergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens of male rats. The intranasal application of 2.0 mg/kg of TE led to an immediate increase (measured in the first sample interval after the treatment) in DA levels in both the neostriatum and nucleus accumbens. In the nucleus accumbens, DA levels were also significantly increased after the 1.0 mg/kg dose, but in the

second sample after treatment. In the neostriatum, DA continued to increase progressively and remained elevated for at least 5 h (until the end of experimentation), while in the nucleus accumbens the increase was significant over the first 4 h after treatment. Serotonin also increased in the neostriatum and nucleus accumbens; while in the nucleus accumbens, both,

Subcutaneous administration of testosterone Nucleus Accumbens

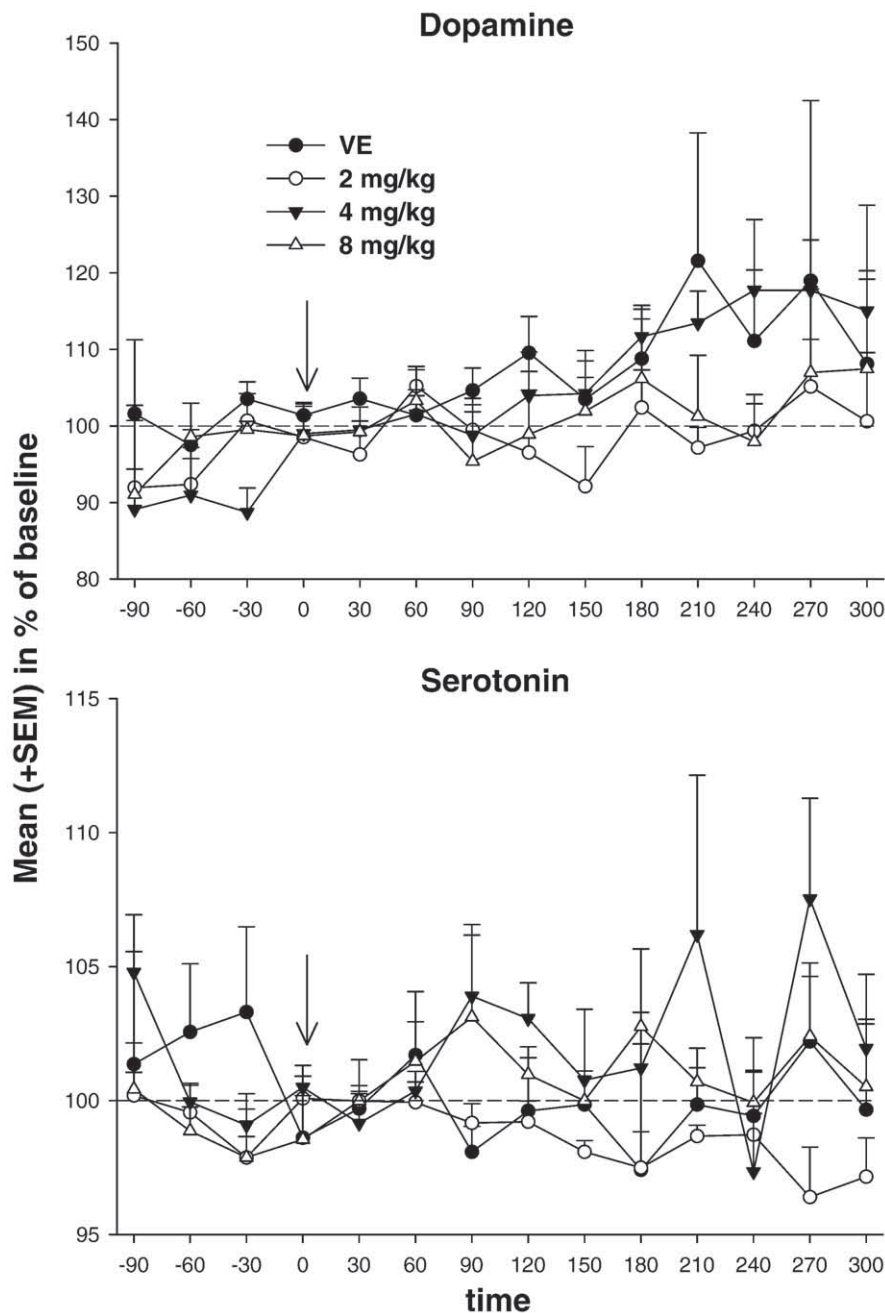


Figure 5 Effect of the subcutaneous administration of testosterone (2.0, 4.0 or 8.0 mg/kg) or vehicle on levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens. Values are expressed as mean (\pm SEM) percent of baseline, with the mean of the four baseline samples taken as 100%. The arrow indicates the time points of the administration. Sample sizes are $n=7$ and $n=16$ for the groups corresponding to intranasal and subcutaneous treatments, respectively. * indicates a significant difference from the vehicle group, $p<0.05$, Dunnett.

the 1 and 2.0 mg/kg doses increased serotonin levels, in the neostriatum the increase occurred only after the 1.0 mg/kg dose. In both brain structures, the increase in serotonin, like that of dopamine, lasted over the course of the 5 h recording period. Subcutaneous administration of TE led to a delayed gradual increase in both dopamine and serotonin only in the

neostriatum after the administration of the high dose of 8.0 mg/kg. Whether the gradual increase in neurotransmitter levels over time, and the long-lasting effects of TE application are a result of a slow rate of absorption, remains to be investigated, perhaps by comparison with effects of direct application of TE into brain areas.

Lipophilic substances, such as TE, are transported from the nasal cavity to the brain through two main mechanisms: they are rapidly and efficiently absorbed into the systemic blood stream across the nasal membrane via the transcellular pathway, and from the blood stream diffuse freely through the blood–brain barrier into the central nervous system (Banks, 2008); or, they can also reach the brain through a direct nose–brain transport (Costantino et al., 2007; Illum, 2004). According to Illum (2004), lipophilic substances do not normally show direct nose–brain transport, although this might be dependent on the site of deposition in the nasal cavity. It is possible that molecules are transported directly from the nose to the brain through (a) the olfactory epithelial pathways (across the sustentacular cells, through tight junctions between sustentacular cells, or clefts between sustentacular cells and olfactory neurons), (b) the olfactory nerve pathway, or through (c) the trigeminal nerve pathway (Graff and Pollack, 2005; Illum, 2004, 2007; Thorne et al., 2004).

Only a few studies have investigated the effect of a different route of TE administration on bioavailability. Both TE and an aqueous-soluble pro-drug of TE, testosterone 17 β -N,N-dimethylglycinate hydrochloride, had similar concentrations in the plasma after intravenous and intranasal administration, with a bioavailability of 90–100% for TE, while the intraduodenal administration provided a much lower bioavailability of 1% (Hussain et al., 1984, 2002). Therefore, even if the existence of a nasal metabolic barrier should be taken into account when considering the intranasal route (Minn et al., 2002), this metabolism seems to be much smaller, and the advantages of the intranasal route of administration seems to be that it is a non-invasive method of administration, and provides the possibility of avoiding the first-pass metabolism in the digestive system and liver, thus, resulting in a higher bioavailability of TE. Besides, there is evidence for a direct transport route from the nasal cavity into the CSF for another lipophilic neuro–hormone, estradiol, which has been shown to be transported into CSF via olfactory neurons (Wang et al., 2006). The therapeutic dose of estradiol for hormone replacement therapy was much smaller when the intranasal route was used, thereby avoiding undesired side effects (Mattsson et al., 2000).

Several previous studies have indicated that TE can influence dopaminergic neurotransmission in the brain. Acute intracerebroventricular (ICV) injection of TE induced c-Fos expression in several brain structures, including the ventral tegmental area (DiMeo and Wood, 2006). Both, systemic and intra-accumbal injection of TE induced conditioned place preference (Alexander et al., 1994; Packard et al., 1997), an effect that was blocked by DA antagonists (Packard et al., 1998; Schroeder and Packard, 2000). Our results are in agreement with the indications of an increased DA neurotransmission induced by TE, since, both, subcutaneous and intranasal TE administration, increased DA levels in the neostriatum, and intranasal administration was effective in increasing DA levels in the nucleus accumbens. A recent study reported that neither subcutaneous (7.5 and 37.5 mg/kg) nor ICV injection of TE (40 or 80 μ g given in 1 or 2 μ g injections every 6 min over a period of 4 h) increased accumbal levels of DA, and the higher dose, given ICV (80 μ g), decreased levels of accumbal DA (Triemstra et al., 2008). Our results are partially in agreement with these

findings: in the present study, subcutaneous TE administration, at similar doses, did not influence DA levels in the nucleus accumbens. However, according to the data obtained in our study, we would have expected ICV administration of TE also to increase DA levels in the accumbens. Several explanations are possible for this discrepancy. First of all, the total dose administered by Triemstra et al. (2008) was lower than our effective dose; and they administered TE in smaller amounts spread over 1 h. Furthermore, administration by ICV would result in a spread of TE throughout the brain, whereas the intranasal route might have activated different brain areas altogether. Another difference pertains to the region of the nucleus accumbens dialyzed: Triemstra et al. (2008) placed the dialysis probes into the shell sub-region of the nucleus accumbens, while in our study the probes were placed in the nucleus accumbens as a whole involving also the core sub-region. The nucleus accumbens core is extensively connected with motor structures, such as the dorsal prefrontal cortex, dorsolateral area of the ventral pallidum and substantia nigra. The nucleus accumbens shell is interconnected with limbic structures, such as the ventral prefrontal cortex, medial ventral pallidum, amygdala and the ventral tegmental area. These are referred to as the “motor” and “limbic” subcircuits, respectively, since they seem to subserve distinct functions (Deutch and Cameron, 1992; Groenewegen et al., 1996; Zahm and Brog, 1992).

