



**Extinktions-induzierte Depression:  
Validierung eines Tiermodells  
zur Untersuchung depressions-ähnlicher  
Verhaltensweisen**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

**Mara Komorowski**

aus Oberhausen

Düsseldorf, Dezember 2013

aus dem Institut für Experimentelle Psychologie  
Center for Behavioral Neuroscience  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.05.2014

*Für meine Eltern & David*

# Danksagung

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

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

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

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Angelica De Souza Silva für ihre Hilfsbereitschaft und unkomplizierte Unterstützung im Rahmen des Projektes.

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

Weiterhin möchte ich allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Physiologische Psychologie für die vielen Diskussionen, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die stets hilfreiche Unterstützung auf allen Ebenen danken.

## Zusammenfassung

Die unipolare Depression ist eine der schwersten rezidivierenden psychischen Erkrankungen, welche gekennzeichnet ist durch negative Verstimmung, Interessen- und Freudlosigkeit, sowie eine starke Antriebsminderung. Die Lebenszeitprävalenz liegt zwischen 15-20%, wobei unter den Betroffenen bis zu 30% unter therapieresistenten Depressionen (TRD) leiden, welche nicht auf eine reguläre medikamentöse Behandlungen ansprechen. Eine ebenfalls hohe Prävalenz von 10-15% haben die geriatrischen Depressionen, deren Erstmanifestation ab dem fünften Lebensjahrzehnt auftritt. Zwar sind die neurobiologischen Grundlagen und die multifaktorielle Ätiologie der Depression gut erforscht, aber dennoch gibt es einen zunehmend großen Bedarf an neuen, antidepressiv wirksamen Substanzen, die speziell im Rahmen von TRD und geriatrischen Depressionen Anwendung finden können. Damit einher geht die Notwendigkeit, die Validität bisher existierender Tiermodelle zur Identifikation solcher Substanzen zu verbessern und neue Modelle zu entwickeln, denen Inhalts-, Konstrukt- und prädiktive Validität, als auch Symptomspezifität zugrunde liegt. Obwohl das unkontrollierbare Erleben von Verlusten, einschneidenden Lebensereignissen und damit verbundenem Stress bei einem Großteil aller Patienten prämorbid gehäuft auftreten, haben diese Faktoren bisher nicht ausreichend Beachtung in Tiermodellen der Depression gefunden, ebenso wie das daraus resultierende Rückzugsverhalten.

Die hier vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Validierung eines neuen Tiermodells zur Erforschung depressions-ähnlicher Verhaltensweisen. Dieses beruht auf der lerntheoretischen Grundlage, dass ein Entzug oder Verlust von erwarteter Verstärkung sowohl im Menschen, als auch im Tier in einer Reduktion von assoziierten Verhaltensweisen resultiert (Extinktion). Extinktion führt innerhalb eines Organismus zu Stress, Erregung, Verzweiflung und kann aufgrund der kognitiven und behavioralen Veränderungen langfristig Depressionen bedingen. Hier steht insbesondere das Rückzugsverhalten depressiver Patienten im Vordergrund, welches Ausdruck einer Extinktions-induzierten Depression (EID) sein kann. Zudem bildet es auch einen aufrechterhaltenden Faktor, da es das Erleben neuer, alternativer Verstärkung verhindert. Ätiologisch spielt die EID vor allem bei geriatrischen Depressionen eine wesentliche Rolle, da mit dem Alter ein Anstieg an Verlusterlebnissen, als auch neurobiologische und kognitive Veränderungen einher gehen, welche die Verhaltensvariabilität der Betroffenen und ihre Stressresistenz einschränken.

In dieser Dissertation wurde in einem ersten Schritt gezeigt, dass der Entzug einer erwarteten Futterbelohnung nach Hebeldruck bei männlichen Wistar-Ratten zu Rückzugsverhalten in einer dualen operanten Versuchskammer führt, welche aus 2 Kompartimenten besteht. Während in dem operanten Kompartiment in den Lerndurchgängen Hinweislichter, ein Hebel und die darauf folgende Futterbelohnung präsentiert wurden, gab es in einem neutralen „Rückzugskompartiment“ keine operanten Module. Eine akute Behandlung mit dem selektiv serotonergen Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Citalopram und dem trizyklischen Antidepressivum (TZA) Imipramin vor der Extinktion reduzierte signifikant das zunehmende Rückzugsverhalten und weitere depressions-assoziierte Verhaltensweisen wie etwa das Beißen des Hebels.

In einem weiterführenden Experiment wurden die Konfiguration der Kammer und die operante Aufgabe an die zuvor gewonnenen Erkenntnisse angepasst. Anstelle zweier getrennter Kompartimente wurde eine längliche Kammer entworfen, welche die genaue Messung eines Rückzugsgradienten und horizontaler Aktivität erlaubt. Zudem wurde ohne Hebeldrücke mit fixen Intervall-Verstärkerplänen und freier Verstärkergabe gearbeitet. Citalopram und das TZA Clomipramin reduzierten nach chronischer Behandlung den Rückzugsgradienten und den Rückzug von der belohnungs-assoziierten Futterluke in Form von Zielaufspürungsverhalten. Zudem wurden alle Tiere nach der fünftägigen Extinktionsphase im Offenfeld (OF) getestet und mit einer naiven Kontrollgruppe verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass Extinktion anxiogene Effekte auf das Verhalten im OF hat, die ebenfalls durch Citalopram reduziert werden konnten.

In einer abschließenden Untersuchung wurde betrachtet, ob EID mit zunehmendem Alter verstärkt auftritt und welchen Einfluss eine chronische Behandlung mit Corticosteron (Cort) auf EID hat. Die Verabreichung von Cort induziert einen depressiven Phänotypen in anderen Tiermodellen der Depression. Es konnte hypothesenkonform gezeigt werden, dass alte Wistar-Ratten im Zuge von Extinktion ebenfalls Rückzugsverhalten ausbilden. Die Behandlung mit Cort führte besonders bei alten Tieren zu einer Zunahme von Rückzugsverhalten und einer Dysfunktion der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN) .

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeiten unterstützen die Validität von EID als Tiermodell der Depression und die ätiologische Relevanz von Verstärkerverlust. Besonders der Rückzugsgradient und die Abnahme von Zielaufspürung am Ort ehemaliger Belohnungsverabreichung haben prädiktive Validität und sind sensitiv gegenüber einer Behandlung mit SSRIs, TZAs und Corticosteron. Gemäß der Hypothese löst Extinktion verstärkt bei alten Tieren depressions-ähnliches Verhalten bei geringerer

Extinktionsresistenz aus. Somit bietet das Modell neue Perspektiven für die Erforschung und Behandlung speziell der geriatrischen Depression, welche geprägt ist von erhöhtem Verstärkerverlust und maladaptiven Reaktionen auf Stress.

## Summary

Major depression (MD) is one of the most severe recurrent psychiatric diseases, characterized by a depressed mood, loss of drive and diminished pleasure or interest. Lifetime prevalence is estimated between 15-20%, with around 30% of affected patients suffering from treatment-resistant depression (TRD) and not responding to antidepressant psychotropic drugs. Beyond, there is a large prevalence of 10-15% for geriatric depression with a first onset after the fifth decade. Although the pathophysiology and the multifactorial etiology of depression are well understood, there is still a serious need for new antidepressive agents to treat the large number of geriatric patients and those suffering from TRD. Along with this goes the necessity to improve the validity of animal models of depression that can detect such agents. The development of new animal models that show face, predictive and construct validity and an increased specificity for the main symptoms of MD is essential. Whilst the experience of uncontrollable life events, stress and especially loss of reinforcement accumulate in a majority of patients prior to the onset of a depressive episode, these factors are not yet integrated into animal models of depression, as well as the resulting withdrawal behavior.

The present dissertation therefore attends to the validation of a new animal model of depression to investigate depressive-like behavior. It is based on the learning theory that omission or withholding of an expected reward leads to extinction of related behaviors performed to gain this reward. Extinction is perceived as stressful and aversive by humans and animals, it increases arousal and finally leads to behavioral despair, which means giving up any attempt to obtain further reward. The resulting behavioral and cognitive consequences of extinction can easily lead to depression. Especially withdrawal from former rewarding situations seen in depressed patients is in the center of attention, since it can serve as a marker for extinction-induced depression (EID). Additionally, it maintains the depression by preventing the experience of new rewarding activities. EID is of special importance for the etiology of geriatric depression as senescence is accompanied on the one hand by a rise in incentive loss and severe life events, but on the other hand by neurobiological and cognitive changes that impair peoples' ability to show behavioral flexibility and cope with the implications of stress.

In a first approach, we could show that omission of a cued food reward in a continuous reinforcement schedule of lever-pressing in a two-compartment operant chamber leads to withdrawal behavior in adult male Wistar-rats. Whereas one of the compartments was equipped with a food magazine, a tray, a lever and cue lights to predict upcoming reward,



the second compartment was left empty and served as a neutral „withdrawal compartment“. Acute treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram and the tricyclic antidepressant (TCA) imipramin significantly reduced withdrawal from and avoidance of the operant compartment, as well as other behaviors such as biting of the lever.

In a follow-up study, the operant chamber was adjusted with respect to the previous findings and transformed into an elongated operant chamber without transitions. This allowed the measurement of a flowing distance gradient from the food tray and of horizontal activity instead of counting duration and frequency of compartment entries only. In place of food-rewarded lever pressing and continuous reinforcement, a cued fixed-time free-reward delivery schedule was employed. Subjects were treated chronically with two different doses of either citalopram or the TCA clomipramine. Both drugs reduced the distance gradient and the decrease in goal-tracking. After five days of extinction, subjects were tested in the open field (OF) to investigate effects of extinction on anxious behavior. Compared to naive control subjects, animals that had undergone extinction exhibited greater anxiety, which was alleviated by the treatment with citalopram.

In a final study, the effects and interactions of advanced age and a chronic corticosterone treatment (Cort) with EID were assessed. The chronic application of exogenous Cort promotes a depressive-like phenotype in other animal models, so it was tested, if Cort additionally enhances EID. In line with the theory, aged rats (18 months) suffered from the consequences of reward omission and exhibited withdrawal behavior. CORT exacerbated EID more in aged than in adult rats. They showed withdrawal behavior to a larger extent and developed a dysfunction of the hypothalamus-pituitary-adrenal gland-axis (HPA).

The results presented in this dissertation lend further support to the validity of EID as a new animal model of depression and stress the role of reward omission in the etiology of MD. Especially the distance gradient and the decline of goal-tracking at the former source of reinforcement are sensitive markers of despair and have predictive validity for treatment with SSRIs, TCAs and Cort as well as a sensitivity to effects of age. The model offers new perspectives and possibilities for the investigation and treatment of geriatric depression, which is especially susceptible to the increased loss of reinforcement and the maladaptive altered response to stress.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>11</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>12</b>
2.1 Depression.....	12
2.1.1 Depression und Stress.....	15
2.1.2 Tiermodelle der Depression.....	18
2.2 Extinktions-induzierte Depression.....	22
2.2.1 Grundlagen operanter Konditionierung und Verstärkung.....	22
2.2.2 Auswirkungen von Verstärkerentzug.....	25
2.2.3 Das Modell der Extinktions-induzierten Depression.....	27
2.2.3.1 EID nach negativer Verstärkung.....	28
2.2.3.2 EID nach positiver Verstärkung.....	30
2.3 Fragestellung.....	32
<b>3 Methodik</b> .....	<b>33</b>
3.1 Die duale Kammer.....	33
3.2 Die verlängerte operante Kammer.....	34
3.3 Das Offenfeld (OF).....	37
3.4 Corticosteronhaltiges Trinkwasser.....	38
3.5 Blutabnahme und Fixation.....	40
<b>4 Durchgeführte Studien</b> .....	<b>41</b>
4.1 Antidepressiva reduzieren Extinktions-induziertes Rückzugs- und Beißverhalten: Ein Modell für depressions-ähnliche Verhaltensweisen.....	41
4.2 Der Rückzugsgradient von der Verstärkerquelle als Indikator Extinktions-induzierter Verzweiflung: Modulation durch die Antidepressiva Clomipramin und Citalopram.....	43
4.3 Die chronische Behandlung mit Corticosteron verstärkt Extinktions- induzierte Depressionen und beeinträchtigt die Funktion der HHN-Achse in alten und adulten Ratten .....	46
<b>5 Zusammenfassende Diskussion</b> .....	<b>50</b>
<b>6 Literatur</b> .....	<b>61</b>
<b>7 Veröffentlichungen</b> .....	<b>78</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

5-HT	- Serotonin
ACTH	- Adrenocorticotrophes Hormon
BDNF	- Brain-derived-neurotrophic factor
CMS	- Chronic Mild Stress
Cort	- Corticosteron
CRH	- Corticotrophin-releasing Hormon
DA	- Dopamin
DOPAC	- Dihydroxyphenylacetic acid
DRL	- Differential-reinforcement-of-low-rate
EID	- Extinktions-induzierte Depression
FST	- Forced Swimming Test
HHN	- Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HPA	- Hypothalamic-Pituitary-Adrenal gland
MAO	- Monoamin-Oxidase
MD	- Major Depression
NA	- Noradrenalin
NAc	- Nucleus accumbens
OF	- Offenfeld
RTE	- Resistance to Extinction
SSRI	- Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
SNRI	- Selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
TRD	- Therapieresistente Depression
TST	- Tail Suspension Test
TZA/TCA	- Tricyclic Antidepressant/Trizyklikum

## 2 Einleitung

Die Einleitung dieser Dissertation soll im Folgenden einen Überblick über das Erscheinungsbild und die neurobiologischen, sowie psychologischen, Grundlagen der unipolaren Depression geben. Im Speziellen wird die ätiologische Bedeutung von Stress und Verlust von Verstärkung im Menschen und Versuchstier dargestellt, sowie die hierzu existierenden Tiermodelle. Ein Exkurs zu Grundbegriffen und Konzepten der operanten (instrumentellen) Konditionierung leitet abschließend über zum hier validierten Modell der Extinktions-induzierten Depression, welches ausführlich vorgestellt und diskutiert wird.

### 2.1 Depression

Die unipolare Depression ist zusammen mit den Formenkreis der Angststörungen eine der häufigsten psychischen Erkrankungen weltweit (Wong & Licino, 2001). Sie ist laut diagnostischer Kriterien gekennzeichnet durch eine länger als zwei Wochen anhaltende Interessen- und Freudlosigkeit, Antriebsstörungen und eine deutlich negative Verstimmung. Zudem können als häufige somatische und kognitive Begleitsymptome Schlafstörungen, kognitive Defizite, Appetitlosigkeit oder auch eine zeitweise Gereizt- und Agitiertheit auftreten (Weltgesundheitsorganisation: ICD-10; Schulte-Markwort, Dilling, Mombour & Schmidt, 2004). Zentraler Bestandteil ist ebenfalls ein starkes Rückzugsverhalten depressiver Patienten von Aktivitäten, welche vor der Manifestation der Erkrankung Freude bereitet haben (Ferster, 1973; Lewinsohn, 1974). Häufig kommt es zur Aufgabe von sozialen Kontakten, Freizeitaktivitäten und beruflichen Verpflichtungen, Suizidalität, sowie einer Vermeidung des Verlassens der Wohnung. Die Lebenszeitprävalenz liegt Schätzungen zufolge zwischen 15-20% (Nestler, Barrot, DiLeone, Eisch, Gold & Monteggia, 2002), wobei Frauen mindestens doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Wong & Licino, 2001). Je nach Untersuchung beträgt das Alter der Erstmanifestation durchschnittlich 25-35 Jahre (Wong & Licino, 2001). Davon abzugrenzen sind die geriatrischen Depressionen mit einer Erstmanifestation jenseits des fünften Lebensjahrzehnts, deren Prävalenz mit 10-15% nochmals stark erhöht ist (Murrell, Himmelfarb & Wright, 1983; Luppá et al., 2012). Innerhalb der geriatrischen

Depressionen zeigt sich kein eindeutiger Effekt des Geschlechts auf die Erkrankungshäufigkeit (Rohr, 2002).

Die Pathophysiologie der Depression ist intensiv erforscht worden und heute weitgehend bekannt (zur Übersicht: Willner, Scheel-Krüger & Belzung, 2013). Neben der Monoamin-Defizit-Hypothese (Schildkraut, 1965), mit der ein Grundstein in der Erforschung der ätiologischen Faktoren gelegt wurde, gibt es viele weitere ursächliche Verknüpfungen zwischen hirnphysiologischen sowie hormonellen Veränderungen und Depressionen. So werden neben den Monoaminen Serotonin (5-HT), Noradrenalin (NE) und Dopamin (DA) auch Glucocorticoide, Glutamat, Nervenwachstumsfaktoren, Neurogenese und Androgene als verursachende bzw. modulierende Faktoren betrachtet (Dailly, Chenu, Renard & Bourin, 2004; Berton & Nestler, 2006; Fernández-Guasti, Fiedler, Herrera & Handa, 2012; Willner et al., 2013). Depressionen können Konsequenz psychosozialer Belastungen wie Isolation, Verlusterlebnissen, Scheitern, chronischem Stress oder dem kognitiven Attributionsstil sein (Kammer, 1983; Mazure, 1998; Kendler, Karkowski & Prescott, 1999). Es zeigen sich deutliche Veränderungen in der Struktur und Aktivität einzelner Hirnregionen, deren Ausmaß stark mit der Dauer der erlebten depressiven Episode korreliert. Entgegen dem erhöhten Blutfluss und Glucosemetabolismus in der Amygdala sind andere limbische Strukturen wie der Hippocampus atrophisch und hypoaktiv (Drevets, 2000). Die Neurogenese und damit zusammenhängend die Verfügbarkeit von neurotrophen Faktoren ist stark reduziert, was zu Defiziten im Lernen und der Plastizität des Gehirns führt (Duman & Monteggia, 2006). Die limbischen Veränderungen können der erhöhten Ängstlichkeit, Emotionalität und den kognitiven Defiziten innerhalb einer Depression zugeordnet werden. Im präfrontalen Cortex (PFC) und ventralen Striatum (Nucleus accumbens) zeigt sich ebenfalls eine geringere Aktivierung als bei Kontrollpersonen, was Rückschlüsse auf eine verringerte Motivation, kognitive Beeinträchtigungen und ein reduziertes Interesse bzw. Empfänglichkeit für Belohnung und hedonistische Verstärker zulässt (Überblick bei: Drevets & Furey, 2009; Willner et al., 2013).

Die heterogene und multifaktorielle Genese der Depression bedingt die Notwendigkeit multidisziplinärer Behandlungsmaßnahmen. Behandlungserfolge zeigen sich primär bei der Kombination einer medikamentösen Behandlung mit Antidepressiva, Verhaltens-, bzw. kognitiver Psychotherapie und in einigen Fällen

auch systemischen und sozialen Therapieergänzungen (Segal, Kennedy & Cohen, 2001; March et al., 2004). Bei schweren und therapieresistenten Verläufen können ergänzend eine Elektrokonvulsivtherapie, Schlafentzug, transkranielle Magnetstimulation oder Tiefenhirnstimulation eingesetzt werden (Mosimann et al., 2004; Mayberg et al., 2005; Fiske, Loebach Wetherell & Gatz, 2009; Sienaert, 2011). Die pharmakologische Behandlung kann anhand des Wirkmechanismus und der angesprochenen Neurotransmittersysteme in verschiedene Klassen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet man die älteren, unselektiv auf alle Monoamine wirkenden trizyklischen Antidepressiva (TZA) von selektiv serotonergen Wiederaufnahmehemmern (SSRI) wie etwa Citalopram, selektiv noradrenergen Wiederaufnahmehemmern (SNRI) wie Desipramin und MAO-A- bzw. MAO-B-Hemmern (Stahl, 1998). Alle Präparate erhöhen die Verfügbarkeit von Monoaminen im synaptischen Spalt, entweder über die Hemmung der Wiederaufnahme oder über eine Hemmung des enzymatischen Abbaus der Transmitter durch Monoaminoxidase (MAO). Neben Präparaten, welche die monoaminerge Transmission erhöhen, gibt es auch neuere Pharmaka, welche speziell auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN) einwirken (Holsboer 2001a; 2001b; Pariante & Lightman, 2008; Thomson & Craighead, 2010). Die Rolle der HHN-Achse bei Depressionen wird in Kapitel 2.1.1 separat dargestellt. Im Rahmen einer erfolgreichen antidepressiven Behandlung remittieren viele der vorangehend geschilderten physiologischen und strukturellen Veränderungen, jedoch nicht alle (McEwen, 1999b; Sapolsky, 2000; Dranovsky & Hen, 2006; Aihara et al., 2007). Trotz der Verfügbarkeit eines großen Behandlungsangebots treten unipolare Depressionen häufig zyklisch rezidivierend auf (Zis & Goodwin, 1979) oder können eine nicht-remittierende Verlaufsform haben, die nicht auf eine Pharmakotherapie anspricht. Diese therapieresistenten Depressionen (TRD) treten bei etwa 20-30% aller Betroffenen auf und sind vor allem im Hinblick auf Suizidalität und die gesundheitlichen Langzeitfolgen der Erkrankung eine sehr schwerwiegende Verlaufsform (Holsboer-Trachsler, 2006; Fava, 2006; Fiske et al., 2009; Holtzheimer & Mayberg, 2011). Eine tendenziell stärkere Häufung tritt unter den geriatrischen Depressionen auf (Bonner, 1995). Die Ursachen hierfür können in der beeinträchtigten Fähigkeit zur Stressadaptation und den neurobiologischen Veränderungen des seneszenten Organismus und Gehirns liegen, welche in Kapitel

2.1.1 und 2.2 näher dargestellt werden. Der hohe Anteil an Patienten, die nicht auf die bisher verfügbaren medikamentösen Behandlungen ansprechen, macht jedoch deutlich, dass ein erhöhter Bedarf an neuen antidepressiven Psychopharmaka besteht, sowie an Tiermodellen, welche inhaltlich valide sind im Hinblick auf die Symptomatik einer Depression und mit Hilfe derer Wirkstoffe effizient getestet werden können.

### **2.1.1 Depression und Stress**

Es gibt viele Hinweise dafür, dass chronischer Stress, neben anderen gesundheitlichen Beeinträchtigungen, langfristig vor allem zu Depressionen führen kann (Holsboer, 2001a). Bei der Mehrheit aller Patienten lässt sich prämorbid eine erhöhte Anzahl langzeitiger Stressoren ausmachen wie etwa einschneidende Lebensereignisse und langwierige Belastungen (Brown Harris & Hepworth, 1994; Kendler, Karkowski & Prescott, 1999; Mazure, 1998; Hammen, 2005). Stress aktiviert im Organismus die HHN-Achse um eine optimale Adaptation an die Bedürfnisse stressreicher Situationen zu gewährleisten. Im Ncl. paraventricularis des Hypothalamus kommt es zur Sekretion des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH), welches an Rezeptoren in der vorderen Hypophyse bindet und dort zur Ausschüttung von ACTH, dem adrenocorticotrophen Hormon, führt. ACTH verstärkt in der Nebennierenrinde die Synthese und Freisetzung von Cortisol, bzw. Corticosteron in der Ratte. Cortisol ist ein Steroidhormon, welches im Organismus sowohl schnelle als auch langfristige, genomische Effekte ausübt. Im Rahmen von Stress kommt es in der Folge zu katabolen Prozessen wie einem erhöhten Puls, Blutdruck, Grundumsatz, erhöhter Atemfrequenz, dem Abbau von Proteinen und Lipiden sowie einer Suppression des Immunsystems und der Fertilität. Diese Mechanismen stellen dem Körper Energie bereit um agieren bzw. reagieren zu können. Nach Beendigung eines Stressors wird die Sekretion von Cortisol über einen negativen Rückkopplungsmechanismus beendet und der Organismus geht über in einen Ruhezustand (Sterner & Kalynchuk, 2010). Vor allem im Hypothalamus und dem Hippocampus gibt es eine hohe Dichte an Glucocorticoidrezeptoren, über welche die Inhibition der HHN-Achse vermittelt wird. Die Amygdala hingegen hat einen

verstärkenden Einfluss auf die Aktivität der HHN-Achse, was die erhöhte Sekretion von Cortisol bei Angstempfinden begünstigt (Brown, Rush & McEwen, 1999).

Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigen sich bei depressiven Patienten massive Veränderung der Achsenaktivität sowie der negativen Rückkopplung. Diese Veränderungen treten bereits prämorbid auf, so dass ihnen eine ursächliche, wenn nicht sogar auslösende Funktion zukommt (Pariante & Lightman, 2008). Die Ausschüttung von Cortisol ist bei etwa 80% aller Patienten chronisch erhöht (Thomson & Craighead, 2008) und hat keine circadiane Rhythmizität (Stokes, 1995; Cowen 2010). Ebenso tritt keine negative Rückkopplung auf. Korrelative Studien zeigen stark positive Zusammenhänge zwischen klinischen Depressionsscores und dem Cortisolspiegel von Patienten (Hinkelmann, Moritz, Botzenhardt, Muhtz, Wiedemann, Kellner & Otte, 2012), sowie zwischen Cortisol und Anhedonie bzw. einer Insensitivität gegenüber Belohnung, die bei Depressionen stark ausgeprägt ist (Davidson, Pizzagalli, Nitschke, Putnam, 2002; Bogdan & Pizzagalli, 2006; Olausson, Kiraly, Gourley & Taylor, 2013). Die langfristig erhöhte Sekretion von Cortisol führt zu Beeinträchtigungen der Rückkopplung und den damit assoziierten Strukturen. So kommt es aufgrund der supraphysiologischen Glucocorticoidexposition zu einer Reduktion der Glucocorticoidrezeptoren im Hippocampus und Hypothalamus, Atrophien dieser Strukturen, reduzierter Neurogenese und einem Mangel an neurotrophen Faktoren wie etwa Neurotrophin oder dem brain-derived-neurotrophic factor (BDNF; McEwen, 1999a; 1999b; Malberg, Eisch, Nestler & Duman, 2000; Gold, Drevets & Charney, 2002). Die Amygdala zeigt eine erhöhte Aktivität und stärkeren Blutfluss (Drevets et al., 1992; Videbech, 2000; Whalen, Shin, Somerville, Mc Lean & Kim, 2002). Alle der genannten Veränderungen beeinträchtigen zusätzlich die Inhibition der HHN-Achse (McEwen, 1999a; 1999b; Mizoguchi, Ishige, Aburada & Tabira, 2003). Neben diesen Befunden gibt es weitere Interaktionen zwischen Glucocorticoiden und Depressionen. So zeigt sich ein hemmender Einfluss von Cortisol als auch CRH auf Monoamine und ihre Rezeptoren (Pacak et al., 2002; Kling, Mjörndal & Rantapää-Dahlqvist, 2013). Einen weiteren Beleg für die ursächliche Rolle von Hypercortisolismus bei Depressionen liefern Untersuchungen von Patienten mit dem Cushing-Syndrom, welche chronisch erhöhte Cortisolwerte aufgrund von Tumoren etwa der Nebennierenrinde haben. So zeigen diese Patienten ähnliche hirmorphologische und funktionelle Veränderungen, wie auch eine hohe



Komorbiditätsrate zu Depressionen von etwa 60% (Sapolsky, 2000). Nach erfolgreicher Dissektion der Tumore remittieren sowohl die Depressionen als auch die funktionellen Defizite.

So wie die Veränderungen der HHN-Achse bereits prämorbid zur Depression auftreten, geht ihre Wiederherstellung ebenfalls der Remission einer depressiven Symptomatik durch Pharmakotherapie zeitlich voraus (Sachar, 1976). Dies wird im klinischen Bereich genutzt, um die Effektivität der eingeleiteten antidepressiven Behandlung bei Patienten mit dysfunktionaler HHN-Achse vorhersagen zu können (Zobel, Nickel, Sonntag, Uhr, Holsboer & Ising, 2001; Ising et al., 2007; Bhagwagar & Cowen, 2008). Innerhalb der zwei- bis dreiwöchigen Wirklatenz des Antidepressivums kommt es bereits vorab zu einer Linderung des Hypercortisolismus und einer Wiederherstellung des Rückkopplungsmechanismus. Tritt dies nicht ein, so wird häufig ein Präparatwechsel durchgeführt. Neben der Regulation der Achsenaktivität und der Wiederherstellung eines circadianen Rhythmus kommt es unter antidepressiver Medikation zu einem Anstieg von Neurogenese und Neurotrophinen in den hippocampalen Gebieten sowie einer Inhibition der Amygdala (Malberg et al., 2000; Thomson & Craighead, 2008). Hier scheint vor allem der serotonerge 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor eine vermittelnde Rolle zu spielen, da diese Effekte bei Mausmutanten ohne 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor blockiert sind (Santarelli, et al., 2003). 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten wie etwa Olanzapin zeigen zudem in Untersuchungen antidepressive Effekte (Bobo & Shelton, 2009; Chen, Gao & Kemp, 2011; Sagud et al., 2011). Ähnliche Resultate erzielen Substanzen, welche spezifisch auf die HHN-Achse einwirken. So haben etwa CRH- und Glucocorticoid-Rezeptor-Antagoisten als auch Cortisol-Synthese-Inhibitoren einen regulierenden Einfluss auf die HHN-Achse, steigern die Neurogenese und wirken antidepressiv (Holsboer 2001a; 2001b; Thomson & Craighead, 2008; Berton & Nestler, 2006).

Im Hinblick auf das in dieser Dissertation validierte Tiermodell ist die Verbindung zwischen Stress und Depressionen an zwei Stellen wesentlich. Zum einen zeigt sich eine besondere Relevanz für geriatrische Depressionen, da es mit zunehmendem Alter nicht nur zu einer stärkeren Häufung von stressreichen Erlebnissen und insbesondere Verlusten kommt (Kraaij et al., 2002; Cairney & Krause, 2008; Fiske et al., 2009), sondern auch zu neurobiologischen Veränderungen im Organismus, welche diesen sensibler gegenüber den Langzeitfolgen von Stress machen und die

Stressresistenz senken (Blazer, 2003; Mroczek & Almeida, 2004; Miller & O'Callaghan, 2005; Topic et al., 2008a; 2008b). Sowohl beim Menschen als auch bei Ratten ist die Seneszenz begleitet von basal erhöhten Glucocorticoidspiegeln (Sapolsky, Krey & McEwen, 1986; Deuschle et al., 1997; Seeman, Singer, Wilkinson & McEwen, 2001), stärkeren hormonellen Reaktionen auf Stressoren (Gotthardt, Schweiger, Fahrenberg, Lauer, Holsboer & Heuser, 1995) und einer eingeschränkten negativen Rückkopplung (Sapolsky, Krey & McEwen, 1983). Die Menge an Neurotrophinen im Gehirn ist signifikant reduziert und die Neurogeneserate somit beeinträchtigt. Trotz dieser Erkenntnisse gibt es kein Tiermodell der Depression, welches die besonderen Umstände des Alters inhaltlich berücksichtigt und sensitiv gegenüber Alterseffekten ist. Im Gegensatz dazu wurden die neurobiologischen Veränderungen und Verhaltenseffekte von chronischem Stress und Corticosteron jedoch erfolgreich in Tiermodelle transferiert und untersucht. Diese sollen neben weiteren gängigen Depressionsmodellen und den zugrunde liegenden Gütekriterien von Tiermodellen im nächsten Abschnitt vorgestellt und diskutiert werden.

### **2.1.2 Tiermodelle der Depression**

Der große Bedarf an geeigneten Tiermodellen zur Erforschung der Ursachen und pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten der Depression hat eine beachtliche Anzahl an Modellen und Verhaltenstests für Mäuse und Ratten hervorgebracht (Deussing, 2006; Refojo & Deussing, 2012). Neben den hier diskutierten verhaltensbasierten Modellen gibt es ebenfalls genetische Modelle und speziell gezüchtete Tierstämme (z.B. Overstreet, Friedman, Mathé & Yadid, 2005), auf die hier nicht näher eingegangen werden kann. Zum Überblick empfehlen sich Arbeiten von Krishnan & Nestler (2011), Deussing (2006), Nestler & Hyman (2010) oder Razafsha et al. (2013).

Da die Depression ein heterogenes klinisches Bild aufweisen kann und auch die Genese multifaktoriell bedingt ist, können sich Tiermodelle bzw. Tests stets nur auf isolierte Aspekte wie etwa spezielle Symptome oder ursächliche Faktoren konzentrieren, jedoch nie das vollständige Abbild einer unipolaren Depression im Menschen umfassen. Diese Limitation gilt stets bei der Anwendung von Tiermodellen in der Forschung, jedoch im Speziellen bei psychischen Erkrankungen, welche sich

verstärkt in Emotionen und Kognitionen äußern, die im Tier nicht absolut messbar sind (Cryan, Markou & Lucki, 2002). Da es nicht möglich ist, Stimmungssymptome wie Anhedonie, Hoffnungslosigkeit, Suizidalität oder Freudlosigkeit zu erfragen, müssen diese über beobachtbares Verhalten operationalisiert werden, um eine qualitativ und quantitativ messbare Einheit darzustellen. Hierbei sollte jedoch nicht auf willkürliche Verhaltensausrägungen zurück gegriffen werden, sondern Tiermodellen und dem zu messenden Verhalten liegen Gütekriterien zugrunde, welche es valide, also aussagekräftig und gültig, machen (McKinney & Bunney, 1969; Willner, 1984; Willner, 1995). Zu unterscheiden sind hierbei die prädiktive Validität (Kriteriumsvalidität) von der Inhalts- und Konstruktvalidität. Auch Augenscheinvalidität, die Plausibilität und offenscheinige Gültigkeit des Modells und der Methodik im Hinblick auf Verhalten und neurobiologische bzw. pathophysiologische Faktoren, muss stets in Betracht gezogen werden (Willner, 1984; Nestler & Hyman, 2010). Generell ist den meisten Tiermodellen gemein, dass sie über die Anwendung eines unvermeidbaren und unvorhersehbaren Stressors oder angstausslösender Situationen Hilflosigkeit, Aufgabe und Aversion induzieren. Die Tiere verfallen in Passivität und zeigen ein eingeschränktes Verhaltensspektrum als Konsequenz der Unvermeidbarkeit. Viele Verhaltenstests der Depression beruhen vor allem auf prädiktiver Validität. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das gemessene Verhalten deshalb als Operationalisierung von Depressivität gültig ist, da es sich durch die Applikation von Antidepressiva verändert. Es wird angenommen, dass die Wirksamkeit im Menschen somit vorausgesagt werden kann. Beispiele hierfür sind der Forced Swim Test (FST; Porsolt, Le Pichon & Jalfre, 1977), der Tail-Suspension-Test (TST; Steru, Chermat, Thierry & Simon, 1985) oder auch die olfaktorische Bulbektomie (Cairncross, Cox, Forster & Wren, 1978). Beim FST wird das Tier an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einen mit Wasser gefüllten Zylinder, aus dem es nicht entkommen kann, platziert. Vor allem am zweiten Tag kommt es nach anfänglichen erfolglosen Fluchtversuchen zu einer immobilen Passivität und das Tier lässt sich im Wasser treiben. Beim TST werden Mäuse am Schwanz in der Luft aufgehängt. Auch hier kommt es nach kurzer Zeit zu Verhaltenspassivität und die Tiere verweilen bewegungslos. In beiden Tests wird die Immobilität des Versuchstiers als Depressionsmaß betrachtet, da sie durch die chronische oder auch akute Gabe von Antidepressiva reduziert wird. Hierbei steht

die prädiktive Validität, also das Ansprechen auf etablierte Psychopharmaka, im Vordergrund. Nachteil solcher Test, die nur auf dieser Form der Validität beruhen, kann das Aufdecken falsch positiver bzw. falsch negativer Befunde sein, wenn noch unbekannte Substanzen getestet werden (Porsolt, Anton, Blavet & Jalfre, 1978; Willner, 1984; Borsini & Meli, 1988). So reduzieren auch solche Präparate die Immobilität, welche beim Menschen nicht antidepressiv wirken, und andersherum. Zudem zeigen einige dieser Tests Verhaltenseffekte nach der akuten Gabe von Antidepressiva, was nicht der Wirklatenz und der Notwendigkeit einer chronischen Behandlung zur Remission im Menschen entspricht (vgl. Detke, Johnson & Lucki, 1997). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse und die inhaltliche Nähe zur Depression im Menschen sind also nur schwach, wodurch der FST und TST mehr als Screening-Tests für monoaminerge Antidepressiva denn als ganzheitliche Modelle betrachtet werden können (Refojo & Deussing, 2012). An dieser Stelle wird die Bedeutung von Inhalts- und Konstruktvalidität deutlich, also dem Anspruch, dass ein Tiermodell sowohl die bestmögliche Operationalisierung eines Konstrukts, etwa Freudlosigkeit, in ein messbares Verhalten bietet und dieses Verhalten das Konstrukt gut, plausibel und möglichst vollständig abbildet. Zudem soll das Modell ebenfalls die neurobiologischen Veränderungen und auslösenden Faktoren einer Depression einbeziehen und aufweisen. Dieser Notwendigkeit versuchen viele Tiermodelle nachzukommen, exemplarisch sind hier das Modell des Chronic Mild Stress (CMS; Willner, 2005) und der chronischen Verabreichung von Corticosteron erwähnt (Gregus, Wintink, Davis & Kalynchuk, 2005; Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006; Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006; Gourley & Taylor, 2009; Sterner & Kalynchuk, 2010). Beide Modelle bilden durch chronischen Stress bzw. die chronische Verabreichung von Glucocorticoiden eine Ursache der Entstehung von Depressionen nach (s. 2.1.1). Im CMS Modell wird den Tieren über den Zeitraum mehrerer Wochen Stress zugefügt in Form von nassem Streu, Lärm, heller Beleuchtung ohne Dunkelphase oder dem Geruch von natürlichen Feinden. Das zweite Modell beruht auf einem ähnlichen theoretischen Ansatz, hierbei wird jedoch über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen exogenes Corticosteron über Injektionen, Trinkwasser, osmotische Minipumpen oder implantierte Pellets verabreicht ohne die Tiere zusätzlich zu stressen. Es wird somit ein künstlich hoher Spiegel an Stresshormonen induziert, welcher die Folgen von chronischem Stress imitiert. Beide Modelle

erzeugen bei Nagern einen depressiven Phänotypen, der sich reliabel in vielen Tests zur Messung depressiven Verhaltens abbildet und zusätzlich auch sensitiv gegenüber antidepressiver Medikation ist (Willner, 2005). Zudem lassen sich hirmorphologische und physiologische Veränderungen nachweisen, die denen im Menschen ähnlich sind, wie etwa hippocampale Atrophie und ein Mangel an neurotrophen Faktoren (Schaaf, de Jong, de Kloet & Vreugdenhil, 1998; Dranovsky & Hen, 2006; Sterner & Kalynchuk, 2010). Die chronische Verabreichung von ACTH oder Corticosteron wird ebenfalls als Modell therapieresistenter Depressionen angewandt, da hier Substanzen wie etwa Ketamin antidepressive Wirkprofile zeigen, die in Screening-Tests nicht aufgezeigt werden können, jedoch bei TRD klinisch wirksam sind (Samuels et al., 2011; Walker et al., 2012; Koike, Iijima & Chaki, 2013). Somit kann das Modell auch für die Erforschung und Therapie geriatrischer Depressionen, denen oft chronischer Stress und eine Vielzahl an Verlusten und Lebensereignissen sowie ein geringes Ansprechen auf Antidepressiva zugrunde liegt, von Relevanz sein (Bonner, 1995).