Little is known about the effects of TE on serotonergic neurotransmission and its relation to mood disorders. There is evidence that TE increases the availability of the serotonin precursor tryptophan in women (Giltay et al., 2008). Also, ICV TE administration increased the firing rate of dorsal raphe 5-HT neurons in both male and female rats (Robichaud and Debonnel, 2005). Such an action of TE on serotonergic activity could be the basis for the results obtained in our study.

The age- and disease-related decline of TE levels in man (hypogonadism) is characterized by abnormally low serum TE levels associated with symptoms, such as sexual dysfunction, mood disturbance, decreased muscle mass and strength, and decreased bone mineral density (Nieschlag et al., 2004; Nieschlag, 2006). By restoring serum TE levels to the normal range using replacement therapy, many of these symptoms can be relieved (Howell and Shalet, 2001). TE seems to be an important modulator of brain functions involving spatial recognition, and age-related declines in cognition and mood. TE replacement therapy appears to improve spatial cognition in younger and older hypogonadal men. Reduced TE is also associated with depressive disorders, and TE supplementation in hypogonadal men of all ages seems to improve many aspects of mood and cognition (Hogervorst et al., 2005; Zitzmann, 2006). In Alzheimer's patients, there are lower levels of neurosteroids in different brain regions, and neurosteroid levels are inversely related to phosphorylated tau protein and the beta-amyloid peptides, two biochemical markers of Alzheimer's disease (Rosario and Pike, 2008; Schumacher et al., 2003). Recent data suggest that the regulatory actions of androgens, particularly of TE, on the development of Alzheimer's disease, speak in favor of HRT for the prevention and treatment of Alzheimer's disease (Rosario and Pike, 2008).

Evidence suggests that an age-related decline in androgen levels in women is also related to physical and emotional

disorders (Davis and Tran, 2001; Margo and Winn, 2006; Morley, 2003). A decline in TE levels may be associated with lower sexual desire in women (Meston and Frohlich, 2001). Intranasally administered TE has been shown to enhance sexual behavior in female capuchin monkeys, an effect that was accompanied by increased levels of plasma TE (Tavares et al., 2007; Topic et al., 2007). Intranasal TE administration to middle-aged women increased amygdala reactivity, a brain structure functionally involved in emotionality (van Wingen et al., in press).

When targeting the brain, the intranasal route of administration has received increasing attention in recent years as an alternative to applying therapeutical substances. Previously, we have demonstrated that intranasally applied progesterone (de Souza Silva et al., in press) and dopaminergic substances, including dopamine, can modulate dopaminergic activity in the brain along with various behavioral parameters (Buddenberg et al., 2008; de Souza Silva et al., 1997a,b, 2008). Here we present evidence that TE can effectively increase dopaminergic and serotonergic activity in the brain when given into the nasal cavity, an effect that was seen only partially, and at higher doses, when TE was given subcutaneously. These findings implicate the nasal route of TE administration as a more efficient one for targeting the brain, in comparison to its systemic administration. They also suggest that the intranasal route should be considered when using TE therapeutically, for example as neuroprotective and for hormonal replacement therapy (Rosario and Pike, 2008; Schumacher et al., 2003; Zitzmann, 2006). The unexpectedly long-lasting effects of single doses of TE in our study indicate that TE replacement could be considered for the treatment of conditions characterized by low serotonergic activity in the brain, such as the case in depression, as well as for conditions with low dopaminergic activity, such as Parkinsons' disease. The mechanisms of action of TE on neuronal dopamine and serotonin are unknown and deserve to be investigated. In any case, the profound action of TE on these transmitter systems, and the high probability that other, related biochemical cascades are influenced concomitantly, must be taken into consideration when interpreting the various known behavioural and therapeutic effects of TE.

Role of the funding source

This experiment was funded by the University of Düsseldorf. Funding source had no role in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript and in the decision to submit the paper for publication.

Contributors

Authors JPH, MASS and CM designed the study and wrote the manuscript. MASS, TEB and BT participated in the collection, analysis and interpretation of data. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflict of interest

CM is employed by M et P Pharma AG. All other authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Alexander, G.M., Packard, M.G., Hines, M., 1994. Testosterone has rewarding affective properties in male rats: implications for the biological basis of sexual motivation. *Behav. Neurosci.* 108, 424–428.
- Banks, W.A., 2008. The blood–brain barrier: connecting the gut and the brain. *Reg. Pept.* 149, 11–14.
- Boix, F., Sandor, P., Nogueira, P.J., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 1995. Relationship between dopamine release in nucleus accumbens and place preference induced by substance P injected into the nucleus basalis magnocellularis region. *Neuroscience* 64, 1045–1055.
- Buddenberg, T.E., Topic, B., Mahlberg, E.D., de Souza Silva, M.A., Huston, J.P., Mattern, C., 2008. Behavioral actions of intranasal application of dopamine: effects on forced swimming, elevated plus-maze and open field parameters. *Neuropsychobiology* 57, 70–79.
- Chen, N.H., Reith, M.E.A., 1994. Autoregulation and monoamine interactions in the ventral tegmental area in the absence and presence of cocaine: a microdialysis study in freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 271, 1597–1610.
- Costantino, H.R., Illum, L., Brandt, G., Johnson, P.H., Quay, S.C., 2007. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int. J. Pharm.* 337, 1–24.
- Cunningham, G.R., 2006. Testosterone replacement therapy for late-onset hypogonadism. *Nat. Clin. Pract. Urol.* 3, 260–267.
- Davis, S.R., Tran, J., 2001. Testosterone influences libido and well being in women. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 33–37.
- de Souza Silva, M.A., Mattern, C., Hacker, R., Nogueira, P.J., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 1997a. Intranasal administration of the dopaminergic agonists L-DOPA, amphetamine, and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: a microdialysis study in the rat. *J. Neurochem.* 68, 233–239.
- de Souza Silva, M.A., Mattern, C., Hacker, R., Tomaz, C., Huston, J.P., Schwarting, R.K., 1997b. Increased neostriatal dopamine activity after intraperitoneal or intranasal administration of L-DOPA: on the role of benserazide pretreatment. *Synapse* 27, 294–302.
- de Souza Silva, M.A., Topic, B., Lamounier-Zepter, V., Huston, J.P., Tomaz, C., Barros, M., 2007. Evidence for hemispheric specialization in the marmoset (*Callithrix penicillata*) based on lateralization of behavioral/neurochemical correlations. *Brain Res. Bull.* 74, 416–428.
- de Souza Silva, M.A., Topic, B., Huston, J.P., Mattern, C., 2008. Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse* 62, 176–184.
- de Souza Silva M.A., Huston J.P., Topic B., and Mattern C., in press. Intranasal administration of progesterone increases dopaminergic activity in amygdala and neostriatum of male rats. *Neuroscience*.
- Deutch, A.Y., Cameron, D.S., 1992. Pharmacological characterization of dopamine Deutch A.Y. and Camersystems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience* 46, 49–56.
- DiMeo, A.N., Wood, R.I., 2006. ICV testosterone induces Fos in male Syrian hamster brain. *Psychoneuroendocrinology* 31, 237–249.
- Giltay, E.J., Bunck, M.C., Gooren, L.J., Zitman, F.G., Diamant, M., Teerlink, T., 2008. Effects of sex steroids on the neurotransmitter-specific aromatic amino acids phenylalanine, tyrosine, and tryptophan in transsexual subjects. *Neuroendocrinology* 88, 103–110.
- Gold, S.M., Voskuhl, R.R., 2006. Testosterone replacement therapy for the treatment of neurological and neuropsychiatric disorders. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 7, 625–630.
- Graff, C.L., Pollack, G.M., 2005. Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. *J. Pharm. Sci.* 94, 1187–1195.
- Groenewegen, H.J., Wright, C.I., Beijer, A.V., 1996. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog. Brain Res.* 107, 485–511.

- Hogervorst, E., Bandelow, S., Moffat, S.D., 2005. Increasing testosterone levels and effects on cognitive functions in elderly men and women: a review. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 4, 531–540.
- Howell, S., Shalet, S., 2001. Testosterone deficiency and replacement. *Horm. Res.* 56 (Suppl 1), 86–92.
- Hussain, A.A., Kimura, R., Huang, C.H., 1984. Nasal absorption of testosterone in rats. *J. Pharm. Sci.* 73, 1300–1301.
- Hussain, A.A., Al Bayatti, A.A., Dakkuri, A., Okochi, K., Hussain, M.A., 2002. Testosterone 17beta-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride: a prodrug with a potential for nasal delivery of testosterone. *J. Pharm. Sci.* 91, 785–789.
- Illum, L., 2004. Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J. Pharm. Pharmacol.* 56, 3–17.
- Illum, L., 2007. Nanoparticulate systems for nasal delivery of drugs: a real improvement over simple systems? *J. Pharm. Sci.* 96, 473–483.
- Margo, K., Winn, R., 2006. Testosterone treatments: why, when, and how? *Am. Fam. Phys.* 73, 1591–1598.
- Martinez-Conde, E., Leret, M.L., Diaz, S., 1985. The influence of testosterone in the brain of the male rat on levels of serotonin (5-HT) and hydroxyindole-acetic acid (5-HIAA). *Comp. Biochem. Physiol.*, C 80, 411–414.
- Martini, L., Celotti, F., Melcangi, R.C., 1996. Testosterone and progesterone metabolism in the central nervous system: cellular localization and mechanism of control of the enzymes involved. *Cell. Mol. Neurobiol.* 16, 271–282.
- Mattsson, L.A., Christiansen, C., Colau, J.C., Palacios, S., Kenemans, P., Bergeron, C., Chevallier, O., Von Holst, T., Gangar, K., 2000. Clinical equivalence of intranasal and oral 17beta-estradiol for postmenopausal symptoms. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 182, 545–552.
- Meston, C.M., Frohlich, P.F., 2001. Update on female sexual function. *Curr. Opin. Urol.* 11, 603–609.
- Minn, A., Leclerc, S., Heydel, J.M., Minn, A.L., Denizcot, C., Cattarelli, M., Netter, P., Gradinaru, D., 2002. Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *J. Drug Target.* 10, 285–296.
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., Murakami, G., Hojo, Y., Ishii, H., Kimoto, T., Kawato, S., 2006. Local neurosteroid production in the hippocampus: influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology* 84 (4), 255–263.
- Morley, J.E., 2003. Testosterone and behavior. *Clin. Geriatr. Med.* 19, 605–616.
- Nieschlag, E., 2006. Testosterone treatment comes of age: new options for hypogonadal men. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 65, 275–281.
- Nieschlag, E., Behre, H.M., Bouchard, P., Corrales, J.J., Jones, T.H., Stalla, G.K., Webb, S.M., Wu, F.C., 2004. Testosterone replacement therapy: current trends and future directions. *Hum. Reprod. Updat.* 10, 409–419.
- Packard, M.G., Cornell, A.H., Alexander, G.M., 1997. Rewarding affective properties of intra-nucleus accumbens injections of testosterone. *Behav. Neurosci.* 111, 219–224.
- Packard, M.G., Schroeder, J.P., Alexander, G.M., 1998. Expression of testosterone conditioned place preference is blocked by peripheral or intra-accumbens injection of alpha-flupentixol. *Horm. Behav.* 34, 39–47.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The Rat Brain in Stereotactic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Robichaud, M., Debonnel, G., 2005. Oestrogen and testosterone modulate the firing activity of dorsal raphe nucleus serotonergic neurones in both male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 17, 179–185.
- Rommerts, F.F.G., 2004. Testosterone: an overview of biosynthesis, transport, metabolism and non-genomic actions. In: Nieschlag, E., Behre, H.M. (Eds.), *Testosterone: Action, deficiency and substitution*, pp. 1–37.
- Rosario, E.R., Pike, C.J., 2008. Androgen regulation of beta-amyloid protein and the risk of Alzheimer's disease. *Brain Res. Rev.* 57, 444–453.
- Schroeder, J.P., Packard, M.G., 2000. Role of dopamine receptor subtypes in the acquisition of a testosterone conditioned place preference in rats. *Neurosci. Lett.* 282, 17–20.
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., et al., 2003. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 71, 3–29.
- Shemisa, K., Kunnathur, V., Liu, B., Salvaterra, T.J., Dluzen, D.E., 2006. Testosterone modulation of striatal dopamine output in orchidectomized mice. *Synapse* 60, 347–353.
- Stoffel-Wagner, B., 2001. Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 669–679.
- Stoffel-Wagner, B., 2003. Neurosteroid biosynthesis in the human brain and its clinical implications. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1007, 64–78.
- Sundblad, C., Eriksson, E., 1997. Reduced extracellular levels of serotonin in the amygdala of androgenized female rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 7, 253–259.
- Tavares, M.C., Topic, B., Abreu, C., Waga, I., Gomes, U., Tomaz, C., Mattern, C., 2007. Effects of intra-nasally administered testosterone on sexual proceptive behavior in female capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Behav. Brain Res.* 179, 33–42.
- Thorne, R.G., Pronk, G.J., Padmanabhan, V., Frey, W.H., 2004. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* 127, 481–496.
- Topic, B., Tavares, M.C., Tomaz, C., Mattern, C., 2007. Prolonged effects of intra-nasally administered testosterone on proceptive behavior in female capuchin monkeys (*Cebus apella*). *Behav. Brain. Res.* 179, 60–68.
- Triemstra, J.L., Sato, S.M., Wood, R.I., 2008. Testosterone and nucleus accumbens dopamine in the male Syrian hamster. *Psychoneuroendocrinology* 33, 386–394.
- Tsutsui, K., Matsunaga, M., Miyabara, H., Ukena, K., 2006. Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 305 (9), 733–742.
- van Wingen G.A., Zyllicz S.A., Pieters S., Mattern C., Verkes R.J., Buitelaar J.K., Fernandez G., in press. Testosterone Increases Amygdala Reactivity in Middle-Aged Women to a Young Adulthood Level. *Neuropsychopharmacology*.
- Wang, X., He, H., Leng, W., Tang, X., 2006. Evaluation of brain-targeting for the nasal delivery of estradiol by the microdialysis method. *Int. J. Pharm.* 317, 40–46.
- Zahm, D.S., Brog, J.S., 1992. On the significance of subterritories in the "accumbens" part of the rat ventral striatum. *Neuroscience* 50, 751–767.
- Zhang, L., Ma, W., Barker, J.L., Rubinow, D.R., 1999. Sex differences in expression of serotonin receptors (subtypes 1A and 2A) in rat brain: a possible role of testosterone. *Neuroscience* 94, 251–259.
- Zitzmann, M., 2006. Testosterone and the brain. *Aging Male* 9, 195–199.

Behavioral Actions of Intranasal Application of Dopamine: Effects on Forced Swimming, Elevated Plus-Maze and Open Field Parameters

Tim E. Buddenberg^a Bianca Topic^a E. Demetris Mahlberg^a
Maria A. de Souza Silva^a Joseph P. Huston^a Claudia Mattern^b

^aInstitute of Physiological Psychology, University of Düsseldorf, Düsseldorf, Germany;

^bMattern Pharmaceuticals AG, Stans, Switzerland

Key Words

Nose-brain pathway · Depression · Emotionality ·
Mesolimbic and nigrostriatal dopamine system ·
Exploration

Abstract

Background: Recently, we found evidence that intra-nasally administered dopamine (DA), can enter the brain, leading to an immediate increase in extracellular DA levels in striatal subregions. This offers a potential alternative approach to target the brain with exogenous DA, which otherwise cannot cross the blood-brain barrier. Here, we examined whether intra-nasally applied DA also exerts behavioral activity on mesocortical and nigrostriatal dopaminergic functions. **Method:** Male Wistar rats (3–4 months) were tested for potential behavioral effects of intra-nasally applied DA (0.03, 0.3 or 3.0 mg/kg) in the forced swimming test (FST) for antidepressant-like activity, elevated plus-maze for anxiety-related behavior, and on motor activity in a novel and familiar environment. **Results:** Intra-nasally administered dopamine in a dose of 0.3 mg/kg exerted antidepressant-like activity in the FST, but had neither anxiolytic-like nor anxiogenic-like effects in the elevated plus-maze. Furthermore, intra-nasal dopamine stimulated locomotor activity in a familiar, but not novel, open field. **Conclusions:** These results support the view that intra-nasally applied DA can act on the central nervous system by entering the brain via the nose-brain

pathway, making this kind of application procedure a promising alternative for targeting the brain, and thus treating disorders involving mesocortical and/or nigrostriatal dopaminergic disturbances.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

The delivery of centrally acting substances to the brain is sometimes limited due to the restrictions of the blood-brain barrier. Intra-nasal drug administration has been considered as a potential alternative route of drug delivery to target the brain by circumventing the blood-brain barrier via the olfactory route. This is thought especially applicable to substances with a high molecular weight, or which are hydrophilic, and thus cannot cross the barrier [1, 2]. Via the nasal route, drugs can be rapidly absorbed through the nasal mucosa, resulting in rapid onset of action and also avoiding degradation in the gastrointestinal tract and first-pass metabolism in the liver, thereby also potentially decreasing the incidence of side effects [3, 4]. The olfactory receptor cells are in direct contact with both the environment and the central nervous system. Thus, targeting the brain via nasal administration offers potential for the development of novel therapeutic approaches. Delivery to the brain of molecules via the nose-brain pathway has been demonstrated for nerve growth

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
0302-282X/08/0572-0070\$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/nps

Joseph P. Huston, PhD
Institute of Physiological Psychology, University of Düsseldorf
Universitätsstrasse 1
DE-40225 Düsseldorf (Germany)
Tel. +49 211 81 14296, Fax +49 211 81 12024, E-Mail huston@uni-duesseldorf.de

factor, insulin, cholecystokinin or insulin-like growth factor 1 [5–7]. Human studies also indicate that some nasally administered drugs are superior in mediating central effects compared to intravenous injection [8, 9].

We have demonstrated that intra-nasal administration of L-DOPA (L-3,4-dioxyphenylalanine), the mainstay of therapies in dopamine (DA) deficiencies, such as Parkinson's disease, led to an increase in extracellular levels of DA and its metabolites in neostriatal regions [10, 11]. Administration of DA via oral or parenteral delivery is limited due to poor absorption, rapid metabolism in the periphery and the inability of DA to cross the blood-brain barrier, which rules out its application by the conventional oral, intravenous, intramuscular or subcutaneous routes. However, we have shown previously [12] that intra-nasal application of dopamine, dissolved in a viscous oil mixture, leads to pronounced immediate increases of DA in striatal subregions, whereas intraperitoneal injection of the same dose is without effect. This supports the view that DA can readily enter the brain via the nose-brain pathway. With respect to this, Dahlin et al. [13, 14] compared intra-nasal to intravenous DA injection and reported an enhanced DA bioavailability in the brain upon intra-nasal administration of DA in mice and rats. Furthermore, Chemuturi et al. [15] demonstrated that portions of the nasal mucosa are innervated by olfactory neurons expressing dopamine transporter (DAT), which may be responsible for the uptake of DA within the central nervous system. Several pathways for the transport of substances from the nose to the brain have been suggested to circumvent the BBB, such as the slow olfactory nerve pathway (axonal transport pathway) or the fast olfactory epithelial pathway, where substance absorption takes place either by transcellular or paracellular mechanisms across the olfactory sustentacular epithelial cells [for review, see 1, 16].