Zusammenfassend wird deutlich, dass einzelne Tests zur Erhebung eines depressions-ähnlichen Verhaltens zwar wichtig sind um Phänotypen zu klassifizieren und als Screening-Tests zu fungieren, dass es aber generell umfassenderer, gesamtheitlicher Modelle bedarf, die theoriegeleitet die Ursachen einer Depression nachstellen und einen Phänotypen erzeugen, dessen Verhalten valide die Symptome einer Depression operationalisiert. Gerade in Anbetracht der hohen Anzahl an Patienten, die nicht auf die bisherigen Behandlungsmethoden ansprechen und die steigende Anzahl geriatrischer Depression bedarf es neuer Modelle, die sich ausführlicher mit Ursachen auseinandersetzen und Verhaltensweisen aufdecken, die reliabel sind und eine translationale Vorhersagbarkeit für die antidepressive Wirkung einer Substanz gewährleisten. Trotzdem muss neben diesen Ansprüchen auch weiterhin ein sorgsamer und sparsamer Umgang mit Versuchstieren sichergestellt sein, so wie eine einfache und effiziente Durchführbarkeit dieser Tests innerhalb verschiedener Laboratorien.

## 2.2 Extinktions-induzierte Depression

Das Erleben von Verlusten, Stress und das Ausbleiben von ehemals erfahrener Verstärkung sind bekannte auslösende und aufrechterhaltende Faktoren einer Depression. Obwohl diese Faktoren offensichtlich sind, wurden sie bisher nicht in ein Tiermodell der Depression integriert. Im Folgenden soll das Modell der Extinktions-induzierten Depression (EID) eingeleitet und die dahinter stehenden tierexperimentellen Befunde und Theorien aus dem Humanbereich erläutert werden. Da in diesem Modell mit operanten Versuchsplänen und Konditionierung gearbeitet wird, werden zunächst einleitend einige wesentliche Grundbegriffe und Konzepte der instrumentellen Konditionierung dargestellt.

### 2.2.1 Grundlagen operanter Konditionierung und Verstärkung

Grundlegend werden zwei Formen der Konditionierung voneinander unterschieden. Bei der **klassischen Konditionierung** wird ein neutraler Stimulus zeitlich nah mit einem unkonditionierten Reiz gepaart, welcher eine unkonditionierte (reflexartige) Reaktion zur Folge hat. Schließlich löst der ehemals neutrale Stimulus diese Reaktion ebenfalls aus. Ein Beispiel hierfür stellen die ursprünglichen Experimente Pawlows dar (Yerkes & Morgulis, 1909), innerhalb derer bei Hunden ein Glockenton so lange mit der Darbietung von Futter gepaart wurde, bis auch der Glockenton alleine einen starken Speichelfluss auslöste. Der neutrale Stimulus wird hierbei zu einem konditionierten Stimulus, die unkonditionierte Reaktion des Speichelflusses wird zu einer konditionierten Reaktion. Die **operante** oder auch **instrumentelle Konditionierung** beschäftigt sich hingegen mit dem Erlernen komplexer, nicht-reflexartiger Verhaltensweisen und den Bedingungen, unter denen Verhalten auftritt bzw. ausbleibt. Sie beruht auf der Theorie, dass Organismen in der Lage sind, ein Verhalten zu erlernen, wenn dieses durch seine Konsequenzen verstärkt wird. Führt ein Verhalten zu einem positiven emotionalen Status oder zu einer Belohnung, so steigt die Wahrscheinlichkeit an, dass dieses Verhalten in einer ähnlichen Situation erneut gezeigt wird. Thorndike (1898; 1927) bezeichnete dies als **Gesetz des Effekts**. Ein Beispiel einer operanten Konditionierung ist das Drücken eines Hebels bei Nagern. Wird Ratten in einer operanten Versuchsanordnung („Problemkäfig“ nach Thorndike & Skinner) ein Hebel dargeboten, so explorieren sie diesen zunächst.

Sobald es zu einem zufälligen Herunterdrücken des Hebels kommt, erhält das Tier unmittelbar eine Futterpille. Diese dient als **positiver Verstärker**. Wenn der Verstärker nun **kontingent** und zeitlich nah zu weiteren Hebeldrücken dargeboten wird, stärkt sich die Assoziation zwischen dem Verhalten und der Belohnung. Die Ratte wird zunehmend häufiger den Hebel drücken um eine Belohnung zu erhalten und die Auftretenswahrscheinlichkeit steigt an. Damit ein Tier an das erforderte operante Zielverhalten herangeführt wird, kann ein **Shaping** oder **Magazin-Training** durchgeführt werden. Hierbei wird durch den Experimentator jede sukzessive Annäherung an das Zielverhalten, das Operandum (z.B. Hebel) oder die Futterluke durch Gabe einer Futterpille verstärkt, bis das erwünschte Verhalten ausgeführt wird. Typische positive Verstärker haben hohen hedonistischen Wert. So können nicht nur Stimuli mit allgemeiner biologischer Relevanz wie etwa Nahrung, Schlaf, Sexualität oder Zugang zu Ressourcen belohnenden Charakter haben (Berridge & Kringelbach, 2008), sondern auch individuelle Faktoren wie etwa Zugang zu Zigaretten oder Ethanol. Auch **negative Verstärkung**, also das Ausbleiben oder die Beendigung eines aversiven Stimulus durch ein gezeigtes Verhalten, erhöht dessen Auftrittswahrscheinlichkeit. In diesem Fall könnte ein Tier durch Drücken des Hebels zum Beispiel einen lauten Ton beenden oder einen Elektroschock verhindern. Der Prozess, in dem die Assoziation zwischen Verhalten und Verstärkung erlernt wird, bezeichnet man als **Akquisition**. Das Kriterium, wie oft oder zu welchem Zeitpunkt ein Verhalten zur Erlangung eines Verstärkers gezeigt werden muss, kann über eine Vielzahl an **Verstärkerplänen** moduliert werden. So gibt es Pläne, bei denen das Verhalten mit einer fixen (fixed ratio FR) oder variablen **Quote** (VR) gezeigt werden muss, oder aber erst nach Ablauf eines festen oder variablen **Zeitintervalls** (FI, VI) erneut verstärkt wird. Anwendung finden solche und komplexere Verstärkerpläne etwa zur Messung von Motivation, Impulsivität oder dem Arbeitsgedächtnis bei Ratten. Wann ein Verstärker verfügbar ist, kann über ankündigende **Hinweisreize** wie etwa Lichter vermittelt werden. So kann ein Tier erlernen, dass es nur beim Aufleuchten des Lichts einen Verstärker erhalten wird, wenn es den Hebel drückt. Bei instrumenteller Konditionierung kommt daher zur Ausbildung von Ziel- und Signalaufspürungsverhalten bei Versuchstieren (Boakes, 1977; Kearns, Gomez-Serrano, Weiss & Riley, 2006). **Zielaufspürung** („goal tracking“) bezeichnet Verhaltensweisen, welche sich auf die Verstärkerquelle, in diesem Falle also die

Futterluke, richten. **Signalaufspürung** („sign-tracking“) hingegen beschreibt Verhalten und Aufmerksamkeit gegenüber den Belohnungs-assoziierten Reizen, welche die Verstärkung ankündigen. Dies kann der Hebel oder aber auch das Hinweislicht sein. Signalaufspürung bildet sich aus, da diese Reize aufgrund ihres Vorhersagepotenzials selbst zu einem verstärkenden Reiz werden (Berridge & Robinson, 2003). Bleibt ein Verstärker aus, obwohl er angekündigt und das erlernte Verhalten gezeigt wurde, bezeichnet man dies als **Extinktion**. Langfristiges Ausbleiben führt zu einer reduzierten Auftretenswahrscheinlichkeit des Verhaltens bis zur endgültigen Löschung. Vor allem Zielaufspürungsverhalten ist im Kontext Extinktions-induzierter Depressionen von Relevanz, da eine Reduktion in Häufigkeit und Dauer auf Rückzug von der ehemaligen Verstärkerquelle schließen lässt und somit eine Variable zur Erhebung von Rückzugsverhalten sein kann.

Viele, auch motorische, Hirnregionen sind an der Ausbildung instrumenteller Verhaltensweisen beteiligt. Zentral für das Empfinden von Belohnung und Verstärkung sind sowohl beim Tier als auch beim Menschen jedoch das mesolimbische dopaminerge System, welches das ventrale tegmentale Areal über das mediale Vorderhirnbündel mit dem Nucleus accumbens (NAc) verbindet (Moore & Bloom, 1978; Nestler & Carlezon, 2006). Die dortige Freisetzung von Dopamin (DA) führt zu einer Verstärkungswirkung von Verhalten (Salamone & Correa, 2012). Werden dopaminerge Rezeptoren im NAc geblockt, so hat ein Reiz bzw. eine Substanz keine verstärkende Wirkung auf Verhalten (Stellar, Kelley & Corbet, 1983). Auch die belohnende Wirkung vieler Suchtmittel wie Amphetamin oder Kokain, sowie natürlicher Verstärker wird über einen Anstieg der Dopaminfreisetzung im NAc vermittelt (Spannagel & Weiss, 1999; Salamone & Correa, 2012). Sowohl die Amygdala als auch der PFC spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Bewertung eines Verstärkers bzw. bei der Beurteilung, ob das gezeigte Verhalten eine Belohnung wahrscheinlich macht (Mesulam, 1986). Beide Strukturen haben efferente Verbindungen zum ventralen tegmentalen Areal und beeinflussen die Aktivität des mesolimbischen Systems und somit die Dopaminausschüttung im NAc (Kelley & Berridge, 2002; Nestler & Carlezon, 2006). Dieser wird in eine Kern- und Schalenregion unterteilt, die jeweils distinkte Funktionen und Rollen innerhalb des Belohnungssystems einnehmen und Efferenzen zu verschiedenen Hirnregionen haben (Corbit, Muir & Balleine, 2001; DiChiara, 2002; Zahm, 2000; Chang & Holland,



2013). Die Verbindung zwischen Depressionen und dem mesolimbischen dopaminergen System ist geprägt von einer verstärkten Insensitivität gegenüber der Aufdeckung und belohnenden Saliens von Verstärkern (Pizzagalli, Jahn & O'Shea, 2005), sowie reduziertem Antrieb und Motivation (Dunlop & Nemeroff, 2007). Bildgebende Untersuchungen zeigen, dass depressive Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen weniger Aktivierung des NAc bei Belohnungsdarbietung zeigen (Pizzagalli et al., 2009). Substanzen, welche die dopaminerge Transmission erhöhen, zeigen im Tierversuch antidepressive Eigenschaften, ebenso wie eine gezielte Erhöhung der dopaminergen Verfügbarkeit im NAc durch physikalische Stimulation (Willner, 1997). Neben der Verfügbarkeit von DA als Transmitter tragen auch Veränderungen der Sensitivität und Anzahl an Dopaminrezeptoren im NAc zur Genese der Depression bei (D'Aquila, Collu, Gessa & Serra, 2000).

### **2.2.2 Auswirkungen von Verstärkerentzug**

Der Entzug oder das Zurückhalten eines erwarteten Verstärkers, unabhängig davon, ob die Verstärkung positiv oder negativ war, ist für einen Organismus aversiv und stressreich (Papini & Dudley, 1997; Papini, 2003). Zwar wird das Verhalten, welches vormals zur Verstärkung geführt hat, initial noch gezeigt während der Extinktion, es tritt jedoch zunehmend seltener auf und weicht alternativen Verhaltensweisen oder gänzlicher Passivität. Die Unkontrollierbarkeit der Situation ähnelt dem Zustand der gelernten Hilflosigkeit (Seligman, 1972). Viele Untersuchungen, die sich mit den Effekten von Extinktion beschäftigen, deuten spezieübergreifend darauf hin, dass es zu einer starken Aktivierung der HHN-Achse und erhöhter Ausschüttung von Cortisol/Corticosteron kommt (Coover, Goldman & Levine, 1971a; 1971b; Davis, Memmott, Macfadden & Levine, 1976; Dantzer, Arnone & Mormede, 1980; Coe, Stanton & Levine, 1983; Kawasaki & Iwasaki, 1997). Zudem treten häufig aggressive Verhaltensweisen und Beißen gegenüber Artgenossen oder aber Gegenständen wie etwa dem Hebel auf, welche mit dem instrumentellen Verhalten unmittelbar in Verbindung stehen (Azrin et al., 1966; Hutchinson, Azrin & Hunt, 1968; Arnone & Dantzer, 1980; Dantzer, Arnone & Mormede, 1980; Tomie, Carelli & Wagner, 1993; Haskell, Coerse & Forkman, 2000). Auch kommt es zu Fluchtversuchen aus der Versuchsanordnung (Daly 1974). Sowohl bei Tauben, Ratten (Thompson & Bloom,

1966), als auch Schweinen (Arnone & Dantzer, 1980; Dantzer et al., 1980) lassen sich diese Verhaltensweisen beobachten. Extinktion führt neben Stress und Aggressivität jedoch auch zu erhöhter Ängstlichkeit (Schulz, Huston, Buddenberg & Topic, 2007; Komorowski et al., 2012). Neuere Untersuchungen weisen einen signifikant erhöhten Konsum von Ethanol mit anxiolytischen Effekten nach, wenn dieser Ratten nach einem Extinktionsdurchgang angeboten wird (Manzo et al., 2013). Der Zusammenhang zwischen Ethanolkonsum und Ängstlichkeit hat im Hinblick auf Extinktions-induzierte Depressionen eine wichtige Rolle, da es neben der hohen Komorbidität zwischen Angststörungen und Depressionen (Sartorius, Üstün, Lecrubier & Wittchen, 1996; Lenze 2003) hohe Komorbiditätsraten zu Abhängigkeitserkrankungen, hierbei vor allem Alkohol, gibt (Grant & Harford, 1995). Der Entzug einer Futterbelohnung erhöht depressions-ähnliche Verhaltensweisen im FST und reduziert den Konsum einer Zuckerlösung (Iemolo et al., 2012). Experimentell induzierte Läsionen der Amygdala oder des NAc interagieren mit den Verhaltenseffekten von Extinktion bzw. des partiellen Ausbleibens eines Verstärkers, was einen weiteren Beleg für die Rolle dieser Strukturen bei der anreizenden Wirkung eines Verstärkers darstellt (Baxter & Murray, 2006; Bueno, Judice-Daher & Tavares, 2012; Judice-Daher & Bueno, 2013). Diese Befunde zeigen einen relevanten Zusammenhang zu Depressionen und der Rolle des NAc beim Menschen, da auch dort die dopaminerge Transmission im NAc eingeschränkt ist, was mit einer reduzierten Empfänglichkeit und Motivation für Verstärkung einher geht (Henriques & Davidson, 2000; Nestler & Carlezon, 2006). Antidepressiva hingegen können die Extinktionsresistenz erhöhen (Flaherty, 1990; Schulz et al., 2007a) und sowohl Ängstlichkeit als auch depressions-ähnliches Verhalten in Folge von Extinktion reduzieren, wie die in dieser Dissertation vorgestellten Befunde belegen. Zusammenfassend zeigt sich somit, dass Extinktion im Tiermodell zu neurobiologischen und emotionalen Zuständen führt, welche auch im Rahmen einer unipolaren Depression auftreten. Im nächsten Kapitel wird deshalb erläutert, wie sich Extinktion und Verstärkerentzug beim Menschen darstellen und was die emotionalen sowie kognitiven Konsequenzen sein können.

### **2.2.3 Das Modell der Extinktions-induzierten Depression**

Wie bereits vorab beschrieben, kommt es bei tierischen Organismen im Laufe einer langfristigen Extinktion zu einer Abnahme des ehemals verstärkten Verhaltens, welches mit Hilflosigkeit und Einschränkungen der Verhaltensvariabilität einher geht. Der Verlust von Verstärkern oder aber eine reduzierte Verfügbarkeit von Verstärkung spielt in der Genese und Aufrechterhaltung der unipolaren Depression eine wesentliche Rolle (Lewinsohn, 1974), wurde jedoch bisher nicht in Tiermodellen berücksichtigt. Auch im Menschen führt Extinktion oder aber Verzögerung einer erwarteten Belohnung zu erhöhter Ausschüttung von Cortisol (Ott et al., 2011), Aggressivität (Kelly & Hake, 1970) oder aber Anhedonie (Lago & Kosten, 1994). Bereits frühe kognitive und verhaltenstherapeutische Theorien zur Entstehung der Depression gehen davon aus, dass ein unkontrollierbares Ausbleiben von Verstärkung zu Verzweiflung, Hilflosigkeit, Anhedonie und vor allem Rückzugsverhalten führt (Ferster, 1973; Lewinsohn, 1974). Laut Theorie erfährt der Mensch hierbei, dass er durch sein Verhalten keine Bestärkung erlangen kann und keinen Einfluss auf den Entzug von Verstärkern hat. Retrospektive Untersuchungen stützen diese Befunde, indem sie aufzeigen, dass es bei vielen Patienten prämorbid zum Ausbruch einer depressiven Episode eine Häufung einschneidender, unkontrollierbarer Lebensereignisse gibt. Solche Stressoren wie etwa familiäre Todesfälle, Krankheit, Verlust des Arbeitsplatzes oder die Beendigung einer Beziehung, aber auch fehlende Verstärkung durch wenige soziale Kontakte oder Aktivitäten stellen Verstärkerverlust bzw. eine reduzierte Verfügbarkeit von Verstärkern dar (Brown, Harris & Hepworth, 1994; Kendler, Karkowski & Prescott, 1999; Mazure, 1998; Hammen, 2005). Tendenziell zeigt sich ein verstärktes Vorkommen solcher Faktoren bei älteren Menschen, was sie neben den angesprochenen neurobiologischen Veränderungen zusätzlich anfälliger für Depressionen macht (Bruce, 2002; Kraaij, Arensman & Spinhoven, 2002; Cairney & Krause, 2008). Lewinsohn (1974) konnte in Untersuchungen gemäß der Theorie zeigen, dass depressive Patienten aufgrund ihrer Symptomatik und dem Vermeidungs- bzw. Rückzugsverhalten, das sie zeigen, seltener erfreulichen Aktivitäten nachgehen und somit innerhalb ihrer Erkrankung zunehmend weniger frequent positive Verstärkung erhalten (Lewinsohn & Graf, 1973). Dieser Umstand erhält die Depressionen aufrecht, so dass es zur Entstehung eines Kreislaufs aus

Rückzug, Depressionen und Verstärkermangel kommt (Martell, Addis & Jacobson, 2001). Zudem korreliert der Grad an Depressivität positiv mit dem Ausmaß an Rückzugsverhalten bei Patienten (Ottenbreit & Dobson, 2004). Ausgehend davon ist auch heute noch der Aufbau von Aktivitäten und sozialen Kontakten ein zentraler Bestandteil der kognitiven Verhaltenstherapie (Beck, Rush, Shaw & Emery, 1979; Jacobson et al., 1996).

Basierend auf diesen Befunden wurde intensiv an einem Tiermodell der Extinktions-induzierten Depression (EID) gearbeitet, welches als Zielsetzung neben der Darstellung relevanter auslösender Faktoren vor allem die Aufdeckung von Verhaltensvariablen hat, welche sich in Folge der Extinktion verändern und gemäß den Anforderungen an Tiermodelle der Depression sowohl prädiktive als auch Konstrukt-, Augenschein- und Inhaltsvalidität besitzen. Zunächst soll ein Überblick über die Untersuchungen zur Extinktion negativer Verstärkung im Water Maze gegeben werden (Überblick bei Huston, Schulz & Topic, 2009). Abschließend werden Ansätze zur Extinktion positiv verstärkten Verhaltens vorgestellt und die dort erhobenen Variablen, welche eine EID operationalisieren können, sowie die Fragestellung dieser Dissertation erläutert.

### 2.2.3.1 EID nach negativer Verstärkung

Negative Verstärkung, die Möglichkeit einen aversiven Zustand oder Reiz durch ein gezeigtes Verhalten zu beenden, findet konzeptuell bereits in einigen Tiermodellen der Depression wie etwa der gelernten Hilflosigkeit und dem FST Anwendung. Beiden Paradigmen ist gemein, dass ein aversiver Zustand, hier ein Elektroschock oder aber das Schwimmen in kühlem Wasser, unkontrollierbar ist und unabhängig von gezeigtem Verhalten nicht beendet werden kann. In beiden Fällen führt dies innerhalb kurzer Zeit zu Verhaltenspassivität bzw. motorischer Immobilität, die auch dann bestehen bleibt, wenn es anschließend die Möglichkeit gibt, dem aversiven Reiz zu entkommen (Seligman, 1972). Ähnliche Effekte treten im Morris Water Maze auf (Morris, 1984). In der Akquisitionsphase lernen Ratten, in einem mit Wasser gefüllten runden Schwimmbecken eine Plattform zu finden, über welche sie aus dem Wasser entkommen können. Zwar wird dieses Paradigma in der Regel zur Untersuchung des räumlichen Gedächtnisses und der Lernfähigkeit von Nagern

eingesetzt, da diese jedoch ohne zusätzliche Anreize hochmotiviert die Plattform suchen und diese ansteuern, ist davon auszugehen, dass die Plattform als negativer Verstärker dient. Wird die Plattform in der Extinktion entfernt, so zeigen die Tiere zunächst ein verstärktes Suchverhalten in dem Quadranten des Beckens, in dem sich die Plattform vorab befand. Proportional zur Anzahl der Extinktionsdurchgänge kommt es jedoch zunehmend zu Immobilität und einem sich treiben lassen, das analog zur Immobilität im FST und TST als depressions-ähnliches Maß bewertet werden kann (Huston, Schulz & Topic, 2009). Immobilität wird sowohl von alten als auch adulten Tieren gezeigt, wobei alte Tiere trotz gleicher Lernleistung und Lokomotion ein höheres Ausmaß an Immobilität ausbilden (Schulz, Topic, de Souza Silva & Huston, 2004). Eine Behandlung mit Desipramin, einem SNRI, reduzierte signifikant die Dauer der Immobilität und erhöhte Fluchtverhalten (klettern), was dem Paradigma prädiktive Validität zuspricht (Willner, 1995; Schulz, Buddenberg & Huston, 2007a). Immobilität korrelierte bei adulten Tieren mit Veränderungen des Neurotransmitters NA und bei alten Tieren mit Dopamin sowie dem Metaboliten Dopac im ventralen Striatum (NAc; Schulz et al., 2004). Die Extinktions-induzierten Veränderungen der Monoamine in Verbindung mit der Zunahme von Immobilität legen eine Verbindung zu Depressivität nahe. Zudem zeigten unbehandelte alte Tiere stärkere Ängstlichkeit als adulte Tiere. Das Ausmaß der Angst korrelierte positiv mit der gezeigten Immobilität (Schulz, Buddenberg, Topic & Huston, 2007b). Veränderungen der Konzentration von Neurotrophinen (Topic, Huston, Nametskova, Zhu, Mohammed & Schulz, 2008a) und der messenger RNA für Mineral- und Glucocorticoidrezeptoren korrelierten altersabhängig ebenfalls mit Immobilität (Topic, Oitzl, Meijer, Huston & de Souza Silva, 2008b).

Abschließend können aus den geschilderten Untersuchungen einige wichtige Faktoren festgehalten werden, die für ein Tiermodell zur Untersuchung der Verhaltensindikatoren von EID nach positiver Verstärkung relevant sind. 1) die auslösenden Faktoren müssen Validität besitzen, 2) das depressions-ähnliche Verhalten muss sensitiv gegenüber antidepressiven Pharmaka sein, 3) das Verhalten sollte gemäß Theorie bei alten Tieren stärker und frühzeitiger auftreten als bei adulten Tieren, 4) die Extinktion sollte neurobiologische und -chemische Veränderungen analog zu Befunden der klinischen Depression bedingen und 5) Extinktion und Ängstlichkeit korrelieren.

### 2.2.3.2 EID nach positiver Verstärkung

Die Befunde zur EID nach negativer Verstärkung haben einen wichtigen Bestandteil zur Entwicklung eines Tiermodells der Depression geleistet, jedoch bedarf es einer Anpassung dieses Modells im Hinblick auf seine Validität. Oftmals ist die klinische Depression nicht von einem Entzug negativer Verstärkung wie etwa Krankheitsgewinn geprägt, sondern es liegt ein Mangel und Verlust positiver Verstärkung vor (Carvalho & Hopko, 2011). Die Extinktion von Verhalten, welches vormals zu Belohnung geführt hat, scheint somit plausibler im Hinblick auf die verursachenden Faktoren einer unipolaren Depression als der Entzug negativer Verstärkung. Zur Untersuchung im Tiermodell eignet sich die operante Extinktion eines appetitiven Verstärkers, da diese, wie bereits in Kapitel 2.2.2 geschildert wurde, aversiv, stressvoll und frustrierend ist und bei Organismen Verzweiflung und Hilflosigkeit auslöst (Papini & Dudley, 1997; Papini, 2003). Die operante Konditionierung von Verhaltensweisen, welche zu einer erwünschten Futterbelohnung führen, wird gemäß den Untersuchungen von B.F. Skinner (1938; 1953; 1963) in operanten Kammern durchgeführt. Auf der Grundlage vorheriger Ergebnisse sollte es während der Extinktion eines operanten Verhaltens, z.B. dem Druck eines Hebels oder einer Reaktion auf Hinweislichter, zu depressionsähnlichem Verhalten kommen, welches über den Verlauf der Extinktion zunimmt. So wie Immobilität im FST oder TST ein Indikator depressions-ähnlichen Verhaltens ist, sollen in einer operanten Kammer ebenfalls Verhaltensweisen identifiziert werden, welche eine EID operationalisieren können und prädiktive Validität zeigen. Bei depressiven Patienten kommt es aufgrund von Verstärkerverlust oftmals zu Rückzugsverhalten. Sie verlassen nur selten die Wohnung und pflegen wenig soziale Kontakte bzw. belohnende Aktivitäten. Rückzugsverhalten könnte auch im Tiermodell eine messbare Variable depressiven Verhaltens sein. So wie Tiere eine konditionierte Platzpräferenz für Orte ausbilden, an denen sie eine Belohnung erhalten (Carboni & Vacca, 2003), sollten sie während der Extinktion diese Orte vermeiden bzw. grösstmögliche Distanz zu ihnen einnehmen. Es ist bekannt, dass Antidepressiva die Extinktionsresistenz („resistance to extinction“ RTE) bei Ratten und somit ihre Reaktionsrate während der Extinktion erhöhen (Nikiforuk & Popik, 2009; Schulz et al., 2007a). Einige Verhaltensparadigmen verwenden operante Kammern bereits zur Erhebung von Motivation, Impulsivität oder Emotionalität bei

Ratten. Bei der progressiven Stufung („progressive ratio“) steigt die Anzahl der Hebeldrücke, die notwendig ist um eine Belohnung zu erhalten, kontinuierlich an. Wie lange ein Tier dieser Erhöhung des operanten Verhaltens nachkommt lässt Rückschlüsse auf die Belohnungsintensität des verwendeten Verstärkers zu. Hierbei wird vor allem der sogenannte „breakpoint“ gemessen, also der Punkt, an dem das Tier das Verhalten einstellt, da die erforderliche Rate für den Verstärker zu hoch ist. Bei differential-reinforcement-of-low-rate (DRL)-Verstärkerplänen führen hingegen speziell niedrige Frequenzen von operantem Verhalten zur Ausgabe einer Belohnung. Das Zeitintervall ist hierbei variabel. Wird das Verhalten vor Ablauf des Intervalls (z.B. zehn Sekunden) gezeigt, so bekommt das Tier keine Belohnung und das Intervall beginnt von vorn. Vorzeitiges Hebeldrücken führt also dazu, dass das Versuchstier nie eine Belohnung erhalten wird. Bei beiden Paradigmen zeigen sich Effekte von antidepressiven Substanzen auf das operante Verhalten. Der breakpoint für einen schwachen oder abgewerteten Verstärker ist bei der progressiven Stufung höher, wenn Tiere mit Citalopram behandelt wurden (Nikiforuk and Popik, 2009). Ebenso senken TZA die Verhaltensfrequenz bei DRL-Verstärkerplänen, so dass die Tiere häufiger eine Belohnung erhalten (O'Donnell & Seiden, 1983). Bisher wurde jedoch in solchen Paradigmen nicht untersucht, wie sich das vollständige Ausbleiben einer Belohnung und die Extinktion von Hebeldruckverhalten bei einem Verstärkerplan mit kontinuierlicher, unlimitierter Verstärkergabe auf Rückzugsverhalten und andere, potenziell depressions-ähnliche, Verhaltensweisen auswirkt.

In Anbetracht der Tatsache, dass appetitive Extinktion stark aversiv ist, ist von einem zunehmenden Rückzug von der Futterluke in einer operanten Kammer auszugehen. Dieser Indikator depressiven Verhaltens sollte durch eine antidepressive Behandlung modulierbar sein. Auch Verhaltensvariablen, die Ausdruck von Aggressivität, Agitiertheit oder Ängstlichkeit sind, können wichtige Erkenntnisse über die Auswirkungen von Extinktion nach positiver Verstärkung vermitteln und das Modell der EID erweitern.

### 2.3 Fragestellung

In dieser Dissertation wurde zunächst untersucht, ob der Entzug eines positiven Verstärkers, hier eine Futterbelohnung, analog zum Entzug negativer Verstärkung in einer operanten Kammer zu extinktions-induzierter Depressivität führt und welche Verhaltensvariablen diese adäquat abbilden. Überprüft wurde die Hypothese, dass es im Laufe der Extinktion, ähnlich wie im Menschen, zu räumlichem Rückzugsverhalten kommt, welches durch eine Behandlung mit den Antidepressiva Citalopram und Imipramin abgeschwächt werden kann.

Im Anschluss wurde in einer speziell angefertigten operanten Kammer die Erhebung von Rückzugsvariablen im Hinblick auf einen Distanzgradienten und die Abnahme von Zielaufspürung an der Futterluke erweitert. Der Einfluss einer chronischen Behandlung mit jeweils zwei Dosierungen des SSRI Citalopram und dem TZA Clomipramin auf Rückzugsverhalten wurde untersucht sowie nach Abschluss der Extinktion die Effekte auf ängstliches Verhalten im Offenfeld.

In der abschließenden Versuchsreihe wurden die Effekte und Interaktionen von Alter und einer chronischen Behandlung mit Corticosteron betrachtet. Mit zunehmendem Alter kann es zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Auswirkungen von Verstärkerverlust kommen, welche das Auftreten einer EID begünstigt. Eine chronische Glucocorticoidexposition bzw. chronischer Stress können ebenfalls einen potenzierenden Einfluss auf depressives Verhalten ausüben. Hierfür wurden sowohl adulte als auch 18 Monate alte Wistar-Ratten getestet. Eine serielle Blutabnahme nach akutem Fixationsstress sollte Aufschluss geben, ob es aufgrund des Alters und der Behandlung mit Corticosteron Veränderungen in der Aktivität und Funktionalität der HHN-Achse gibt.



### 3 Methodik

In diesem Abschnitt werden die Methoden und Paradigmen der vorliegenden Arbeit erläutert. Detaillierte Beschreibungen können dem Methodenteil der jeweiligen Publikation entnommen werden.

#### 3.1 Die duale Kammer

Die duale Kammer für Experiment I wurde durch einen Umbau zweier operanter Kammern gefertigt (je 29,5 x 28,5 x 23,5 cm, Coulbourn Industries®). Ausgehend von der Annahme, dass Extinktion für den Organismus aversiv ist und zu depressions-ähnlichem Verhalten führt, kann mit dieser Versuchsanordnung getestet werden, ob der Entzug einer Futterbelohnung räumliches Rückzugsverhalten und Vermeidung der Futterluke bedingt. In einer der Kammern, dem operanten Kompartiment, befinden sich eine Futterluke, ein Hinweislicht mit 3 farbigen Lämpchen, ein Hebel, sowie am oberen Ende eine Beleuchtungseinheit, welche die Kammer mit etwa einem Lux ausleuchtet (Coulbourn Industries®; s. Abb.1). Auf der Rückseite der Kammer ist ein Futtermagazin montiert, welches Futterpillen (BioServ® Dustless precision pellets) in die Luke ausgibt. Innerhalb der Futterluke ist ein Lichtsensor angebracht. Über Durchbrüche der dortigen Lichtschranke kann automatisch erhoben werden, wie oft ein Tier in die Futterluke schaut bzw. ob es die Belohnung entnimmt.

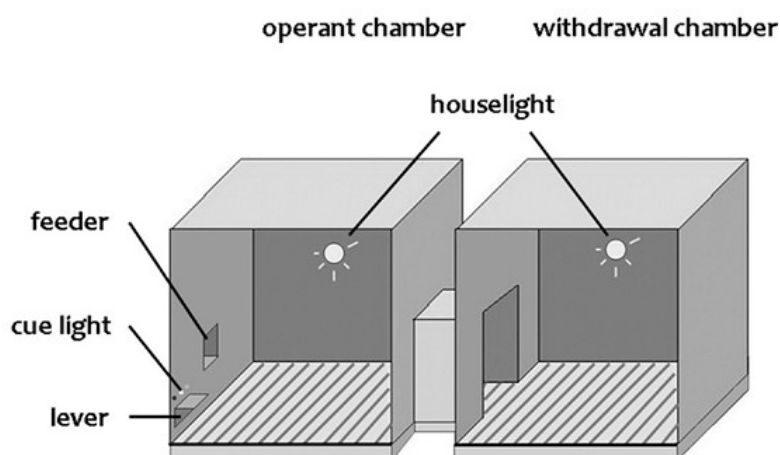


Abbildung 1. Schematische Darstellung der dualen Kammer. In der Mitte befindet sich ein Durchgang, welcher das operante mit dem Rückzugskompartiment verbindet.

Das Rückzugskompartiment ist hierbei jederzeit frei explorierbar und über einen Durchgangstunnel aus grauem Kunststoff (16 x 12,5 x 9 cm) mit dem operanten Kompartiment verbunden. Bis auf eine Beleuchtungseinheit, die ebenfalls mit einem Lux die Kammer ausleuchtet, ist das Rückzugskompartiment leer. Beide Kammern haben einen Gitterfußboden und werden von jeweils einer Kamera seitlich gefilmt. Die Ratten lernen im hier beschriebenen Paradigma, dass der Hebel bei Aufleuchten der Hinweislampen aktiv ist. Nach erfolgtem Hebeldruck erhalten sie zur Verstärkung eine Futterpille und das Hinweislicht bleibt so lange ausgeschaltet, bis die Belohnung aus der Futterluke entnommen wird. Erst dann beginnt ein neuer Zyklus. Das instrumentelle Verhalten wird in mehrtätigen Akquisitionsdurchgängen von 15 Minuten gefestigt. Vorab wird das Drücken des Hebels durch ein Shaping ausgeformt um das Tier schrittweise an das Verhalten heranzuführen. Über eine manuelle Steuerung des Futtermagazins wird in den ersten Tagen jede Annäherung oder Kontakt mit dem Hebel mit der Verabreichung von Futterpillen verstärkt, bis die Tiere eigenständig den Hebel drücken um eine Belohnung zu erhalten. In der Extinktion werden Hebeldrücke nicht weiter mit Futter verstärkt, obwohl die Hinweislichter aktiv sind. EID und Rückzug wurden hierbei operationalisiert über den Aufenthalt im Rückzugskompartiment während der Extinktion, sowie über Beißen des Operandums, also des Hebels, als wichtiger Bestandteil des vormals instrumentellen Verhaltens. Beide Verhaltensweisen, Rückzug und Beißen, sollten gemäß Hypothese zunehmend ausgeprägter auftreten während der Extinktion. Zusätzlich können in dieser Versuchsanordnung die vertikale Aktivität (Aufrichten) sowie Putzen manuell erhoben werden.

### **3.2 Die verlängerte operante Kammer**

Die verlängerte Kammer (s. Abb.2) wurde als Weiterentwicklung der dualen Kammer in Experiment II und III eingesetzt. Sie ist eine Maßanfertigung aus Kunststoff, welche eine vielseitige Erhebung von Rückzugsverhalten während der Extinktion erlaubt. Mit einer Länge von 72cm ist sie mehr als doppelt so lang als reguläre operante Boxen. Im Vergleich zur dualen Kammer gibt es keinen Durchgang zwischen dem operanten und dem Rückzugskompartiment, da sich in vorangegangenen Studien bei Versuchstieren die Tendenz zeigte diesen als

Aufenthaltort aufgrund der Dunkelheit und thigmotaktischen Stimulation zu bevorzugen. Die modulare Ausstattung der Kammer ist äquivalent zur dualen Kammer, jedoch wird im Gegensatz zu Experiment I nicht mit instrumentellem Hebelverhalten gearbeitet. Stattdessen werden in dieser Apparatur fixe, freie Intervall-Verstärkerpläne angewandt. Eine Paarung von Hinweislicht und sofortiger Verstärkergabe wird hierbei immer innerhalb eines bestimmten Intervalls dargeboten, ohne dass das Tier einen Hebel bedienen muss. In Exp. II wurde alle 90 Sekunden (FI 90) das Hinweislicht für drei Sekunden dargeboten, in Exp. III alle 30 Sekunden (FI 30) für die Dauer von 5 Sekunden. Die Verstärkergabe erfolgt sofort beim Einsetzen des Lichts.



*Abbildung 2. Gezeigt ist die Seitenansicht der verlängerten Kammer (oben links) sowie eine Aufsicht von oben (unten links). Zu erkennen ist mittig die Futterluke, links davon das Hinweislicht, sowie am oberen Ende die Beleuchtungseinheit der Apparatur (oben rechts). Für Experiment III wurden mittig Trennwände aus Kunststoff angebracht (unten rechts).*

Der Verzicht auf die Verwendung eines Hebels gestaltet die Akquisition einfacher und schneller erlernbar ohne vorangehendes Shaping. Das verkürzte Intervall und die längere Darbietung des Hinweisreizes in Exp. III wurden im Hinblick auf eventuelle motorische und kognitive Schwächen bei alten Ratten adaptiert. Zu Beginn eines Experiments durchlaufen die Tiere in dieser Apparatur einen Habitationsdurchgang zur Exploration und einen Tag später ein Magazin-Training. Hierbei wird, ähnlich wie in 3.1 geschildert, jede Annäherung an die Futterluke manuell verstärkt über die Verabreichung einer Futterpille. Zeitgleich dazu leuchten die Hinweislichter auf, so dass die Assoziation zwischen Licht und Verstärker erlernt wird. Sobald ein Versuchstier die Futterluke als Verstärkerquelle identifiziert hat, beginnt die Akquisition mit fixem Verstärkerplan. Über den Lichtsensor innerhalb der Futterluke wird hierbei nicht nur die Anzahl der Eintritte gemessen, sondern auch die Latenz zwischen dem Aufleuchten der Hinweislichter bzw. der Belohnungsausgabe und dem darauf folgenden Lichtschrankendurchbruch. Die Latenz kann neben der absoluten Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche als Lernmaß herangezogen werden, da eine Verkürzung dieser Zeit innerhalb der Akquisitionsphase anzeigt, dass die Assoziation zwischen dem Hinweisreiz und der Belohnungsausgabe erlernt wurde. Sobald alle Tiere ein stabiles Performanzniveau in der Latenz und den Lichtschrankendurchbrüchen zeigen, kann eine pharmakologische Intervention stattfinden um, wie in Exp. II und III, Effekte auf das Verhalten in der Extinktion zu untersuchen. Bei einer chronischen Behandlung werden im Abstand von wenigen Tagen weitere Akquisitionstrainings durchgeführt, um das erlernte Verhalten über die Behandlungsdauer hinweg aufrecht zu erhalten. Innerhalb dieser Phase würde sich bereits zeigen, ob eine Substanz selbst das Verhalten signifikant verändert oder ob spätere Effekte tatsächlich auf die Extinktion zurückzuführen sind. Der beispielhafte Ablauf eines solchen Experiments ist in Abbildung 3 skizziert.