The behavioral effects of intra-nasal application of DA have not been investigated. In a first attempt, we aimed to examine whether the neurochemical action of intranasally applied DA is paralleled by behavioral effects of dopamine applied via this route. The mesocorticolimbic DA system projects from the ventral tegmental area of the midbrain to the nucleus accumbens and plays a critical role in the control of reward and motivation, mechanisms which are disrupted in depression [17–21]. Previous studies have shown a reduced level of the DA metabolite homovanillic acid in the cerebrospinal fluid in depressed patients [22–24]. Furthermore, D2 or mixed D2/D3 receptor agonists exert antidepressant-like effects in diverse depression models [25, 26] and appear to be effective

in treatment-resistant depressed patients [27–29]. Levels of DA declined in the nucleus accumbens after exposure to the forced swimming test (FST) [30]. These lines of evidence suggest that DA may have potential antidepressant-like effects. Thus, we decided to investigate potential beneficial effects of intra-nasal DA application on depressive-like behavior in the FST, a widely held screening paradigm for assessing antidepressant-like activity of applied substances [31–33]. Clinically, depression is often comorbid with anxiety [34–36] and the mesocortical dopamine system (especially the prefrontal cortex) as well as several dopamine receptor subtypes have been implicated in anxiety-related behavior in diverse experimental animal models of anxiety [37–40]. Thus, potential effects of dopamine following intra-nasal application on anxiety parameters were also assessed using the elevated plus-maze.

Besides the mesocorticolimbic dopaminergic system and its prominent role in affective states, disruptions of the dopaminergic system originating from the substantia nigra with projections to the basal ganglia (nigrostriatal dopaminergic system) result in deficits of motor functions, which are often co-morbid with or preceded by depressive disorders [41, 42], and which are also key symptoms in neurodegenerative neurological diseases, such as Parkinson's or Huntington's disease. Since we found an enhanced extracellular release of DA in the striatum upon intra-nasal application of DA [12], we expected also to find psychostimulant effects of such application. Given that experimental conditions represent an important factor in determining the effects of substances on motor activity [43, 44], and since habituation to test procedure was found to modulate the involvement of DA in locomotor stimulation [45, 46], we examined the influence of intra-nasal DA on open field activity in both novel and familiar environments.

Materials and Methods

Animals

In total, 136 male, 3–4 month-old Wistar rats (weight: 335.9 ± 27.4 g SEM; Tierversuchsanlage, University of Düsseldorf) were used. All animals were housed in standard Macrolon cages (Type IV) in groups of 5 each, and maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on: 7:00 p.m.) in a temperature- (21°C) and humidity-controlled colony. Behavioral studies were carried out between 10 a.m. and 6 p.m. The animals were given free access to food and water throughout the experiments. All animals were tail-marked and handled for 4–5 days prior to behavioral testing. The experiments were carried out in accordance with the German Animal Protection Law and approved by Bezirksregierung Düsseldorf.

Drug Treatment

Animals were randomly divided into 4 groups, receiving vehicle or dopamine hydrochloride (DA; 3-hydroxytyramine hydrochloride; Sigma-Aldrich, USA) in a dosage of either 0.03, 0.3 or 3.0 mg/kg body weight. The doses were chosen on the basis of the results of the intra-nasal effects of DA on central neurochemical parameters found in the anesthetized preparation [12]. DA was dissolved in the respective vehicle gel, consisting of a viscous galenic castor-oil formulation (DopaMat; Mattern Pharmaceuticals AG, Switzerland). Intra-nasal drug administration with a depth of about 4 mm and duration of about 2 s was carried out via micropipette for viscous media (Brand ISO 9001-14001) in a volume of 5 μ l into each nostril. The gel adheres to the mucous membrane, and thus is not significantly dislodged by respiration. If not otherwise specified, DA was applied 3 times per subject, with fresh solutions prepared on each testing day.

Forced Swimming Test

The procedure consisted of placing the rats into a Plexiglas cylinder (46 cm height \times 20 cm diameter) that had been filled with water (25°C) up to 20 \pm 2 cm from bottom. On the first day, rats were placed into the water for a 15-min period (pre-test phase). At the end of this pre-test phase, each rat was removed from the water, and placed in a plastic cage under a red light heating lamp for about 15 min to allow drying. Twenty-four hours later, the animals were exposed to the same experimental conditions, but this time for only a 5-min period (test-phase). All test sessions were recorded on video via a camera (SSC-M388CE; Sony) located to the cylinder so as to provide a front view of the whole cylinder. Applications were performed 17 h, 5 h and 15 min prior to the start of the test phase ($n = 15$ per group). Such an application scheme was shown to be useful for assessing potential antidepressant-like effects in the FST [47]. In pilot studies, rats treated with conventional antidepressants exhibited a reduction in the duration of immobility compared to vehicle-treated controls on the second exposure to the FST, in line with the vast literature.

The duration and time to first onset of *immobility* (defined as a lack of motion of the animal, except for movements required to keep its head above the water), *swimming* and *climbing* (vigorous movements with forepaws in and out of the water, usually in contact with the walls) were recorded by an experimenter blind to treatment conditions.

Open-Field Test I: Unfamiliar Environment

Since it is well known that DA has pronounced effects on locomotor activity [48–50], we examined the effects of intra-nasal DA application in the open field test with a new set of animals. Twenty-four animals were randomly divided into 3 groups, receiving either vehicle or DA (0.3 and 3.0 mg/kg). Rats received 3 applications as described for the FST and were individually placed into the center of the open field, and allowed to explore the field for 10 min. Furthermore, another 20 animals were randomly assigned into 4 groups, receiving either vehicle or DA (0.03, 0.3 or 3.0 mg/kg; $n = 5$ per group) intra-nasally and tested in the open field for a duration of 30 min, directly after intra-nasal application of the substance. The open field apparatus consisted of a grey quadratic box (60 \times 60 \times 40 cm) made of Plexiglass, which was dimly illuminated (corner: 6 lx; center: 12 lx). The rats' behavior was recorded by means of a video camera mounted 100 cm above the maze, and was analyzed post-hoc using a video tracking sys-

tem (EthoVision 3.0; Noldus, The Netherlands). Overall motor activity was quantified as the distance (measured in centimeters) travelled in the field. Furthermore, the number and duration (measured in seconds) of *rearings* (raising up on hind legs with the forelegs in the air or against the wall) and *quiescence* (defined by lack of movements of the animal) were quantified. In order to also derive some measures of emotionality [51], the distance moved, number of entries and time spent in the center (30 \times 30 cm) and periphery were analyzed post-hoc by EthoVision. The arena was cleaned with an ethanol solution between animals. A broad spectrum generator emitted noise at 60 dB.

Open-Field Test II: Familiar Environment

In order to extenuate the effect of novelty associated with behavioral testing on potential locomotor stimulatory effects of DA [46, 52], another set of animals was habituated to the test apparatus for 30 min, 24 h before treatment, which was followed by another open field exposure for 30 min. In this experiment 32 animals were randomly divided into 4 groups, receiving either vehicle or DA (0.03, 0.3 and 3.0 mg/kg). We administered the intra-nasal treatment on the test day immediately prior to placement into the open field to monitor general activity. In addition to the data for the whole 30 min exposure presented here, effects on activity were also analyzed post-hoc, by EthoVision, in 10 min intervals corresponding to the time window of the neurochemical experiment. The results of this analysis are presented in the publication by de Souza Silva et al. [12].

Elevated Plus-Maze

The elevated plus-maze consisted of 2 open (50 cm long \times 10 cm wide) and 2 walled arms (50 cm long \times 10 cm wide \times 38.5 cm high) with an open roof, arranged around a central platform (10 \times 10 cm), with the 2 arms of each type placed opposite each other. Illumination (1 and 6 lx on the closed and open arms, respectively) was provided by diffuse ceiling lighting and four 75 W bulb lights that were placed in the corners of the room away from the maze. A camera (CCD-IRIS; Sony) was mounted ca. 1.5 m above the maze.