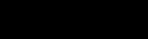


Testphase	Tag	Zeit
Habituation	1	
Magazin-Training	2	
Akquisition	3 – 7	
Akquisition mit Behandlung	8 – 21	
Extinktion mit Behandlung	17 – 21	

Abbildung 3. Skizze eines möglichen Versuchsablaufs zur Testung einer Behandlung auf die Effekte von Extinktion.

Innerhalb der anschließenden Extinktionsphase nimmt die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche ab und die Latenz steigt an, bzw. wird von den Versuchstieren zunehmend nicht mehr bei jeder Stimuluspräsentation nach der vermeintlichen Belohnung geschaut. Die offene Bauweise der Kammer ohne Dach (s. Abb.2) ermöglicht die zusätzliche Anbringung einer Kamera oberhalb der Kammer, so dass der genaue Aufenthaltsort eines Versuchstieres besser bestimmt werden kann. Im Gegensatz zur dualen Kammer ist hier eine ausführlichere Erhebung von Rückzugsvariablen möglich. Nicht nur die horizontale Aktivität (zurückgelegte Strecke) eines Tieres und seine Geschwindigkeit können gemessen werden, sondern auch die mittlere Distanz zur Futterluke. Gemäß der Hypothese, dass Extinktion zu Rückzugsverhalten führt, wäre ein stetiger Anstieg in der Distanz zur Futterluke zu erwarten. Zudem besteht die Möglichkeit, die verlängerte Kammer für eine differenzierte Auswertung des Aufenthaltsortes in Segmente aufzuteilen. In Experiment II fand post-hoc eine Einteilung in 3 Aufenthaltssegmente á 24 cm statt, wobei Zone 1 hierbei den ersten Abschnitt mitsamt Futterluke und Hinweislichtern umschreibt, was der operanten Zone der dualen Kammer entspricht. Zone 2 bezeichnet die Mitte der Kammer und Zone 3 entspricht dem Rückzugskompartiment mit dem weitesten Abstand zur Futterluke. In Experiment III wurde die Apparatur post-hoc nur noch in 2 Zonen zu je 36cm unterteilt. In der Mitte der Kammer wurden seitlich 2 Trennwände aus durchsichtigem Plexiglas angebracht (s. Abb.2 unten rechts), welche eine Trennung zwischen dem operanten und dem Rückzugskompartiment schaffen. Ziel- und Signalaufspürung werden in der verlängerten Box ebenfalls gemessen. Signalaufspürung wurde operationalisiert über Blicke und Aufrichten zum Hinweislicht, Zielaufspürung durch physische Kontakte mit der Futterluke (über Pfoten oder Schnauze). Eine Reduktion von Zielaufspürungsverhalten ist im Kontext extinktions-induzierter Depressionen von Relevanz, da dies auf eine Vermeidung von Kontakten mit ehemaligen Verstärkerquelle hindeutet.

### **3.3 Das Offenfeld (OF)**

Das Offenfeld, welches in Experiment I und II verwendet wurde, ist eine Standardapparatur zur Untersuchung von Habituationlernen, Lokomotion,

Explorationsverhalten und Ängstlichkeit (Hall, 1934; Belzung, 1999; Prut & Belzung, 2003). Es handelt sich hierbei um eine quadratische, reizarme, schwarze Box, welche eine Größe von 60x60cm hat und von 40cm hohen Wänden umgeben ist. Aufbau, Größe und Ausleuchtung können zwischen Laboratorien differieren (Überblick bei Ramos & Morméde, 1997). Das Tier wird zu Beginn in das Zentrum des OF gesetzt und kann dieses für einen bestimmten Zeitraum frei explorieren. Zur Erhebung der lokomotorischen Aktivität werden Maße wie die zurückgelegte Distanz (horizontale Aktivität), die Laufgeschwindigkeit und Frequenz bzw. Dauer des Aufrichtens (vertikale Aktivität) erhoben. Das Zentrum des OF (30x30cm) bietet keinerlei thigmotaktische Reize und ist heller beleuchtet als die Ecken. Generell tendieren Nager dazu, helle und weite Räume zu vermeiden, somit kann die Zeit und die Anzahl der Eintritte in das Zentrum als Maß für Emotionalität und speziell unkonditionierte Ängstlichkeit dienen (Überblick bei Ramos & Morméde, 1997). Zudem handelt es sich um eine für das Versuchstier neue, unbekannte Umgebung, so dass Explorations- und Annäherungs-/Vermeidungsverhalten betrachtet werden können (Montgomery, 1955).

Substanzen und experimentelle Manipulationen, die im Rahmen von Untersuchungen verwendet werden, können sich stets auch auf die lokomotorische Aktivität oder Ängstlichkeit des Versuchstieres auswirken. So haben etwa Amphetamine eine antriebssteigernde Wirkung im OF (Leavitt, 1969), während Diazepam die Lokomotion reduziert und anxiolytisch wirkt (Prut & Belzung, 2003). Um die Beeinflussung von Effekten durch Veränderungen in der Lokomotion oder Ängstlichkeit kontrollieren zu können, sind Überprüfungen im OF wichtiger Bestandteil vieler Untersuchungen. Zusätzlich zur Messung im Offenfeld wurde die horizontale und vertikale Aktivität in der vorliegenden Arbeit auch in den operanten Kammern erhoben.

### **3.4 Corticosteronhaltiges Trinkwasser**

Für die chronische Behandlung mit dem Steroidhormon Corticosteron in Experiment III wurde die Verabreichung über das Trinkwasser gewählt. Neben dieser Behandlungsmethode gibt es zudem die Möglichkeit, Cort über Injektionen, osmotische Pumpen oder Depotpellets zu applizieren (Überblick bei Hermann et al.,

2009; Sterner & Kalynchuk, 2010). Da es sich hierbei jedoch um invasive bzw. operative und somit für das Tier stressreiche Eingriffe handelt, ist die Verabreichung über das Trinkwasser zu bevorzugen. Es kann allerdings auch eine größere unkontrollierte Varianz in der Aufnahmemenge auftreten kann als bei der passiven Applikation. Im Gegensatz zu Injektionen bieten Pumpen, Pellets und Trinkwasserverabreichung den Vorteil, einen relativ konstanten Hormonspiegel über den Tag aufrecht zu erhalten anstelle eines einmaligen starken Anstiegs.

Zur Berechnung der notwendigen Dosierung von Cort im Trinkwasser wird bei futterdeprivierten Tieren über einen Zeitraum von mehreren Tagen die tägliche Flüssigkeitsaufnahme gemessen. In der hier durchgeführten Studie lag mittlere Aufnahmemenge von adulten Tieren doppelt so hoch wie bei alten Tieren, somit wurden zwei verschiedene Trinkwasserlösungen erstellt. Um eine tägliche Aufnahmedosis von 6-9mg/kg/Tier erzielen zu können, wurden für adulte Tiere 50µg Cort/ml Wasser gelöst und für alte Tiere 125µg/ml. Corticosteron Hemisuccinate (Tocris®) ist nur bedingt wasserlöslich, deshalb muss zur vollständigen Lösung der pH-Wert mit 4M Natriumhydroxid auf 13 angehoben werden. Anschließend wird der pH-Wert vorsichtig mit einer geringen Menge 25%-iger Salzsäure auf den Ausgangswert von 7-7,4 angeglichen (siehe Gourley & Taylor, 2009). Diese Methodik umgeht die Lösung von Cort in Ethanol, wobei stets die Möglichkeit einer Interaktion bzw. Konfundierung von Effekten durch die Ethanolverabreichung bei Nagern besteht (z.B. Nacher, Pham, Gil-Fernandez & McEwen, 2004). Es wurde täglich frisches Trinkwasser hergestellt und alle 24 Stunden ausgetauscht. Die Flüssigkeitsaufnahme pro Käfig wurde weiterhin täglich gemessen, blieb jedoch im Laufe des Experiments konstant. Die in Experiment III angewandte Methode und Dosierung eignen sich speziell für die langfristige Behandlung mit Cort um einen persistierenden, depressiven Phänotypen für die Verhaltenstestung sicherzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass nach chronischer Behandlung im FST und im TST ein signifikanter Anstieg der Immobilität als Indikator für Anhedonie vorliegt, welcher durch Behandlung mit BDNF und dem TZA Amitryptilin signifikant verringert wurde (Gourley et al., 2008a; 2008b; Gourley & Taylor, 2009).

### 3.5 Blutabnahme und Fixation

Zum Abschluss von Experiment III wurde ein akuter Stresstest mittels Fixation durchgeführt. Hierbei wurde untersucht, ob sich die Plasmakonzentrationen von ACTH und Cort zwischen den Gruppen im Ruhezustand unterscheiden und ob es zu differentiellen Reaktionen nach akutem Stress kommt.

Zunächst wurde jedem Tier vorab eine Blutprobe an der Schwanzspitze zur Bestimmung der Basalmenge entnommen. Hierfür wurde die Inzisionstechnik angewandt (Fluttert, Dalm & Oitzl, 2000), welche sich besonders für sequentielle Probenentnahmen bis 300µl eignet. Das Tier wird hierbei mit einem dunklen Tuch abgedeckt und mit einer sterilen Klinge wird etwa 2cm über der Schwanzspitze eine oberflächliche Inzision gesetzt. Durch EDTA-beschichtete Microvetten (Microvette® CB 300 Sarstedt®) kann eine beliebig große austretende Menge Blut innerhalb weniger Sekunden gesammelt werden. An der Inzisionsstelle bildet sich kurz darauf eine Wundkruste, die im Weiteren für erneute Blutabnahmen vorsichtig mit lauwarmem Wasser entfernt werden kann. Durch die Ausübung von sanftem Druck tritt an dieser Stelle erneut Blut aus. Da für diese schmerzarme Form der Blutabnahme weder eine Anästhesie, noch eine spezielle Fixation des Tieres nötig sind, ist sie als minimal-invasiv und stressfrei zu betrachten. Dies bestätigen auch Untersuchungen, welche keinen oder nur einen geringen Anstieg von Cort im Anschluss an eine solche Blutabnahme berichten (Fluttert, Dalm & Oitzl, 2000).

Im Anschluss an die basale Blutabnahme wurde jedes Tier in einem Plexiglas-Zylinder (Harvard Apparatus®) für die Dauer von 10 Minuten fixiert. Die Länge des Zylinders konnte an die Größe des jeweiligen Tieres angepasst werden, um die Beweglichkeit vollständig zu limitieren. Enge und Fixation sind ein starker Stressor, welcher zu einem Anstieg von Cort und ACTH führt (Dallmann & Jones, 1973). Nach 10 Minuten wurde die zweite Probe innerhalb des Zylinders entnommen und das Tier im Anschluss in einen Einzelkäfig zurückgesetzt. Weitere Proben wurden nach 60, 120 und 180 Minuten entnommen. Die Blutproben wurden bei 4°C für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. ACTH wurde mittels Radioimmunoassay (Immulite® 2000 ACTH, Siemens, Erlangen, Germany) bestimmt, Cort mittels enzymatischer Antikörperbestimmung (ELISA IBL International, Hamburg, Germany).



## 4 Durchgeführte Studien

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

### 4.1 Antidepressiva reduzieren Extinktions-induziertes Rückzugs- und Beißverhalten: Ein Modell für depressions-ähnliche Verhaltensweisen

In Experiment I sollte zu Beginn grundlegend untersucht werden, ob die Erkenntnisse zur Extinktion von negativer Verstärkung und EID übertragbar sind auf den Entzug positiver Verstärkung. Da es vor allem positive Verstärker sind, die depressiven Patienten fehlen, bzw. entzogen werden (Lewinsohn, 1974), führt die Extinktion positiv verstärkter Verhaltensweisen im Tiermodell zu einem Zugewinn an Konstrukt-, Augenschein- und inhaltlicher Validität (Überblick bei Razafsha et al., 2013). Operante Extinktion ist aversiv, stressreich und kann neben Aggressionen auch zu Vermeidungsverhalten führen (Papini, 2003). Daher wurde untersucht, ob die Extinktion von futterbelohntem Hebeldrücken in einer operanten Kammer potentiell depressions-ähnliche Verhaltensweisen hervorruft. Rückzugsverhalten ist ein Kernsymptom der unipolaren Depression (Ferster, 1973) und sollte, wenn es Ausdruck einer experimentell-induzierten Depression ist, durch eine Behandlung mit Antidepressiva reduziert werden. Zur Untersuchung der prädiktiven Validität wurden die Tiere während der Extinktionsphase täglich akut mit dem SSRI Citalopram (20mg/kg), dem TZA Imipramin (20mg/kg) oder einer Vehikellösung behandelt.

Der Aufbau der dualen Kammer ist in Abschnitt 3.1 beschrieben. Eine reguläre operante Kammer, welche mit einem Hebel, einer Futterluke und einem Hinweislicht ausgestattet ist, ist über einen Durchgang mit einer zweiten, neutralen Kammer ohne operante Module verbunden. Diese ist jederzeit frei explorierbar und kann während der Extinktion als neutrales Rückzugskompartiment dienen. Gemessen wurde in Experiment I die Hebeldruckrate, Lichtschrankendurchbrüche im Futternapf, die Gesamtanzahl und -dauer der Eintritte in das Rückzugskompartiment, vertikale Aktivität und Beißen des Hebels. 20 männliche Wistar-Ratten durchliefen an zwölf aufeinanderfolgenden Tagen Akquisitionsdurchgänge von je 15 Minuten. Der Hebel in der operanten Kammer war hierbei aktiv, sobald die Hinweislichter aufleuchteten.

Ein Hebeldruck wurde mit der Ausgabe einer Futterpille belohnt und die Lichter erloschen bis zur Entnahme der Belohnung aus der Luke. Nach Erreichen einer stabilen Hebeldruckrate wurden alle Tiere randomisiert auf 3 Gruppen (n=6-7) aufgeteilt. An den folgenden fünf Extinktionstagen wurden Hebeldrücke trotz Aufleuchten der Hinweislichter nicht mehr belohnt. Die Tiere erhielten jeweils 30 Minuten vor den Extinktionsdurchgängen eine intraperitoneale Injektion mit Vehikellösung, Citalopram oder Imipramin. Da innerhalb der dualen Kammer keine Erhebung der horizontalen Aktivität möglich ist, wurde im Anschluss an die Extinktion ein 15-minütiger Test im Offenfeld durchgeführt zur Messung der vertikalen und horizontalen Aktivität.

Die Ergebnisse zeigten, dass während der Extinktion Veränderungen im Rückzugsverhalten, Beißen und Aufrichten auftraten, die signifikant von Imipramin und Citalopram beeinflusst wurden. Rückzugsverhalten wurde operationalisiert über die Eintrittsfrequenz und die verbrachte Zeit im hinteren Kompartiment. Im Laufe der Extinktion nahm Rückzugsverhalten signifikant zu. Die Frequenz und die Aufenthaltsdauer im Rückzugskompartiment wurden jedoch durch die Behandlung mit Citalopram signifikant reduziert. Zudem zeigten sich Haupteffekte der Behandlung auf die Frequenz und Dauer der vertikalen Aktivität. Die Tiere der Vehikelgruppe richteten sich in beiden Kompartimenten häufiger und insgesamt länger auf. Vertikale Aktivität wird im Tiermodell nicht nur als Aktivitätsmaß betrachtet, sondern kann auch ein Zeichen für erhöhte Emotionalität oder Ängstlichkeit sein (Borta & Schwarting, 2005). Citalopram und Imipramin führten beide zu einer Reduktion der vertikalen Aktivität während der Extinktion, was auf anxiolytische Effekte beider Substanzen hindeutet. Das Beißen des Hebels, ein Indikator Extinktions-induzierter Aggression oder Erregung, trat während der Extinktion ebenfalls statistisch seltener bei den mit Citalopram und Imipramin behandelten Tieren auf.

Zusammenfassend konnten in Experiment I erste Verhaltensindikatoren einer EID identifiziert werden, welche sich durch akute antidepressive Behandlung abschwächten. Sowohl räumlicher Rückzug als auch Beißen des Hebels sind valide Verhaltensmerkmale zur Messung von Depressivität und Frustration. Vor allem das SSRI Citalopram als auch Imipramin reduzierten bei einer Dosis von 20mg/kg Rückzugsverhalten, Beißen und Erregung und bestätigten somit die Hypothese des

Modells. Speziell bei der Behandlung mit Imipramin führte die gewählte Dosis jedoch auch zu einer reduzierten Hebeldruckrate während der Extinktion und beeinträchtigte im Offenfeld die horizontale Aktivität, vertikale Aktivität und die Laufgeschwindigkeit. Dies lässt auf eine dosisbedingte Sedierung der Tiere schließen (Porsolt, Anton, Blavet & Jalfre, 1978; Custodio Teixeira, Zangrossi & Graeff, 2000). Für Experiment II wurden deshalb geringere Dosierungen in zweifacher Abstufung gewählt und der Behandlungsplan, analog zum Wirkprofil von Antidepressiva im Menschen (Wong & Licino, 2001), auf eine chronische Verabreichung umgestellt.

#### **4.2 Der Rückzugsgradient von der Verstärkerquelle als Indikator Extinktions-induzierter Verzweiflung: Modulation durch die Antidepressiva Clomipramin und Citalopram**

Ausgehend von den Befunden zum Rückzugs- und Beißverhalten als Indikator depressiven Verhaltens in Experiment I wurde eine verlängerte operante Kammer ohne Durchgangstunnel gefertigt. In Experiment II wurde untersucht, ob sich anstelle eines binären Maßes -das Tier ist entweder im Rückzugskompartiment oder nicht- ein durchgängiger Rückzugsgradient innerhalb der Kammer ermitteln lässt, der hypothesenkonform über die gesamte Extinktionsphase hinweg ansteigt. Im Menschen korreliert das Ausmaß von Rückzugsverhalten positiv mit dem Ausmaß der Depression (Ottenbreit & Dobsen, 2004). Des Weiteren wurde speziell Zielaufspürungsverhalten, physischer Kontakt mit der Futterluke, betrachtet. Komplementär zum Rückzug sollte es während der Extinktion zu einer Abnahme des Verhaltens kommen. Wie im vorherigen Experiment wurde der Einfluss des SSRIs Citalopram auf depressions-ähnliches Rückzugsverhalten ermittelt, hier jedoch in zweifach abgestuften, niedrigeren Dosierungen (7.5 und 10mg/kg). Zusätzlich dazu wurde die Wirkung des TZA Clomipramin in zwei Dosierungen untersucht (7.5 und 10mg/kg), welches im Tierversuch keine psychomotorischen Veränderungen verursacht. Die chronische Behandlung wurde nach der Akquisition über 14 Tage jeweils nach einem Versuchsdurchgang durchgeführt.

Im Hinblick darauf ein Paradigma zu entwickeln, das möglichst schnell und einfach in Laboren durchführbar ist und auch von alten Tieren gut erlernt werden kann, wurde die operante Aufgabe variiert und auf den Einsatz eines Hebels verzichtet.

Stattdessen wurde ein fixer Intervallplan mit freier Verstärkergabe nach 90 Sekunden verwendet, welche über Hinweislichter angekündigt wurde. Gemessen wurde die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche, die Latenz, horizontale Aktivität, Beißverhalten, Ziel- und Signalaufspürung, die mittlere Distanz zur Futterluke (Rückzugsgradient) und die Anzahl der Eintritte in die 3 Zonen der Kammer sowie die darin verbrachte Zeit.

60 adulte Ratten wurden an 5 aufeinanderfolgenden Tagen für täglich 15 Minuten mit einem fixen Belohnungsintervall von 90 Sekunden trainiert. Hierbei leuchteten für 3 Sekunden die Hinweislampen auf und kündigten alle 90 Sekunden die sofortige Verfügbarkeit von zwei Futterpillen im Futternapf an. Wie in der vorherigen Studie wurde die Lernleistung dieser Assoziation durch die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche, als auch über die Latenz zwischen Lichtreiz und darauf folgendem Durchbruch kontrolliert. Anschließend wurden die Tiere in 5 Gruppen (n=12) aufgeteilt und neun Tage durch intraperitoneale Injektionen mit Vehikellösung, Citalopram (7.5 und 10mg/kg) oder Clomipramin (7.5 und 10mg/kg) behandelt. An jedem dritten Tag fand ein weiteres aufrechterhaltendes Akquisitionstraining statt. Es folgten 5 Extinktionstage mit jeweils zwei Durchgängen pro Tag, in denen das Hinweislicht ohne Belohnung präsentiert wurde. Die Behandlung wurde bis zum letzten Extinktionstag fortgeführt.

Die Analyse zeigte, dass während der Extinktion der Rückzugsgradient signifikant in allen Gruppen anstieg. Die Tiere hielten sich zunehmend weiter entfernt von der Futterluke auf und verbrachten mehr Zeit in der hintersten Zone der Kammer. Damit einhergehend zeigte sich eine statistisch relevante Abnahme in der Frequenz und Dauer der Zielaufspürung. Zwischengruppenvergleiche der einzelnen Extinktionstage belegten, dass sowohl 7.5 mg/kg Clomipramin als auch 10mg/kg Citalopram den Rückzugsgradienten am zweiten Tag signifikant reduzierten im Vergleich zur Vehikelgruppe. Clomipramin verringerte in beiden Dosierungen signifikant die Aufenthaltsdauer in der Rückzugszone an Tag 1 und 2 der Extinktion. Der Rückzug von der vormals belohnungs-assoziierten Futterluke konnte ebenfalls aufgehoben werden. Es zeigte sich ein tendenzieller Haupteffekt der Behandlung auf die Dauer des Zielaufspürungsverhaltens. Generell verbrachten behandelte Tiere mehr Zeit an der Futterluke als Tiere der Vehikelgruppe. Vor allem am zweiten Extinktionstag war die Dauer der Kontakte signifikant länger nach chronischer Behandlung mit 10mg

Citalopram. Beißverhalten trat, im Gegensatz zu Experiment I, nur sehr niederfrequent auf, jedoch stieg es prozentual in allen Gruppen leicht an über die Zeit. Behandlungseffekte konnten hier jedoch nicht gezeigt werden.

Abgesehen von den Indikatoren der EID beeinflusste keine der Substanzen andere Verhaltensweisen wie die Lokomotion, Latenz oder Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die hier gefundenen Effekte auf Manipulation der Aktivität, Motivation oder kognitiver Performanz zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen (Nikiforuk and Popik, 2009, Schulz et al., 2007a) konnte hier kein Einfluss von Antidepressiva auf eine Erhöhung der Extinktionsresistenz nachgewiesen werden. Alle Gruppen zeigten das gleiche Ausmaß an Extinktion, jedoch schwächten Citalopram und Clomipramin speziell das Rückzugsverhalten deutlich ab.

Einen Tag nach dem letzten Extinktionsdurchgang wurden alle Tiere für 10 Minuten im Offenfeld getestet. Es wurde eine weitere, experimentell naive, Kontrollgruppe (n=12) hinzugezogen, um im direkten Vergleich die Effekte der Extinktion und antidepressiver Behandlung auf ängstliches Verhalten im Offenfeld untersuchen zu können. Gemessen wurden vertikale und horizontale Aktivität, sowie die Eintritte und Verweildauer im Zentrum. Zwischengruppenvergleiche zeigten signifikante Unterschiede zwischen der Kontroll- und Vehikelgruppe für die im Zentrum verbrachte Zeit. Die Vehikelgruppe, welche im Experiment Extinktionserfahrung gemacht hatte, verbrachte weniger Zeit im Zentrum als die naive Gruppe. Beide Gruppen, die mit Citalopram behandelt wurden, zeigten weniger Ängstlichkeit und verbrachten mehr Zeit im Zentrum als die Vehikelgruppe. Clomipramin hatte im Offenfeld keine signifikanten Auswirkungen auf ängstliches Verhalten.

Zusammenfassend zeigte sich in Experiment II eine Zunahme von Rückzugs- und Vermeidungsverhalten, welches in der verlängerten Kammer auch über einen durchgängig ansteigenden Rückzugsgradienten gemessen werden konnte. Verstärkerentzug in einer simplen Aufgabe ohne Hebeldrücke verstärkte die Indikatoren einer EID, welche durch chronische Behandlung mit den Antidepressiva Citalopram und Clomipramin vor allem während der initialen Extinktion reduziert wurden. Die Messung des Rückzugsgradienten und der horizontalen Aktivität ist im Vergleich zu Experiment I mit dieser Versuchsausrüstung möglich und bietet einen deutlichen qualitativen Zugewinn in der Verhaltensforschung. Beißverhalten als

Ausdruck von Aggression trat ohne die Anwesenheit eines Operandums nur vereinzelt auf. Die Ergebnisse der Untersuchung im OF liefern weitere Belege dafür, dass das Erleben von Verstärkerentzug anxiogene Effekte hat und besonders SSRIs hierbei ein anxiolytisches Wirkprofil zeigen.

### **4.3 Die chronische Behandlung mit Corticosteron verstärkt Extinktionsinduzierte Depressionen und beeinträchtigt die Funktion der HHN-Achse in alten und adulten Ratten**

Seneszenz und die Langzeitfolgen von chronischem Stress können beim Menschen die Genese von Depressionen begünstigen und Vermeidungsverhalten beeinflussen. Mit dem Alter erhöht sich die Anzahl von Verlusten und Verstärkerentzug, was sich vor allem in gesundheitlichen Problemen, Todesfällen, Verlust von Partner-/Freundschaften oder dem Übertritt vom Beruf zum Ruhestand widerspiegelt (Mazure, 1998; Kraaij et al., 2002; Hammen, 2005). Die Anzahl solcher Lebensereignisse ist prämorbid erhöht und begünstigt die Entstehung einer Depression (Brown Harris & Hepworth, 1994; Kendler, Karkowski & Prescott, 1999). Eine der möglichen Ursachen sind die Auswirkungen des mit Verlust verbundenen Stresses und einer chronischen Erhöhung der Aktivität der HHN-Achse (Coover, Goldman & Levine, 1971; Coe, Stanton & Levine, 1983; Kawasaki & Iwasaki, 1997; Stokes, 1995). Im Tiermodell führt die chronische Verabreichung von Cort zu einem depressiven Phänotypen (z.B. Gourley & Taylor, 2009; Sterner & Kalynchuk, 2010). Da mit der Seneszenz neurobiologische und Verhaltensänderungen einhergehen, welche die Fähigkeit zur Adaptation an Stress im Menschen senken und die Aktivität der HHN-Achse erhöhen, ist diese Population besonders anfällig für die Auswirkungen von Verstärkerentzug, Stress und somit auch für EID (McEwen, 1999a; Miller & O'Callaghan, 2005; Mroczek & Almeida, 2004). Ein besonderes Problem stellt in diesem Zusammenhang die erhöhte Prävalenz von TRD bei geriatrischen Depressionen dar und ein Mangel an geeigneten antidepressiven Pharmaka zur Behandlung (Bonner, 1995).

Ausgehend von den Befunden aus Experiment II untersuchten wir in der nachfolgenden Studie die Effekte einer chronischen Behandlung mit Cort bei adulten und alten Wistar-Ratten im Modell der EID. Zudem standen Veränderungen der

HHN-Achse im Alter und nach erfolgter Behandlung im Fokus. 24 adulte (3-4 Monate) und 30 alte (18 Monate) männliche Wistar-Ratten wurden in der verlängerten operanten Box (s. Experiment II) an 6 Tagen mit einem fixen Intervallplan von 30 Sekunden trainiert. Während des 5-sekündigen Lichtstimulus wurde eine Futterbelohnung verabreicht. In diesem Experiment wurden in der Mitte der Box seitlich zwei kurze Trennwände angebracht, um eine räumliche Trennung zwischen der operanten und der Rückzugszone zu schaffen. Im Anschluss an die Akquisition wurden randomisiert pro Alterskohorte jeweils eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe zugeteilt. Während die Kontrollgruppe reguläres Trinkwasser erhielt, bekam die Behandlungsgruppe täglich frisches corticosteronhaltiges Trinkwasser ad libitum. Angepasst an die unterschiedlichen Trinkmengen adulter und alter Tiere, betrug die Konzentration 125µg/ml (alt) bzw. 50µg/ml (adult), um eine jeweilige Aufnahme von 6-9mg/kg/Tag zu gewährleisten. Unter chronischer Behandlung wurden die Tiere an jedem dritten Tag weiterhin trainiert, bevor nach 23 Tagen die Extinktion einsetzte. Die gemessenen Variablen waren analog zu Experiment II.

Zum Abschluss der Trainingsphase unter Behandlung zeigte sich, dass Cort keine der Variablen statistisch signifikant beeinflusste, somit, entgegen anderer Berichte, keine Auswirkungen auf die Akquisition einer einfachen operanten Aufgabe hatte (Olausson et al., 2013). Die Lokomotion und alle Indikatoren des Rückzugsverhaltens zeigten vor dem Einsetzen der Extinktion ebenfalls keine Veränderungen aufgrund der Behandlung. Innerhalb der Extinktion zeigten sich Alterseffekte im Rückzugsverhalten. In beiden Alterskohorten stiegen der Rückzugsgradient und die Abnahme von Zielaufspürung signifikant an, was darauf hindeutet, dass EID bei alten und adulten Tieren auftritt. Adulte Tiere führten jedoch signifikant mehr Zielaufspürung aus als alte Tiere, so dass diese Ergebnisse eine größere Extinktionsresistenz bei adulten Ratten anzeigen. Die Behandlung mit Cort steigerte hypothesenkonform den Rückzugsgradienten und die Abnahme von Zielaufspürungsverhalten in beiden Altersgruppen zusätzlich. Bei den alten Tieren waren diese Effekte durchgängig evident. Dies spiegelte sich auch in Interaktionen zwischen den Extinktionsdurchgängen mit dem Alter und der Behandlung wider. Aufmerksamkeits-assoziierte Parameter variierten ebenfalls aufgrund von Altersunterschieden und Einflüssen der Behandlung während der Extinktion. Cort

reduzierte die Dauer eines einzelnen Aufrichtens und die Frequenz von Signalaufspürungsverhalten. Untersuchungen zeigen, dass Cort bei chronischer Verabreichung den Hippocampus und PFC beeinträchtigt, welche essentiell an der Ausbildung dieser Funktionen beteiligt sind (Meneses, 2003; Holmes & Wellmann, 2009).

Die Tiere wurden weiterhin behandelt und nach zweiwöchiger Ruhephase einem akuten Stresstest unterzogen. Zunächst wurde mit Hilfe der Inzisionsmethode (Fluttert, Dalm & Oitzl, 2000) eine basale Blutprobe an der Schwanzspitze entnommen. Im Anschluss wurde jedes Tier für 10 Minuten in Kunststoffzylindern fixiert und weitere Proben nach 10, 60, 120 und 180 Minuten abgenommen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die basalen Werte von ACTH und Cort nicht in Abhängigkeit vom Alter unterschieden. Bei alten Ratten reduzierte die Behandlung mit Cort jedoch signifikant die basalen Werte beider Hormone im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser Effekt zeigte sich bei adulten Tieren nicht. Nach der Fixierung stieg Corticosteron signifikant in allen Gruppen an, jedoch blieben die Werte der Behandlungsgruppen statistisch relevant zu allen Messzeitpunkten geringer als in den jeweiligen Kontrollgruppen. Für alte Tiere war der Effekt statistisch stärker als bei adulten Tieren. Somit induzierte Cort hier eine abgeschwächte Reaktion der HHN-Achse auf akuten Stress. ACTH zeigte in dieser Untersuchung keine globale Veränderung nach akutem Stress oder in Abhängigkeit der Behandlung. Aufgrund der zeitlich vorangehenden Ausschüttung von ACTH im Vergleich zu Corticosteron besteht die Möglichkeit, dass der Höchstwert bereits innerhalb der ersten 10 Minuten auftrat und somit nicht gemessen wurde. Nach der Fixation traten jedoch Alterseffekte auf, wobei alte Tiere höhere Konzentrationen von ACTH sekretierten als adulte Ratten.

Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass seneszente Organismen anfälliger sind für die depressogenen Effekte von Extinktion, als auch für die Folgen einer chronischen Corticosteronbehandlung. Corticosteron verstärkte EID in alten und adulten Tieren, hier vor allem operationisiert über die Abnahme von Zielaufspürungsverhalten an der Futterluke. Dies lässt den Schluss zu, dass auch chronischer Stress, welcher mit einer erhöhten Aktivierung der HHN-Achse einher geht, depressives Verhalten begünstigen und EID verstärken kann. Da sowohl die Behandlung mit Cort als auch die Extinktion bei alten Tieren stärkere Verhaltens- und



endokrine Effekte erzeugte, ist das Modell der EID besonders im Rahmen geriatrischer Depressionen valide und könnte zur Untersuchung neuer Pharmaka eingesetzt werden.

## 5 Zusammenfassende Diskussion

Die in dieser Dissertation durchgeführten Studien sollten einen Beitrag leisten zur Entwicklung neuer Tiermodelle, welche zur effizienten Erforschung neuer, antidepressiv wirksamer Substanzen und Verfahren dienen können.

Mit zunehmender Kenntnis der neurobiologischen Grundlagen von Depressionen und den beteiligten Transmittersystemen konnten bisher zahlreiche Psychopharmaka identifiziert werden, welche antidepressive Eigenschaften aufweisen. Hierunter befinden sich vor allem serotonerge und noradrenerge Wiederaufnahmehemmer sowie MAO-Hemmer. Zunehmend treten aber auch Substanzen wie etwa Ketamin in den Vordergrund, welche nicht primär auf das monoaminerge System wirken und speziell bei TRD eingesetzt werden (Samuels et al., 2011; Walker et al., 2012; Koike et al., 2013; Murrough et al., 2013). Eine weiterführende Erforschung neuer Pharmazeutika ist jedoch indiziert, da es trotz der großen Auswahl verschieden wirksamer Antidepressiva einen therapieresistenten Patientenanteil von etwa 30% gibt, welcher bisher noch nicht ausreichend effektiv behandelt werden kann (Holsboer-Trachsler, 2006; Fava, 2006). Ebenfalls kommt es zunehmend zu einer steigenden Anzahl geriatrischer Depressionen, die nicht nur durch die angestiegene Lebenserwartung begründet ist, sondern vor allem durch die Zunahme belastender Faktoren im Alter (Kraaij et al., 2002; Cairney & Krause, 2008). Bisher ist nicht ausreichend untersucht, ob die etablierten Antidepressiva optimal abgestimmt sind für die Behandlung geriatrischer Depressionen und die mit der Seneszenz einhergehenden Veränderungen von Pharmakodynamik und -kinetik (Mangoni & Jackson, 2004). Zur schnellen Identifizierung antidepressiver Wirkstoffe wurden Screening-Tests im Tiermodell entwickelt, die zuverlässig die antidepressiven Eigenschaften einer Substanz vorhersagen sollen. Wie eingangs erläutert unterliegen Screening-Tests und Tiermodelle einer Bewertung anhand von Gütekriterien. Diese können sicherstellen, dass Modellen und Tests ausreichende Reliabilität und Validität zugrunde liegen. Viele Screening-Tests können zwar durch Veränderungen im Verhalten von Nagern die antidepressive Wirksamkeit einer Substanz im Menschen voraussagen, besitzen also prädiktive Validität, jedoch mangelt es ihnen an Sensitivität und Spezifität. Zudem bilden sie oftmals nicht die auslösenden Faktoren einer Depression im Menschen ab, sondern betrachten nur isolierte Verhaltensweisen, welche durch eine Behandlung mit Antidepressiva modulierbar

sind. Ein Tiermodell der Depression sollte jedoch so konzipiert sein, dass auch ätiologische Faktoren operationalisiert und manipuliert werden können. Das zu beobachtende Verhalten sollte analog zu Symptomen der Depression im Menschen sein (Willner, 1984; Willner, 1985; Nestler & Hyman, 2010) und durch eine antidepressive Behandlung remittieren.

Da Verlusterlebnisse und das Ausbleiben von antizipierten Verstärkern eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Depressionen im Menschen spielen (Hammen, 2005), sollte in den Untersuchungen dieser Dissertation, aufbauend auf vorangegangenen Befunden (Huston et al., 2009), ein Tiermodell der Depression weiterentwickelt und validiert werden, welches unkontrollierbaren Verstärkerverlust einer positiven Verstärkung als Ursache depressions-ähnlicher Verhaltensweisen in der Ratte abbildet. Gemäß der aufgestellten Hypothesen wurde untersucht, welche Verhaltensvariablen geeignete Indikatoren einer EID nach Extinktion von futterbelohntem Verhalten sind. Hierfür wurden depressions-ähnliche Verhaltensweisen wie räumlicher Rückzug, Beißen und die Abnahme der Exploration der Futterluke identifiziert und nachfolgend validiert. Wenn diese Verhaltensweisen Indikatoren einer Extinktions-induzierten Depression sind, so sollte eine Behandlung mit Antidepressiva Rückzugsverhalten reduzieren. Hingegen sollten solche Indikatoren einer EID durch Faktoren, welche sich negativ auf den Affekt und Depressivität auswirken, so etwa zunehmendes Alter und erhöhter Stress, verschlechtert werden. Dies wurde im Rahmen der Dissertation in drei aufeinander aufbauenden Experimenten untersucht.

In Experiment I wurde zunächst das Verhalten von männlichen Wistar-Ratten bei der Extinktion von futterbelohntem Hebeldruckverhalten in einer operanten Kammer mit zwei Kompartimenten betrachtet. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass einige der auftretenden Verhaltensweisen als Variablen zur Erhebung depressions-ähnlichen Verhaltens geeignet sind. Alle Tiere verbrachten erwartungsgemäß während der Extinktion mehr Zeit in einem Rückzugskompartiment als während der Akquisition, welches räumlich getrennt vom Hebel und der Futterluke ist. Hinweisend auf einen depressiven Phänotypen zogen sich die Tiere im Laufe der Extinktion zurück und verließen das operante Kompartiment zunehmend. Rückzug von ehemals angenehmen Aktivitäten tritt auch bei depressiven Patienten in den Vordergrund der

Erkrankung (Ferster, 1973) und es konnte nachgewiesen werden, dass die Stärke der Depression stark mit dem Ausmaß des Rückzugsverhaltens korreliert (Ottenbreit & Dobson, 2004). Eine akute Vorbehandlung mit dem Trizyklikum Imipramin und dem SSRI Citalopram 30 Minuten vor jedem Extinktionsdurchgang hatte signifikante Effekte auf Rückzugsverhalten. Beide Antidepressiva reduzierten die Eintrittsfrequenz in das Rückzugskompartiment. Citalopram verringerte ebenfalls die dort verbrachte Zeit während der Extinktion. Beide Antidepressiva verringerten zudem das Beißen des Hebels, welches als Ausdruck von Aggressivität gehäuft bei der Extinktion von futterbelohntem Verhalten auftritt (Azrin et al., 1966; Tomie et al., 1993). Somit kann auch diese Variable bei der Verwendung eines Operandums, wie etwa dem Hebel, als Indikator Extinktions-induzierter Frustration bzw. Verzweiflung betrachtet werden. Die vertikale Aktivität im operanten und im Rückzugskompartiment wurde durch die Substanzen im Vergleich zu einer Vehikelgruppe gemindert. Zusammenfassend konnten in Experiment I somit erste Belege dafür aufgezeigt werden, dass Rückzugsverhalten wie auch Beißen als Indikatoren speziell des Subtypus der Extinktions-induzierten Depression geeignet sind. Sie waren sensitiv gegenüber trizyklischen und selektiv serotonergen Antidepressiva. Imipramin reduzierte im Vergleich zur Vehikelgruppe neben dem Rückzugsverhalten und Beißen jedoch zusätzlich auch die Hebeldruckrate während der Extinktion. Eine geminderte Druckrate kann als Senkung der Extinktionsresistenz interpretiert werden, dies ist jedoch unwahrscheinlich in Anbetracht anderer Untersuchungen, welche eindeutig zeigen, dass Antidepressiva die Extinktionsresistenz erhöhen können (Flaherty, 1990; Schulz et al., 2007a; Nikiforuk & Popik, 2009). Speziell die Effekte von Imipramin auf die vertikale Aktivität und die Hebeldruckrate deuten hier darauf hin, dass die Substanz in der gewählten Dosierung von 20mg/kg bei akuter Verabreichung eine sedierende Wirkung hat. Auch in einer an die Extinktion anschließenden Untersuchung im Offenfeld zeigten die mit Imipramin behandelten Tiere weniger Aktivität und Lokomotion als die Vehikelgruppe, was unterstützt wird durch die Befunde anderer Veröffentlichungen (Porsolt et al., 1978; Custodio Teixeira et al., 2000).

Die Befunde aus Experiment I ließen somit einige Aspekte noch ungeklärt und gaben zudem Anstoß für experimentelle Modifikationen, welche in Experiment II weiterführend untersucht wurden. Zum einen galt es, zu klären, ob die Reduktion des

Rückzugsverhaltens, Aufrichtens und Beißens konfundierend beeinflusst wurde durch sedative Effekte der Dosierung von 20mg/kg, zum anderen wurde der Behandlungsplan moduliert. In Experiment I wurden die Tiere akut 30 Minuten vor jedem Extinktionsdurchgang behandelt. Beim Menschen und auch bei einigen Tiermodellen zeigen sich antidepressive Effekte im Verhalten jedoch in der Regel erst nach einer chronischen Behandlung von etwa 10-14 Tagen, was der Wirklatenz beim Menschen entspricht (Wong & Licino, 2001). Um die zeitliche Durchführung des Modells der Extinktions-induzierten Depression und die Verhaltensmessung effizient zu optimieren, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, das Akquisitionstraining zu verkürzen und die Verhaltensvariablen zu spezifizieren. Die Untersuchungen von Ottenbreit & Dobson (2004) zeigen, dass ein starker korrelativer Zusammenhang zwischen Affekt und Rückzugsverhalten bzw. Vermeidung besteht. Um das Rückzugsverhalten von Ratten differenzierter messen zu können als über die binäre Eintrittsfrequenz und die Zeit im Rückzugskompartiment, wurde für Experiment II eine verlängerte, operante Kammer entwickelt. Diese ermöglichte, den vom Versuchstier eingehaltenen Abstand zur Futterluke als Gradienten zu bestimmen. Zusätzlich dazu ist mit der verlängerten Kammer zeitgleich auch eine Messung der horizontalen Aktivität durchführbar, so dass mögliche sedative Effekte einer Substanz bereits vor oder während der Extinktion offensichtlich werden. In Experiment II erhielten männliche Wistar-Ratten ein Akquisitionstraining mit freier Verstärkergabe in einem fixen Intervall von 90 Sekunden. Auf die Anwendung eines Operandums wurde hierbei verzichtet, so dass die Akquisition bereits nach 5 Tagen aufgrund der leichter erlernbaren Kontingenz zwischen Hinweislicht und Verstärkergabe abgeschlossen werden konnte. Im Gegensatz zu Experiment I erfolgte eine chronische Behandlung mit Citalopram oder dem Trizyklikum Clomipramin für die Dauer von insgesamt 14 Tagen. Die Dosierung war zweistufig bei jeweils 7.5 und 10mg/kg festgelegt um sedierende Effekte zu vermeiden und Dosis-Wirkungs-Effekte zu untersuchen. Innerhalb der 5-tägigen Extinktion zeigten die unbehandelten Tiere ein depressives Verhaltensprofil. Der mittlere Abstand zur Futterluke stieg signifikant an und die Tiere verbrachten mehr Zeit in der hintersten Zone der verlängerten Kammer. Auch Zielsuchverhalten an der Futterluke, welches hier erstmalig erhoben wurde, nahm aufgrund des Rückzugs stetig ab. Die unbehandelten Tiere bildeten somit hypothesenkonform Rückzugsverhalten im Sinne

einer Depression aus. Die Versuchsgruppen, welche vor Beginn der Extinktion bereits für neun Tage eine Behandlung mit Antidepressiva erhalten hatten, zeigten diese Verhaltensweisen stark abgeschwächt oder erst zu einem verzögerten Zeitpunkt im Laufe der Extinktion. Sowohl Citalopram als auch Clomipramin reduzierten den Abstand zur Futterluke. Clomipramin verkürzte in beiden Dosierungen die Verweildauer im hinteren Teil der Kammer. Die behandelten Tiere zeigten zudem signifikant mehr Zielaufspürungsverhalten im Gegensatz zur Kontrollgruppe, was auf eine erhöhte Extinktionsresistenz hindeutet. Auch andere Antidepressiva wie Fluoxetin, Desipramin und Imipramin erhöhen die Extinktionsresistenz in operanten Verfahren (O'Donnell & Seiden, 1983; Schulz et al., 2007a; Nikiforuk & Popik, 2009). Ein eindeutiger Dosis-Wirkungs-Effekt trat nicht ein. Beide Dosierungen, sowohl 7.5 als auch 10mg/kg, hatten ähnlich starken Einfluss auf das depressions-ähnliche Verhalten der Tiere. Keines der beiden Antidepressiva war in seiner Wirksamkeit deutlich überlegen. Sedierende Effekte traten im Vergleich zu Experiment I aufgrund der niedrigeren Dosierung und der chronischen Applikation nicht auf (Kugelberg, Apelqvist & Bengtsson, 2002). Sowohl die horizontale als auch die vertikale Aktivität unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht, so dass die in Experiment II gefundenen Effekte auf die Indikatoren depressiven Verhaltens nicht auf Veränderungen der Lokomotion rückführbar sind. Wie auch zuvor in Experiment I unterlagen die Parameter, welche die Performanz der operanten Aufgabe messen, einer typischen Extinktionskurve. Die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche nahm in allen Gruppen über die Extinktion hinweg ab, während die Latenz zwischen dem Hinweislicht und dem nächsten Lichtschrankendurchbruch stetig zunahm. Die Tiere schauten insgesamt seltener und mit größerer Latenz nach der angekündigten Futterbelohnung. Keines der beiden Antidepressiva beeinflusste die Latenz und die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche. Die Extinktionsresistenz wurde innerhalb dieser Parameter somit nicht durch die chronische Behandlung mit Citalopram und Clomipramin moduliert. Dieses Ergebnis ist jedoch auch relevant für die Validität des Modells. Bei der Extinktion von erlerntem Verhalten ist es notwendig, dass die Tiere die veränderte Kontingenz zwischen dem Hinweislicht und der nicht mehr auftretenden Futterbelohnung erlernen. Nur durch dieses Erlernen kommt es zu Extinktionskurven in Performanzparametern und schließlich zu einem Unterlassen

des Verhaltens, welches vormals zu der Futterbelohnung geführt hat. Die Tatsache, dass die Tiere nach einer chronischen Behandlung mit Antidepressiva mehr Zielsuchverhalten zeigen als eine unbehandelte Kontrollgruppe und weniger Rückzugsverhalten ausbilden, könnte somit auch interpretiert werden als mangelnde Lernleistung der veränderten Kontingenz. Somit würde es sich hier um eine kognitive Beeinträchtigung anstelle von antidepressivem Verhalten handeln. Zur Entkräftigung dieser Argumentation sind die Befunde zur Latenz und den Lichtschrankendurchbrüchen von besonderer Bedeutung. Da es sich um Lernparameter handelt, sollten sich diese im Rahmen einer kognitiven Beeinträchtigung durch Antidepressiva ebenfalls verändern. Die Latenz wäre in diesem Fall geringer als in der Kontrollgruppe und die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche in der Futterluke höher. Veränderungen dieser Parameter aufgrund einer Behandlung konnten weder in Experiment II noch in Experiment III gefunden werden, so dass eine Beeinflussung kognitiver Maße unwahrscheinlich ist. Neben anderen Untersuchungen konnten auch Liljequist, Linnoila & Mattila (1974) keine Beeinträchtigung von Lernleistungen aufgrund chronischer Behandlung mit Antidepressiva, hier Imipramin, finden. Die Abschwächung von Rückzugsverhalten deutet stattdessen auf eine Modulation von depressivem Verhalten nach unerwartetem, unkontrollierbarem Verstärkerentzug hin.

Beißen trat in Experiment II und III als Folge des veränderten Verstärkerplans mit Verzicht auf einen Hebel nur äußerst selten auf. Aufgrund des Bodeneffektes ließen sich keine Behandlungseffekte nachweisen. Es zeigte sich allerdings, dass die prozentuale Dauer des Beißens der Futterluke über den Verlauf mehrerer Extinktionsdurchgänge hinweg anstieg, zumal die Tiere zunehmend weniger Zeit an der Futterluke verbrachten. Unter Verwendung eines Operandums oder bei der Darbietung anderer Objekte kann Beißverhalten jedoch als Indikator für extinktionsbedingte, depressive Frustration herangezogen werden (Weinstein, 1982; Tomie et al., 1993). Neben Frustration und Depressivität führt operante Extinktion auch zu erhöhter Ängstlichkeit im Menschen und Versuchstier, so dass Depressionen und Angststörungen häufig komorbid auftreten (Lenze, 2003). Deshalb wurde in Experiment II nach Abschluss der Extinktion eine Untersuchung im Offenfeld angeschlossen. Zusätzlich zu den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe wurde auch eine experimentell naive Gruppe getestet um rein

extinktions-bedingte Unterschiede in der Ängstlichkeit zu betrachten. Es zeigte sich, dass unbehandelte Tiere nach der Extinktion weniger Zeit im Zentrum des Offenfelds verbrachten als experimentell naive Tiere, was auf eine erhöhte Ängstlichkeit hindeutet. Im Vergleich dazu hielten sich die mit Citalopram behandelten Tiere länger im Zentrum auf als die Vehikelgruppe. SSRIs haben anxiolytische Eigenschaften und werden daher oftmals bei Angststörungen oder gemischten ängstlich-depressiven Krankheitsbildern eingesetzt (Prut & Belzung, 2003). Auch in dieser Untersuchung reduzierten sie extinktions-bedingte Ängstlichkeit. Clomipramin hingegen hatte hier keine Effekte auf die Zentrumszeit.

In Experiment II konnte somit gezeigt werden, dass der mittlere Abstand zur Futterluke, Zielaufspürung und der Aufenthalt in einer entfernten Rückzugszone valide Indikatoren von Rückzugsverhalten im Sinne einer EID sind. Wie durch Modelle aus dem Humanbereich bekräftigt, führt ein unerwarteter, unkontrollierbarer Verstärkerverlust bzw. ein Mangel an alternativen Verstärkern zu Depressivität (Lewinsohn, 1973; 1974; Ferster 1973). Die hierbei untersuchten Verhaltensmarker in der Ratte reagierten sensitiv auf eine Behandlung mit Citalopram und Clomipramin. Depressives Verhalten wurde in den anfänglichen Extinktionsphasen signifikant reduziert. Zudem konnte ausgeschlossen werden, dass diese Effekte Artefakte sind und nicht auf einer substanzinduzierten Sedierung oder kognitiven Beeinträchtigung der Tiere beruhen. Abschließend blieb noch ungeklärt, ob sich zusätzliche Stressoren und depressogene Faktoren potenzierend im Modell der EID auswirken. Wie zu Beginn erläutert, entsteht eine Depression nicht primär aus einem singulären Verlusterlebnis heraus, sondern vor allem bei einer Häufung solcher Verluste, mangelnden Verhaltensalternativen und einer Dauerbelastung durch Stress, bzw. Stresshormone. Chronischer Stress ist ein prädisponierender Faktor für die Genese von Depressionen (Pollak, Rey & Moje, 2010). Besonders ältere Menschen sind von dieser Konstellation aus gehäuften Verlusterleben und einer gesteigerten Aktivität der HHN-Achse betroffen. Die Tatsache, dass mit der Seneszenz auch eine reduzierte Verhaltensvariabilität und ein Defizit an natürlichen Verstärkerquellen einher geht, macht alte Menschen im Speziellen anfälliger für Depressionen auf Basis von Verstärkerverlust und Extinktion. Daher sollte in Experiment III untersucht werden, ob chronischer Stress in Form einer Corticosteronbehandlung die Genese einer EID beschleunigt bzw. das Ausmaß



verschlechtert. Die chronische Verabreichung von Corticosteron induziert in vielen Screening-Tests einen depressiven Phänotypen bei Nagern (z.B. Gourley & Taylor, 2009; Sterner & Kalynchuk, 2010). Zudem wurden adulte als auch alte Tiere getestet um der Frage nachzugehen, ob Extinktion und Corticosteron sich im alten Organismus stärker auf depressions-ähnliches Verhalten auswirken als im adulten Organismus. Wie zuvor in Experiment II wurde ein Verstärkerplan mit freier Verabreichung der Futterbelohnung diesmal in einem festen Intervall von 30 Sekunden angewandt. Nach einem mehrtägigen Akquisitionstraining wurden die Tiere unter weiterem, aufrechterhaltenden Training für 23 Tage mit Corticosteron oder normalem Trinkwasser behandelt bis zur Extinktionsphase. Alle Gruppen bildeten während der Extinktion depressives Verhalten gemäß des Modells aus, sowohl alte als auch adulte, behandelte und unbehandelte Tiere. Innerhalb der Extinktion zeigten sich jedoch wesentliche Gruppenunterschiede in den Variablen des Rückzugsverhaltens. Der Distanzgradient zur Futterluke, dem ehemaligen Ort der Belohnung, nahm sowohl bei adulten als auch alten Tieren zu Beginn der Extinktion innerhalb der Behandlungsgruppen stärker zu als in den Kontrollgruppen. Zielaufspürung war in dieser Untersuchung der sensitivste aller Indikatoren einer EID. Im Laufe der Extinktion nahmen die Dauer und Frequenz in allen Gruppen stark ab, die Tiere waren seltener in Kontakt mit der vormals bevorzugten Futterluke. Jedoch zeigten sich während der Extinktion sowohl Alters- als auch Behandlungseffekte. Adulte Tiere betrieben mehr und auch länger Zielaufspürung an der Futterluke als alte Tiere. Zudem zeigte sich ein statistischer Trend für einen Einfluss der Behandlung. Corticosteron reduzierte in beiden Alterskohorten die Frequenz und Dauer der Zielaufspürung. Bei alten Tieren tendenziell an vier von fünf, bei adulten Tieren tendenziell an einem von insgesamt fünf Extinktionstagen. Auch Signalaufspürung, die Blicke und das Aufrichten zum Hinweislicht- nahm aufgrund der Corticosteronbehandlung in beiden Altersgruppen ab. Die Corticosteronbehandlung hatte in Experiment III jedoch keinen Einfluss auf die in der Rückzugszone der verlängerten Kammer verbrachten Zeit. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass alte Tiere erwartungsgemäß stärker anfällig sind für EID als adulte Tiere und dass sich EID bei alten Tieren durch eine chronische Behandlung mit Corticosteron zusätzlich stärker verschlechtert. Der Distanzgradient zur Futterluke

und die Abnahme von Zielaufspürungsverhalten waren bei alten Tieren durch die chronische Behandlung mit Cort stärker ausgeprägt.

Wie auch in Experiment II und in vergleichbaren Studien zeigte sich hier kein Einfluss der Behandlung auf die horizontale Aktivität (Brotto, Gorzalka & Barr, 2001), die Latenz oder die Anzahl der Lichtschrankendurchbrüche in der Futterluke, so dass Alternativerklärungen zur Erhöhung des Rückzugsverhaltens innerhalb der Extinktion unwahrscheinlich sind. Andere Studien zeigen, dass Corticosteron bei chronischer Verabreichung das Erlernen einer belohnten Aufgabe erschwert (Gourley et al., 2008a; 2008b). Diese Befunde stützen Untersuchungen im Humanbereich, welche darauf hindeuten, dass Belohnungslernen bei depressiven Patienten beeinträchtigt ist. Neben einer geringeren Aktivität des mesolimbischen, dopaminergen Systems (Pizzagalli et al., 2005; 2009) könnte auch eine Überaktivität der HHN-Achse mit erhöhten Cortisolspiegeln ursächlich für diese Beeinträchtigung sein. Das Erlernen der veränderten Kontingenz innerhalb der Extinktion war in Experiment III weder bei adulten noch bei alten Tieren beeinträchtigt. Die Extinktionsresistenz wurde durch die Corticosteronbehandlung nicht moduliert, jedoch zeigten alte Tiere in der Extinktion eine signifikant größere Latenz und eine niedrigere Anzahl an Lichtschrankendurchbrüchen als adulte Tiere. Dieser Befund könnte Indikator einer verringerten Extinktionsresistenz im Alter sein, was durch eine Reihe anderer Studien unterstützt wird (Schulz et al., 2004; Andrzejewski, Schochet, Feit, Harris, McKee & Kelley, 2011). Zudem zeigten alte Tiere mehr Verhalten im Sinne einer EID als adulte Tiere, so dass diese Ergebnisse die Hypothese bekräftigen, dass EID altersabhängig wahrscheinlicher auftritt und aufgrund einer verringerten Extinktionsresistenz verstärkt ist. Die in Experiment III durchgeführten Blutuntersuchungen konnten aufzeigen, dass neben dem depressivem Verhalten auch die Aktivität der HHN-Achse bei alten Tieren stärker beeinträchtigt war aufgrund der Behandlung mit Corticosteron. Die Basiswerte von endogenem ACTH und Cort unterschieden sich entgegen der Befunde anderer Untersuchungen nicht in Abhängigkeit des Alters (Tang & Phillips, 1978; Sapolsky et al., 1986), jedoch ist es möglich, dass sich Altersunterschiede zuverlässig erst mit höherem Alter >22 Monaten nachweisen lassen (Sapolsky et al., 1983; 1986). In der Behandlungsgruppe der alten Tiere waren signifikant niedrigere Basalwerte von ACTH und Cort nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Für adulte Tiere zeigte sich

dieser Effekt nicht. Nach der akuten Fixation für 10 Minuten stiegen in allen Gruppen die Plasmakonzentrationen von endogenem Cort signifikant an. Die Ausschüttung war bei alten Tieren in der Behandlungsgruppe jedoch über die Dauer von drei Stunden deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei adulten Tieren zeichnete sich dies nur tendenziell ab, was darauf hinweist, dass mit dem Alter die Anpassung an chronische Stressexposition zunehmend nachlässt. Speziell bei den alten Tieren führte die Behandlung mit Cort zu einer Inhibition der HHN-Achse mit abgeschwächter Reagibilität auf einen akuten Stressor (Young, Kwak & Kottak, 1995; Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006). Die Plasmaspiegel von ACTH veränderten sich nicht durch akuten Stress oder in Abhängigkeit der Behandlung, jedoch zeigten sich nach akutem Stress die erwarteten Alterseffekte. Alte Tiere sekretierten mehr ACTH als adulte Tiere, vermutlich aufgrund einer altersbedingten Beeinträchtigung des negativen Feedbackmechanismus der HHN-Achse (Riegle, 1973; Sapolsky et al., 1983).

Zusammenfassend können aus den Experimenten und Befunden dieser Dissertation wesentliche Aussagen zur Validität und Anwendbarkeit des Modells der Extinktions-induzierten Depression nach positiver Verstärkung getroffen werden. Im Hinblick auf die initialen Fragestellungen konnte gezeigt werden, dass der Entzug einer erwarteten Belohnung analog zu Befunden der Extinktion negativer Verstärkung zu Extinktions-induzierter Depressivität führt. Als valide Verhaltensindikatoren wurden der Distanzgradient zur Futterluke, die Abnahme von Zielaufspürung, der Rückzug in ein entferntes Rückzugskompartiment und das Beißen des Hebels identifiziert. Die verlängerte operante Kammer und die Anwendung von freien Verstärkerplänen ohne Hebeldruckraten stellen ein einfaches, schnell erlernbares Tiermodell zur Verfügung, mit dem neben operanten Variablen und depressivem Verhalten auch horizontale und vertikale Aktivität gemessen werden können. Anhand verschiedener Verstärkerpläne wurde sowohl für adulte als auch alte Tiere gezeigt, dass es während der Extinktion von positiv verstärktem Verhalten zu räumlichem Rückzug und vermehrtem Beißen der vormals bevorzugten Futterluke kommt. Alle der identifizierten Verhaltensweisen zeigen eine große inhaltliche Nähe zu sozialem Rückzug und Vermeidungsverhalten, welches bei depressiven Patienten mangels verfügbarer Verstärkung und alternativen Verhaltensweisen zur Erlangung von Verstärkung auftritt. Die chronische Behandlung mit dem Trizyklikum Clomipramin

und dem SSRI Citalopram reduzierte alle Verhaltensmaße von Rückzugsverhalten während der initialen Extinktion. Dem Modell liegt somit Konstruktvalidität und prädiktive Validität zugrunde (Willner, 1984; Pollack et al., 2010). Hingegen verstärkte die chronische Behandlung mit Corticosteron, welche die Folgen von chronischem Stress auf den Organismus nachstellt, hypothesenkonform die Indikatoren depressiven Verhaltens. Alte Tiere zeigten als Folge der Extinktion und aufgrund geringerer Extinktionsresistenz stärkere Verhaltensänderungen im Sinne einer EID als adulte Tiere. Sie konnten sich zudem schlechter an die Corticosteronbehandlung anpassen, was zu verstärktem depressiven Verhalten und einer Beeinträchtigung der Funktionalität der HHN-Achse führte. Da sich das beschriebene Tiermodell und die gemessenen Verhaltensindikatoren als sensitiv gegenüber zunehmendem Alter und der chronischen Behandlung mit Corticosteron erwiesen haben, kann dies ein Anhaltspunkt dafür sein, EID speziell zur Erforschung geriatrischer und therapieresistenter Depressionen einzusetzen. Für beide Subtypen der Depression gibt es bisher wenig spezifische Psychopharmaka. Eine Testung von Ketamin, das in vielen Humanstudien eine gute Wirksamkeit bei TRD aufweist, in klassischen Screening-Tests und Tiermodellen jedoch vermeintlich wirkungslos erscheint, könnte zukünftig weiteren Aufschluss darüber geben, ob mit dem Modell neue antidepressive Substanzen detektiert werden können.

## 6 Literatur

Aihara M, Ida I, Yuuki N, Oshima A, Kumano H, Takahashi K, Fukuda M, Oriuchi N, Endo KI, Matsuda H, Mikuni M (2006) HPA axis dysfunction in unmedicated major depressive disorder and its normalization by pharmacotherapy correlates with alteration of neural activity in prefrontal cortex and limbic/paralimbic regions. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 155, 245-256.

Andrzejewski ME, Schochet TL, Feit EC, Harris R, McKee BL, Kelley AE (2011) A comparison of adult and adolescent rat behavior in operant learning, extinction, and behavioral inhibition paradigms. *Behavioral Neuroscience*, 125, 93-105.

Arnone M, Dantzer R (1980) Effects of diazepam on extinction induced aggression in pigs. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 13, 27-30.

Azrin NH, Hutchinson RR, Hake DF (1966) Extinction induced aggression. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 9, 191-204.

Baxter MG, Murray EA (2002) The amygdala and reward. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 563-573.

Beck AT, Rush AJ, Shaw BF, Emery G (1979) *Cognitive Therapy of Depression*. New York: Guilford Press. ISBN: 0-89862-000-7.

Belzung, C (1999) Measuring exploratory behavior. In: Crusio, WE, Gerlai, RT (Eds.), *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. Elsevier, Amsterdam, 739-749.

Berridge KC, Kringelbach ML (2008) Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology*, 199, 457-480.

Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends in Neuroscience*, 26, 507-513.

Berton O, Nestler EJ (2006) New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 137-151.

Bhagwagar Z, Cowen PJ (2008) 'It's not over when it's over: Persistent neurobiological abnormalities in recovered depressed patients. *Psychological Medicine*, 38, 307-313.

- Blazer DG (2003) Depression in late life: Review and commentary. *Journal of Gerontology*, 58, 249-265.
- Bobo WV, Shelton RC (2009) Olanzapine and fluoxetine combination therapy for treatment-resistant depression: review of efficacy, safety, and study design issues. *Neuropsychiatric Diseases and Treatment*, 5, 369-383.
- Bonner D (1995) Treatment resistant depression in the elderly. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 10, 259-264.
- Bogdan R, Pizzagalli DA (2006) Acute stress reduces reward responsiveness: implications for depression. *Biological Psychiatry*, 10, 1147-1154.
- Borsini F, Meli A (1988) Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology*, 94, 147-160.
- Borta A, Schwarting RKW (2005) Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiology & Behavior*, 84, 387-396.
- Brotto LA, Gorzalka BB, Barr AM (2001) Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *European Journal of Pharmacology*, 424, 203-209.
- Brown GW, Harris TO, Hepworth C (1994) Life events and endogenous depression. A puzzle reexamined. *Archives of General Psychiatry*, 51(7), 525-534.
- Brown ES, Rush AJ, McEwen BS (1999) Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology*, 21, 474-484.
- Bueno JLO, Judice-Daher DM, Tavares TF (2012) Role of the amygdala in the reinforcement omission effect. *Psychology & Neuroscience*, 5, 265-273.
- Cairncross KD, Cox B, Forster C, Wren AF (1978) A new model for the detection of antidepressant drugs: olfactory bulbectomy in the rat compared with existing models. *Journal of Pharmacological Methods*, 1, 131-143.
- Cairney J, Krause N (2008) Negative life events and age-related decline in mastery: Are older adults more vulnerable to the control-eroding effect of stress? *Journal of Gerontology: Social Sciences*, 63, 162-170.

Carboni E, Vacca C (2003) Conditioned Place Preference. *Drugs of Abuse: Methods In Molecular Medicine*, 79, 481-498.

Carvalho JP, Hopko DR (2011) Behavioral theory of depression: reinforcement as a mediating variable between avoidance and depression. *Journal of Behavior Therapy and Experimental Psychiatry*, 42, 154-162.

Chang SE, Holland PC (2013) Effects of nucleus accumbens core and shell lesions on autoshaped lever-pressing. *Behavioral Brain Research*, 256, 36-42.

Chen J, Gao K, Kemp DE (2011) Second-generation antipsychotics in major depressive disorder: update and clinical perspective. *Current Opinion in Psychiatry*, 24, 10-17.

Coe LC, Stanton ME, Levine S (1983) Adrenal responses to reinforcement and extinction: Role of expectancy versus instrumental responding. *Behavioral Neuroscience*, 97(4), 654-657.

Coover GD, Goldman L, Levine S (1971a) Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 6, 261-263.

Coover GD, Goldman L, Levine S (1971b) Plasma corticosterone levels during extinction of a lever-press response in hippocampectomized rats. *Physiology & Behavior*, 7, 727-732.

Corbit LH, Muir JL, Balleine BW (2001) The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *Journal of Neuroscience*, 21, 3251-3260.

Cowen PJ (2010) Not fade away: the HPA axis and depression. *Psychological Medicine*, 40, 1-4.

Cryan JF, Markou A, Lucki I (2002) Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245.

Custodio Teixeira R, Zangrossi H, Graeff FG (2000) Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 4, 571-576.

Dailly E, Chenu F, Renard CE, Bourin M (2004) Dopamine, Depression and antidepressants. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 18, 601-607.

Dallman MF, Jones MT (1973) Corticosteroid feedback control of ACTH secretion: effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology*, 92, 1367-1375.

Daly HB (1974) Reinforcing properties of escape from frustration aroused in various learning situations. *Psychology of Learning and Motivation*, 8, 187-231.

Dantzer R, Arnone M, Mormede P (1980) Effects of frustration on behavior and plasma corticosteroid levels in pigs. *Physiology & Behavior*, 24, 1-4.

D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G (2000) The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *European Journal of Pharmacology*, 405, 365-373.

Davidson RJ, Pizzagalli D, Nitschke JB, Putnam K (2002) Depression: Perspectives from affective neuroscience. *Annual Review of Psychology*, 53, 545-574.

Davis H, Memmott J, Macfadden L, Levine S (1976) Pituitary-adrenal activity under different appetitive extinction procedures. *Physiology & Behavior*, 17, 687-690.

Detke MJ, Johnson J, Lucki I (1997) Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 5, 107-112.

Deuschle M., Gottherdt U, Schweiger U, Weber B, Körner A, Schmider J, Standhardt H, Lammers C-H, Heuser I (1997). With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its diurnal amplitude flattens. *Life Sciences*, 61, 2239-2246.

Deussing JM (2006) Animal models of Depression. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3, 375-383.

DiChiara GD (2002) Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioral Brain Research*, 137, 75-114.

Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: Regulation by stress and antidepressants. *Biological Psychiatry*, 59, 1136-1143.



- Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST, Raichle ME (1992) A functional anatomical study of unipolar depression. *Journal of Neuroscience*, 12, 3628–3641.
- Drevets WC (2000) Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Progress in Brain Research*, 126, 413-431.
- Drevets WC, Furey ML (2009) Depression and the Brain. *Encyclopedia of Neuroscience*, 459-470.
- Duman RS, Monteggia LM (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorder. *Biological Psychiatry*, 59, 1116-1127.
- Dunlop BW, Nemeroff CB (2007) The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Archives of General Psychiatry*, 64, 327-337.
- Fava M (2006) Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biological Psychiatry*, 53, 649-659.
- Fernández-Guasti A, Fiedler JL, Herrera L, Handa RJ (2012) Sex, stress, and mood disorders: at the intersection of adrenal and gonadal hormones. *Hormone and Metabolic Research*, 44, 607-618.
- Ferster CB (1973) A functional analysis of depression. *American Psychologist*, 28, 857-870.
- Fiske A, Loebach Wetherell J, Gatz M (2009) Depression in older adults. *Annual Reviews in Clinical Psychology*, 5, 363-389.
- Flagel SB, Watson SJ, Robinson TE, Akil H (2007) Individual differences in the propensity to approach signals vs. goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology*, 191, 599-607.
- Flaherty CF (1990) Effects of anxiolytics and antidepressants on extinction and negative contrast. *Pharmacology and Therapeutics*, 46, 309-320.
- Fluttert M, Dalm S, Oitzl, MS (2000) A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Laboratory Animals*, 34, 372-378.
- Gold PW, Drevets WC, Charney DS (2002) New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biological psychiatry*, 52, 381-385.

Gotthardt U, Schweiger U, Fahrenberg J, Lauer CJ, Holsboer F, Heuser I (1995) Cortisol, ACTH, and cardiovascular response to a cognitive challenge paradigm in aging and depression. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 268, 865-873.

Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL, Olausson P, Taylor JR (2008a) Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biological Psychiatry*, 64, 884-890.

Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (2008b) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biological Psychiatry*, 63, 353-359.

Gourley SL, Taylor JR (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodent. *Current Protocols in Neuroscience*, chapter 9, unit-9.32.

Grant BF, Harford TC (1995) Comorbidity between DSM-IV alcohol use disorders and major depression: results of a national survey. *Drug and Alcohol Dependence*, 39, 197-206.

Hall CS (1934) Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18, 385-403.

Hammen C (2005) Stress and depression. *Annual Review of Clinical Psychology*, 1, 293-319.

Haskell M, Coerse NCA, Forkman B (2000) Frustration-induced aggression in the domestic hen: the effect of thwarting access to food and water on aggressive responses and subsequent approach tendencies. *Behavior*, 137, 531-546.

Henriques JB & Davidson RJ (2000) Decreased responsiveness to reward in depression. *Cognition & Emotion*, 14, 711-724.

Herman M, Henneicke H, Street J, Modzelewski, Kalak R, Buttgereit F, Dunstan CR, Zhou H, Seibel MJ (2009) The challenge of continuous exogenous glucocorticoid administration in mice. *Steroids*, 74, 245-249.

Hinkelmann K, Moritz S, Botzenhardt J, Muhtz C, Wiedemann K, Kellner M, Otte C (2012) Changes in cortisol secretion during antidepressive treatment and cognitive

improvement in patients with major depression: a longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 685-692.

Holmes A, Wellmann CL (2009) Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 773-783.

Holtzheimer PE, Mayberg HS (2011) Stuck in a rut: rethinking depression and its treatment. *Trends in Neurosciences*, 34, 1-9.

Holsboer F (2001a) Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: Implications for therapy. *Journal of affective disorders*, 62, 77-91.

Holsboer F (2001b) Prospects for antidepressant drug discovery. *Biological Psychology*, 57, 47-65.

Holsboer-Trachsler E (2006) Therapieresistente Depression. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*, 7(1), 43-46.

Hutchinson RR, Azrin NH, Hunt GM (1968) Attack produced by intermittent reinforcement of a concurrent operant response. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 11, 489-495.

Iemolo A, Valenza M, Tozier L, Knapp CM, Kornetsky C, Steardo L, Sabino V, Cottone P (2012) Withdrawal from chronic, intermittent access to a highly palatable food induces depressive-like behavior in compulsive eating rats. *Behavioral Pharmacology*, 23, 593-602.

Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Künzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F (2007) Combined dexamethasone/corticotrophin releasing hormone test predicts treatment response in major depression-a potential biomarker? *Biological Psychiatry*, 62, 47-54.

Jacobson NS, Dobson KS, Truax PA, Addis ME, Koerner K, Gollan JK, Gortner E, Prince SE (1996) A component analysis of cognitive-behavioral treatment for depression. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 64, 295-304.

Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE (2006) Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioral Brain Research*, 168, 280-288

Judice-Daher DM, Bueno JLO (2013) Lesions of the nucleus accumbens disrupt reinforcement omission effects in rats. *Behavioral Brain Research*, 252, 439-443.

Kammer D (1983) Depression, attributional style, and failure generalization. *Cognitive Therapy and Research*, 7, 413-423.

Kawasaki K, Iwasaki T (1997) Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, 61(17), 1721-1728.

Kelley AE, Berridge KC (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *Journal of Neuroscience*, 22, 3306-3311.

Kelly JF, Hake DF (1970) An extinction-induced increase in an aggressive response with humans. *Journal of Experimental Analysis of Behavior*, 14, 153-164.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 156, 837-841.

Kling A, Mjörndal T, Rantapää-Dahlqvist S (2013) Glucocorticoid treatment increases density of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1014-1020.

Kugelberg FC, Apelqvist G, Bengtsson F (2002) Effects of chronic citalopram treatment on central and peripheral spontaneous open-field behaviors in rats. *Pharmacology & Toxicology*, 90, 303-310.

Koike H, Iijima M, Chaki S (2013) Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 107, 20-23.

Kraaij V, Arensman E, Spinhoven P (2002) Negative life events and depression in elderly persons: a meta-analysis. *Journal of Gerontology: Psychosocial Sciences*, 57(B), 87-94.

Krishnan V, Nestler EJ (2011) Animal models of depression: molecular perspectives. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 7, 121-147.

Lago JA, Kosten TR (1994) Stimulant withdrawal. *Addiction*, 89, 1477-1481.

- Leavitt FI (1969) Drug-induced modifications in sexual behavior and open field locomotion of male rats. *Physiology and Behavior*, 4, 677-683.
- Lenze EJ (2003) Comorbidity of depression and anxiety in the elderly. *Current Psychiatry Reports*, 5, 62-67.
- Lewinsohn PM, Graf M (1973) Pleasant activities and depression. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 41, 261-268.
- Lewinsohn PM (1974) A behavioral approach to depression. In: The psychology of depression: contemporary theory and research. (Friedman RJ, Katz MM, eds), 157-185. New York: Wiley.
- Liljequist R, Linnoila M, Mattila MJ (1974) Effect of two weeks' treatment with chlorimipramine and nortriptyline, alone or in combination with alcohol, on learning and memory. *Psychopharmacologia*, 39, 181-186.
- Luppa M, Sikorski C, Luck T, Ehreke L, Konnopka A, Wiese B, Weyerer S, König HH, Riedel-Heller SG (2012) Age- and gender-specific prevalence of depression in latest-life-Systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders*, 136, 212-221.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20, 9104-9110.
- Mangoni AA, Jackson SHD (2004) Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 57, 6-14.
- Manzo L, Gomez MJ, Callejas-Aguilera JE, Fernandez-Teruel A, Papini MR, Torres C (2013) Anti-anxiety self-medication induced by incentive loss in rats. *Physiology & Behavior*, in press, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.10.002>.
- Martell CR, Addis ME, Jacobson NS (2001) Depression in context: strategies for guided action. New York: Norton & Co. ISBN: 0393703509 .
- Mayberg HS, Louano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowitz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH (2005) Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*, 45, 651-660.

- Mazure CM (1998) Life stressors as risk factors in depression. *Clinical Psychology: Science and Practice*, 5(3), 291-313.
- McEwen BS (1999a) Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20, 49-70.
- McEwen BS (1999b) Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 105-122.
- McKinney WT, Bunney WE (1969) Animal model of depression I. Review of evidence: implications for research. *Archives of General Psychiatry*, 21, 240-248.
- Meneses A (2003) A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT1 to 5-HT7 receptor subtypes function on a Pavlovian/instrumental autoshaped memory. *Learning & Memory*, 10, 363-372.
- Mesulam MM (1986) Frontal cortex and behavior. *Annals of Neurology*, 19, 320-325.
- Miller DB, O'Callaghan JP (2005) Aging, stress and the hippocampus. *Stress, Neuropeptides and Age-Related Diseases*, 4, 123-140.
- Mizoguchi K, Ishige M, Aburada M, Tabira T (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119, 887-897.
- Montgomery KC (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 48, 254-260.
- Moore RY, Bloom FE (1978) Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annual Reviews in Neuroscience*, 1, 129 -169.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 11, 47-60.
- Mosimann UP, Schmitt W, Greenberg BD, Kosel M, Müri RM, Berkhoff M, Hess CW, Fisch HU, Schlaepfer TE (2004) Repetitive transcranial magnetic stimulation: A putative add-on treatment for major depression in elderly patients. *Psychiatry Research*, 126, 123-133.
- Mroczek DK, Almeida DM (2004) The effect of daily stress, personality, and age on daily negative affect. *Journal of Personality*, 72, 355-378.

Murrell SA, Himmelfarb S, Wright K (1983) Prevalence of depression and its correlates in older adults. *American journal of Epidemiology*, 117(2), 173-185.

Murrough JW, Iosifescu DV, Chang LC, Al Jurdi RK, Green CE, Perez AM, Iqbal S, Pillemer S, Foulkes A, Shah A, Charney DS, Mathew SJ (2013) Antidepressant efficacy of ketamine in treatment-resistant major depression: a two-site randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 170, 1134-1142.

Nacher J, Pham K, Gil-Fernandez V, McEwen BS (2004) Chronic restraint stress and chronic corticosterone treatment modulate differentially the expression of molecules related to structural plasticity in the adult rat piriform cortex. *Neuroscience*, 126, 503-509.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (2002) Neurobiology of depression. *Neuron*, 34, 13-25.

Nestler EJ, Carlezon Jr. WA (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological Psychiatry*, 59, 1151-1159.

Nestler EJ, Hyman SE (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature Neuroscience*, 13, 1161-1169.

Nikiforuk A, Popik P (2009) Antidepressants alleviate the impact of reinforcer downshift. *European Neuropsychopharmacology*, 19, 41–48.

O'Donnell JM, Seiden LS (1983) Differential-reinforcement-of-low-rate 72-sec schedule: selective effects of antidepressant drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 224, 80-88.

Olausson P, Kiraly DD, Gourley SL, Taylor JP (2013) Persistent effects of chronic exposure to corticosterone on reward related learning and motivation in rodents. *Psychopharmacology*, 225(3), 569-577.

Ott V, Friedrich M, Prilop S, Lehnert H, Jauch-Chara K, Born J, Hallschmid M (2011) Food anticipation and subsequent withdrawal increase serum cortisol in healthy men. *Physiology and Behavior*, 103, 594-599.

Ottenbreit ND, Dobsen KS (2004) Avoidance and depression: The construction of the Cognitive Behavioral Avoidance Scale. *Behavior Research and Therapy*, 42, 293-313

Overstreet DH, Friedman E, Mathé AA, Yadid G (2005) The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29, 739-759.