After a washout period of 2 days, the animals from the open field test II were tested in the elevated plus-maze to assess effects of intra-nasally applied DA on anxiety-related behavior. For this purpose, rats from the open field test II were re-assigned to the treatment groups (vehicle, 0.03, 0.3 and 3.0 mg/kg) in a balanced way to rule out potential carry-over effects. DA or vehicle was acutely administered 15 min before the animals were placed onto the central platform, facing one of the open arms. The animals were allowed to explore the maze for 5 min. The following variables were measured post-hoc by EthoVision: time (in seconds) spent in the open and closed arms, number of entries into the open and closed arms (an entry was counted when the animal entered an arm with all 4 paws), time to first entry into the open and closed arms, number and duration of rearings on the closed arms, head dips on the open arms (head is lowered beneath the edge of the arm), risk assessments from the closed arms (forepaws and head exit the closed arms; often accompanied by body stretching), as well as the total distance (in centimeters) travelled and total number of entries.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Between group comparisons were done using one-way ANOVA (group as between-group factor), followed by a priori

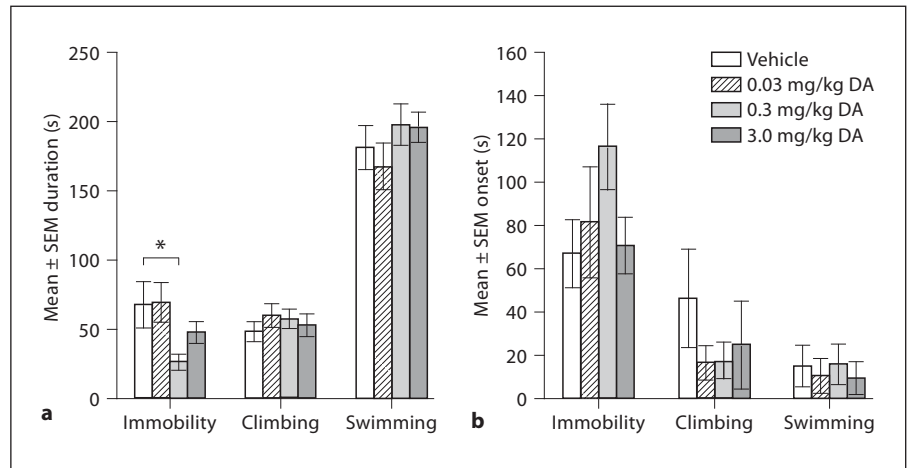


Fig. 1. Antidepressant-like activity of intra-nasally applied dopamine examined in the forced swimming test (FST). **a** Mean \pm SEM duration of immobility, climbing and swimming behaviors during the 5 min testing period in response to vehicle or intra-nasally applied dopamine (0.03, 0.3 and 3.0 mg/kg; $n = 15$ per group). The application of dopamine induced a significant decrease in the duration of immobility in the group treated with 0.30

mg/kg dopamine. **b** The mean \pm SEM time to onset of immobility, climbing and swimming behavior during the 5 min test period upon application of dopamine. Dopamine in a dosage of 0.30 mg/kg tended to induce a later onset of immobility in the FST compared to vehicle-treated controls. * $p < 0.05$, compared to vehicle-treated controls (Dunnett's test).

planned comparisons of treatment groups against the control group via post-hoc Dunnett's tests [53, 54]. For intra-group comparisons between the first 5 min of the pre-test (PRE 5) and the 5-min test-phase (test) of the FST, t tests for dependent samples were used.

If not otherwise specified, results were calculated on the basis of two-tailed statistics. The level for statistical significance was set at $p < 0.05$ (a trend was considered at $p < 0.10$).

Results

Effects of Intra-Nasal Dopamine on the Duration of Immobility in the Forced Swimming Test

One-way ANOVA revealed a significant main effect for groups ($F_{(3, 59)} = 3.103$; $p = 0.034$). Post-hoc analysis showed that, compared to the vehicle-treated control group, the group treated with 0.3 mg/kg DA exhibited a significant reduction of 60.89% in the duration of immobility ($p = 0.02$, one-tailed, fig. 1a) and a trend toward a later onset of immobility ($p = 0.095$, one-tailed; fig. 1b). All other group comparisons of behaviors in the FST failed to reach statistical significance (ANOVA: $F_{(3, 59)} \leq 1.316$; all $p \geq 0.278$).

Independently of the treatment conditions, all rats showed a decrease in the duration of immobility from the PRE-5 to the test-phase (see table 1), which reached statistical significance only in the group of animals treated with

0.3 mg/kg DA ($t_{(14)} = 4.905$; $p < 0.001$); the animals treated with 3.0 mg/kg DA showed a trend towards a decrease ($t_{(14)} = 1.868$; $p = 0.083$). Such an effect was not found for the vehicle and the 0.03 mg/kg DA-treated groups (vehicle: $t_{(14)} = 0.642$, $p = 0.531$; 0.03 mg/kg DA: $t_{(14)} = 0.949$, $p = 0.359$). On the other hand, a significant decrease in the duration of climbing behavior on the test phase compared to the PRE-5 phase was revealed for the groups treated with either vehicle, 0.03 or 3.0 mg/kg DA (vehicle: $t_{(14)} = 3.142$, $p = 0.007$; 0.03 mg/kg DA: $t_{(14)} = 2.166$, $p = 0.048$; 3.0 mg/kg DA: $t_{(14)} = 2.914$, $p = 0.011$). In contrast to the other groups, such an effect was not found for the group treated with 0.3 mg/kg DA ($t_{(14)} = 0.997$, $p = 0.196$).

Motor Activity in an Unfamiliar Open Field

Data on motor activity as well as anxiety-related parameters in the unfamiliar open field are depicted in table 2. One-way ANOVA failed to reveal a significant main group effect for the distance moved in the open field ($F_{(2, 23)} = 1.626$; $p = 0.221$). Likewise, pre-planned comparisons between treatment and vehicle groups revealed no significant differences (all $p > 0.05$, one-tailed). We also examined rearings in the open field as an index of vertical exploratory behavior. However, frequency and duration of rearing also were not significantly different between groups (one-way ANOVA: $F_{(2, 23)} \leq 1.638$, $p \geq 0.28$; post-hoc Dunnett: $p > 0.05$). Similarly, treatment

Table 1. Effects of intra-group comparisons for the duration of behavior during the first 5 min of the pre-test and the testing phase in the forced swimming test

Treatment	Immobility, s		Climbing, s		Swimming, s	
	0–5 min pre-test	test phase	0–5 min pre-test	test phase	0–5 min pre-test	test phase
Vehicle	81.15 ± 11.65	67.81 ± 17.23	69.05 ± 8.48	49.19 ± 6.32**	148.4 ± 16.16	182.03 ± 15.83
0.03 mg/kg DA	82.76 ± 15.18	70.92 ± 12.73	83.92 ± 8.05	60.15 ± 8.41*	131.99 ± 14.99	167.95 ± 17.04
0.3 mg/kg DA	76.27 ± 12.07	26.40 ± 5.94**	65.41 ± 9.02	58.31 ± 6.72	157.17 ± 11.28	198.67 ± 14.57
3.0 mg/kg DA	70.12 ± 12.47	48.36 ± 7.15	77.60 ± 6.47	53.52 ± 7.91*	151.23 ± 13.38	197.07 ± 9.90

Data are mean duration (in seconds) ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to 0–5 min pre-test, t test for dependent samples.

Table 2. Activity in an unfamiliar open field (data are mean ± SEM)

Behavior	Vehicle	Dopamine	
		0.3 mg/kg	3.0 mg/kg
Distance moved, cm	3,234 ± 348	3,051 ± 180	2,511 ± 328
Duration of rearings, s	84.20 ± 11.26	106.60 ± 14.08	84.60 ± 11.89
Number of rearings	42.13 ± 2.73	48.08 ± 2.80	38.50 ± 5.17
Duration of quiescence, s	221.85 ± 25.19	183.67 ± 31.21	222.62 ± 2.86
Number of quiescences	94.00 ± 6.46	78.75 ± 10.35	71.88 ± 7.18
Number of entries center	10.88 ± 1.88	8.75 ± 1.59	7.38 ± 2.34
Time spent in center, s	18.60 ± 4.71	18.50 ± 4.50	14.45 ± 4.62
Distance moved in center, cm	238.60 ± 73.81	161.89 ± 34.72	119.79 ± 44.44
Number of entries periphery	11.80 ± 1.88	9.75 ± 1.59	8.13 ± 2.38
Time spent in periphery, s	581.40 ± 4.71	581.50 ± 4.50	585.55 ± 4.62
Distance moved in periphery, cm	3,013.45 ± 277.52	2,889.34 ± 167.75	2,373.58 ± 289.30

groups did not differ from controls in number of bouts or duration of quiescence (one-way ANOVA: $F_{(2,23)} \leq 1.921$, $p \geq 0.171$; post-hoc Dunnett: $p > 0.05$). Thus, changes in general motor activity upon intra-nasal administration of DA in the doses of 0.3 and 3.0 mg/kg were not evident in a novel environment after sub-chronic treatment. With respect to effects on anxiety-related parameters assessed in the novel open field, no significant group differences were found (one-way ANOVA: $F_{(2,23)} \leq 1.904$, $p \geq 0.17$; post-hoc Dunnett: $p > 0.05$). The results of a second experiment, when animals were tested for 30 min directly after intra-nasal application, revealed that a single injection of intra-nasal DA also failed to exert stimulatory effects on motor activity and did not affect anxiety-like parameter in an unfamiliar environment (ANOVA: $F_{(3,19)} \leq 1.664$; all $p \geq 0.215$, data not shown).

Motor Activity in a Familiar Open Field

The group treated with 0.3 mg/kg DA exhibited a significant increase in distance moved in the familiar open

field compared to vehicle-treated controls ($p = 0.039$, one-tailed, fig. 2a) as revealed by a priori pre-planned post hoc comparisons, although one-way ANOVA yielded no significant main effect for groups ($F_{(3,31)} = 2.069$; $p = 0.154$). No main group effects were found by the ANOVA ($F_{(3,31)} \leq 1.921$, $p \geq 0.171$). However, animals treated with 0.3 mg/kg DA moved longer distances in the periphery ($p \leq 0.031$; fig. 2b), but not in the center ($p = 0.579$; fig. 2c) of the open field compared to controls. However, as expected, a main group effect for the frequency of quiescence bouts ($F_{(3,31)} = 3.315$; $p = 0.034$) was found and rats treated with 0.3 mg/kg DA showed significantly less quiescence compared to the vehicle-treated group ($p = 0.041$, one-tailed, fig. 2d), but did not differ in the number of entries and time spent in the different areas of the open field (one-way ANOVA: $F_{(3,31)} \leq 0.858$, $p \geq 0.474$; post-hoc Dunnett: $p \geq 0.497$, data not shown).