Pacak K, Tjurmina O, Palkovits M, Golstein DS, Koch CA, Hoff T, Chrousos GP (2002) Chronic hypercortisolemia inhibits dopamine synthesis and turnover in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *Neuroendocrinology*, 76, 148-157.

Pariante CM, Lightman SL (2010) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31, 464-468.

Papini MR, Dudley RT (1997) Consequences of surprising reward omission. *Review of General Psychology*, 1, 175-197.

Papini MR (2003) Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62, 83-95.

Pizzagalli DA, Holmes AJ, Dillon DG, Goetz L, Birk JL, Bogdan R, Dougherty DD, Iosifescu DV, Rauch SL, Fava M (2009) Reduced caudate and nucleus accumbens response to rewards in unmedicated subjects with major depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*, 166, 702-710.

Pizzagalli DA, Jahn AL, O'Shea JP (2005) Toward an objective characterization of an anhedonic phenotype: a signal-detection approach. *Biological Psychiatry*, 57, 319-327.

Pollak DD, Rey CE, Moje FJ (2010) Rodent models in depression research: Classical strategies and new directions. *Annals of Medicine*, 42, 252-264.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. *Nature*, 266, 730-732.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology*, 47, 379-391.

Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3-33.



Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai RAL, Khaku A, Mondello S, Gold MS, Kobeissy FH (2013) *An updated overview of animal models in neuropsychiatry. Neuroscience, 240, 204-218.*

Ramos A, Morméde P (1997) Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 22, 33-57.*

Refojo D, Deussing JM (2012) Animal Models of Depression. In: *Neurobiology of Depression* (F. López-Munoz & C. Álamo eds.) Boca Raton: Taylor & Francis Group, ISBN: 978-1-4398-3849-5.

Riegle GS (1973) Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology, 11, 1-10.*

Rohr UD (2002). The impact of testosterone imbalance on depression and women's health. *Maturitas, 41, 25-46.*

Sachar EJ (1976) Neuroendocrine dysfunction in depressive illness. *Annual Reviews of Medicine, 27, 389-396.*

Sagud M, Mihaljevic-Peles A, Begic D, Vuksan-Cusa B, Kramaric M, Zivkovic M, Jakoljevic M (2001) Antipsychotics as antidepressants: what is the mechanism? *Psychiatria Danubina, 23, 302-307.*

Salamone JD, Correa M (2012) The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron, 76, 470-485.*

Samuels BA, Leonardo ED, Gadiant R, Williams A, Zhou J, David DJ, Gardier AM, Wong EHF, Hen R (2011) Modeling treatment-resistant depression. *Neuropharmacology, 61, 408-413.*

Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science, 301, 805-809.*

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983) Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. *Brain Research, 289, 235-240.*

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986) The adrenocortical axis in the aged rat: Impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiology of Aging, 7, 331-335.*

Sapolsky RM (2000) Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Archives of General Psychiatry*, 57, 925-935.

Sartorius N, Üstün TB, Lecrubier Y, Wittchen HU (1996) Depression comorbid with anxiety: results from the WHO study on "Psychological disorders in primary health care. *The British Journal of Psychiatry*, 168, 38-43.

Schaaf MJM, de Jong J, de Kloet ER, Vreugdenhil E (1998) Downregulation of BDNF mRNA and protein in the rat hippocampus by corticosterone. *Brain Research*, 813, 112-120.

Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *The American Journal of Psychiatry*, 122, 509-522.

Schulz D, Topic B, de Souza Silva MA, Huston JP (2004) Extinction-induced immobility in the water maze and its Neurochemical concomitants in aged and adult rats: A possible model for depression? *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 128-141.

Schulz D, Buddenberg TE, Huston JP (2007a) Extinction-induced "despair" in the water maze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 624-634.

Schulz D, Huston JP, Buddenberg TE, Topic B (2007b) "Despair" induced by extinction trials in the water maze: Relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 309-323.

Schulte-Markwort E, Dilling H, Mombour W, Schmidt HM (2004) Internationale Klassifikation psychischer Störungen. Kapitel V F. Klinisch-diagnostische Leitlinien. 5., durchgesehene und ergänzte Auflage. Hans Huber Verlag: Bern, Göttingen, Toronto. ISBN 3456841248.

Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *American Journal of Psychiatry*, 122(5), 509-522.

Seeman TE, Singer B, Wilkinson CW, McEwen BS (2001) Gender differences in age-related changes in HPA axis activity. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 225-240.

Segal ZV, Kennedy SH, Cohen NL & CANMAT Depression Work Group (2001) Clinical guidelines for the treatment of depressive disorders. V. Combining psychotherapy and pharmacotherapy. *Canadian Journal of Psychiatry*, 46(1), 59-62.

Seligman MEP (1972). Learned helplessness. *Annual Review of Medicine*, 23, 407-412.

Sienaert (2011) What we have learned about electroconvulsive therapy and its relevance for the practising psychiatrist. *Canadian Journal of Psychiatry*, 56, 5-12.

Skinner BF (1938) Behavior of organisms: an experimental analysis. Appleton-Century: Oxford, England.

Skinner BF (1953) Science and human behavior. Macmillan: New York.

Skinner (1963) Operant behavior. *American Psychologist*, 18, 503-515.

Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in Neurosciences*, 22, 521-527.

Stahl SM (1998) Basic psychopharmacology of antidepressants, Part 1: antidepressants have seven distinct mechanisms of action. *Journal of Clinical Psychiatry*, 59(4), 5-14.

Stellar JR, Kelley AE, Corbett D (1983) Effects of peripheral and central dopamine blockade on lateral hypothalamic self-stimulation: evidence for both reward and motor deficits. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 18, 433-442.

Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, 85, 367-370.

Sterner EY, Kalynchuk LE (2010) Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34, 777-790.

Stokes PE (1995) The potential role of excessive cortisol induced by HPA hyperfunction in the pathogenesis of depression. *European Neuropsychopharmacology Supplement*, 77-82.

Tang F, Phillips JG (1978) Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *Journal of Gerontology*, 33, 377-382.

- Thompson T, Bloom W, (1966). Aggressive behavior and extinction-induced response rate increase. *Psychonomic Science*, 5, 335-336.
- Thomson F, Craighead M (2008) Innovative approaches for the treatment of depression: Targeting the HPA-axis. *Neurochemical Research*, 33, 691-707.
- Thorndike EL (1898) Animal intelligence: an experimental study of the associative processes in animals. *Psychological Monographs: General and Applied*, 2, i-109.
- Thorndike EL (1927) The law of effect. *American Journal of Psychology*, 39, 212-222.
- Tomie A, Carelli R, Wagner GC (1993) Negative correlation between tone (S-) and water increases target biting during S- in rats. *Animal Learning and Behavior* 21, 355-359.
- Topic B, Huston JP, Nametskova K, Zhu SW, Mohammed AH, Schulz D (2008a) Extinction-induced "despair" in aged and adult rats: Links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 519-526.
- Topic B, Oitzl MS, Meijer OC, Huston JP, de Souza Silva MA (2008b) Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neurochemical parameters. *Neuropsychobiology*, 58, 138-153.
- Videbech P (2000) PET measurements of brain glucose metabolism and blood flow in major depressive disorder: a critical review. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 101, 11-20.
- Walker AJ, Burnett SA, Hasebe K, McGillivray JA, Gray LJ, McGee SL, Walder K, Berk M, Tye SJ (2013) Chronic adrenocorticotrophic hormone treatment alters tricyclic antidepressant efficacy and prefrontal monoamine tissue levels. *Behavioral Brain Research*, 242, 76-83.
- Whalen PJ, Shin LM, Somerville LH, McLean AA, Kim H (2002) Functional neuroimaging studies of the amygdala in depression. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*, 7, 234-242.
- Weinstein L (1982) Negative incentive contrast effects with sucrose and rats as due to aggression. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 19, 359-361.

- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology*, 83, 1-16.
- Willner P (1995) Animal models of depression: validity and applications. *Advances in biochemical Psychopharmacology*, 49, 19-41.
- Willner P (1997) The mesolimbic dopamine system as a target for rapid antidepressant action. *International Clinical Psychopharmacology*, 12.
- Willner P (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*, 52, 90-110.
- Willner P, Scheel-Krüger J, Belzung C (2013) The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>.
- Wong M, Licino J (2001) Research and treatment approaches to depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 343-351.
- Yerkes RM, Morgulis S (1909) The method of Pavlov in animal psychology. *Psychological Bulletin*, 6, 257-273.
- Young EA, Kwak SP, Kottak J (1995) Negative feedback regulation following administration of chronic exogenous corticosterone. *Journal of Neuroendocrinology*, 7, 37-45.
- Zahm DS (2000) An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24, 85-105.
- Zis AP, Goodwin FK (1979) Major affective disorder as a recurrent illness: a critical review. *Archives of General Psychiatry*, 36, 835-839.
- Zobel AW, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Holsboer F, Ising M (2001) Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression: A prospective study. *Journal of Psychiatric Research*, 35, 83-94.

## 7 Veröffentlichungen

Nachfolgend sind die Veröffentlichungen, auf denen diese Dissertation basiert, mitsamt einer Angabe der Eigenleistung aufgeführt. Die darin zitierte Literatur ist im Anhang der jeweiligen Arbeit aufgelistet.

1. **Huston JP, van den Brink J, Komorowski M, Huq Y, Topic B (2012) Antidepressants reduce extinction-induced withdrawal and biting behaviors: a model for depressive-like behavior. *Neuroscience*, 210, 249-257.**

Impact Faktor: 3.122

Eigenanteil: 10%

2. **Komorowski M, Huston JP, Klingenhegel I, Paulat J, Sackers J, Topic B (2012) Distance from source of reward as a marker for extinction-induced "despair": modulation by the antidepressants clomipramine and citalopram. *Neuroscience*, 223, 152-162.**

Impact Faktor: 3.122

Eigenanteil: 80%

3. **Komorowski M, Huston JP, Lamounier-Zepter V, Topic B (2013) Chronic corticosterone treatment enhances extinction-induced despair and impairs HPA-axis activity in aged and adult rats. *Submitted, 2013.***

Eigenanteil: 80%

## ANTIDEPRESSANTS REDUCE EXTINCTION-INDUCED WITHDRAWAL AND BITING BEHAVIORS: A MODEL FOR DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR

J. P. HUSTON,\* J. VAN DEN BRINK, M. KOMOROWSKI, Y. HUQ AND B. TOPIC

Center for Behavioral Neuroscience, Department of Experimental Psychology, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Universitätsstr.1, 40225 Düsseldorf, Germany

**Abstract**—The withholding of expected rewards results in extinction of behavior and, hypothetically, to depression-like symptoms. In a test of this hypothesis, we examined the effects of extinction of food-reinforced lever-pressing on collateral behaviors that might be indices of depression. Operant extinction is known to be aversive to the organism and results in avoidance behavior. We hypothesized that avoidance of, or withdrawal from, the former source of reward may serve as a marker for “despair.” Adult male Wistar rats ( $n=6-7$  animals per group) were exposed to a Skinner box attached to a second compartment of the same size, providing opportunity for the animals to leave the operant chamber and to enter the “withdrawal” compartment. The animals spent a portion of the time during the extinction trials in this second chamber. To assess the predictive validity of this behavior as a potential marker of “despair,” we tested the effects of chronic administration of two common antidepressant drugs on this measure. The tricyclic antidepressant imipramine (20 mg/kg) as well as the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram (20 mg/kg) reduced the number of entries and time spent in the withdrawal compartment. We propose that entries into and time spent in the withdrawal compartment may operationalize “avoidance,” a core symptom of major depression. Rearing as well as biting behaviors during the extinction trials were also attenuated by the antidepressant treatment. These results lend support to the hypothesis that extinction of positively reinforced operants evokes behaviors that reflect elements of “despair/depression” because these behaviors are modulated by antidepressant treatment. The avoidance of the operant chamber as a consequence of extinction, together with rearing and biting behaviors, may serve as useful measures for the testing of antidepressant treatments. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** depression, extinction, operant behavior, despair, imipramine, citalopram.

Chronic stressors, as well as the absence or withdrawal of positive reinforcers (rewards) (Lewinsohn, 1974), such as the loss of employment, partner, friends, and health, are associated with the risk for the onset of major depressive

\*Corresponding author. Tel: +49-172-212-6861; fax: +49-211-811-2024.

E-mail address: [Huston@uni-duesseldorf.de](mailto:Huston@uni-duesseldorf.de) (J. P. Huston).

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; MD, major depressive disorder.

0306-4522/12 \$36.00 © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.  
10.1016/j.neuroscience.2012.02.024

disorder (MD) (for review see Hammen, 2005; Kessler, 1997). The main symptoms are a depressed mood, low drive, loss of interest and pleasure, hopelessness, feelings of guilt or worthlessness, suicidal intentions, avoidance, and agitated behavior.

Given the importance of loss, or lack of reinforcers in the etiology of human clinical depression, we have begun to investigate the possibility of developing an animal model for extinction-induced despair/depression-like behavior. Initially we employed extinction of negatively reinforced behavior in the search for behavioral and physiological markers of extinction-induced “despair” (see Huston et al., 2009, for review). Specifically, we found that extinction of successful escape in the Morris water maze was accompanied by behaviors akin to depression, such as an increase in immobility (Schulz et al., 2004, 2007a,b) that correlated with measures of anxiety (Schulz et al., 2007b) and was attenuated by chronic antidepressant treatment (Schulz et al., 2007a). The despair-like behavior also correlated with changes in physiological parameters that are well-known biomarkers for depression (Schmidt et al., 2011), including changes in monoamine neurotransmitters (Schulz et al., 2004; Topic et al., 2008b), neurotrophins (Topic et al., 2008a), and hypothalamus-pituitary-adrenal axis (HPA)-related stress markers (Topic et al., 2008b). Although negative reinforcements are an important component of human life, the loss of positive reinforcers may be equally aversive. Thus, we set out to search for behaviors that were emitted during the course of operant extinction as a result of the withdrawal of expected appetitive reinforcement and might serve as markers for “despair.” Although it is well established that the extinction of instrumental behavior or the reduction in the magnitude of the reinforcer is aversive to the organism and is accompanied by behaviors indicative of “aggression” (Azrin et al., 1966), “frustration” (Papini and Dudley, 1997), and “stress” (Coover et al., 1971; Kawasaki and Iwasaki, 1997), there has been no serious attempt to relate the effects of operant extinction to “despair” or “depression,” and consequently, there is no available animal model for extinction-induced depression-like behaviors.

Given that extinction of appetitive behavior is aversive to the organism, we hypothesized that the withholding of reward should lead to avoidance of, or, escape from the site or source of the reinforcer. To assess avoidance behavior, we attached a second compartment devoid of lever and feeder to the operant chamber, so that during the extinction trials the animals had the “choice” to either remain in the compartment where the food pellets were

delivered or traverse into the empty compartment that was not associated with food reward. In addition to the time and number of entries into the “withdrawal” chamber, we assessed rearing and biting behaviors. Because any animal model must have predictive validity—in the present case—validity as a model of depression, we examined the influence of two common antidepressant drugs (citalopram and imipramine) administered daily over the course of the extinction trials. We hypothesized that, to be considered as a potential marker of “despair/depression,” the behavior emitted during the extinction trials must be modified by an antidepressant treatment. We expected that the antidepressant treatments would decrease avoidance of the former source of reward and, thus, decrease the number of entries and duration of time spent in the “withdrawal” compartment and, potentially, influence other behaviors emitted during the extinction trials.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Subjects

Twenty naïve male Wistar rats obtained from the Animal Facility of the University of Düsseldorf were used. They weighed 254 g ( $\pm 3$  g SEM) at the beginning of the experiments. The animals were housed in groups of five in Macrolon cages type IV with a reversed 12-h light: 12-h dark schedule (lights off at 7:00 AM). They were food deprived for 5 days before commencement of experimentation. Ten gram of standard laboratory pellets was given per rat and day no earlier than 1 h after the end of each testing day. The animals were weighed daily for monitoring weight reduction, which ranged between 82 and 94% of their free feeding weight and did not differ between treatment groups over the course of the experiment (analysis of variance [ANOVA]:  $F_{(2, 16)} = 2.485$ ,  $P > 0.05$ ). Water was freely available. The experiments were carried out during the active phase between 8:00 AM and 5:00 PM. Animals were acclimated to the animal holding room for 10 days after arrival before the experiments started. In this time, they were handled on three consecutive days to habituate them to the experimenter. All experiments were carried out in accordance with and approved by the German Animal Protection Law (Bezirksregierung Düsseldorf). The experimental protocol used was chosen to allow minimizing suffering and using a minimal number of animals.

### Drugs

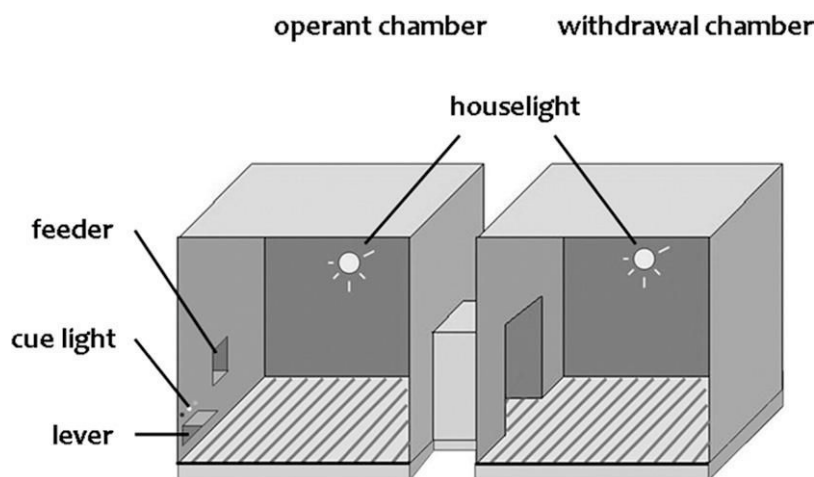
According to group assignment, either the tricyclic antidepressant imipramine (10,11-Dihydro-N,N-dimethyl-5H-dibenz[b,f]azepine-5-propanamine hydrochloride, 5-[3-(Dimethylamino)propyl]-10,11-dihydro-5H-dibenz[b,f]azepine hydrochloride; Sigma-Aldrich, Germany) or the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram (Cipramil, Lundbeck, Germany) was applied in a dose of 20 mg/kg, which was shown to exert antidepressant-like effects in rodents (e.g., Paul et al., 1990; Cryan et al., 2004; Réus et al., 2010). Both substances were diluted with distilled water (vehicle) and given intraperitoneally in an injection volume of 1 ml/kg.

### Experimental schedule

Animals were tested in the Skinner box for 17 days, with one session per day lasting for 15 min. They were exposed to the open field (OF) 24 h later, followed by testing in the forced swim test (FST) the next day. Daily substance administration started on day 13 and was carried out 30 min before testing on every testing day. The behavior of the animals during each task was recorded by video cameras which were connected to a DVD recorder for further post hoc analysis by a trained observer blind to the treatment conditions. The apparatus was cleaned with a 60% ethanol solution after each trial.

### Skinner box with withdrawal chamber

*Apparatus.* The animals were tested for 15 min each day in a dual operant chamber, which is depicted in Fig. 1. Two boxes (29.5×28.5×23.5 cm; modular test cage system, Coulbourn Instruments, USA) with a grid floor were connected via a tunnel (16×12.5×9 cm) made of gray plastic. Transition between the compartments was possible during the whole experiment. Both chambers were equipped with a light mounted near the top, in the center of one of the walls, which was on during the whole testing session (1 lux). In the reinforcement chamber, a lever (2 cm×3.5 cm) was mounted on the wall at 3 cm height. Three cue lights (yellow, green, red) were positioned above the lever. In the middle of the wall, a food magazine for reward pellets (4 cm×3 cm) was placed at 3 cm height. All cue lights were illuminated when the lever was “active,” thus, indicating the availability of food reward after lever-pressing. The cue lights ceased glowing when the lever was pressed. The animal had to cross the photo-beams of the food dispenser to retrieve a food pellet before the cue lights could be activated again and another lever-press led to the delivery of the next pellet. In the second box (the withdrawal box) only the



**Fig. 1.** Scheme of operant chamber with withdrawal compartment, and testing schedule for the treatments with either vehicle, citalopram (20 mg/kg), or imipramine (20 mg/kg).



housetlight was installed. Data output was controlled by Graphic State software (Coulbourn Instruments, USA). Two cameras were mounted next to each chamber. The recordings were stored on DVD for further post hoc analysis of the behavior.

**Procedure.** Shaping and acquisition phase. The 20 rats were individually placed into the operant chamber for 15 min per session. Each lever-press led to the delivery (continuous reinforcement—CRF) of one 45 mg sucrose pellet (Dustless Precision Pellets, Bio-Serve, USA). During shaping, every approach to the lever was manually reinforced with a sucrose pellet until the animals pressed the lever themselves. After 10 days of shaping and acquisition training, 19 of the 20 animals showed stable lever-pressing, which was allowed to stabilize for two additional days. One rat, which did not press the lever at all, was removed from data analysis. The remaining animals were matched for rate of lever-pressing and assigned to one of the following groups: imipramine: 20 mg/kg,  $n=6$ ; citalopram: 20 mg/kg,  $n=7$ ; vehicle: 1 ml/kg,  $n=6$ .

**Extinction.** On testing days 13–17, lever-pressing no longer led to reinforcement (extinction), whereas all other conditions (cue light on- and offset) were the same as during acquisition.

**Behavioral analysis.** The lever-pressing rate and food-cup entries were automatically recorded by GraphicState software (Coulbourn Instruments, USA). Additionally, the frequency and duration (s) of rearing (vertical movements), biting behavior (defined as biting of the lever, food tray, or other edges in the chambers, such as the partition), as well as time spent in (s) and number of entries into the withdrawal chamber were assessed post hoc manually by a trained and blind observer using Anymaze 4.5 software (Stoelting, USA). For statistical analysis, the duration of rearing and biting behaviors was calculated and expressed as percentage of sojourn time within a given compartment. One animal, which did not enter the withdrawal compartment at all on the last day of extinction, was not included in the analysis.

### Open field

A square box (60×60×30 cm) illuminated by four 40-W light bulbs was used as an open field (approx. 7 lux in center, 3 lux in corners). The animals were individually placed into the center of

the field for 15 min. Distance moved (cm) and velocity (cm/s) were recorded automatically, whereas frequency and duration (s) of grooming, rearing, and quiescence were assessed manually by a blind and trained observer using EthoVision software 3.1 (Noldus, Wageningen, The Netherlands).

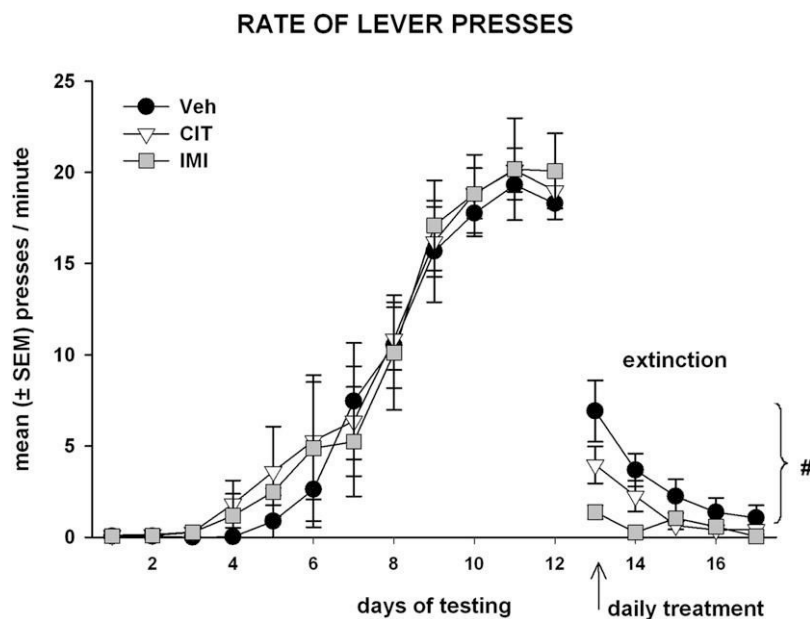
### Statistics

All data were expressed as means and standard error of the mean ( $\pm$ SEM). Statistical analysis was performed using PASW Statistics 18. Data from the Skinner-box test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA, with the factors time as the repeated measures factor and group as the between groups factor, which was followed by post hoc Dunnett's tests for group comparisons between vehicle and treatment groups, respectively. Whenever the data failed to meet the criterion of sphericity (Mauchly test of sphericity), the Greenhouse–Geisser correction was used. In case of interaction effects, preplanned between-group comparisons for single days were carried out using the one-way ANOVA and post hoc Dunnett tests. Similarly, data from the OF and FST were analyzed via one-way ANOVA followed by post hoc Dunnett test. All statistical tests were two-tailed. A  $P$ -value below 0.05 was considered to be statistically significant.

## RESULTS

### Skinner box

The rate of lever-pressing increased during acquisition (testing days 1–12, see Fig. 2). The repeated measures ANOVA over testing days 1–12 showed a significant effect for time ( $F_{2,3, 37.6}=71.347$ ,  $P<0.001$ ) but not for treatment ( $F_{2, 16}=0.167$ ,  $P>0.05$ ) or time×treatment ( $F_{4, 37.6}=0.186$ ,  $P>0.05$ ). During extinction (testing days 13–17), there was a significant main effect of time ( $F_{1,9, 30.4}=26.15$ ,  $P<0.001$ ), treatment ( $F_{2, 16}=4.281$ ,  $P=0.032$ ), as well as an interaction between time and treatment ( $F_{3,8, 30.4}=4.612$ ,  $P=0.006$ ), indicating a differential change in the rate of lever-pressing for the treatment groups. The post hoc Dun-



**Fig. 2.** Mean ( $\pm$ SEM) rate of lever presses/min during acquisition (days 1–12) and extinction (days 13–17). Veh, vehicle; CIT, citalopram; IMI, imipramine; #  $P<0.05$  vs. imipramine.

nett's test revealed a significant difference between imipramine- and vehicle-treated animals ( $P=0.02$ ). Over the course of extinction, the vehicle-treated animals exhibited a higher rate of lever-presses compared with the imipramine-treated rats.

One-way ANOVA for single extinction days revealed main groups effects for days 13 ( $F_{2, 16}=5.561$ ,  $P=0.015$ ) and 14 ( $F_{2, 16}=5.214$ ,  $P=0.018$ ). When single testing days were compared, significant differences were found in the rate of lever-pressing between the imipramine and the control group on day 13 ( $P=0.008$ ) and day 14 ( $P=0.01$ ), indicating a lower rate of lever-pressing under imipramine treatment during extinction (all other  $P>0.05$ ).

**Entries and time spent in withdrawal chamber during extinction.** For the number of entries into the withdrawal compartment (see Fig. 3, left), the repeated measures ANOVA showed a significant effect of time ( $F_{4, 64}=4.93$ ,  $P=0.002$ ) and treatment ( $F_{2, 16}=13.68$ ,  $P<0.001$ ), but no interaction effect ( $F_{8, 64}=0.965$ ,  $P>0.05$ ). Post hoc Dunnett's test yielded significant differences between imipramine ( $P<0.001$ ) as well as citalopram ( $P=0.002$ ) compared with the vehicle-treated rats. Thus, during the extinction trials, both treatment groups entered the withdrawal compartment less often than the control group.

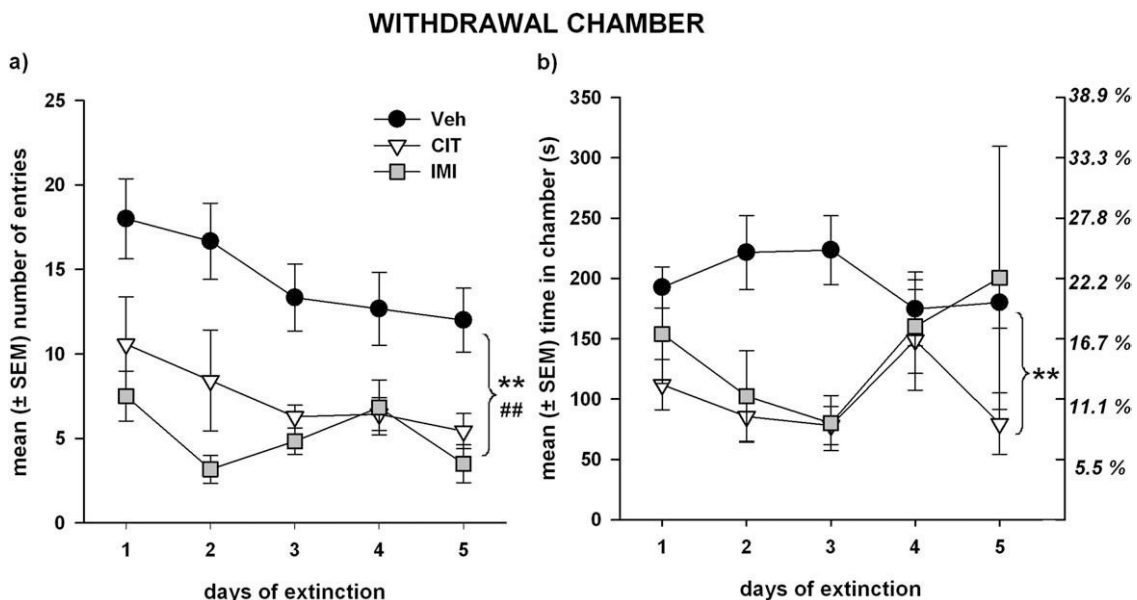
There was no significant main effect for time spent in the withdrawal compartment ( $F_{2, 3, 37.2}=0.451$ ,  $P>0.05$ ) and no interaction ( $F_{4, 6, 37.2}=1.194$ ,  $P>0.05$ ), but a main effect for treatment ( $F_{2, 16}=5.184$ ,  $P=0.018$ ). The post hoc Dunnett's test only revealed differences between the citalopram and control group ( $P=0.01$ ). As depicted in Fig. 3 (right), the animals treated with citalopram spent less time in the withdrawal chamber compared with vehicle-treated controls.

**Rearing behavior.** There was a significant effect of treatment ( $F_{2, 16}=54.315$ ,  $P<0.001$ ) on the number of rearings in the operant chamber during extinction (Fig. 4a). The post hoc Dunnett's test showed that these differences occurred between imipramine ( $P<0.001$ ) as well as citalopram ( $P<0.001$ ) and vehicle-treated rats. There was no significant effect of time ( $F_{2, 43, 38.99}=2.843$ ,  $P>0.05$ ) and no interaction ( $F_{4, 9, 38.99}=1.542$ ,  $P>0.05$ ).

The statistical analysis of the duration of rearing as a function of time spent in the operant chamber (see Fig. 4b) also exhibited a significant effect of treatment ( $F_{2, 16}=53.149$ ,  $P<0.001$ ), which was significant for both antidepressant treatment groups (post hoc Dunnett,  $P<0.001$  in both cases). Additionally, a significant effect of time ( $F_{4, 64}=2.816$ ,  $P=0.032$ ) and an interaction effect ( $F_{8, 64}=2.760$ ,  $P=0.011$ ) was found. When single testing days were compared, the ANOVA revealed main treatment effects for all extinction days (all  $F_{2, 16}\geq 9.969$ , all  $P\leq 0.002$ ), and differences between rats treated with both antidepressants and the control group were found on all testing days (imipramine: all  $P\leq 0.022$ ; citalopram: all  $P\leq 0.001$ ).

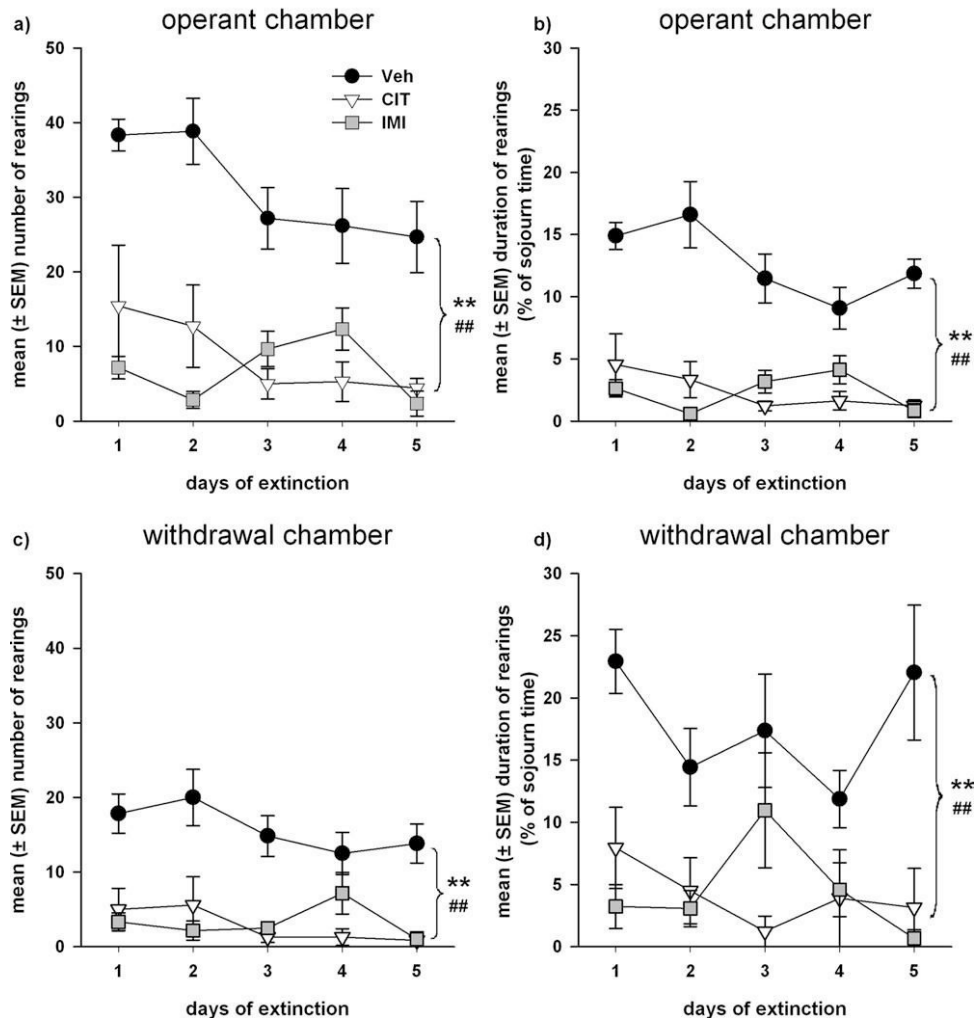
The repeated-measures ANOVA yielded a significant main effect for treatment ( $F_{2, 16}=29.1$ ,  $P<0.001$ ) concerning the number of rearings in the withdrawal chamber, but not for time ( $F_{4, 64}=1.949$ ,  $P>0.05$ ) and no interaction effect ( $F_{8, 64}=1.271$ ,  $P>0.05$ ; see Fig. 4c). Animals either treated with imipramine or citalopram reared less often in the withdrawal chamber compared with vehicle-treated rats (post hoc Dunnett, both  $P<0.001$ ).

For the duration of rearing as a function of time spent in the withdrawal chamber (Fig. 4d), the repeated-measures ANOVA revealed a significant effect for treatment ( $F_{2, 15}=19.369$ ,  $P<0.001$ ). Both treatment groups differed significantly from vehicle controls (post hoc Dun-



**Fig. 3.** Mean ( $\pm$ SEM) (a) number of entries and (b) time spent in the withdrawal chamber over the course of extinction. The right axis of (b) describes the sojourn time in the withdrawal chamber as percent of trial duration. Veh, vehicle; CIT, citalopram; IMI, imipramine; \*\*  $P<0.01$  vs. citalopram, ##  $P<0.01$  vs. imipramine.

## REARING BEHAVIOR



**Fig. 4.** Mean ( $\pm$ SEM) (a) number of and (b) time spent rearing as a function of time spent in the operant chamber (c) number of and (d) time spent rearing as a function of time spent in the withdrawal chamber over the course of extinction. Veh, vehicle; CIT, citalopram; IMI, imipramine; \*\*  $P < 0.01$  vs. citalopram, ##  $P < 0.01$  vs. imipramine.

nett,  $P < 0.001$  in both cases). There was no significant effect of time ( $F_{4, 60} = 0.382$ ,  $P > 0.05$ ) and no interaction effect ( $F_{8, 60} = 1.483$ ,  $P > 0.05$ ). Because one animal of the imipramine group did not enter the withdrawal chamber at all, the quotient of duration of rearing and time spent in the withdrawal chamber could not be calculated.

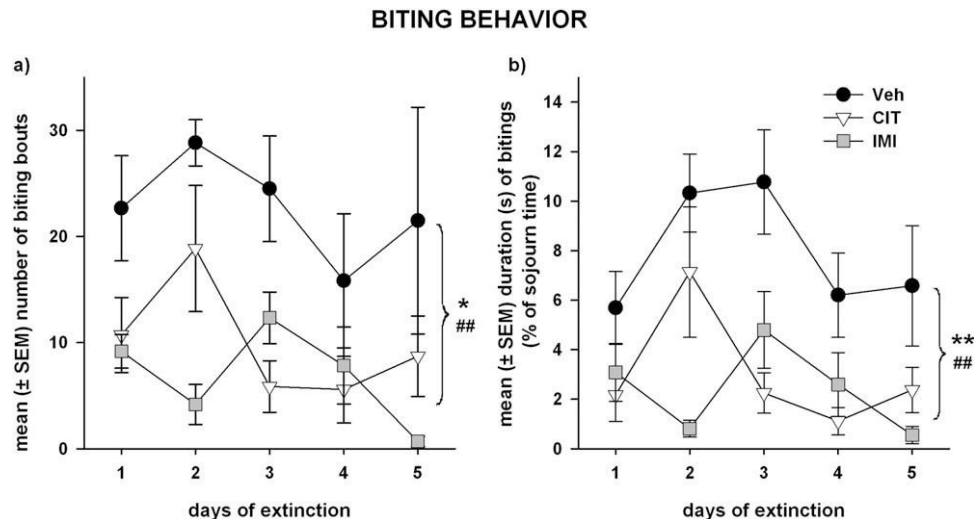
**Biting behavior.** As depicted in Fig. 5, the repeated-measures ANOVA revealed a significant effect of treatment for both, frequency ( $F_{2, 16} = 6.804$ ,  $P = 0.007$ ) and duration ( $F_{2, 16} = 14.557$ ,  $P < 0.001$ ), as well as a significant effect of time ( $F_{4, 64} = 3.164$ ,  $P = 0.02$ ) for the duration of biting behavior. Animals treated with citalopram (post hoc Dunnett, frequency:  $P = 0.02$ ; duration:  $P = 0.001$ ) or imipramine (frequency:  $P = 0.006$ ; duration:  $P < 0.001$ ) showed less biting behavior than control rats.

For the number of biting bouts, the repeated-measures ANOVA failed to reveal an effect of time ( $F_{4, 64} = 2.245$ ,  $P > 0.05$ ) or group  $\times$  time interaction with

frequency ( $F_{8, 64} = 1.640$ ,  $P > 0.05$ ) and duration ( $F_{8, 64} = 2.039$ ,  $P > 0.05$ ).