Fig. 2. Effects of intra-nasally applied dopamine on behavior in a familiar open field. Depicted is the mean \pm SEM performance of vehicle-treated animals ($n = 9$) and dopamine-treated animals (0.03, 0.3 and 3.0 mg/kg; $n = 9$ per group) during the second exposure in a familiar environment (animals were exposed to the open field for a duration of 30 min, 24 h before). The application of dopamine (0.3 mg/kg) induced a significant increase in the distance moved in the whole arena (a) as well as in the periphery (b), but was without effect on the distance moved in the center of the open field (c). A reduction in the number of quiescence bouts was found upon application of the 0.3 mg/kg dose (d). * $p < 0.05$ compared to vehicle-treated controls (Dunnet's test).

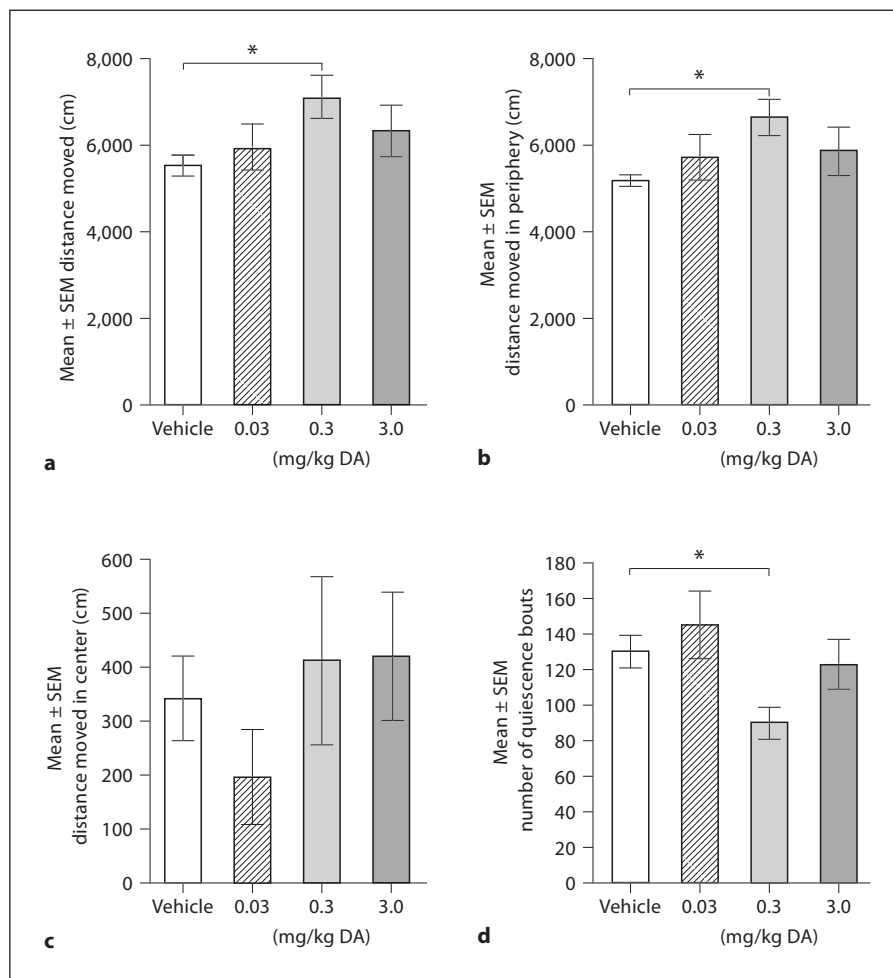


Table 3. Effects of intra-nasally applied dopamine in the elevated plus-maze test (data are mean \pm SEM)

Behavior	Vehicle	Dopamine		
		0.03 mg/kg	0.3 mg/kg	3.0 mg/kg
Number of entries open	8.63 \pm 1.6	5.88 \pm 1.3	8.25 \pm 1.7	8.50 \pm 0.8
Number of entries closed	13.88 \pm 1.6	12.75 \pm 2.9	12.50 \pm 2.0	13.88 \pm 2.1
Time open, s	59.12 \pm 12.4	73.00 \pm 23.0	73.85 \pm 23.9	81.75 \pm 15.8
Time closed, s	142.90 \pm 22.0	146.90 \pm 19.5	144.7 \pm 13.8	139.20 \pm 14.2
Time to first open arm entry, s	55.32 \pm 21.4	55.82 \pm 18.8	22.4 \pm 12.8	20.00 \pm 7.5
Time to first closed arm entry, s	3.90 \pm 3.1	22.02 \pm 20.9	50.25 \pm 22.1	7.02 \pm 4.7
Number of risk assessments	5.63 \pm 0.8	5.75 \pm 1.1	6.63 \pm 0.6	5.25 \pm 0.7
Duration of risk assessments, s	75.85 \pm 12.2	58.97 \pm 18.5	50.22 \pm 12.9	56.7 \pm 18.0
Number of head dips	4.38 \pm 1.4	3.75 \pm 1.1	5.13 \pm 1.8	6.00 \pm 1.3
Duration of head dips, s	21.20 \pm 8.8	30.98 \pm 11.1	17.6 \pm 5.6	37.17 \pm 8.5
Number of rearings	8.13 \pm 0.9	8.38 \pm 1.0	8.88 \pm 0.7	8.63 \pm 1.5
Duration of rearings, s	24.42 \pm 3.1	20.90 \pm 4.6	22.55 \pm 3.8	24.15 \pm 5.3
Distance moved, cm	1,490.5 \pm 79.6	1,266.98 \pm 111.7	1,367.06 \pm 114.3	118.77 \pm 80.1
Total number of entries	22.5 \pm 1.3	18.62 \pm 3.1	20.75 \pm 2.8	22.37 \pm 1.8

Elevated Plus-Maze

Data from the elevated plus-maze test, are depicted in table 3. Although the data point to a dose-dependent increase in the time spent on the open arms induced by intra-nasal DA administration, accompanied by reduction in the time treated animals required to enter the open arms, the statistical analysis failed to reveal any significant effects (one-way ANOVA: $F_{(3, 31)} \leq 1.876$, $p \geq 0.157$; post-hoc Dunnet: $p \geq 0.107$).

Discussion

Previously, we demonstrated that L-DOPA readily enters the brain upon intra-nasal application, leading to increases in extracellular levels of DA in neostriatal regions [10, 11]. Additionally, recently, we found evidence that DA, administered intra-nasally in the rat, can also enter the brain, leading to an immediate pronounced increase in extracellular DA levels in striatal subregions [12]. This finding offers a potential alternative for targeting the brain directly with DA via the intra-nasal route, which by other conventional systemic administration routes is restricted due to DA's hydrophilic properties, and thus low penetration through the blood-brain barrier. The main purpose of the present study was, in a first attempt, to examine whether DA applied via the nasal route at the same doses used in the *in vivo* neurochemistry study [12], also exerts behavioral effects within the context of mesocorticolimbic and nigrostriatal dopaminergic functions. Thus, we tested the effects of intra-nasally applied DA for antidepressant-like activity (FST), for anxiety-like parameters (elevated plus-maze), and on general motor activity in a novel and familiar open field. We found that intra-nasally administered DA dose-dependently exerted antidepressant-like activity in the FST, but had neither anxiolytic-like nor anxiogenic-like effects in the elevated plus-maze. Furthermore, intra-nasal DA stimulated locomotor activity in the open field, which was dependent on the familiarity of the test environment. Thus, these results provide support for the view that intra-nasally applied DA can act on the central nervous system by entering the brain via the nose-brain pathway, making this kind of application procedure a promising alternative for substance brain targeting, and thus treatment of disorders involving dopaminergic deficiencies, such as PD or affective disorders.

A reduction in the duration of immobility in the FST is an established measure of the effectiveness of potential antidepressant drugs. The present study demonstrated

that DA, in a dose of 0.3 mg/kg, induced antidepressant-like effects after intra-nasal application in rats, as indicated by a significant reduction in the duration of immobility, which was accompanied by a decrease in the duration of immobility compared to the pre-test phase, and a trend towards a later onset of immobility during the testing phase in the FST. The lack of behavior-stimulating effects in the unfamiliar open field, as well as measures of general motor activity in the elevated plus-maze, might rule out the possibility that the immobility-attenuating effects of the intra-nasally administered DA could be due to an increase in general motor activation, and suggest that the suppressive effects on immobility can be interpreted in terms of antidepressant-like activity. However, DA exerted motor-stimulating effects in a familiar environment, and, since in both the FST and the familiar open field test animals were initially exposed to the test procedure before being treated and tested again in the experimental paradigm, the potential antidepressant activity following intra-nasal DA administration cannot be satisfactorily separated from the motor-stimulatory effects. Future studies are needed using other animal models of depression to further assess its antidepressant properties.

Several lines of evidence indicate a role of the dopaminergic system in depressive disorders, and there are 2 main DA systems that appear to play complementary roles in depression. The mesocorticolimbic system, which innervates limbic structures such as the nucleus accumbens, amygdala, ventral hippocampus, and prefrontal cortex, is involved in a variety of behavioral functions related to motivation and reward, and may thus modulate symptoms like anhedonia [55]. Moreover, chronic stress and depressive states are associated with impaired limbic dopaminergic transmission [56–58], and antidepressants were shown to increase mesolimbic DA-neurotransmission [59]. Although we did not examine the exact mechanism by which intra-nasally applied DA exerts its effects on immobility in the FST, there is evidence suggesting a key role of the dopamine D_2 -receptor in mediating antidepressant-like activity [for reviews, see 60, 61]. Several studies provide evidence for an increased D_2 -like and also D_3 -like binding activity in the nucleus accumbens after chronic antidepressant treatment [62–65], while a decrease in D_1 -like binding activity was also found [66]. Furthermore, it was shown that mixed $D_{2/3}$ -agonists suppressed immobility in the FST, which could be dissociated from its action on motor activity in a novel environment [67–69]. Likewise, other mixed DA-receptor agonists all exert antidepressant-like effects in experimental

models of depression at doses that do not stimulate motor activity in unfamiliar environments and which, additionally, failed to influence anxiety-like behavior in the elevated plus-maze [26, 70, 71]. This is in accordance with the results from the elevated-plus maze of the present study.