### Open field

For the data of the open-field experiment (see Table 1), one-way ANOVA revealed significant main effects of treatment for frequency ( $F_{2, 16} = 7.340$ ,  $P = 0.005$ ) and duration ( $F_{2, 16} = 7.634$ ,  $P = 0.005$ ) of rearing. Citalopram- (Dunnett:  $P = 0.026$ ) as well as imipramine- (Dunnett:  $P = 0.004$ ) treated animals reared less often than the control rats. Duration of rearing was shorter for both treatment groups compared with the control group ( $P = 0.017$  for the citalopram and  $P = 0.004$  for the imipramine group). The imipramine-treated rats moved more slowly (ANOVA:  $F_{2, 16} = 6.377$ ,  $P = 0.009$ ; Dunnett:  $P = 0.009$ ) and shorter distances than the controls (ANOVA:  $F_{2, 16} = 6.398$ ,  $P = 0.009$ ; Dunnett:  $P = 0.009$ ). There were no differences in velocity (Dunnett:  $P > 0.05$ ) and distance moved (Dunnett:  $P > 0.05$ )



**Fig. 5.** Mean ( $\pm$ SEM) (a) number of and (b) duration of biting as a function of time spent in the operant chamber over the course of extinction. Veh, vehicle; CIT, citalopram; IMI, imipramine; \* $P < 0.05$  vs. citalopram, \*\*  $P < 0.01$  vs. citalopram, \*\*\*  $P < 0.01$  vs. imipramine.

between control and citalopram-treated animals. For grooming behavior, the ANOVA found a significant main effect for the number ( $F_{2, 16} = 8.995$ ,  $P = 0.002$ ), but not duration of grooming episodes ( $F_{2, 16} = 2.984$ ,  $P > 0.05$ ). Post hoc analysis revealed that compared with vehicle-treated controls, rats treated with imipramine groomed significantly less often ( $P = 0.001$ ), without being significantly different in grooming duration (Dunnett:  $P > 0.05$ ). Similar differences were not found between the citalopram-treated and control animals (number:  $P > 0.05$ ; duration:  $P > 0.05$ ). No group differences were found for quiescence behavior (all  $F_{2, 16} \leq 2.346$ , all  $P \geq 0.128$ ).

## DISCUSSION

The purpose of this study was to assess the behavior of rats during extinction of food-reinforced lever-pressing with the expectation that certain behaviors might serve as markers for extinction-induced “depression” or “despair.” The major results of this study are that the omission of an appetitive reinforcer was accompanied by biting, rearing, and withdrawal behaviors and that these activities were attenuated by antidepressant treatment. We consider these results to provide a promising advance toward establishing an animal model for despair/depression-like be-

haviors that accompany the withdrawal of, or absence of, expected rewarding events.

### Withdrawal/avoidance

Our most important dependent variable, withdrawal behavior, was significantly affected by antidepressant treatment. Animals treated with 20 mg/kg imipramine or citalopram spent less time in and made fewer entries into the withdrawal compartment.

Avoidance behavior in the short term is said to reduce distress and in the long term to lead to anxiety (Moulds et al., 2007) and is also a symptom of MD. According to Ferster (1973), “The most obvious characteristic of a depressed person is a loss of certain kinds of activity coupled with an increase in avoidance and escape activity. . . .” Withdrawal from an aversive situation is a coping strategy depressive patients often use, and antidepressant treatment can reduce avoidance-like behaviors in depressive patients (Ottenbreit and Dobson, 2004). Skinner (1953) found that “A pigeon which has failed to receive reinforcement turns away from the key, cooing, flapping its wings and engaging in other emotional behaviors.” Animals of all groups visited the withdrawal chamber, but only vehicle-treated animals spent significantly more time in the with-

**Table 1.** Behaviors in the open-field test presented as means  $\pm$  SEM

Open field	Vehicle	Citalopram (20 mg/kg)	Imipramine (20 mg/kg)
Distance moved (cm)	4728.90 $\pm$ 491.19	4479.17 $\pm$ 240.64	2799.03 $\pm$ 487.42***
Velocity (cm/s)	5.27 $\pm$ 0.55	4.98 $\pm$ 0.27	3.11 $\pm$ 0.54***
Rearing duration (s)	146.53 $\pm$ 20.51	68.74 $\pm$ 17.59*	45.13 $\pm$ 18.35***
Number of rearings	70.00 $\pm$ 11.34	36.29 $\pm$ 7.71*	23.00 $\pm$ 6.76***
Grooming duration (s)	78.50 $\pm$ 21.17	74.74 $\pm$ 19.60	14.03 $\pm$ 21.17
Number of groomings	9.50 $\pm$ 1.29	6.57 $\pm$ 1.195	1.83 $\pm$ 1.29***
Quiescence duration (s)	39.37 $\pm$ 47.98	46.51 $\pm$ 44.42	166.83 $\pm$ 47.98
Number of quiescences	17.00 $\pm$ 3.27	23.86 $\pm$ 3.03	14.67 $\pm$ 3.27

\*  $P < 0.05$  vs. citalopram, \*\*\*  $P < 0.01$  vs. imipramine.

drawal chamber. Thus, the lower sojourn time in the withdrawal chamber exhibited by the antidepressant groups is unlikely to be because of differences in general motor activity. We hypothesized that time spent in the “withdrawal” chamber could serve as a marker for extinction-induced withdrawal or avoidance; in support of this hypothesis, antidepressant treatment during the extinction trials reduced both, the relative time spent therein and number of entries into this compartment. It should be noted that we initiated drug treatment only during the extinction trials, whereas the antidepressant action of such drugs in humans appears after more prolonged treatment. Unpublished studies indicate that two weeks of chronic application of clomipramine and citalopram also decrease the distance from source of reward during extinction trials.

### Biting behavior

Citalopram as well as imipramine treatment reduced biting behavior during the extinction trials. Operant extinction has been shown to be accompanied by aggressive-like behavior in various species. Already Skinner (1953) reported that “The failure of a response to be reinforced leads not only to operant extinction but also to a reaction commonly spoken of as frustration or rage”. Pigeons attack a conspecific at the onset of extinction after food conditioning (Azrin et al., 1966), humans show increasing aggressive responses during extinction (Kelly and Hake, 1970), pigs trained to lever-press for food show aggressive behaviors toward conspecifics and a rise in corticosterone levels during extinction (Arnold and Dantzer, 1980; Dantzer et al., 1980), and rats are well-known to emit aggressive behaviors like biting during extinction (Tomie et al., 1993; see Looney and Cohen, 1982 for overview of different species). “Frustrative” biting behavior has not, so far, been considered as a dependent variable in animal models of depression, yet our results suggest that it may be a promising variable to consider in more detail.

### Rate of responding, horizontal and vertical activity

The daily treatment with the two antidepressants, the SSRI citalopram and the tricyclic antidepressant imipramine, commenced with the first extinction trial. Treatment with imipramine, but not citalopram, significantly reduced the rate of lever-pressing during extinction. Although the imipramine effect could at first glance be interpreted as a decrease in resistance-to-extinction, it is more likely that the drug simply reduced overall level of activity and, thereby, also attenuated the rate of lever-pressing. In support of an interpretation is the finding that the imipramine-treated animals, but not the citalopram group, traveled shorter distances and at a lower velocity than the control. Sedative effects of imipramine on locomotor activity in an open field have been reported in studies using acute and chronic injection schedules (Porsolt et al., 1978; Custodio Teixeira et al., 2000). Akin to the extinction trials, in the open field, the citalopram-treated animals did not differ from controls in distance moved or velocity, but exhibited less rearing behavior.

The group treated with imipramine also emitted fewer responses to extinction as compared with the vehicle group. Because imipramine decreased motor activity in general (including lever-pressing during extinction, entries into withdrawal chamber, open-field activity), this apparent lower resistance to extinction could be interpreted in terms of simply reduced activity levels.

Both, citalopram and imipramine reduced rearing activity in the open field, in the operant chamber, as well as in the withdrawal compartment. Rearing behavior has been related to emotionality (Carnevale et al., 1990). Rats expressing increases in vertical activity in a novel open field also showed higher levels of anxiety in the elevated-plus maze (Borta and Schwarting, 2005, but see Thiel et al., 1999). Furthermore, an increase in rearing activity was also found in other animal models of depression (Van Riezen et al., 1990; Slotkin et al., 1999; Schulz et al., 2010) and has also been shown to be influenced by antidepressant treatment (Van Riezen and Leonard, 1990). For example, imipramine reduced vertical activity (Paul et al., 1990). Similarly, in the open field, a metabolite of imipramine, desipramine, reduced activity levels, but was without effect on traditional fear parameters in the elevated-plus maze (Schulz et al., 2007a). Brookshire and Jones (2009) found that 20 mg/kg citalopram suppressed rearing in mice, in accordance with our results. We found no influence on citalopram treatment on distance travelled in the open field, whereas Brookshire and Jones (2009) report shorter distances travelled in mice treated with 20 mg/kg citalopram. Another group found no influences on distance moved with the same dosages in rats, like we did, and, in contrast to our results, also no influence on duration of rearing (Kugelberg et al., 2002).

### General discussion

The initial work, done on extinction-induced despair, used extinction of escape from the Morris water maze (reviewed by Huston et al., 2009). It was shown that the extinction of the escape response resulted in an immobility that was attenuated by antidepressant treatment (Schulz et al., 2007a). The time spent in an immobile posture during extinction in the water maze task was correlated with BDNF in the frontal cortex in adult animals, which is closely linked to MD (Topic et al., 2008a), and adult animals showing high levels of extinction immobility exhibited similar alterations in HPA-axis parameters as depressive patients (Topic et al., 2008b). Because extinction of positively reinforced behavior is also discussed to be a trigger for depressive symptoms (e.g., especially in the aged, loss of health, friends, youth, and cognitive functions), we focused here on the possibility to model extinction of appetitive behavior in the rat.

Earlier work exists on the effects of reward omission on rodent behavior and physiological parameters (for a review see Papini and Dudley, 1997). For example, Flaherty et al. (1979) found, that the shift from a 32% to a 4% sucrose solution led to increased locomotor activity in rats, and Coover et al. (1971) reported that extinction of appetitive behavior led to elevated corticosterone levels, possibly

signaling stress. The experience of repeated stress is a major predisposing factor for the development of diverse psychiatric disorders, including MD (Pollak et al., 2010). Relevant to the hypothesis that extinction of appetitive behavior may be related to depressive symptoms is the finding, by Nikiforuk and Popik (2009), that animals treated with antidepressants (e.g., fluoxetine and citalopram) have higher break-point values after reduction of reinforcer magnitude in a partial reinforcement task, indicative of a higher motivation to obtain the reward. Also of potential relevance is the data indicating that withdrawal from addictive drugs can lead to depression-like behaviors (Gawin and Kleber, 1986; for a review see Barr and Markou, 2005). We conclude that extinction-induced avoidance and biting behavior may be a useful animal model for the subclass of depressive-like behaviors that result from the withdrawal or attenuation of rewarding events. For practical purposes of screening for antidepressant agents, it would be important to establish the minimal amount of acquisition training necessary for extinction trials to result in withdrawal, biting, and rearing activity sensitive to drug treatment effects. Potentially a two-chamber place-preference procedure could also be employed, or a cued fixed- or variable-time reward delivery schedule that dispenses with lever-pressing behavior.

*Acknowledgments*—This study was supported by the German National Science Foundation grant Hu 306/27-2, the Research Training Group GK 1033-2, and a grant from NEURON-ERANET DISCover (BMBF 01EW1003). The authors thank Mr. Srejic for constructing the withdrawal chamber.

## REFERENCES

- Arnone M, Dantzer R (1980) Effects of diazepam on extinction induced aggression in pigs. *Pharmacol Biochem Behav* 13:27–30.
- Azrin NH, Hutchinson RR, Hake DF (1966) Extinction induced aggression. *J Epx Anal Behav* 9:191–204.
- Barr AM, Markou A (2005) Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:675–706.
- Borta A, Schwarting RKW (2005) Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behaviour in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiol Behav* 84:387–396.
- Brookshire BR, Jones SR (2009) Direct and indirect 5-HT receptor agonists produce gender-specific effects on locomotor and vertical activities in C57 BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav* 94:194–203.
- Carnevale UAG, Vitullo E, Sadile AG (1990) Post-trial NMDA receptor allosteric blockade differentially influences habituation of behavioral responses to novelty in the rat. *Behav Brain Res* 39:187–195.
- Coover GD, Goldman L, Levine S (1971) Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. *Physiol Behav* 6:261–263.
- Cryan JF, O'Leary OF, Jin SH, Friedland JC, Ouyang M, Hirsch BR, Page ME, Dalvi A, Thomas SA, Lucki I (2004) Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8186–8191.
- Custodio Teixeira R, Zangrossi H, Graeff FG (2000) Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 4:571–576.
- Dantzer R, Arnone M, Mormede P (1980) Effects of frustration on behaviour and plasma corticosteroid levels in pigs. *Physiol Behav* 24:1–4.
- Ferster CB (1973) A functional analysis of depression. *Am Psychol* 28:857–870.
- Flaherty CF, Troncoso B, Deschu N (1979) Open field behaviors correlated with reward availability and reward shift in three rat strains. *Am J Psychol* 92:385–400.
- Gawin FH, Kleber HD (1986) Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* 43:107–113.
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Annu Rev Clin Psychol* 1:293–319.
- Huston JP, Schulz D, Topic B (2009) Toward an animal model of extinction-induced despair: focus on aging and physiological indices. *J Neural Transm* 116:1029–1036.
- Kawasaki K, Iwasaki T (1997) Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sci* 61:1721–1728.
- Kelly JF, Hake DF (1970) An extinction-induced increase in an aggressive response with humans. *J Epx Anal Behav* 14:153–164.
- Kessler RC (1997) The effects of stressful life events on depression. *Annu Rev Psychol* 48:191–214.
- Kugelberg FC, Apelqvist G, Bengtsson F (2002) Effects of chronic citalopram treatment on central and peripheral spontaneous open-field behaviors in rats. *Pharmacol Toxicol* 90:303–310.
- Lewinsohn PM (1974) A behavioral approach to depression. In: *The psychology of depression: contemporary theory and research* (Friedman RJ, Katz MM, eds), pp 157–185. New York: Wiley.
- Looney TA, Cohen PS (1982) Aggression induced by intermittent positive reinforcement. *Neurosci Biobehav Rev* 6:15–37.
- Moulds ML, Kandris E, Starr S, Wong ACM (2007) The relationship between rumination, avoidance and depression in a non-clinical sample. *Behav Res Ther* 45:251–261.
- Nikiforuk A, Popik P (2009) Antidepressants alleviate the impact of reinforcer downshift. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:41–48.
- Ottenbreit ND, Dobson KS (2004) Avoidance and depression: the construction of the cognitive-behavioral avoidance scale. *Behav Res Ther* 42:293–313.
- Papini MR, Dudley RT (1997) Consequences of surprising reward omission. *Rev General Psychol* 1:175–197.
- Paul IA, Duncan GE, Kuhn C, Mueller RA, Hong JS, Breese GR (1990) Neural adaptation in imipramine-treated rats processed in forced swim test: assessment of time course, handling, rat strain and amine uptake. *J Pharmacol Exp Ther* 252:997–1005.
- Pollak DD, Rey CE, Monje FJ (2010) Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med* 42:252–264.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379–391.
- Réus GZ, Stringari RB, Kirsch TR, Fries GR, Kapczinski F, Roesler R, Quevedo J (2010) Neurochemical and behavioural effects of acute and chronic memantine administration in rats: Further support for NMDA as a new pharmacological target for the treatment of depression? *Brain Res Bull* 81:585–589.
- Schmidt HD, Shelton RC, Duman RS (2011) Functional biomarkers of depression: diagnosis, treatment, and pathophysiology. *Neuropsychopharmacology* 36:2375–2394.
- Schulz D, Buddenberg TE, Huston JP (2007a) Extinction-induced “despair” in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiol Learn Mem* 87:624–634.
- Schulz D, Huston JP, Buddenberg TE, Topic B (2007b) “Despair” induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 87:309–323.
- Schulz D, Mirrione MM, Henn FA (2010) Cognitive aspects of congenital learned helplessness and its reversal by the monoamine ox-

- dase (MAO)-B inhibitor deprenyl. *Neurobiol Learn Mem* 93: 291–301.
- Schulz D, Topic B, de Souza Silva MA, Huston JP (2004) Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? *Neurobiol Learn Mem* 82:128–141.
- Skinner BF (1953) *Science and human behavior*. New York: Macmillan.
- Slotkin TA, Miller DB, Fumagalli F, McCook EC, Zhang J, Bissette G, Seidler FJ (1999) Modeling geriatric depression in animals: biochemical and behavioral effects of olfactory bulbectomy in young versus aged rats. *J Pharmacol Exp Ther* 289:334–345.
- Thiel CM, Müller CP, Huston JP, Schwarting RKW (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience* 93:243–251.
- Tomie A, Carelli R, Wagner GC (1993) Negative correlation between tone (S-) and water increases target biting during S- in rats. *Anim Learn Behav* 21:355–359.
- Topic B, Huston JP, Nametskova K, Zhu SW, Mohammed AH, Schulz D (2008a) Extinction-induced “despair” in aged and adult rats: Links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 90:519–526.
- Topic B, Oitzl MS, Meijer OC, Huston JP, de Souza Silva MA (2008b) Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neurochemical parameters. *Neuropsychobiol* 58:138–153.
- Van Riesen H, Leonard BE (1990) Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther* 47:21–34.

*(Accepted 12 February 2012)*  
*(Available online 22 February 2012)*

## DISTANCE FROM SOURCE OF REWARD AS A MARKER FOR EXTINCTION-INDUCED “DESPAIR”: MODULATION BY THE ANTIDEPRESSANTS CLOMIPRAMINE AND CITALOPRAM

M. KOMOROWSKI, J. P. HUSTON,\* I. KLINGENHEGEL  
J. PAULAT, J. SACKERS AND B. TOPIC

Center for Behavioral Neuroscience, Heinrich-Heine-University of  
Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

Key words: depression model, extinction, despair, antidepressants, sign tracking, goal tracking.

**Abstract**—Despair-related withdrawal behaviors are common symptoms of major depression (MD) and can be ascribed to a loss or absence of former rewarding events. Extinction of negatively reinforced escape behavior in the Morris Water Maze has been shown to induce despair-like behavior. A new animal model of depressive-like behavior is based on the extinction of positively reinforced behavior, which was shown to induce spatial avoidance of the former source of reward and biting of the operandum. Treatment with antidepressants attenuated these extinction-induced behaviors, suggesting that they reflect a depressive-like state. Here we present a methodological variation of this depression model. We employed an elongated operant chamber rather than a two-compartment procedure with the intent to establish a flowing gradient of withdrawal from the source of reward, rather than an all-or-none binary measure. Furthermore, instead of employing extinction of lever-pressing behavior, we applied a cued fixed-time food-delivery schedule. Sixty adult male Wistar rats ( $n = 12/\text{group}$ ) were trained to receive a food reward after appearance of a cue-light (fixed interval 90 s) in an elongated Skinner-box of 72 cm length. Prior to extinction, the animals were treated for 9 days with either 7.5 or 10 mg/kg of the tricyclic antidepressant clomipramine, 7.5 or 10 mg/kg of the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram or vehicle. Subsequent testing in an open field was carried out to investigate potential effects of the antidepressants on locomotor- and anxiety-like behavior. An overall increase in distance from the feeder and biting behavior was found over the course of the extinction trials. Both, citalopram and clomipramine decreased the distance from the pellet feeder during the initial extinction trials compared to the vehicle-treated group. The attenuation of withdrawal behavior by the antidepressants supports the hypothesis that avoidance/withdrawal behavior during extinction trials can serve as a marker for extinction-induced depression and suggests the utility of this paradigm as a rodent model of depression. © 2012 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\*Corresponding author. Tel: +49-172-2126861; fax: +49-211-811-2024.

E-mail addresses: [Huston@uni-duesseldorf.de](mailto:Huston@uni-duesseldorf.de), [BBR@uni-duesseldorf.de](mailto:BBR@uni-duesseldorf.de) (J. P. Huston).

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; HPA, hypothalamus-pituitary-adrenal; MD, major depression; OFT, Open Field Test; RTE, resistance to extinction; SEM, standard error of the mean; SSRI, serotonin reuptake inhibitor.

### INTRODUCTION

Major depression (MD) is characterized by multifactorial clusters of symptoms and etiologies, including feelings of despair, helplessness and avoidance/withdrawal from social situations (Wittchen et al., 2011). Lewinsohn (1974) related those symptoms to the loss of reinforcers in everyday life, which is further enhanced as MD progresses. Diminished sources of reinforcement, such as partnership, employment, friendships, health and others are commonly observed in patients suffering from MD (see Mazure, 1998 or Hammen, 2005 for review), and probably contribute to the increasing rate of depression and anhedonia in elderly humans (Bruce, 2002; Kraaij et al., 2002). Avoidance and withdrawal behaviors are central symptoms of depression (Ferster, 1973) and correlate with its severity (Ottenbreit and Dobsen, 2004).

The withdrawal or loss of former reinforcing stimulation leads to ‘extinction’ of learned behavior, which is considered to be stressful, uncontrollable and aversive to organisms (Papini and Dudley, 1997; Barr and Markou, 2005). The despair and arousal resulting from extinction are often accompanied by aggressive behavior (Azrin et al., 1966; Hutchinson et al., 1968; Arnone and Dantzer 1980; Dantzer et al., 1980; Haskell et al., 2000), and increased activity of the stress-related hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis (Coover et al., 1971; Coe et al., 1983; Kawasaki and Iwasaki, 1997; Flagel et al., 2007). Severe or long episodes of stress and “loss” generally precede episodes of MD (Hammen, 2005).

Although existing animal models mimic the emotional state of helplessness and surrender during MD (Willner, 1984, 1990), there is a need for animal models for depicting despair, avoidance and spatial withdrawal behavior that supersedes the absence and withholding of expected rewards. We have formerly introduced the concept of extinction-induced despair/depressive-like behavior (see Huston et al., 2009 for review) and, in a first approach, investigated behavior after extinction of negative reinforcement (escape behavior onto a platform) in the Morris Water Maze. In these studies, extinction increased the time that animals spent immobile in water (Schulz et al., 2004; Schulz et al., 2007a,b). Immobility is considered to be a marker of



behavioral despair also in other paradigms reflecting depressive-like behavior, e.g. the forced swim test (Porsolt et al., 1978a,b) and tail suspension test (Steru et al., 1985). The duration of extinction-induced immobility was decreased by chronic antidepressant treatment with desipramine (Schulz et al., 2007a). In aged rats, the extent of immobility and, thereby, hypothetically, “despair”, was correlated with different measures of anxiety in the open field, black-white box and the elevated-plus maze (Schulz et al., 2007b). Animals that had undergone extinction of water-maze escape also showed significant changes in the density of the mineralocorticoid/glucocorticoid receptors in the hippocampus (Topic et al., 2008b) and in the levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve-growth factor (NGF; Topic et al., 2008a), all supporting the hypothesis that extinction can lead to a depressive-like state.

Considering also the importance of positive reinforcement and its loss for the human (Carvalho and Hopko, 2011), we set out to establish an animal model of extinction-induced despair based on positive reinforcement derived from food reward (Huston et al., 2012). We hypothesized that withdrawal from the source of reward during extinction could serve as a behavioral marker of a depressive-like state, which would be sensitive to antidepressant treatment. For this purpose we employed a Skinner-box that was connected to a second chamber which provided a place for withdrawal from the source of the reward during extinction. The tricyclic antidepressant imipramine as well as the selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) citalopram reduced biting of the lever, rearing behavior and the number of entries and time spent in the withdrawal chamber, indicating that these behaviors may serve as measures of extinction-induced depression.

In the present study, we also explore the utility of withdrawal behavior as a marker of extinction-induced despair. Whereas in the former study we used a two-compartment chamber that only enabled the possibility to measure an all-or-none withdrawal response, we here employed an elongated operant chamber in order to allow measurement of a distance gradient from the source of the reinforcer. Also, unlike in the former study, we here dispensed with lever-pressing behavior and employed cue-light signaled delivery of a food reward on a fixed-time schedule. Animals were treated with the antidepressants citalopram or clomipramine chronically during the final phase of acquisition and throughout the whole extinction period. Biting behavior directed toward the source of reinforcement (food cup) was also measured during the extinction trials. Apart from goal-tracking (interactions with the food-tray; Boakes, 1977), we here additionally investigated sign-tracking (rearing or glances toward the cue-lights) to test for possible changes over extinction trials and to determine whether these parameters are sensitive to antidepressant treatment (see Flagel et al., 2007 for an overview of sign- and goal-tracking behavior). We hypothesized that antidepressant treatment would decrease the mean distance animals spent from the food magazine during

extinction of the appetitive reinforced behavior together with biting of the food tray.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Subjects

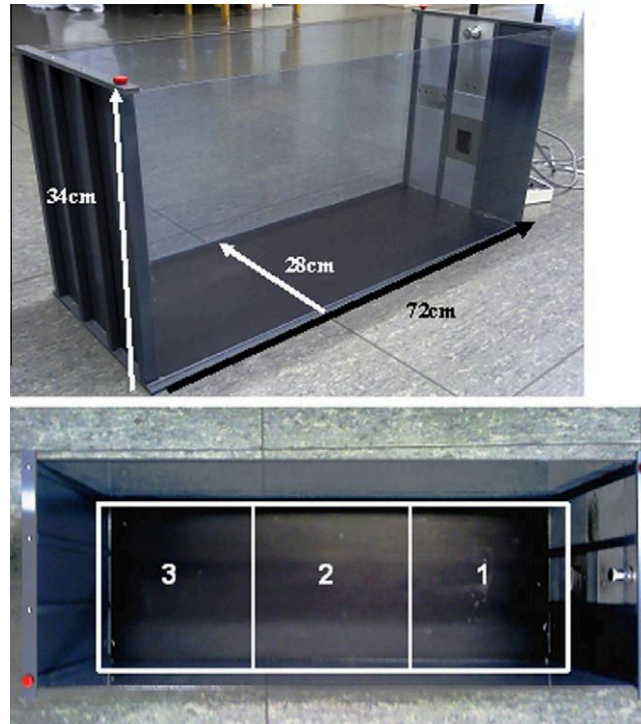
Seventy-two naive, male 3–4 month old Wistar rats with a mean weight ( $\pm$  SEM) of  $275.51 \pm 3.47$  g were obtained 2 weeks prior to the experiments from the local animal facilities (Tierversuchsanlage, University of Düsseldorf). They were housed in type VI macrolon cages in groups of five; water and food (Ssniff Spezialdiäten) were provided *ad libitum* until food deprivation started. They were subjected to a reversed 12 h light/dark cycle (lights on at 7 pm) with room temperature maintained at  $22 \pm 2$  °C in the husbandry room. This study was carried out in accordance with the German Law on the Protection of Animals and was approved by the state authority (Bezirksregierung Düsseldorf).

After 1 week of familiarization, the animals were food deprived (15 g/animal/day), marked and handled over 3 days prior to the experiment. Food deprivation was continued until the end of the study. Sixty animals were assigned to the five groups performing the extinction-experiment in the operant chambers prior to the test in the open field. The other twelve animals served as a control group that received vehicle injections for 14 days prior to the test in the open field after 3 weeks of food deprivation, but did not participate in any conditioning or extinction procedure.

### Apparatus and procedure

Two elongated operant chambers were self-constructed for the purpose of this study to allow measurement of a distance gradient from the food magazine. Each chamber was 72 cm long, 28 cm wide and 34 cm high with walls made of dimmed Plexiglas. The floor was covered with a black rubber mat and the top of the box was open (see Fig. 1 top). Each operant chamber was situated in a dark, sound-attenuating box, containing a masking white noise generator. Infra-red cameras (Conrad Elektronik) were mounted on the top and side of the chambers to allow observation of behavior from two perspectives. The hardware modules (Coulbourn Industries<sup>®</sup>) were placed on one of the short end-walls. The food cup with an integrated photodetector and the food magazine (BioServ<sup>®</sup> Dustless precision pellets) were fastened in the middle of the wall. The photodetector gathered the frequency and point of time when an animal entered the food cup. A house light with a partially open hood, offering slight illumination ( $\sim$ 1 lux), was placed at the top of the wall, whereas the triple cue lamp (green, yellow, red) was located next to the food cup (see Fig. 1 top). For the magazine training session, an additional hand-switch was connected to the apparatus, so that the experimenters could shape the animals' behavior toward the feeder manually. All modules were connected to a computer via a link box from PanLab<sup>®</sup> and controlled by the related PackWin<sup>®</sup> 2.0.01 Software. Apart from the variables measured by the PackWin<sup>®</sup> Software, automatic tracking of the animals' behavior was done via center-point detection and manually by an experienced rater with Ethovision XT 7<sup>®</sup> (Noldus<sup>®</sup>).

Experiments in the operant chambers were begun after 1 week of food deprivation. On every test day the animals were taken to the behavioral laboratory one hour prior to testing and taken back to the husbandry room for feeding and subsequent injections. On the first day the subjects received a 15-min long magazine training session without the use of the cue-lights.



**Fig. 1.** *Top:* Side view of the elongated operant chamber. From this view, the house light, triple cue lamp and food cup can be seen. The light barrier of the photodetector is built into the food cup and cannot be seen from the outside. *Bottom:* Top view of elongated operant chamber. The three zones defined to measure the distance gradient are shown schematically.

During this trial, approaching toward, or manipulation of the food-cup, was reinforced manually via a hand-switch and a single food pellet was delivered to the food cup.

On the next 5 days, daily acquisition trials of 15 min were performed with all subjects in random order. During these trials the cue-lights turned on every 87 s for 3 s (fixed interval FI: 90 s) and two food pellets were delivered immediately at the onset of the cue-lights. Cue-lights and food delivery were, thus, paired ten times during each session. After the last day of acquisition the animals were matched by the variables mentioned below (see section 2.3) and assigned to one of the five treatment groups (Vehicle, Citalopram 7.5 or 10 mg/kg, Clomipramine 7.5 or 10 mg/kg). For the next 9 days the animals received daily injections prior to feeding in the afternoon and underwent a single 15-min re-acquisition trial every 3rd day. Extinction trials commenced after the last day of re-acquisition. Two daily trials (inter-trial-interval ITI: 2 h) of nine minutes were performed for 5 days with each subject. Drug treatment and food deprivation were continued over the extinction trials. During an extinction trial, the cue-lights were presented without coincident food delivery. All variables measured in the two trials were averaged for each extinction day. During these experiments, the control-group remained in the husbandry room and received saline injections for 14 days at the same points of time. All subjects received the last injection on the final extinction day and underwent testing in the open field 1 day later.

The following variables were recorded automatically: distance moved (cm), number of beambreaks in the food cup, latency between cue-light onset and first consecutive beambreak (inter-response time IRT), the mean distance to the food cup and residence within previously defined zones of the operant chamber. For the latter, the operant chamber was subdivided into 3 virtual zones, each of 24 cm length, by the Ethovision<sup>®</sup> software (Noldus<sup>®</sup>; see Fig. 1 for details). Zone 1 here represents the area close to the food cup, whereas zone 3 contains the last 24 cm of the box opposite to the food cup. Zone 2 is defined as the middle of the rectangular chamber. The residence at the food cup (a contact was counted when

the animal entered the food cup with its mouth or touched it with its forelimbs), biting into the food cup and glances/rears toward the cue-lights were recorded manually by an experienced and blinded rater.

### Drugs and application

After 5 days of acquisition, the 60 animals were matched by weight, number of beambreaks, IRT and distance moved and randomly assigned to the following treatment groups: Vehicle ( $n = 12$ ), citalopram 7.5 mg/kg ( $n = 12$ ) and 10 mg/kg ( $n = 12$ ), clomipramine 7.5 mg/kg ( $n = 12$ ) and 10 mg/kg ( $n = 12$ ). The 12 animals serving as control subjects received vehicle injections ( $n = 12$ ). The doses used here (7.5 and 10 mg/kg) were chosen on the basis of our prior investigations with citalopram (e.g. Huston et al., 2012) and doses commonly used by other investigators working with chronic treatment of citalopram and clomipramine that did not evoke any locomotor side-effects (e.g. Kugelberg et al., 2002). Clomipramine HCl (Tocris<sup>®</sup>) was dissolved in distilled water; citalopram was acquired as an injection solution (Cipramil<sup>®</sup>). Distilled water was also used for the vehicle groups. Animals were treated chronically for 14 days until the last day of extinction with an injection volume of 1 ml/kg. Intraperitoneal (i.p.) injections and weighing were carried out for all groups every afternoon prior to feeding in the husbandry room.

### Open field apparatus

After the last day of treatment, all six groups were tested in the Open Field Test (OFT). Testing was carried out between 9am and 4pm. After each trial, the devices were cleaned with a 70% ethanol–water-solution. The open field was 60 × 60 cm wide and surrounded by 40 cm high walls. For evaluation of behavior it was separated into a 30 × 30 cm wide center and the periphery. The field was illuminated from the top with a

brightness of 7 lux in the center and 3 lux in the corners. Background noises were masked by white noise and a camera was fastened at the ceiling of the experimental room to observe behavior. Each subject was placed in the middle of the open field and allowed to traverse it for 10 min. The distance moved (cm), the number of center entries and the time spent in the center were calculated automatically by the software (Ethovision 3.1). *Rearing* was recorded manually by a trained and blinded rater.

## Analysis

Data are presented as means + standard error of the mean (SEM). We separated data into three blocks, namely acquisition, re-acquisition and extinction, and calculated single repeated-measure analysis of variance (ANOVA) for each of the time periods and variables. Due to the death of one subject during re-acquisition, the group size for the 10-mg citalopram group was reduced to  $n = 11$ . Data of this subject were not included into statistical analysis. For acquisition, ANOVAs included only the factor "time/trials" as within-subject factor. For the re-acquisition and extinction conditions, "treatment" was added as the between-subject factor. Interactions are only reported if statistically relevant. When indicated, one-way ANOVAs for the single extinction days and post-hoc tests (Dunnett tests) were performed. Due to the different length of acquisition and extinction trials, durations of behaviors are presented as percent of the whole trial duration. For the OFT, unpaired two-sample *t*-tests were done to compare results of the control (not conditioned) and the vehicle group (conditioned), as well as comparisons between the single treatment groups and the vehicle group. The significance level (two-tailed) was set at  $p \leq .05$ , statistical trends are reported if  $p \leq 0.1$ .

## RESULTS

### Operant procedure

*Acquisition.* Repeated-measure ANOVAs were performed for all variables over the course of the five acquisition days. As subjects were not assigned to any treatment groups yet at this point of time, only the general development over the trials was of interest. The statistical results are presented in detail in Table 1. The significant decrease in the latency (from  $13.28 \pm 2.10$  s to  $2.67 \pm 0.21$ ) and the decrease in the number of beambreaks (from  $218.69 \pm 13.34$  to  $152.41 \pm 9.44$ ) down to a stable performance level were important to assure that the subjects had learned about the contingency of the cue-light and the consecutive food reward.

*Re-acquisition.* Over the course of re-acquisition, the latency and number of beambreaks remained constant, (latency:  $F(2,108) = 0.599$ ,  $p = .551$ ; beambreaks:  $F(2,108) = 2.224$ ,  $p = .113$ ), whereas the distance moved in the chamber decreased significantly ( $F(2,108) = 13.140$ ,  $p < .001$ ). Concomitant, the number of entries into zone 1 decreased ( $F(2,108) = 8.991$ ,  $p < .001$ ) and significantly fewer entries were made into zone 2 ( $F(2,108) = 9.700$ ,  $p < .001$ ) and 3 ( $F(2,108) = 3.973$ ,  $p = .022$ ). The number of contacts with the food cup remained stable ( $F(2,108) = 0.873$ ,  $p = .421$ ) but the duration increased ( $F(2,108) = 5.980$ ,  $p = .003$ ).

None of the variables was differentially influenced by the incipient treatment ( $p > .05$ ).

*Extinction.* The changes that occurred during extinction as a function of time can be seen in table 1. Due to the absent food reward, the mean number of beambreaks decreased within all groups significantly below 20 counts at the end of extinction ( $F(4,216) = 99.113$ ,  $p < .001$ ; see Fig. 2A) and the latency increased significantly ( $F(4,216) = 167.243$ ,  $p < .001$ ; see Fig. 2B). Repeated measures ANOVA did not reveal a main effect of the treatment (beambreaks:  $F(4,54) = 0.442$ ,  $p > .05$ ; latency:  $F(4,54) = 0.217$ ,  $p > .05$ ). Also, one-way ANOVAs calculated for the single days of extinction did not indicate significant differences between the groups in latency or number of beambreaks ( $p > .05$  for all). The significant decrease of the travelled distance over the time ( $F(4,216) = 92.644$ ,  $p < .001$ ) was not influenced by the treatment ( $F(4,54) = 0.952$ ,  $p = .441$ ; data not shown). The mean distance from the food cup increased significantly as subjects tended to stay further away ( $F(4,216) = 8.872$ ,  $p < .001$ ; see Fig. 3A). Repeated measures ANOVA failed to show a significant main effect of the treatment ( $F(4,54) = 2.019$ ,  $p = .105$ ), so we decided to perform a more detailed analysis by looking at the single days of extinction with one-way ANOVAs. The groups treated with antidepressants kept closer to the food cup on the average on every day, but a significant effect was revealed only for the second day ( $F(4,54) = 3.070$ ,  $p = .024$ ). Post-hoc Dunnett tests detected a significant difference between the vehicle group and both the 10-mg citalopram group ( $p = .029$ ) and the 7.5-mg clomipramine group ( $p = .009$ ).

For the duration of residence and the number of entries into zone 1 diminished significantly for all groups, but no main effect of the treatment was detected (time:  $F(4,54) = 1.022$ ,  $p = .405$ ; see Fig. 3B; entries:  $F(4,54) = 0.648$ ,  $p = .631$ ). No effects of treatment were revealed for the residence in zone 2 as well (time:  $F(4,54) = 0.654$ ,  $p = .627$ ; entries:  $F(4,54) = 0.720$ ,  $p = .582$ ). Complementary, the time spent in zone 3 rose significantly ( $F(4,216) = 39.905$ ,  $p < .001$ ; see Fig. 3C), but independent of the treatment ( $F(4,54) = 0.884$ ,  $p = .480$ ). Again, a more detailed evaluation of the data was performed. One-way ANOVA for the single extinction days revealed significant group differences for the residence in zone 1 on day 1 ( $F(4,54) = 2.536$ ,  $p = .05$ ) and 2 ( $F(4,54) = 3.380$ ,  $p = .015$ ). Post-hoc Dunnett tests showed significant differences between the vehicle group and the clomipramine 7.5 mg- as well as the clomipramine 10 mg-group (clm 7.5/Veh  $p = .026$  on day 1 and  $p = .023$  on day 2; clm 10/Veh  $p = .035$  on day 1 and  $p = .006$  on day 2). Both treatment groups spent significantly more time in zone 1 compared to the vehicle group. Significant group effects were also found for the time spent in zone 3 on extinction day 1 ( $F(4,54) = 2.924$ ,  $p = .029$ ) and 2 ( $F(4,54) = 3.297$ ,  $p = .017$ ). Here, again the clm 7.5 mg- and the clm 10 mg/kg groups spent significantly less time in zone 3

**Table 1.** Results of acquisition, re-acquisition and extinction. The table presents the within-subject effects of repeated measures ANOVAs for the three periods. Arrows indicate the direction of the significant changes. ↑ increase, → stable, ↓ decrease

Variable	Acquisition		Re-Acquisition		Extinction		
	<i>p</i>	Effect	<i>p</i>	Effect	<i>p</i>	Effect	
Latency	<.001	↓	.180	→	<.001	↑	
Beambreaks	<.001	↓	.362	→	<.001	↓	
Distance moved	.416	→	.264	→	<.001	↓	
Distance to food							
Cup	<.001	↓	.332	→	<.001	↓	
Food cup	Frequency	<.001	↑	.452	→	<.001	↓
	Time	.283	→	.159	→	<.001	↓
Biting	Time				.010	↑	
	Entries	.835	→	.622	→	<.001	↓
Zone 1	Time	<.001	↑	.319	→	<.001	↓
	Entries	.960	→	.229	→	<.001	↓
Zone 2	Time	<.001	↓	.088	→	.276	→
	Entries	.649	→	.528	→	<.001	↓
Zone 3	Time	<.001	↓	.721	→	<.001	↑

on that day than the vehicle group (clm 7.5/Veh  $p = .016$  on day 1 and  $p = .036$  on day 2; clm 10/Veh  $p = .016$  on day 1 and  $p = .005$  on day 2).