On the other hand, the nigrostriatal system is primarily involved in extrapyramidal motor functions, and may modulate symptoms like psychomotor retardation, since lower levels of striatal DA in depressed patients with psychomotor retardation have been reported [72]. Interestingly, although no stimulatory effects of intra-nasally applied DA on motor activity in a novel open field were found in the present study, they became apparent after habituation to the novel open field, after only a single intra-nasal injection. It is well established that novel stimuli, such as handling [73] or new environments [73–75], increase dopaminergic neurotransmission in striatal subregions. These effects of novelty stimulation upon dopaminergic neurotransmission correlate well with the increase in activity shown by rats upon exposure to a novel environment [43, 76, 77]. However, the effects of DA-receptor agonists and antagonists upon general motor activity are dependent on baseline activity and the age of animals [78], receptor subtype involved, dosage, and whether or not the animals are habituated to the environment. The results on behavior in the novel and familiar environments in the present study resemble those found for other dopamine D₂-receptor agonists. Thus, it was found that pramipexole decreases locomotor behavior in rats and mice in a novel environment in low doses, but increases motor activity in a familiar environment in higher doses (3.2 mg/kg) [79, 80]. These lines of evidence support the view, that exogenous DA, applied via the nasal route, exerted its behavioral effects by actions on D₂-receptors, although participation of D₁- or D₃-receptors cannot be excluded. Further studies are needed to evaluate the precise mechanism by which exogenous DA exerts its antidepressant and/or locomotor stimulating effects when applied via the nasal route.

The transport pathway by which intra-nasally applied DA reaches the brain remains to be determined. Previously, we could show a rapid onset of increase in extracellular DA levels in striatal subregions 10 min after intra-nasal application of DA [12], indicating a fast transport of DA from the nasal cavity to the central nervous system. While systemic circulation of DA into the brain seems unlikely, due to its hydrophilic properties that prevent penetration through the blood-brain barrier, several pathways have been suggested for the transport of sub-

stance from the nose to the brain, such as the olfactory epithelial pathway, systemic circulation from the nasal mucosa, and the olfactory nerve pathway [1]. Recently, it was demonstrated that portions of the nasal mucosa are innervated by olfactory neurons expressing the dopamine transporter (DAT), which is responsible for the uptake of DA [15], providing a possible mechanism by which exogenous DA could have entered the brain. Assessing the exact transport pathway of intra-nasal DA remains to be examined in future research. Currently, a direct transport of drugs from the nose to the central nervous system is still a matter of debate [81] and only 2 studies provide evidence for a greater access of drugs to the brain upon intra-nasal application [81, 82]. As postulated [81], behavioral and neurochemical effects of labelled DA applied either by intra-nasal or intravenous route should be compared to validate the uptake and distribution of labelled DA in the brain in future studies. Nevertheless, the rapid behavioral effects in the present study along with quick neurochemical effects in our previous ones [10–12], strongly suggest a fast transport mechanism into the brain. Thus, the intra-nasal application procedure may represent a valuable alternative for targeting the brain with exogenous DA, resulting in rapid neurochemical and behavioral effects.

In conclusion, the present study provides the first evidence for behavioral actions of intra-nasally applied DA, including antidepressant-like action, and locomotor-stimulating activity in a familiar open field. The behavioral profile found for intra-nasally applied DA resembles those found for other antiparkinsonian agents [26, 71]. Since, treatment with L-DOPA, the mainstay of therapy in Parkinson's disease, is accompanied by a number of side effects [83], the intra-nasal delivery of exogenous DA into the brain may provide an alternative or adjunct in the therapy of diseases involving dopaminergic deficiencies. Its use should be further evaluated in animal models of Parkinson's disease in comparison to other conventional antiparkinson agents.

References

- 1 Illum L: Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci* 2000;11:1–18.
- 2 Vyas TK, Shahiwala A, Marathe S, Misra A: Intranasal drug delivery for brain targeting. *Curr Drug Deliv* 2005;2:165–175.
- 3 Hussain AA: Intranasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:39–49.

- 4 Minn A, Leclerc S, Heydel JM, Minn AL, Denizcot C, Cattarelli M, Netter P, Gradinaru D: Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *J Drug Target* 2002;10:285–296.
- 5 Harris AS, Nilsson IM, Wagner ZG, Alkner U: Intranasal administration of peptides: nasal deposition, biological response, and absorption of desmopressin. *J Pharm Sci* 1986;75:1085–1088.
- 6 Chen XQ, Fawcett JR, Rahman YE, Ala TA, Frey II WH: Delivery of nerve growth factor to the brain via the olfactory pathway. *J Alzheimers Dis* 1998;1:35–44.
- 7 Liu XF, Fawcett JR, Thorne RG, DeFor TA, Frey WH: Intranasal administration of insulin-like growth factor-I bypasses the blood-brain barrier and protects against focal cerebral ischemic damage. *J Neurol Sci* 2001;187:91–97.
- 8 Pietrowsky R, Strüben C, Mölle M, Fehm HL, Born J: Brain potential changes after intranasal vs. intravenous administration of vasopressin: evidence for a direct nose-brain pathway for peptide effects in humans. *Biol Psychiatry* 1996;39:332–340.
- 9 Pietrowsky R, Thiemann A, Kern W, Fehm HL, Born J: A nose-brain pathway for psychotropic peptides: evidence from a brain evoked potential study with cholecystokinin. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:559–572.
- 10 de Souza Silva MAD, Mattern C, Häcker R, Nogueira PJC, Huston JP, Schwarting RKW: Intranasal administration of the dopaminergic agonists L-DOPA, amphetamine, and cocaine increases dopamine activity in the neostriatum: a microdialysis study in the rat. *J Neurochem* 1997;68:233–239.
- 11 de Souza Silva MD, Mattern C, Häcker R, Tomaz C, Huston JP, Schwarting RKW: Increased neostriatal dopamine activity after intraperitoneal or intranasal administration of L-DOPA: on the role of benserazide pretreatment. *Synapse* 1997;27:294–302.
- 12 de Souza Silva MA, Topic B, Huston JP, Mattern C: Intranasal dopamine application increases dopaminergic activity in the neostriatum and nucleus accumbens and enhances motor activity in the open field. *Synapse* 2007;62:176–184.
- 13 Dahlin M, Bergman U, Jansson B, Björk E, Brittebo E: Transfer of dopamine in the olfactory pathway following nasal administration in mice. *Pharm Res* 2000;17:737–742.
- 14 Dahlin M, Jansson B, Björk E: Levels of dopamine and brain following nasal administration to rats. *Eur J Pharm Sci* 2001;14:75–80.
- 15 Chemuturi NV, Haraldsson JE, Prisinzano T, Donovan M: Role of dopamine transporter (DAT) in dopamine transport across the nasal mucosa. *Life Sci* 2006;79:1391–1398.
- 16 Illum L: Is nose-to-brain transport of drugs in man a reality? *J Pharm Pharmacol* 2004;56:3–17.
- 17 Pasquier DA, Kemper TL, Forbes WB, Morgane PJ: Dorsal raphe, substantia nigra and locus coeruleus: the neostriatum. *Brain Res Bull* 1977;2:323–339.
- 18 Phillips AG, Blaha CD, Fibiger HC: Neurochemical correlates of brain-stimulation reward measured by *ex vivo* and *in vivo* analyses. *Neurosci Biobehav Rev* 1989;13:99–104.
- 19 Willner P, Muscat R, Phillips G: The role of dopamine in rewarded behavior: ability, insight, drive or incentive? *Pol J Pharmacol Pharm* 1991;43:291–300.
- 20 Tremblay LK, Naranjo CA, Cardenas L, Herrmann N, Busto UE: Probing brain reward system function in major depressive disorder: altered response to dextroamphetamine. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:409–416.
- 21 Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, Busto UE: Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62:1228–1236.
- 22 Willner P: Dopamine and depression: a review of recent evidence. II. Theoretical approaches. *Brain Res* 1983;287:225–236.
- 23 Roy A, Pickar D, Linnoila M, Doran AR, Ninan P, Paul SM: Cerebrospinal-fluid monoamine and monoamine metabolite concentrations in melancholia. *Psychiatry Res* 1985;15:281–292.
- 24 Jimmerson DC: Role of dopamine mechanisms in the affective disorders; in Meltzer HY (ed): *Psychopharmacology: The Third Generation of Progress*. New York, Raven Press, 1987.
- 25 Muscat R, Papp M, Willner P: Antidepressant-like effects of dopamine agonists in an animal-model of depression. *Biol Psychiatry* 1992;31:937–946.
- 26 Millan MJ, Brocco M, Papp M, Serres F, La Rochelle CD, Sharp T, Peglion JL, Dekeyne A: S32504, a novel naphthoxazine agonist at dopamine D-3/D-2 receptors: III. Actions in models of potential antidepressive and anxiolytic activity in comparison with ropinirole. *J Pharm Exp Ther* 2004;309:936–950.
- 27 Inoue T, Tsuchiya K, Miura J, Sakakibara S, Denda K, Kasahara T, Koyama T: Bromocriptine treatment of tricyclic and heterocyclic antidepressant-resistant depression. *Biol Psychiatry* 1996;40:151–153.
- 28 Perugi G, Toni C, Ruffolo G, Frare F, Akiskal H: Adjunctive dopamine agonists in treatment-resistant bipolar II depression: an open case series. *Pharmacopsychiatry* 2001;34:137–141.
- 29 Goldberg JF, Burdick KE, Endick CJ: Preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled trial of pramipexole added to mood stabilizers for treatment-resistant bipolar depression. *Am J Psychiatry* 2004;161:564–566.
- 30 Yadid G, Overstreet DH, Zangen A: Limbic dopaminergic adaptation to a stressful stimulus in a rat model of depression. *Brain Res* 2001;896:43–47.
- 31 Lucki I: The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997;8:523–532.
- 32 Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I: Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:547–569.
- 33 Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M: Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;177:245–255.
- 34 Cloninger CR: Comorbidity of anxiety and depression. *J Clin Psychopharmacol* 1990;10:43S–46S.
- 35 Lenze EJ, Mulsant BH, Shear MK, Alexopoulos GS, Frank E, Reynolds CF 3rd: Comorbidity of depression and anxiety disorders in later life. *Depress Anxiety* 2001;14:86–93.
- 36 Aina Y, Susman JL: Understanding comorbidity with depression and anxiety disorders. *J Am Osteopath Assoc* 2006;106:s9–s14.
- 37 Taylor DP, Riblet LA, Stanton HC, Eison AS, Eison MS, Temple Jr DL: Dopamine and anti-anxiety activity. *Pharmacol Biochem Behav* 1982;17:25–35.
- 38 Bartoszyk GD: Anxiolytic effects of dopamine receptor ligands: I. Involvement of dopamine autoreceptors. *Life Sci* 1998;62:649–663.
- 39 Espejo EF: Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. *Brain Res* 1997;762:281–284.
- 40 Wall PM, Blanchard RJ, Markham C, Yang M, Blanchard DC: Infralimbic D1 receptor agonist effects on spontaneous novelty exploration and anxiety-like defense responding in CD-1 mice. *Behav Brain Res* 2004;152:67–79.
- 41 Lieberman A: Are dementia and depression in Parkinson's disease related? *J Neurol Sci* 2006;248:138–142.
- 42 Lieberman A: Depression in Parkinson's disease – a review. *Acta Neurol Scand* 2006;113:1–8.
- 43 Badiani A, Oates MM, Robinson TE: Modulation of morphine sensitization in the rat by contextual stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 2000;151:273–282.
- 44 Carey RJ, dePalma G, Damianopoulos E: Response to novelty as a predictor of cocaine sensitization and conditioning in rats: a correlational analysis. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;168:245–252.
- 45 Heijtz RD, Beraki S, Scott L, Aperia A, Forssberg H: Sex differences in the motor inhibitory and stimulatory role of dopamine D1 receptors in rats. *Eur J Pharmacol* 2002;445:97–104.