The frequency of visits to the food cup decreased toward 10 or less for all groups ( $F(4,216) = 329.585$ ,  $p < .001$ ), though not influenced by any of the treatments ( $F(4,54) = 0.872$ ,  $p = .487$ ; see Fig. 2C). For the steep decrease in time spent at the food cup, repeated measures ANOVA revealed a significant main effect of the time ( $F(4,216) = 146.733$ ,  $p < .001$ ) and a trend for a main effect of the treatment ( $F(4,54) = 2.090$ ,  $p = .095$ ; see Fig. 2D). Consecutive post-hoc Dunnett tests indicated a trend for a difference between the vehicle group and the group treated with 10 mg/kg citalopram ( $p = .071$ ). Subjects treated with the higher dose of citalopram, therefore, tended to spend more time at the food cup over the course of extinction. One-way ANOVA for the single days of extinction detected a statistical trend for a main effect of treatment on the second day ( $F(4,54) = 2.217$ ,  $p = .071$ ).

Though the time spent at the food cup decreased overall, a significant increase in the duration of biting into the cup was emitted during the extinction ( $F(4,212) = 3.395$ ,  $p = .01$ ; see Table 1), whereas the frequency of biting remained stable ( $F(4,212) = 0.828$ ,  $p = .509$ ; see Fig. 4B). Fig. 4A depicts the duration of biting as a percentage of the decreasing time spent at the food cup. Repeated measures ANOVA revealed a significant increase over time ( $F(4,212) = 9.278$ ,  $p > .001$ ), but no main effect of the treatment ( $F(4,53) = 0.354$ ,  $p = .840$ ). Sign-tracking, operationalized as glances and rearing toward the cue-lights, changed significantly in frequency ( $F(4,212) = 12.295$ ,  $p < .001$ ; see Fig. 4D) and duration ( $F(4,212) = 3.319$ ,  $p = .012$ ; see Fig. 4C) during extinction, but no main effects of the treatment were detected ( $p > .05$  for both).

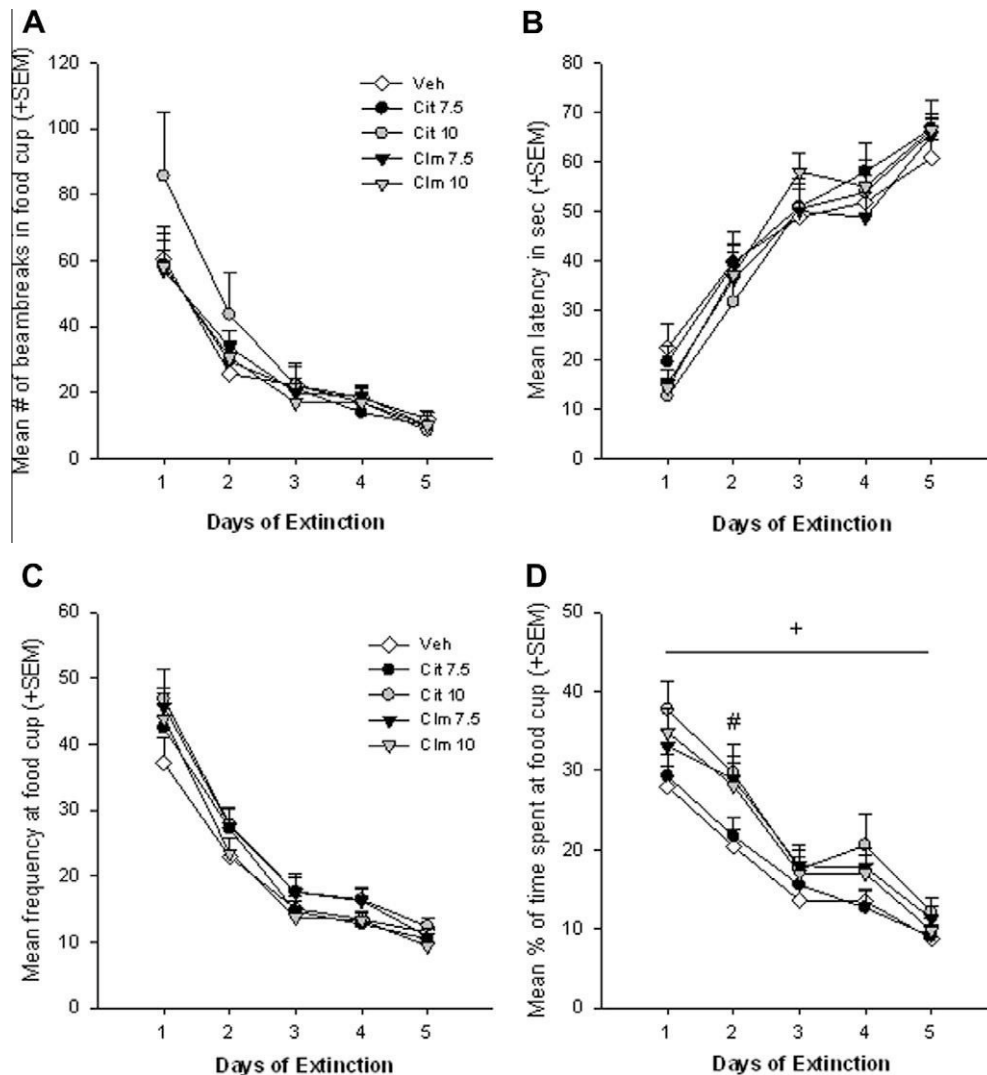
### Open field

Pre-planned comparisons of the control- and the vehicle group via *t*-tests revealed a significant difference of the time spent in the center of the open field ( $t(11,902) = 2.535$ ,  $p = .026$ ). Vehicle-treated animals that had experienced extinction, spent significantly less time in the center compared to their inexperienced controls (see Fig. 5B). In contrast, the animals treated with either 7.5 mg/kg ( $t(22) = 3.996$ ,  $p = .036$ ) or 10 mg/kg of citalopram, spent more time in the center than the vehicle-treated group ( $t(11,447) = 8.298$ ,  $p = .082$ ; Fig. 5B). None of the groups treated with clomipramine spent more time in the open field center than the vehicle group ( $p > .05$  for both). The number of entries into the center square (Fig. 5A) did not differ significantly between the groups ( $p > .05$  for all). For the distance moved and rearing, no significant effects were detected ( $p > .05$  for all; data not shown).

### DISCUSSION

In summary, the results indicate that chronic administration of antidepressants decreased several variables marking withdrawal behavior during extinction trials. Both, clomipramine- and citalopram-treatment, reduced the mean distance from the former source of reinforcement during the initial days of extinction and clomipramine decreased the time spent in the zone furthest from the food source. These results lend support to the hypothesis that avoidance/withdrawal behavior during extinction trials can serve as a measure for extinction-induced depression.

The performance during the reinforced sessions was not differentially influenced by the antidepressant treatment. As expected, the latency between the onset



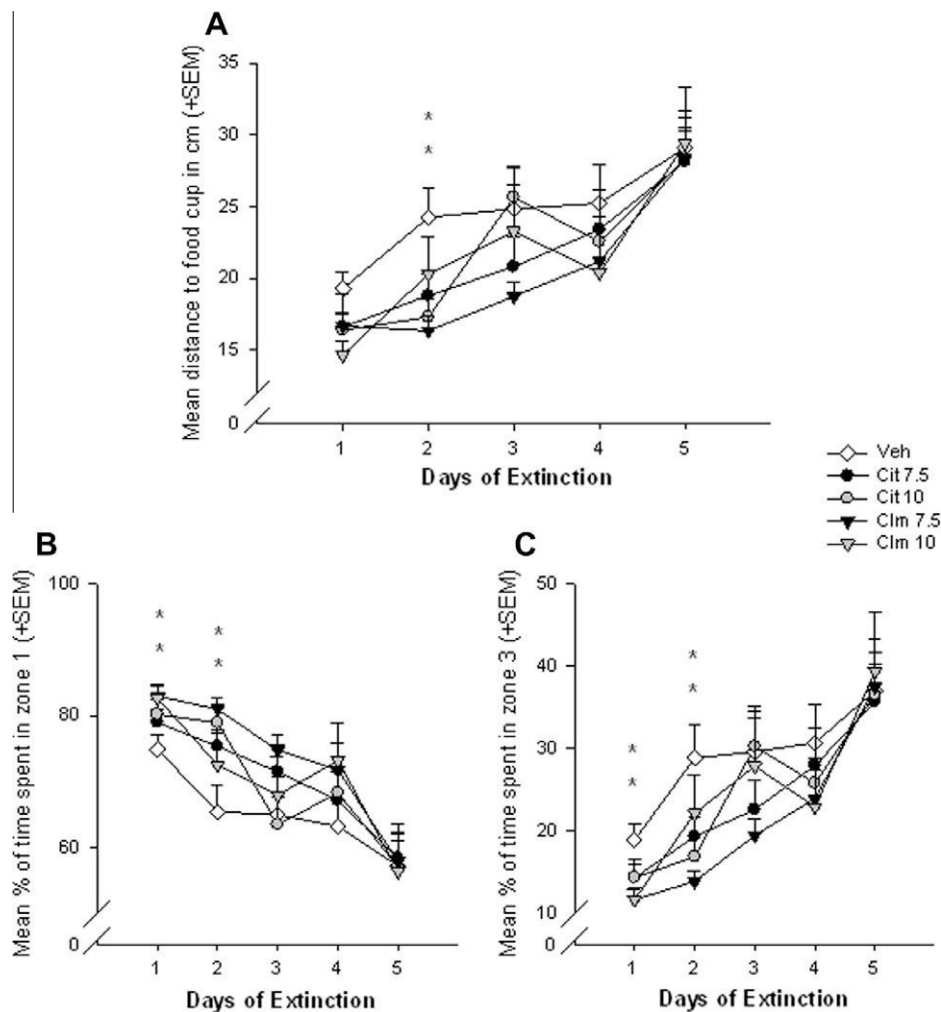
**Fig. 2.** Upper panel: Mean number (+SEM) of beambreaks (A) and latency (B) during extinction. Groups did not differ significantly at any point of time. Bottom panel: Mean number (C) and duration (D; +SEM) of contacts with the food cup during extinction. A contact was counted, when the animal entered the food cup with its mouth or touched it with the forelimbs. # $p < .1$  in one way ANOVA on extinction day 2. + $p < .1$  for effect of treatment in repeated measures ANOVA.

of the cue-light and the first consecutive beambreak in the food cup decreased over the acquisition trials and significantly rose again during extinction, when the reward was omitted. Complementary, the number of beambreaks progressively decreased asymptotically toward zero over the extinction trials, indicating that animals had learned that food reward will no longer be provided by the magazine. Thus, the initial decrease in the number of beambreaks over the course of acquisition has to be differentiated from the decrease of the response rate during extinction. Within acquisition it reflects the progress to a stable response rate. Once a stable rate was achieved, the number of beambreaks remained stable over the re-acquisition period.

Both, the latencies and number of beambreaks remained unaffected by the antidepressant treatments within the reacquisition-period, as expected from results of other studies. E.g., the serotonergic drugs, fluoxetine and citalopram, did not influence the break-point or

response-rate of rats in progressive ratio (PR) schedules if the reinforcer was not downshifted (Nikiforuk and Popik, 2009). The same goes for potentially depressogenic procedures, such as chronic mild stress (CMS), which did not influence the break-point for receiving a sucrose solution in rats (Barr and Phillips, 1998).

If a reinforcer is downshifted or omitted, as in the present study, some antidepressant drugs are known to increase the resistance to extinction (RTE) by inhibiting the decrease of the break-point compared to the control groups (Nikiforuk and Popik, 2009). Antidepressants also reduce the response-rate in differential-reinforcement-of-low-rate (DRL) schedules and, therefore, increase the reinforcement rate (O'Donnell and Seiden, 1983). We previously found that desipramine increased RTE in the water maze (Schulz et al., 2007a), but not in a two-compartment operant chamber (Huston et al., 2012). In the latter case,

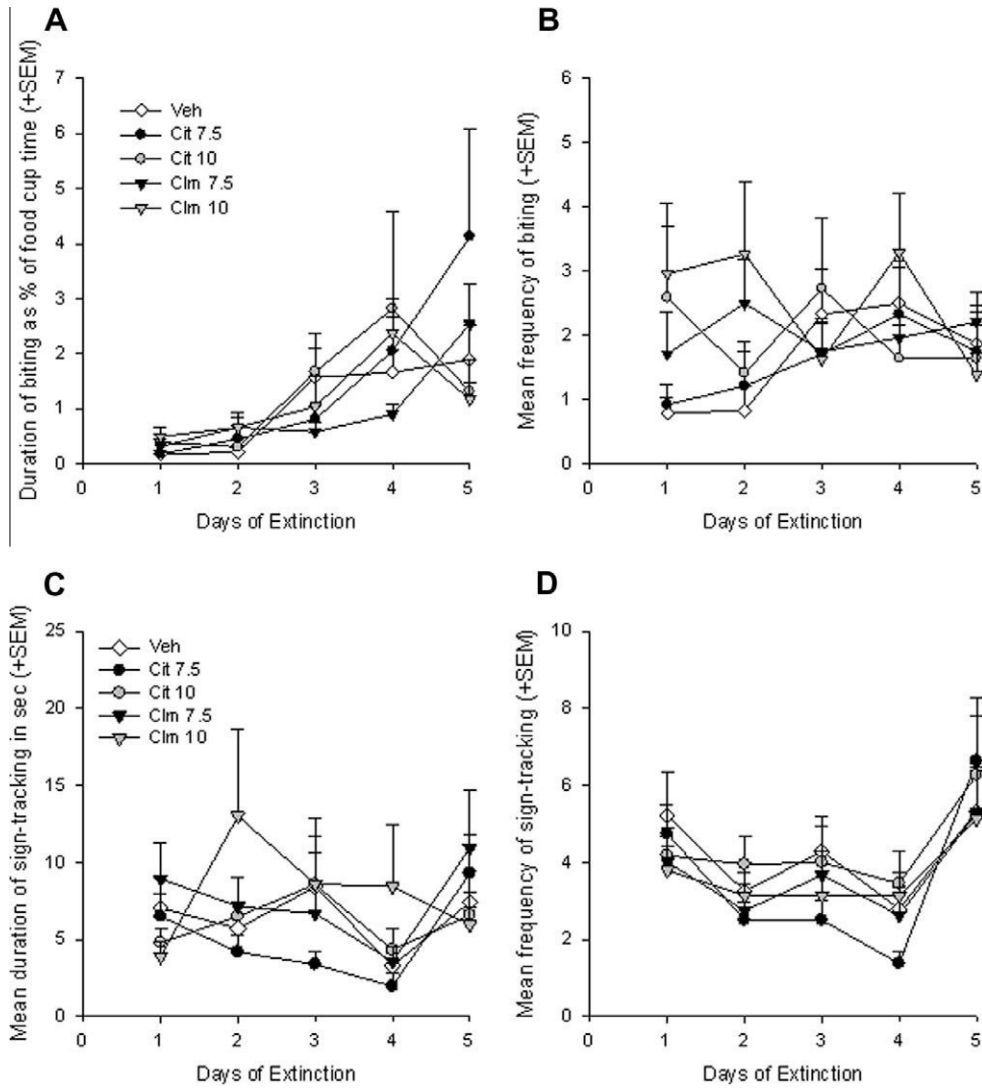


**Fig. 3.** Mean (+SEM) distance to the food cup (A) in cm, percentage of time animals spent in the 24-cm zone of the chamber near the food-cup (B) and in the last (C) 24-cm zone of the chamber furthest from food-cup. The first zone includes the area around the food cup. The vehicle group withdrew from the zone earlier during extinction and spent more time in zone 3. \* $p < .05$  compared to corresponding time point in the vehicle group.

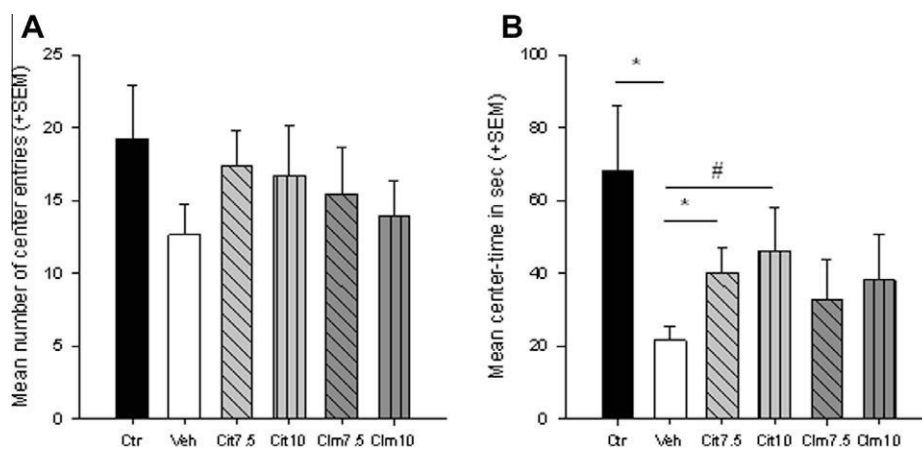
treatment with 20 mg/kg of imipramine reduced the number of lever presses during extinction, likely because of sedative effects rather than a decrease in RTE. Citalopram, as in the present investigation, did not influence the rate of responding. Neither citalopram nor clomipramine had a significant impact on the latency or number of beambreaks here during extinction.

Locomotor activity, unlike in other investigations (Porsolt et al., 1978a; Custodio Teixeira et al., 2000; Huston et al., 2012; see Tucker and File, 1986 for review), was not altered by any of the antidepressant treatments. The distance travelled within the extinction trials decreased significantly over time in all groups, probably as an effect of habituation. The same observations were made for rearing behavior (data not shown here) and the number of entries into the three zones of the operant chamber. In the OFT, locomotor and exploratory behavior also remained unaffected by the treatments. Other studies using the same rather low doses also did not report significant locomotor effects (Kugelberg et al., 2002).

Based on the model of spatial withdrawal as a potential marker for extinction-induced despair, we investigated several variables reflecting the distance of the animals from the former reinforcing food cup and their exact residence during extinction. The mean distance from the food-tray significantly increased during the extinction trials. Subjects treated chronically with 7.5 mg/kg clomipramine and 10 mg/kg citalopram stayed significantly closer to the food cup on extinction day 2. The increase in the distance is also reflected by the percentage of time that animals spent at the food cup, or rather, in contact with it. The frequency and percental duration of contacts significantly decreased over extinction between the trials. While the decline in frequency was independent of treatment, a trend for a main effect of the treatment in repeated-measures ANOVA was detected for the time spent at the food cup. We segmented the operant chamber into three zones and counted the number of entries as well as the time spent within these zones. On the first 2 days, the groups treated with either 7.5- or 10 mg/kg



**Fig. 4.** Upper panel: Mean duration of biting expressed as percent of time spent at the food cup (+SEM; A) and mean frequency of biting (B). Whereas the time spent at the food cup decreased significantly during extinction, the mean duration of biting increased. Frequency of biting remained stable. The increase of the percentage over time is significant ( $p < .05$ ). panel: Duration (C) and frequency (D) of sign-tracking.



**Fig. 5.** Number of entries (A) and time (B) in open field center. Vehicle-treated subjects spent less time in the center of the open field compared to their inexperienced controls. \* $p < .05$ ; # $p < .1$  (unpaired *t*-test).

clomipramine spent significantly more time in the zone closest to the food cup and less time in the zone furthest away as compared to the vehicle group. To check, whether these differences are present from the beginning on or only emerge over time, we performed a more detailed analysis by looking at each of the two daily trials and not only at the means (data not shown). Hereby we found that the significant differences only appear within the second trial on the first day of extinction and not directly in the first trial. Therefore, the effects of the antidepressants on animals' residence do not unconditionally rest upon a greater RTE, but seem to reflect withdrawal behavior, as predicted. Apart from that, the differences between the treatment groups and the vehicle group in the mean distance to the food cup and the residence in the zones might also suggest an interpretation of the results in terms of learning deficits. If the antidepressant treatment impaired learning of the new contingency, that the cue lights do not predict food reward anymore, within extinction, this might be an alternative explanation for the results found here. However, we can largely rule out the existence of learning deficits by looking at the latencies and number of beambreaks during extinction. As we could not detect any effects of the treatment on these two variables during re-acquisition and especially extinction, learning deficits seem unlikely, as we would expect them to change those learning-associated parameters as well. There are few studies investigating the effects of antidepressants on learning processes in healthy volunteers or healthy rats. Whereas most of them support the assumption, that antidepressants do not seem to impair learning in healthy subjects (Liljequist et al., 1974), some also report of inconclusive results (Jansen and Andrews, 1994).

The OFT did not reveal significant treatment effects on the locomotor parameters. This can be ascribed to several possible reasons. On the one hand, extinction is well known to be an arousing and anxiety-inducing event that activates the stress-related HPA-system and the release of corticosterone in rodents (Coover et al., 1971; Coe et al., 1983; Kawasaki and Iwasaki, 1997). On the other hand, the doses of citalopram and clomipramine used here were chosen with respect to their non-sedative effects. Therefore, it could be expected that locomotion will not be altered by the treatment. The decrease of time that vehicle-treated animals spent in the center of the open field compared to the control group, might be further indicative of an anxiogenic-like effect of extinction. Chronic treatment with 7.5 mg/kg, and marginally with 10 mg/kg, citalopram increased the center-time and, thus, attenuated the anxiogenic-like effects of the extinction-procedure. This concurs with the anxiolytic properties of most other antidepressants (Prut and Belzung, 2003). Both doses of clomipramine, however, failed to increase center-time here. This lack of effect might derive from an altered responsiveness to some antidepressants under certain circumstances. It has been shown, that moderate to severe stress decreases the

responsiveness of rats toward clomipramine (Consoli et al., 2005) and imipramine (Gutiérrez-García and Contreras, 2009) in the FST. This may be relevant to our results here, showing that the clomipramine-treated groups exhibited equal number of entries into and time in the center compared to the vehicle-treated group.

Biting behavior could only be measured here during the extinction trials. In contrast to former studies (Huston et al., 2012), we did not use a lever or another operandum, but only worked with cue-lights as a predictor of reward delivery. Therefore, the animals could only direct biting against the food cup, which made it difficult to distinguish biting from other consumatory behaviors as long as food was still delivered. In general, biting appeared less frequent here in comparison to the previous investigation using lever-pressing behavior during which biting was mainly directed at the lever (Huston et al., 2012). But, interestingly, a significant increase in the duration of biting emerged over trials, although the frequency of biting remained stable and the animals spent less time at the food cup. Thus, the duration of biting behavior may provide a useful measure of extinction-induced "aggression" when the environment lacks convenient objects to bite, except for the food-tray. Unlike lever-biting (Huston et al., 2012), food-tray biting was not significantly influenced by the antidepressant treatments. Perhaps it is possible and necessary to differentiate biting of the goal (food-tray) from biting of the sign (lever), akin to goal- vs. sign-tracking during positively reinforced behavior (Berridge and Robinson, 2003; Flagel et al., 2007). In any case, in order to ensure antidepressant-sensitive biting behavior, it may simply be necessary to equip the chamber additionally with an operandum or inanimate objects, which can serve as potential targets of biting (Weinstein, 1982; Tomie et al., 1993; Huston et al., 2012).

Biting and other forms of actions toward the food-tray within operant tasks are termed as so-called "goal-tracking" (Boakes, 1977). Within a cued operant task, rats tend to become either sign- or goal-trackers (Kearns et al., 2006). Goal-trackers directly relate the delivery of reward to the food-tray and spend the time between two cues/stimuli while surveying the source of reinforcement, thus the food-tray, only (Boakes, 1977). On the contrary, sign-trackers rarely engage in any activities with the food-tray until the food reward is delivered. They especially focus on the cues that predict the reinforcement (cue-lights, lever, etc.), as they gain incentive salience themselves for sign-trackers and become motivational magnets ("autoshaping"; Berridge and Robinson, 2003). In the present investigation, subjects exclusively tended to become goal-trackers as can be seen by the strong approaching behavior toward the food cup. This might be due to the lack of an operandum. After the onset of reward omission, goal-tracking extinguished over trials, but its duration was influenced by antidepressant treatment with 10 mg/kg of citalopram. Sign-tracking (rearing and glances toward the cue lights), on the other hand, was insensitive



toward the treatment. Sign-tracking did not undergo extinction as rapidly and steeply as goal-tracking. Therefore, one may suppose that sign- and goal-tracking reflect distinct emotional or motivational states. Sign-tracking, e.g., is sensitive to and manipulated by changes in the dopaminergic system and is more likely related to issues of addiction and drug craving (see e.g. Tomie et al., 2000; Flagel et al., 2007).

With the present investigation, we introduce a new variant of the animal model for depression that focuses on extinction-induced withdrawal as a marker for extinction-induced despair. In summary, the results lend support to our former findings and especially the utility of spatial withdrawal as a sensitive marker for depressive-like behavior caused by extinction (Huston et al., 2012). Earlier, we found that extinction in the water maze leads to higher immobility as a marker for despair, which was reduced by chronic treatment with desipramine (Schulz et al., 2004; Schulz et al., 2007a,b). In a two-compartment operant chamber, treatment with imipramine and citalopram reduced the time spent in the withdrawal compartment as well as biting and rearing behaviors during extinction (Huston et al., 2012). Here, we again show in another version of this model, one employing a signaled fixed-time reward schedule and a long operant chamber instead of two-compartments, that extinction of positively reinforced operant behavior leads to an increase in distance from the former source of reinforcement and to biting behavior. The withdrawal seems to derive from a depressive-like state in the rats, induced by extinction, as it is attenuated by antidepressant treatment. The distance from the food cup and the time spent in the area furthest away from it were significantly reduced by the tricyclic antidepressant clomipramine. Antidepressant treatment also tended to increase the time spent in contact with the food cup, compared to vehicle-treated subjects, while the reward was withheld.

The results are in accordance with our earlier findings using a two-compartment chamber, rather than one elongated chamber and employing a light-cued fixed time schedule rather than a lever-pressing operant. Our main findings are that (1) extinction induces withdrawal, a symptom commonly found in persons suffering from MD, (2) the distance gradient increases as extinction progresses and (3) chronic treatment with citalopram and clomipramine prior to extinction attenuated spatial withdrawal. Therefore, withdrawal behavior and avoidance, common symptoms of MD, can be operationalized in an animal model of depression. The model shows sensitivity to chronic treatment with antidepressants and, thereby, provides both, construct validity as well as predictive validity, indispensably demanded for animal models of depression (Willner, 1984, 1990; Pollack et al., 2010).

*Acknowledgements*—Supported by the German National Science Foundation Grant Hu 306/27-2, the Research Training Group GK 1033-2 and a Grant from NEURON-ERANET DISCover (BMBF 01EW1003).

## REFERENCES

- Arnone M, Dantzer R (1980) Effects of diazepam on extinction induced aggression in pigs. *Pharmacol Biochem Behav* 13:27–30.
- Azrin NH, Hutchinson RR, Hake DF (1966) Extinction induced aggression. *J Exp Anal Behav* 9:191–204.
- Barr AM, Markou A (2005) Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 29:675–706.
- Barr AM, Phillips AG (1998) Chronic mild stress has no effect on responding by rats for sucrose under a progressive ratio schedule. *Physiol Behav* 64(5):591–597.
- Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci* 26:507–513.
- Boakes RA (1977) Performance on learning to associate a stimulus with positive reinforcement. In: Davis H, Hurwitz HMB, editors. *Operant-pavlovian interactions*. Hillsdale, NJ 1977: Erlbaum. p. 67–101.
- Bruce ML (2002) Psychosocial risk factors for depressive disorders in late life. *Biol Psychiatr* 52:175–184.
- Carvalho JP, Hopko DR (2011) Behavioral theory of depression: reinforcement as a mediating variable between avoidance and depression. *J Behav Ther Exp Psychiatr* 42:154–162.
- Coe LC, Stanton ME, Levine S (1983) Adrenal responses to reinforcement and extinction: role of expectancy versus instrumental responding. *Behav Neurosci* 97(4):654–657.
- Consoli D, Fedotova J, Micale V, Saponov NS, Drago F (2005) Stressors affect the response of male and female rats to clomipramine in a model of behavioral despair (forced-swim test). *Eur J Pharmacol* 520:100–107.
- Coover GD, Goldman L, Levine S (1971) Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. *Physiol Behav* 6:261–263.
- Custodio Teixeira R, Zangrossi H, Graeff FG (2000) Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 4:571–576.
- Dantzer R, Arnone M, Mormede P (1980) Effects of frustration on behavior and plasma corticosteroid levels in pigs. *Physiol Behav* 24:1–4.
- Ferster CB (1973) A functional analysis of depression. *Am Psychol* 28(10):857–870.
- Flagel SB, Watson SJ, Robinson TE, Akil H (2007) Individual differences in the propensity to approach signals vs. goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology* 191:599–607.
- Gutiérrez-García AG, Contreras CM (2009) Stressors can affect immobility time and response to imipramine in the rat forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 91:542–548.
- Hammen C (2005) Stress and depression. *Ann Rev Clin Psychol* 1:293–319.
- Haskell M, Coerse NCA, Forkman B (2000) Frustration-induced aggression in the domestic hen: the effect of thwarting access to food and water on aggressive responses and subsequent approach tendencies. *Behavior* 137:531–546.
- Huston JP, Schulz D, Topic B (2009) Toward an animal model of extinction induced despair: focus on aging and physiological indices. *J Neural Trans* 116:1029–1036.
- Huston JP, van den Brink J, Komorowski M, Huq Y, Topic B (2012) Antidepressants reduce extinction-induced withdrawal and biting behaviors: a model for depressive-like behavior. *Neuroscience* 210:249–257.
- Hutchinson RR, Azrin NH, Hunt GM (1968) Attack produced by intermittent reinforcement of a concurrent operant response. *J Exp Anal Behav* 11(4):489–495.
- Jansen JH, Andrews JS (1994) The effects of serotonergic drugs on short-term spatial memory in rats. *J Psychopharmacol* 8:157–163.
- Kawasaki K, Iwasaki T (1997) Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sci* 61(17):1721–1728.
- Kearns DN, Gomez-Serrano MA, Weiss SJ, Riley AL (2006) A comparison of Lewis and Fischer rat strains on autoshaping (sign-

- tracking), discrimination reversal learning and negative automaintenance. *Behav Brain Res* 169(2):193–200.
- Kraaij V, Arensman E, Spinhoven P (2002) Negative life events and depression in elderly persons: a meta-analysis. *J Gerontol* 57(B):87–94.
- Kugelberg FC, Apelqvist G, Bengtsson F (2002) Effects of chronic citalopram treatment on central and peripheral spontaneous open-field behaviors in rats. *Pharmacol Toxicol* 90:303–310.
- Liljequist R, Linnoila M, Mattila MJ (1974) Effect of two weeks' treatment with chlorimipramine and nortriptyline, alone or in combination with alcohol, on learning and memory. *Psychopharmacologia* 39:181–186.
- Lewinsohn PM (1974) A behavioral approach to depression. In: Friedman RJ, Katz MM, editors. *The psychology of depression: contemporary theory and research*. New York: Wiley. p. 157–185.
- Mazure CM (1998) Life stressors as risk factors in depression. *Clin Psychol: Sci Pract* 5(3):291–313.
- Nikiforuk A, Popik P (2009) Antidepressants alleviate the impact of reinforcer downshift. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:41–48.
- O'Donnell JM, Seiden LS (1983) Differential-reinforcement-of-low-rate 72-sec schedule: selective effects of antidepressant drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 224(1):80–88.
- Ottenbreit ND, Dobsen KS (2004) Avoidance and depression: the construction of the Cognitive Behavioral Avoidance Scale. *Behav Res Ther* 42:293–313.
- Papini MR, Dudley RT (1997) Consequences of surprising reward omission. *Rev Gen Psychol* 1:175–197.
- Pollack DD, Rey CE, Monje FJ (2010) Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. *Ann Med* 42:252–264.
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978a) Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47:379–391.
- Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1978b) "Behavioral despair" in rats and mice. Strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol* 51:291–294.
- Prut L, Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: a review. *Eur J Pharmacol* 463:3–33.
- Schulz D, Topic B, de Souza Silva MA, Huston JP (2004) Extinction-induced immobility in the water maze and its neurochemical concomitants in aged and adult rats: a possible model for depression? *Neurobiology of learning and memory* 82(2):128–141.
- Schulz D, Bueddenberg TE, Huston JP (2007a) Extinction-induced "despair" in the water maze, exploratory behavior and fear: effects of chronic antidepressant treatment. *Neurobiol Learn Mem* 87:624–634.
- Schulz D, Huston JP, Bueddenberg TE, Topic B (2007b) "Despair" induced by extinction trials in the water maze: relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiol Learn Mem* 87:309–323.
- Steru L, Chermat R, Thierry B, Simon P (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85:367–370.
- Tomie A, Carelli R, Wagner GC (1993) Negative correlation between tone (S-) and water increases target biting during S- in rats. *Animal Learn Behav* 21:355–359.
- Tomie A, Aguado AS, Pohorecky LA, Benjamin D (2000) Individual differences in pavlovian autoshaping of lever pressing in rats predict stress-induced corticosterone release and mesolimbic levels of dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* 65:509–517.
- Topic B, Huston JP, Nametskova K, Zhu SW, Mohammed AH, Schulz D (2008a) Extinction-induced "despair" in aged and adult rats: links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 90:519–526.
- Topic B, Oitzl MS, Meijer OC, Huston JP, de Souza Silva MA (2008b) Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and neurochemical parameters. *Neuropsychobiology* 58:138–153.
- Tucker JC, File SE (1986) The effects of tricyclic and 'atypical' antidepressants on spontaneous locomotor activity in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 10:115–121.
- Weinstein L (1982) Negative incentive contrast effects with sucrose and rats as due to aggression. *Bull Psychon Soc* 19:359–361.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83:1–16.
- Willner P (1990) Animal models of depression: an overview. *Pharmacol Ther* 45:425–455.
- Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen HC (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(9):655–679.

(Accepted 29 July 2012)  
(Available online 4 August 2012)

## Chronic corticosterone treatment enhances extinction-induced depression and impairs HPA-axis activity in aged and adult rats

Mara Komorowski<sup>(1)</sup>, Valéria Lamounier-Zepter<sup>(2)</sup>, Bianca Topic<sup>(1\*)</sup>

(1) Center for Behavioral Neuroscience, Institute of Experimental Psychology, Heinrich-Heine-University of Düsseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany

(2) Medical Clinic III, University of Technology Dresden, Fetscherstr. 74, 01307 Dresden, Germany

Corresponding author:

\* Bianca Topic, PhD

Center for Behavioral Neuroscience

University of Duesseldorf

Universitaetsstr. 1

40225 Duesseldorf

Tel. +49-211-811-4296

FAX: +49 211-811-2024

E-mail address: [topic@uni-duesseldorf.de](mailto:topic@uni-duesseldorf.de)

## **Abstract**

Withdrawal and avoidance behavior are common symptoms of depression and appear as a consequence of lack of reinforcers and chronic stress. Avoidance of the former site of reward and increased withdrawal into a distant compartment accompany extinction of food-rewarded behavior in rats. Chronic treatment with antidepressants attenuated extinction-induced avoidance, indicating such behavior as a marker for extinction-induced depression (EID). A prolonged exposure to corticosterone (CORT) also incurs a depression-like phenotype in rodents. We examined the effect of a chronic treatment with CORT on extinction-induced behaviors proposed to be markers of EID. Since especially the aged are subjected to loss of reinforcers and EID, we hypothesized interactive effects with age. Adult (3-4 months) and aged (18 months) male Wistar rats were treated with CORT via drinking water over three weeks prior to extinction of cued food reward. Afterwards, plasma levels of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and CORT were determined in an acute restraint stress procedure. CORT treatment increased the distance from the site of reward and decreased goal tracking behavior during extinction especially in the aged rats, indicating an additive influence of CORT to EID. Aged subjects had lower baseline levels of ACTH and CORT than untreated controls. CORT treatment significantly impaired the HPA-axis activity after acute stress. The enhancement of extinction-induced withdrawal and avoidance behavior by chronic treatment with CORT and age lend further support to the hypothesis that such behaviors are sensitive markers for EID. This depression model might have special relevance for the investigation of human geriatric depression.

**Key words:** Depression model, extinction, despair, corticosterone, ACTH, glucocorticoids, chronic stress, goal tracking, withdrawal behavior

## 1. Introduction

Loss of reward and reinforcement play a crucial role in the psychopathology of major depression and can lead to despair, anhedonia and withdrawal (Ferster, 1973; Wittchen et al., 2011), resulting in avoidance of former desirable situations (Lewinsohn, 1974). The onset of depression is often preceded by stressors and experiences of loss such as unemployment, disease or parting (Brown, Harris & Hepworth, 1994; Kendler, Karkowski & Prescott, 1999). Loss of reward can induce depression and amplify avoidance or withdrawal behavior (Mazure, 1998; Hammen, 2005). Experiences of loss affect particularly the aged population and may account for the increasing number of old people suffering from depression (Bruce, 2002; Kraaij, Arensman & Spinhoven, 2002). The severity of depression is highly correlated with the degree of avoidance that patients show (Ottenbreit & Dobson, 2004).

The absence of formerly delivered reinforcers induces cessation, and thus, “extinction” of behavior that formerly led to the reinforcer. Such extinction is perceived as stressful and aversive by organisms and can initially raise aggressive behavior (Papini & Dudley, 1997; Papini, 2003). It is accompanied by an increased activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA)-axis and an elevated secretion of cortisol/CORT (Coover, Goldman & Levine, 1971; Coe, Stanton & Levine, 1983; Kawasaki & Iwasaki, 1997). In humans, elevated cortisol levels go together with anhedonia and insensitivity towards reward (Davidson et al., 2002; Bogdan & Pizzagalli, 2006). An excessive and prolonged secretion of cortisol and a dysfunction of the HPA-axis appear in a majority of patients precursory to the first depressive episode (Stokes, 1995; Zobel et al., 2001; Ising et al., 2007; Bhagwagar & Cowen, 2008; Pariante & Lightman, 2008; Cowen, 2010). The amount of plasma cortisol is highly correlated with depression scores (Hinkelmann et al., 2012) and results in a reduction of glucocorticoid receptors in the hippocampus, hippocampal atrophy, hyperactivity of the amygdala, decreased neurogenesis and a lack of neurotrophins (McEwen, 1999a; 1999b; Malberg et al., 2000; Gold, Drevets & Charney, 2002). These changes obstruct the negative feedback regulation and disinhibit the HPA-axis activity (Bruce 1999a; 1999b; Mizoguchi et al., 2003). Antidepressants significantly decrease the release of cortisol, increase neurogenesis (Malberg et al., 2000) and restore the circadian HPA-axis activity (Thomson & Craighead, 2008).

In our attempts to validate a new animal model of depression that depicts the effects of reward omission and loss, namely extinction-induced depression (EID), we have delineated a number of behavioral markers sensitive to antidepressant treatment (see Huston, Schulz & Topic, 2009 and Huston et al., 2013 for review). Especially the withdrawal from the food cup and the cessation of goal tracking during extinction are sensitive, reliable measures of EID (Komorowski et al., 2012). These variables have strong face validity and coincide with

avoidance and withdrawal behavior that is seen in patients suffering from major depression. During extinction of food-rewarded behavior, the distance to the food cup increased and animals spent more time in a distant withdrawal area instead of engaging in goal tracking (Huston et al., 2012; Komorowski et al., 2012). Chronic treatment with antidepressants decreased withdrawal behavior (Huston et al., 2012; Komorowski et al., 2012). In aged rats, we previously found changes in the amount of striatal neurotransmitters (Schulz et al., 2004), neurotrophins (Topic et al., 2008a) and mineral-/glucocorticoid-receptors in the hippocampus and frontal cortex after extinction. These correlated with measures of EID upon the withholding of negative reinforcement (Topic et al., 2008b).