- 46 Pastor R, Miquel M, Aragon CM: Habituation to test procedure modulates the involvement of dopamine D2- but not D1-receptors in ethanol-induced locomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2005; 182:436–446.
- 47 Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M: Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 1978;47:379–391.
- 48 Paulus MP, Geyer MA: A scaling approach to find order parameters quantifying the effects of dopaminergic agents on unconditioned motor activity in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1991;15: 903–919.
- 49 Lapin IP, Rogawski MA: Effects of D1 and D2 dopamine-receptor antagonists and catecholamine depleting agents on the locomotor stimulation induced by dizocilpine in mice. *Behav Brain Res* 1995;70:145–151.
- 50 O'Neill MF, Shaw G: Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D-1 agonist C-APB in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;145: 237–250.
- 51 Prut L, Belzung C: The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
- 52 Carey RJ: Response to novelty as a predictor for drug effects: the pitfalls of some correlational studies – reply. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;173:225–226.
- 53 Olson CL: *Statistics: Making Sense of Data*. Boston, Allyn and Bacon, 1987.
- 54 Ramsey PH: Multiple comparisons of independent means; in Edwards KL (ed): *Applied Analysis of Variance in Behavioural Science*. New York, Marcel Dekker, 1993, pp 25–61.
- 55 Willner P, Scheel-Kruger J: *The Mesolimbic Dopamine System: From Motivation to Action*. Chichester, John Wiley, 1991.
- 56 Zacharko RM, Bowers WJ, Kokkinidis L, Anisman H: Region-specific reductions of intracranial self-stimulation after uncontrollable stress – possible effects on reward processes. *Behav Brain Res* 1991;9:129–141.
- 57 Stamford JA, Muscat R, O'Connor JJ, Patel J, Trout SJ, Wiczorek WJ, Kruk ZL, Willner P: Voltammetric evidence that subsensitivity to reward following chronic mild stress is associated with increased release of mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology (Berl)* 1991;105:275–282.
- 58 Shumake J, Edwards E, Gonzalez-Lima F: Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior. *Brain Res* 2003;963: 274–281.
- 59 D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G : The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur J Pharmacol* 2000;405:365–373.
- 60 Willner P: The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action. *Int Clin Psychopharmacol* 2000;12 (suppl 3):S7–S14.
- 61 Gershon AA, Vishne T, Grunhaus L: Dopamine D2-like receptors and the antidepressant response. *Biol Psychiatry* 2007;61:145–153.
- 62 Dziedzicka-Wasylewska M, Rogoz Z, Klimek V, Maj J: Repeated administration of antidepressant drugs affects the levels of mRNA coding for D1 and D2 dopamine receptors in the rat brain. *J Neural Transm* 1997;104:515–524.
- 63 Maj J, Rogoz Z, Margas W, Kata M, Dziedzicka-Wasylewska M: The effect of repeated treatment with pramipexole on the central dopamine D3 system. *J Neural Transm* 2000; 107:1369–1379.
- 64 Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P: Dopamine D3 receptor gene expression in the shell of nucleus accumbens is increased by chronic antidepressant treatment. *Mol Psychiatry* 2000;5:229.
- 65 Lammers CH, Diaz J, Schwartz JC, Sokoloff P: Selective increase of dopamine D3 receptor gene expression as a common effect of chronic antidepressant treatments. *Mol Psychiatry* 2000;5:378–388.
- 66 Klimek V, Nielsen M: Chronic treatment with antidepressants decreases the number of [³H]SCH 23390 binding sites in the rat striatum and limbic system. *Eur J Pharmacol* 1987;139:163–169.
- 67 Brocco M, Dekeyne A, Papp M, Millan MJ: Antidepressant-like properties of the anti-Parkinson agent, piribedil, in rodents: mediation by dopamine D2 receptors. *Behav Pharmacol* 2006;17:559–572.
- 68 Borsini F, Lecci A, Mancinelli A, D'Aranno V, Meli A: Stimulation of dopamine D-2 but not D-1 receptors reduces immobility time of rats in the forced swimming test: implication for antidepressant activity. *Eur J Pharmacol* 1988;148:301–307.
- 69 Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Kolodziejczyk K: Antidepressant effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *J Neural Transm* 1997;104:525–533.
- 70 Basso AM, Gallagher KB, Bratcher NA, Briani JD, Moreland RB, Hsieh GC, Drescher K, Fox GB, Decker MW, Rueter LE: Antidepressant-like effect of D-2/3 receptor, but not D-4 receptor-activation in the rat forced swim test. *Neuropsychopharmacology* 2005;30: 1257–1268.
- 71 Bertaina-Anglade V, La Rochelle CD, Scheller DK: Antidepressant properties of rotigotine in experimental models of depression. *Eur J Pharmacol* 2005;548:106–114.
- 72 Ebert D, Feistel H, Loew T, Pirner A: Dopamine and depression – striatal dopamine D-2 receptor SPECT before and after antidepressant therapy. *Psychopharmacology (Berl)* 1996;126:91–94.
- 73 Feenstra MG, Botterblom MH, Mastenbroek S: Dopamine and noradrenaline efflux in the prefrontal cortex in the light and dark period: effects of novelty and handling and comparison to the nucleus accumbens. *Neuroscience* 2000;100:741–748.
- 74 Horvitz JC: Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience* 2000;96:651–656.
- 75 Legault M, Wise RA: Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 2001;13:819–828.
- 76 Hooks MS, Kalivas PW: The role of mesoaccumbens pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience* 1995;64:587–597.
- 77 Badiani A, Oates MM, Day HE, Watson SJ, Akil H, Robinson TE: Environmental modulation of amphetamine-induced c-fos expression in D1 versus D2 striatal neurons. *Behav Brain Res* 1999;103:203–209.
- 78 Robbins TW: ADHD and addiction. *Nat Med* 2002;8:24–25.
- 79 Maj J, Rogoz Z, Skuza G, Kolodziejczyk K: The behavioural effects of pramipexole, a novel dopamine receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1997;324:31–37.
- 80 Siuciak JA, Fujiwara RA: The activity of pramipexole in the mouse forced swim test is mediated by D2 rather than D3 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;175:163–169.
- 81 Merkus FW, van den Berg MP: Can nasal drug delivery bypass the blood-brain barrier? Questioning the direct transport theory. *Drugs R D* 2007;8:133–144.
- 82 Bagger MA, Bechgaard E: The potential of nasal application for delivery to the central brain – a microdialysis study of fluorescein in rats. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:235–242.
- 83 Katzenschlager R, Lees AJ: Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. *J Neurol* 2002;249(suppl 2):II19–II24.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst zu haben.

Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei keiner Anderen Hochschule eingereicht.

Düsseldorf, den 12.11.2008

(Dipl. Psych. Tim Buddenberg)