Since especially the aged are confronted with life events that subsume loss of reinforcers (Kraaij et al., 2002), it is particularly important to investigate EID and stress in the aged organism. Senescence is accompanied by various physiological and behavioral changes that influence an organism's resistance to extinction, HPA-axis activity and the ability to cope with stress (Blazer, 2003; Mroczek & Almeida, 2004; Miller & O'Callaghan, 2005; Topic et al., 2008a; 2008b). Aged rats display increased HPA-axis activity, with elevated baseline levels of CORT and ACTH in the plasma and an impaired suppression of release (see Sapolsky, Krey & McEwen, 1986). The chronic administration of exogenous CORT is an established animal model of depression (Gregus et al., 2005; Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006; Sterner & Kalynchuk, 2010) and induces a depression-like phenotype (Gregus et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zhao et al., 2008) that is responsive to antidepressant treatment (see Dranovsky & Hen, 2006 for review). It is also considered as a model of treatment resistant depression (TRD; Samuels et al., 2011; Walker et al., 2012; Koike, Iijima & Chaki, 2013) and is thus of special interest for geriatric TRD (Bonner, 1995).

In the present study, we examined the effects of a chronic corticosterone treatment in aged and adult rats on measures of EID. Three weeks after extinction, subjects underwent a restraint stress procedure with blood-sampling over five time points. We hypothesized that CORT would enhance EID and impair HPA-axis function. Additionally, we expected an interaction between age and CORT, with aged rats being more sensitive to the effects of extinction and the treatment than adult rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Subjects**

Thirty aged (18 months) and twenty-four adult (3-4 months) naive, male Wistar rats were obtained two weeks prior to the experiments from the local animal facilities (Tierversuchsanlage, University of Düsseldorf). The aged rats had a mean weight ( $\pm$  SEM) of  $601.93 \pm 11.86$ g and the adult rats of  $253.21 \pm 3.6$ g. They were housed in type VI macrolon

cages in groups of 2-3 (aged) or four (adult). Water and food (Ssniff Spezialdiäten) were provided ad libitum until food deprivation started. Animals were subjected to a 12h light/dark cycle (lights on at 7am) with room temperature maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  in the husbandry room. The study was carried out in accordance with the German Law on the Protection of Animals and was approved by the state authority (Bezirksregierung Düsseldorf).

After one week of familiarization, the animals were weighed, marked and food deprived (15g/animal/day for aged, 12g/animal/day for adult). The total daily fluid intake of each cage was measured during food deprivation so that the approximate amount of water intake could be calculated for each rat by division. Three handling sessions were carried out prior to the experiment. Food deprivation and weighing were continued until the end of the study. After the acquisition sessions, animals were randomly assigned to the control- or CORT-group in equal numbers ( $n=15$  for aged,  $n=12$  for adult rats). Some animals had to be excluded post-hoc from statistical analysis of the blood-samples, because the sample size was too low for measurement with hormone-assays. Here, group size was reduced to 7-10 animals/group.

## **2.2 Apparatus and procedure**

Two elongated operant chambers (see Komorowski et al., 2012 for details) with walls made of dimmed plexiglas were used. The chambers were 72cm long, 28cm wide and 34cm high. The floor was covered with a black rubber mat and the top of the box was open. Each operant chamber was situated in a dark, sound attenuating box, containing a masking white noise of 60 dB. Infra-red cameras (Conrad Elektronik®) were mounted on the top and side of the chambers. The chambers were segmented by half into two compartments by additional side walls made of Plexiglas. Animals could freely enter both compartments through a transition in the middle of the walls. A triple cue light (green, yellow, red), the food magazine (BioServ® Dustless precision pellets) and the food cup (Coulbourn Industries®) with an integrated photodetector were fastened in the middle of the short wall. A house light offered slight illumination ( $\sim 1$  lux). For the magazine training sessions, an external hand-switch was connected to the apparatus to shape the animals' behavior toward the feeder. All modules were connected via a link box from PanLab® and controlled by the PackWin® 2.0.01 Software. Automated tracking of the animals' behavior was done by center-point detection and manually by an experienced rater with Ethovision XT 8® (Noldus®). The sound attenuated boxes were located within the animals' husbandry room.

Three days prior to the experiment, animals received 1g of the BioServ® pellets daily additionally to the restricted regular rat chow. On the first day of the experiment, all animals underwent a habituation session of 15 minutes and could freely explore the chamber. Two magazine training sessions of 15 minutes were performed on the consecutive two days (see Komorowski et al., 2012 for details). Hereby, the cue lights were turned on for five seconds

each time reinforcement was delivered. Within the next days, six daily acquisition trials of 15 minutes were performed with all subjects in random order. A fixed interval cued reward schedule of 30 seconds (FI 30) was applied whereby the cue lights were turned on every 25 seconds for five seconds and two food pellets were delivered immediately at the onset. After the last day of acquisition the aged and adult subjects were each assigned to one of two groups, either receiving regular drinking water (veh) or CORT-enriched water (cort; ~6-9mg/day/kg, depending on the amount of water intake/rat). For the next 23 days, the animals received fresh drinking water daily and the water intake was measured for each 24hr-period to control the intake of CORT. Re-acquisition trials were performed on every 3rd day. After 23 days of treatment and re-training, extinction trials were run daily for five days under continuous food deprivation and treatment. Here, the cue lights were presented for 15 minutes with an FI 30 free reward schedule as well, but without coincident food delivery.

The following variables were recorded automatically: horizontal activity (distance moved), vertical activity (rearing), number of beam breaks in the food cup, latency between cue light onset and first consecutive beam break, the mean distance to the food cup and residence within the withdrawal compartment of the chamber. The withdrawal compartment was situated in the latter part of the chamber and therefore offered the possibility to withdraw. Goal tracking (direct contact with the food cup by entering or touching it) and sign tracking (glances/rears towards the cue lights) were recorded manually by an experienced and blinded rater.

### **2.3 Drugs & Application**

After 6 days of acquisition training, the animals were randomly assigned either to the vehicle groups (aged/veh n=15 and adult/veh n=12), further receiving regular drinking water, or the treatment groups (aged/cort n=15 and adult/cort n=12). Animals were treated chronically for 28 days until the last day of extinction. Before the onset of the treatment, the daily water intake of the rats during food deprivation was measured for two weeks. Water bottles were weighed and replaced every 24 hours during the experiment. Animals were housed in groups, so the total intake of each cage was divided by the number of rats to estimate the individual intake of water. Adult rats had a consistently higher mean water intake per day than aged rats. To ensure a daily CORT intake of ~6-9 mg/kg for both, aged and adult rats, two distinct water solutions were produced, adapted to the different water intake. For the aged rats, a concentration of 125µg/ml was chosen and 50µg/ml for the adult rats. CORT hemisuccinate (Tocris®) was dissolved in distilled water adjusted to an alkaline pH of 13 with 4M sodium hydroxid (NaOH; details in Gourley & Taylor, 2009). After dissolution, the pH-value was equalized to 7-7,4 by 25% hydrochloric acid.



## **2.4 Restraint stress and blood analysis**

The restraining and blood sampling were carried out 3 weeks after the last day of extinction. Animals had continuously received regular tap water or CORT drinking water until then. They were brought to a holding area one hour prior to the first blood sampling. Each subject was taken to the lab individually and remained in a single cage to recover for two hours after the last sampling. Blood samples were taken by tail incision with a sterile blade (see Fluttert, Dalm & Oitzl, 2000 for details of the procedure). For the first sample (baseline  $t=0$ ), a cut was made at the distal part of the tail and blood was collected in 300 $\mu$ l EDTA-coated vials (Microvette® CB 300 Sarstedt®). Immediately after the baseline sample, animals were put into restrainers (Harvard Apparatus®), where they remained for 10 minutes. A red light was mounted over the restrainers to provide warmth. The second sample was taken in the restrainer after ten minutes ( $t=10$ ). Animals were placed in single cages with water available and three more samples were taken after 60 ( $t=60$ ), 120 ( $t=120$ ) and 180 minutes ( $t=180$ ) by carefully removing the crust from the incision with warm water. The samples were centrifuged at 4°C for ten minutes with a speed of 4000rpm. The plasma was separated and stored by -80°C until the assays were analysed. ACTH plasma concentrations were analysed by chemiluminescence immunometric assay (Immulite® 2000 ACTH, Siemens, Erlangen, Germany) and CORT plasma concentrations by ELISA (IBL International, Hamburg, Germany).

## **2.5 Analysis**

Data for the last day of re-acquisition and the extinction trials are presented as means + standard error of the mean (SEM) for all variables. If main effects of the treatment or age on the behavior on the last day of re-acquisition were detected by a multivariate one-way ANOVA, the data were involved in the further analysis as a covariate. We calculated multivariate repeated-measures ANOVAs with the three factors “time”, “treatment” and “age” for the behavioral data of the extinction period. When indicated by main effects of treatment or age, group comparisons with student’s t-tests were performed. Interactions of treatment or age with time were further specified by doing separate repeated-measures ANOVAs for single groups and consecutive paired t-tests. Detailed pre-planned comparisons between single groups were calculated for the distance gradient and goal tracking, since we could show that the effects of extinction on these despair-related behaviors are specific for the early period of extinction (Komorowski et al., 2012).

Baseline levels of CORT and ACTH were compared via multivariate ANOVAs and consecutive t-tests when indicated by effects of age, treatment or interactions. Multivariate repeated-measures ANOVAs with the baseline values as a covariate were calculated over the four time points after restraining and data were further analysed in detail by t-tests for the

single time points. A  $p$ -value  $\leq 0.05$  was considered as significant, statistical trends are reported for  $p$ -values  $\leq 0.1$ . All statistical tests were calculated using the software IBM SPSS Statistics 20.

### 3. Results

During the experiments, one of the aged rats in the control group died spontaneously and had to be excluded from analysis. Group-size was also decreased for the blood-analysis (see section 2.1). An overview of the general direction of the effects of age and CORT on all variables measured is given in table 1.

#### 3.1 Extinction

##### 3.1.1 Latency and beam breaks

On the last day of re-acquisition, neither the latency, nor the total number of beam breaks was significantly influenced by the treatment (latency:  $F(1,50) = 0.040$ ,  $p = 0.842$ , beam breaks:  $F(1,50) = 0.070$ ,  $p = 0.793$ ). Age did not have an impact on the latency ( $F(1,50) = 0.377$ ,  $p = 0.542$ ), but a significant influence on the number of beam breaks ( $F(1,50) = 25.533$ ,  $p < 0.001$ ). Adult rats exhibited a higher frequency of beam breaks than aged rats ( $t(52) = -5.148$ ,  $p < 0.001$ ). No interactions were detected between age and treatment ( $p > 0.05$ ). Repeated-measures ANOVA over the five days of extinction revealed a significant increase of the latency over time ( $F(4,196) = 127.195$ ,  $p < 0.001$ ) and a main effect of age ( $F(1,49) = 76.334$ ,  $p < 0.001$ ), with aged rats showing larger latencies to look into the food cup than adult rats ( $p < 0.001$  in  $t$ -test for every time point). The treatment had no impact on the latency and none of the factors interacted significantly with one another ( $p > 0.05$  for all). The number of beam breaks decreased during extinction ( $F(4,1962) = 10.058$ ,  $p < 0.001$ ). A main effect of age on the number of beam breaks ( $F(1,49) = 45.161$ ,  $p < 0.001$ ) and an interaction between age and the time was detected ( $F(1,49) = 6.667$ ,  $p < 0.001$ ). The number of beam breaks was constantly higher in the adult than in the aged group ( $p < .05$  for all in  $t$ -tests). Separate repeated-measures ANOVAs for the aged and adult group detected significant changes over the extinction period for both groups ( $p < 0.001$  for both), but comparisons by paired  $t$ -tests revealed that whereas in the aged group the number of beam breaks did not further decrease between day 3 and 4 ( $t(29) = 0.572$ ,  $p = 0.571$ ), in the adult group there was no further decrease between day 2 and 3 ( $t(23) = 1.555$ ,  $p = 0.134$ ) and from day 4 to 5 ( $t(23) = 0.759$ ,  $p = 0.455$ ). The treatment did not affect the number of beam breaks and did not interact with age or time ( $p > 0.05$  for all).

##### 3.1.2 Distance gradient and withdrawal

The mean distance to the food cup differed prior to extinction with respect to age ( $F(1,50) = 10.944, p = 0.002$ ), but was unaffected by the CORT treatment ( $p > 0.05$ ). Adult rats stayed closer to the food cup than the aged rats ( $t(52) = 3.233, p = 0.002$ ). During extinction, the distance to the food cup increased significantly over time ( $F(4,196) = 16.812, p < 0.001$ ; see Fig.1A), but no main effects of age or the treatment were found ( $p > 0.05$ ). The pre-planned comparisons between treatment- and control-groups with t-tests detected a significantly larger distance to the food cup in the treatment groups of aged and adult rats compared to their untreated controls on extinction day 2 ( $p < 0.05$  for all). In contrast, adult rats treated with CORT maintained a shorter distance to the food cup on day 5 compared to their controls ( $t(22) = 2.988, p = 0.007$ ). In aged rats, there was a tendency for the fourth day showing that CORT-treated subjects stayed further away than control subjects ( $t(28) = -1.810, p = 0.081$ ; see Fig. 1A for details).

The number of entries into the withdrawal zone was influenced by age prior to extinction ( $F(1,50) = 16.824, p < 0.05$ ), whereas the time spent in this compartment was not ( $F(1,50) = 2.190, p = 0.145$ ). Adult rats entered the withdrawal compartment more frequently than aged rats ( $t(52) = -4.182, p < 0.001$ ). Frequency was not influenced by the CORT treatment ( $p > 0.05$ ), but there was a trend for an effect of CORT on the time ( $F(1,50) = 2.979, p = 0.091$ ). Over the extinction trials, the proportion of time spent in this compartment rose significantly ( $F(4,196) = 13.738, p < 0.001$ ), independent of age or the treatment ( $p > 0.05$  for all). The number of entries into this zone did not change over time ( $F(4,196) = 1.507, p = 0.202$ ). A main effect of age ( $F(1,49) = 83.088, p < 0.001$ ) and an interaction between the time and the CORT treatment were revealed ( $F(4,49) = 3.649, p = 0.007$ ). Unpaired t-tests detected a higher frequency of entries into the compartment during all days of extinction in adult rats compared to aged ( $p < 0.001$  for all). For the interaction between time and CORT, single repeated-measures ANOVAs for the treated and untreated subjects showed a significant overall decrease in frequency for the control subjects ( $F(4,100) = 2.660, p = 0.037$ ), but not for subjects treated with CORT ( $F(4,104) = 1.646, p = 0.168$ ).

### 3.1.3 Goal tracking

The contacts with the food cup did not differ in frequency or duration prior to extinction with respect to the treatment ( $p > .05$  for both), but as a function of age ( $F(1,50) = 45.100, p < 0.001$  and  $F(1,50) = 16.322, p < 0.001$ ). The factors did not interact ( $p > 0.05$  for all). Adult rats had more contacts with the food cup ( $t(52) = -6.828, p < 0.001$ ) and for a longer duration compared to aged rats ( $t(52) = -4.105, p < 0.001$ ). Over the extinction trials, the frequency decreased significantly ( $F(4,196) = 164.733, p < 0.001$ ) and was influenced by age ( $F(1,49) = 267.452, p < 0.001$ ) and the CORT treatment ( $F(1,49) = 6.395, p = 0.015$ ). Time interacted significantly with age ( $F(4,196) = 3.825, p = 0.005$ ). Age and CORT did not interact ( $p >$

0.05). Age, time and CORT interacted by tendency ( $F(4,196) = 2.122, p = 0.08$ ), as well as CORT and time ( $F(4,196) = 2.151, p = 0.076$ ). Detailed post-hoc analysis revealed that frequency of goal tracking was higher in adult than in aged rats on each day ( $p < 0.001$  for all). CORT-treated animals tended to perform less goal tracking than control subjects on the second day ( $t(52) = 1.971, p = 0.054$ ). Further analysis with t-tests (see Fig.1B) showed that aged rats treated with CORT showed significantly less goal tracking than their age-matched controls on day 5 ( $t(27) = 2.392, p = 0.024$ ), whereas adult rats exhibited fewer contacts with the food cup than their controls on day 2 ( $t(22) = 3.728, p = 0.001$ ).

The duration of goal tracking changed during extinction ( $F(4,196) = 56.500, p < 0.001$ ), but only as a function of age ( $F(1,49) = 31.523, p < 0.001$ ). Adult rats spent overall more time with goal tracking than aged rats on each day of extinction ( $p < 0.05$  for all). No main effect of the treatment or interactions were detected ( $p > 0.05$  for all), except a strong trend for a threefold interaction between age, time and the treatment ( $F(4,196) = 2.329, p = 0.057$ ). Pre-planned comparisons between the treatment groups revealed that aged rats treated with CORT spent significantly less time with goal tracking on day 5 ( $t(27) = 4.301, p < 0.001$ ) and by tendency on day 2 ( $t(28) = 1.927, p = 0.064$ ), 3 ( $t(28) = 1.902, p = 0.067$ ) and 4 ( $t(28) = 2.038, p = 0.051$ ) compared to the aged control group (see Fig. 1C). In contrast, there was an U-shaped gradient in adult rats. CORT-treated adult subjects tended to spend less time in goal tracking than the adult control group on day 2 ( $t(22) = 1.955, p = 0.063$ ), but more time on day 5 ( $t(22) = -2.069, p = 0.051$ ).

#### 3.1.4 Horizontal and vertical activity

The distance travelled was significantly influenced by the factor age prior to extinction ( $F(1,50) = 61.410, p < 0.001$ ), but not by the treatment ( $p > 0.05$ ). The factors did not interact ( $p > 0.05$ ). Adult rats moved a longer distance compared to aged rats ( $t(52) = -7.752, p < 0.001$ ). Repeated-measures ANOVA showed a significant decrease of the distance moved during extinction for all groups ( $F(4,196) = 5.998, p < 0.001$ ). This decrease over time was not influenced by the treatment ( $p > 0.05$ ). Age had a significant main effect on the distance travelled ( $F(1,49) = 94.069, p < 0.001$ ) and tended to interact with the time ( $F(4,196) = 2.395, p = 0.052$ ) with adult animals walking a longer distance than aged rats during extinction ( $p < 0.001$  for all in t-tests).

Rearing behavior differed significantly in frequency ( $F(1,50) = 32.659, p < 0.001$ ) and total duration ( $F(1,50) = 5.477, p = 0.023$ ) between the groups on the last day of re-acquisition as a function of age, but not of the treatment ( $p > 0.05$ ). The two factors did not interact ( $p > 0.05$ ). Adult rats reared more often and longer than aged rats at the last re-acquisition trial and on each day of extinction ( $p < 0.001$  for all in t-tests). Thus over the extinction trials, the frequency of rearing was influenced by the factor age ( $F(1,49) = 188.607, p < 0.001$ ), and

decreased significantly over time ( $F(4,196) = 21,379, p < 0.001$ ). The CORT treatment did not have any impact ( $F(1,49) = 0.003, p = 0.958$ ). The total duration of rearing changed over time as well ( $F(4,196) = 4.678, p = 0.001$ ), and a main effect of age ( $F(1,49) = 115.613, p < 0.001$ ) and an interaction between time and age ( $F(4,196) = 3.265, p = 0.013$ ) was detected. Paired t-tests showed that the duration of rearing increased from the first to the second day ( $t(29) = -2.072, p = 0.047$ ) and then decreased from the second to the third day of extinction in old rats ( $t(29) = 2.323, p = 0.027$ ), whereas in adult rats, it only increased from the first to the second day ( $t(23) = -3.042, p = 0.006$ ). Additionally, t-tests detected an overall longer total duration of rearing in adult rats compared to aged rats for each day of extinction ( $p < 0.05$  for all).

Subsequently, the mean duration of a single rear was calculated (Fig. 2A). The duration increased over time ( $F(4,196) = 12.529, p < 0.001$ ) and was influenced by age ( $F(1,49) = 20.141, p < 0.001$ ), with aged rats rearing for longer periods than adult rats ( $p < 0.05$  in t-tests). Also, a trend for an influence of the CORT treatment on the duration was shown ( $F(1,49) = 3.951, p = 0.053$ ), but there were no interactions ( $p > 0.05$  for all).

### 3.1.5 Sign tracking

Sign tracking did not differ in frequency or duration prior to extinction with respect to the treatment ( $p > 0.05$  for both), but was influenced by age ( $F(1,50) = 10.540, p = 0.002$  and  $F(1,509) = 8.069, p = 0.006$ ). Adult rats performed more sign tracking ( $t(52) = -3.295, p = 0.002$ ) and for a longer duration than aged rats ( $t(52) = -2.834, p = 0.007$ ). During extinction, the frequency changed significantly over time ( $F(4,196) = 20.097, p < 0.001$ ) and was affected by age ( $F(1,196) = 59.906, p < 0.001$ ). The factors did not interact ( $p > 0.05$  for all). Adult rats performed more sign tracking than aged rats in each trial ( $p < 0.001$  for all). A trend for an effect of CORT on the frequency was revealed, Both groups treated with CORT showed significantly less sign tracking compared to their aged-matched controls. Significant differences between the aged groups were detected for day 2 ( $t(28) = 2.227, p = 0.034$ ). Trends for a decrease appeared on day 5 ( $t(28) = 1.741, p = 0.093$ ) and for the adult rats on day 3 ( $t(22) = 1.892, p = 0.072$ ; see Fig.2B). For the duration of sign tracking, main effects of the time ( $F(4,196) = 5.514, p < 0.001$ ) and age ( $F(1,49) = 31.023, p < 0.001$ ) were detected, but no significant influence of CORT ( $F(1,49) = 2.759, p = 0.103$ ). The factors did not interact ( $p > 0.05$  for all).

## 3.2 Blood analysis

### 3.2.1 CORT

The mean baseline levels of plasma CORT (+SEM) are shown in Fig.3A and 3B, separated by age. A multivariate ANOVA revealed a significant effect of the treatment ( $F(1,48) = 4.598,$

$p = 0.037$ ) and a trend for an effect of age on the baseline level of CORT ( $F(1,48) = 3.888$ ,  $p = 0.054$ ). The interaction was not significant ( $p > 0.05$ ). In general, subjects treated with CORT had lower baseline levels than untreated controls ( $t(52) = 2.157$ ,  $p = 0.036$ ). However, consecutive t-tests showed that the baseline values were significantly different between the vehicle and treatment group of aged rats ( $t(27) = 2.385$ ,  $p = 0.024$ ), but not of adult rats ( $p > 0.05$ ). The amount of CORT did not differ between aged and adult control- or treatment groups ( $p > 0.05$  for all). A multivariate repeated-measures ANOVA over the four time points after restraint stress (t10, t60, t120 and t180) revealed a significant change over time ( $F(3,126) = 3.537$ ,  $p = 0.017$ ), an interaction between time and the baseline ( $F(3,126) = 5.290$ ,  $p = 0.002$ ) and an interaction between time and the treatment ( $F(3,126) = 2.985$ ,  $p = 0.034$ ). Also, a main effect of the treatment ( $F(1,42) = 34.694$ ,  $p < 0.001$ ) and the baseline ( $F(1,42) = 9.745$ ,  $p = 0.003$ ) was detected, but no effect of age ( $F(1,42) = 1.275$ ,  $p = 0.265$ ). Overall, CORT-treated subjects had significantly lower levels of CORT in the plasma than the control groups over the four time points ( $p < 0.001$  for all). As shown in Fig.3A, aged rats treated chronically with CORT released significantly lower amounts of CORT after restraining constantly at all points of time (t10:  $t(26) = 5.510$ ,  $p < 0.001$ ; t60:  $t(27) = 4.293$ ,  $p < 0.001$ ; t120:  $t(26) = 4.045$ ,  $p < 0.001$ ; t180:  $t(26) = 3.155$ ,  $p = 0.004$ ). For adult rats, significant differences were detected at t10 ( $t(21) = 3.174$ ,  $p = 0.005$ ) and t180 ( $t(21) = 2.507$ ,  $p = 0.02$ ) and tendencies for a lower amount of CORT at t60 ( $t(20) = 1.750$ ,  $p = 0.095$ ) and t120 ( $t(20) = 1.750$ ,  $p = 0.095$ ; see Fig.3B).

### 3.2.2 ACTH

A multivariate ANOVA revealed a significant effect of the treatment ( $F(1,48) = 8.924$ ,  $p = 0.004$ ), but no effect of age on the baseline amount of ACTH ( $p > 0.05$ ). A trend was detected for an interaction between age and treatment ( $F(1,48) = 3.668$ ,  $p = 0.061$ ). T-tests yielded a significantly lower amount of ACTH in the treatment group compared to the control group of aged rats ( $t(27) = 4.290$ ,  $p < 0.001$ ), but no difference between the adult groups ( $t(21) = 0.621$ ,  $p = 0.541$ ). Repeated-measures ANOVA over the four time points did not show a significant change over time ( $p > 0.05$ ; see Fig.3C and 3D), but an interaction of time with the baseline amount of ACTH ( $F(3,99) = 3.777$ ,  $p = 0.013$ ). Also, main effects of the baseline levels ( $F(1,332) = 4.838$ ,  $p = 0.035$ ) and age ( $F(1,33) = 9.960$ ,  $p = 0.003$ ) were detected, but no main effect of the treatment on ACTH ( $p > 0.05$ ). Aged rats showed higher levels of ACTH than adult rats at t60, t120 and t180 ( $p < 0.05$  for all). Group comparisons via t-tests revealed that aged rats treated with CORT tended to have a lower plasma concentration of ACTH than the aged control group only ten minutes after restraining ( $t(22) = 1.986$ ,  $p = 0.06$ ; see Fig.3C), whereas in the adult group, the amounts did not differ between the groups at this point of time. Here, adult rats treated with CORT only tended to show lower amounts 120

( $t(20) = 1.820$ ,  $p = 0.084$ ) and 180 minutes after restraining ( $t(19) = 2.060$ ,  $p = 0.053$ ; see Fig. D).

#### **4. Discussion**

In summary, the main results presented here show, in accordance with our hypothesis, that chronic treatment with CORT 1) increased the distance to the former source of reward during early extinction trials and increased avoidance of goal tracking especially in aged rats, indicative of a depression-like phenotype, 2) did not impair the performance and extinction of an acquired operant behavior in aged and adult rats and 3) diminished baseline plasma levels of CORT and ACTH in aged rats as well as the hormonal response after restraint stress. Additionally, 4) there were age differences in goal- and sign tracking, rearing and HPA-axis function. An overview of the direction of effects is shown in table 1.

##### **4.1 Performance parameters**

The performance of the operant task was not significantly impaired by the chronic treatment with CORT. Neither the number of beam breaks nor the latency between the cue-light signal and consummation of the food-reward differed between the treatment groups prior to extinction. Other studies show that reward-related learning is impaired after a chronic CORT treatment (Olausson et al., 2013). Therefore, such results could have relevance to the lack of reward-related learning seen in patients suffering from major depression (Kumar et al., 2008; Gotlib & Jormann, 2010). Gourley et al. (2008a; 2008b) also showed that CORT-treatment reduced the performance on a progressive-ratio schedule, which can be interpreted as indicative of a decreased resistance to extinction.

At the end of acquisition, the adult rats exhibited more beam breaks than the aged rats, whereas the latency did not differ. An increased response rate of adult rats in operant tasks is documented in some investigations (Solyom & Miller, 1965), whereas others report no differences (Campbell & Haroutunian, 1981; Port, Murphy & Magee, 1996). Our results may merely reflect differences in locomotor activity between aged and adult rats (Gage, Dunnett & Björklund, 1984; Jucker, Oettinger & Bättig, 1988) than differences in learning ability per se, since the latencies did not differ prior to extinction. Although there is evidence for a different ability to acquire and perform instrumental tasks between aged and adult rats, this is merely with respect to the number of training sessions it takes to the criterion (Gallagher & Burwell, 1989; Port et al., 1996). We found an effect of age on the locomotor activity, which may account for the differences in the number of beam breaks. During extinction, aged rats had increased latencies compared to adults. This finding reflects the decreased number of beam breaks in aged rats: If an animal did not enter the food cup at all after a stimulus

presentation, this increased the mean latency. Apart from that, the mean latency was higher in aged rats for the trials where they did enter the food cup to look for reward. The result suggests a lower resistance to extinction in aged rats compared to adults that we also found in previous investigations on extinction of negative reinforcement in the water maze (Schulz et al., 2004). CORT did not influence the latency or number of beam breaks during extinction and, therefore, the subjects were not impaired in the learning of changes in contingency of cue signal and reward-delivery in extinction. It should be noted that the application of CORT via drinking water might be prone to variations in the daily uptake of CORT. Since animals were not housed alone during the treatment period but in cages of 2-4 rats, the exact individual uptake of water and CORT could not be quantified. However, the method is non-invasive and therefore does not subject the animals to further stress. Additionally, single housing is a form of social isolation that might alter the animals' behavior to an unknown extent.

#### 4.2 Effects on EID

In accordance with our main hypothesis, CORT treatment enhanced avoidance of goal tracking and the distance to the former site of reward-delivery during extinction. The increases in the markers of EID indicate that CORT exacerbated the depression-like behavior. The mean distance to the food cup and the time spent in the withdrawal compartment increased significantly over the extinction trials in all groups. A depression-like phenotype appeared in adult as well as aged rats in this model. The distance gradient increased irrespective of age in common with the time spent in the withdrawal compartment. The chronic treatment with CORT influenced both, the aged and adults rats. An additive effect on the exacerbation of the distance gradient was, like in our previous investigation (Komorowski et al., 2012), detected on the second day of extinction and in aged rats by tendency also on the fourth day. Both treatment groups maintained a greater distance from the former site of reward compared to their controls and avoided the food tray. In the last extinction trial, the adult rats treated with CORT stayed closer to the food cup than the control group. Here, it is important to consider that CORT might have adverse effects on long-term extinction, which has not been investigated so far. The frequency of entries into the withdrawal compartment did not change significantly during extinction, but was higher in adult than in aged rats on all days. This is likely due to the greater locomotor activity seen in the adult rats. Additionally, the subjects treated with CORT entered the withdrawal compartment less frequently than control subjects, but spent the same amount of time in this compartment. Though it seems that the CORT treatment influenced the activity with respect to this parameter, such effects were not detected in the horizontal and vertical activity measures.



Like in one of our previous studies (Komorowski et al., 2012), goal tracking was the most sensitive marker of EID. The duration and frequency progressively decreased in all groups. This is indicative of depression-like behavior, since it reflects avoidance of the place that was formerly rewarding. Additionally, we found effects of age and the treatment: The adult rats contacted the food cup more often than the aged rats during extinction. CORT tended to decrease the frequency of contacts compared to the control condition in both cohorts. Effects were relevant especially on the second day of extinction, but also on the fifth day. The time spent in goal tracking was higher in adult than in aged rats as well. CORT additionally reduced the time in both cohorts, but only by tendency. Particularly the CORT-treated aged rats showed a lower duration of goal tracking by tendency continuously from the second to the last day of extinction compared to vehicle. Since this effect was steady, we assume that a larger group size would result in significant results here. It is known that there is a great variability in aged rats with respect to behavior and neurochemical variables, that makes it necessary to employ large group sizes. In adult rats, a U-shaped change was detected, with treated rats showing less goal tracking on day two, but more on day five.

#### 4.3 Effects on locomotor function and attention

Locomotor behavior differed, as expected, as a function of age. Adult rats traveled a larger distance and reared more often than aged rats (Stanford, Currier & Gerhardt, 2002). The distance moved was not affected by the CORT treatment and neither was the frequency or duration of rearing. These findings are supportive of other reports that do not show an effect of chronic CORT treatment on horizontal and vertical activity, even in old rats (Brotto, Gorzalka & Barr, 2001). For the horizontal activity, we found an interaction between the time and age: the total duration of rearing increased from the first to the second day of extinction. After the second day, it decreased in aged rats only, but not in adults. The initial increase in rearing activity might be an indicator of extinction-induced arousal (Papini & Dudley, 1997; Papini, 2003). The mean duration of a single rearing unit increased over the extinction trials. The duration of a unit was higher in aged than in adult rats. CORT tended to decrease the duration of a single rear. The duration and frequency of rearing are also considered to be markers of non-selective attention (NSA), especially when directed towards environmental stimuli (Aspide et al., 1998; 2000). Therefore, a reduction in the duration of single rearing units by the CORT treatment might indicate a shift in NSA. Interestingly, aged rats reared for longer periods than adults on every day of extinction.

Sign tracking, focusing on the cues that predict reinforcement (e.g. cue lights; Berridge & Robinson, 2003), might also serve as a marker of attention, since it is directed towards an environmental stimulus. We found that sign tracking appeared more often and longer in adults compared to aged rats. CORT tended to decrease the frequency of sign tracking

during extinction in both cohorts compared to the control groups. Both, the decrease in sign tracking and the shorter duration of a single rear by the CORT treatment would support the decrease of NSA. However, both measures are not independent from each other, since rearing towards the cue light includes both, sign tracking and regular rearing. Reduced sign tracking and attention in aged rats has also been reported in numerous other publications (McEwen, 1999a; 1999b; Malberg et al, 2000; Gold et al., 2002; Meneses, 2003; Holmes & Wellmann, 2009).

#### 4.4 HPA-axis function

Restraint is commonly used to assess the effects of acute stress on HPA-axis function (Sterner & Kalynchuk, 2010). Here, after seven weeks of continuous treatment, animals were restrained for ten minutes and CORT and ACTH were measured in plasma samples over a period of three hours. The hormone status differed between the groups in the baseline samples prior to restraining: the aged rats treated with CORT had lower basal levels of CORT and ACTH compared to the control group. The application of exogenous CORT promotes the negative feedback inhibition of the HPA-axis and hence decreases the levels of endogenous CORT/ACTH (Sapolsky et al., 1986b for review, Johnson et al., 2006). With the dose used here, we found effects only on aged rats, whereas the adults remained unaffected. Gourley et al. (2008a) did not report effects on baseline CORT after chronic treatment with CORT for 14 days in adult mice as well. Unlike other reports showing an elevated baseline HPA-axis activity in aged rats (Tang & Phillips, 1978; Sapolsky et al., 1986a), we did not find such an age difference.

After restraint, all groups exhibited a significant increase in CORT. In the aged rats, the levels of the treatment group remained significantly lower compared to the control group at all points of time over three hours. In adult rats, the levels of the treatment group were only lower by tendency. The treatment with CORT presumably inhibited the HPA-axis and suppressed the release of endogenous CORT with a blunted response to restraining (Young, Kwak & Kottak, 1995; Johnson et al., 2006). The plasma levels of CORT did not differ with respect to age after restraining. Although this is not a frequent observation, some groups also report of no age-related differences in the amount of CORT or ACTH after acute stress (Tang & Phillips, 1978; Keck et al., 2000). The studies reporting lower stress-hormones in aged rats employed older rats than the ones used here, so it is possible that age-related differences yet emerge reliably at an age of 18-20 months (Sapolsky et al., 1983; 1986a; 1986b; Keck et al., 2000). However, it seems that adult rats can cope better with effects of chronic stress than aged, since the treatment effects on plasma CORT were stronger in the aged group.

ACTH did not change significantly after restraint and was not influenced by the CORT treatment. This finding contrasts reports of increases in ACTH after acute stress (Sterner &

Kalynchuk, 2010). The temporal pattern of ACTH secretion after acute stress precedes the rise in CORT, so it is possible that the peak in ACTH was missed during the first ten minutes. A main effect of age was evident after restraint, with aged rats secreting higher amounts of ACTH than adults. This is in line with other reports and hints to a decline in the sensitivity of feedback inhibition with age (e.g. Riegler, 1973; Sapolsky et al., 1983). To our knowledge, there are yet no comparable studies that deal with the effects of chronic CORT administration on HPA-axis function after a treatment period of seven weeks, thus comparisons to other studies can only be made with reservations. In summary, our results point to a decreased variability of the HPA-axis and impaired inhibition after chronic administration of CORT, especially in aged rats.

#### 4.5 Conclusion

Overall, the findings described here lend further support to the validity of the extinction-induced depression model. Goal tracking and withdrawal behavior changed during extinction in adult and aged rats, indicative of a depression-like phenotype. The chronic treatment with CORT, a method used to induce depression-like behavior, **additively** exacerbated EID (Gregus et al., 2005; Johnson, Fournier & Kalynchuk, 2006; Sterner & Kalynchuk, 2010). Earlier, we reported that extinction of negatively (removal of the platform in a water-maze) and positively reinforced behaviors led to despair-like behavior in rats (Huston et al., 2009; 2013). Extinction of negative reinforcement increased immobility in the water-maze (Schulz et al., 2004; Schulz, Buddenberg, & Huston, 2007a; Schulz et al., 2007b). Omission of food-reward during extinction of positive reinforcement increased the distance to the food cup, decreased goal tracking and led to increases in the time spent in a distant withdrawal area. Treatment with desipramine, citalopram and clomipramine significantly reduced EID in adult and aged rats in the water maze and in an operant chamber (Huston et al., 2012; Komorowski et al., 2012; Huston et al., 2009; 2013). As there is also evidence that antidepressants reverse depression-like behavior after treatment with CORT (Gourley et al., 2008a; Gourley & Taylor, 2009; Sterner & Kalynchuk, 2010), it would be of interest to assess the effects of antidepressants on EID after CORT treatment.

With respect to differences in age, the resistance to extinction was lower in the aged than adult rats. They exhibited a steeper increase in the latencies and less goal tracking during extinction. Treatment with CORT increased despair-like behaviors, such as avoidance, in both, the aged and adult rats, but more so in the aged. The CORT treatment also apparently impaired the HPA-axis function with altered plasma levels of ACTH and CORT. Age-related differences in resistance to extinction, the functioning of the HPA-axis and an organism's

ability to cope with stress are known to correlate with depression-like behaviors (Blazer, 2003; Mroczek & Almeida, 2004; Schulz et al., 2004; Miller & O'Callaghan, 2005; Topic et al., 2008a; 2008b).

The presented results demonstrate that aged rats exhibit stronger EID than adults and are more sensitive to the effects of treatment with CORT. Thus, this animal model of EID may be particularly useful as a model for geriatric depression, since it reflects etiological factors that especially concern the aged population.

## 5. Acknowledgements

Supported by the German National Science Foundation Grant Hu 306/27-2 and the Research Training Group GRK 1033-2. We thank U. Lehnert for the analysis of the hormone-assays.

## 6. Literature

Aspide R, Fresiello A, de Filippis G, Gironi Carnevale UA, Sadile AG (1998) Non-selective attention and nitric oxide in putative animal models of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Behavioral Brain Research*, 95, 123-133.

Aspide R, Fresiello A, de Filippis G, Gironi Carnevale UA, Sadile AG (2000) Non-selective attention in a rat model of hyperactivity and attention deficit: subchronic methylphenydate and nitric oxide synthesis inhibitor treatment. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24(1), 59-71.

Berridge KC, Robinson TE (2003) Parsing reward. *Trends in Neurosciences*, 26, 507-513.

Bhagwagar Z, Cowen PJ (2008) 'It's not over when it's over': Persistent neurobiological abnormalities in recovered depressed patients. *Psychological Medicine*, 38, 307-313.

Blazer DG (2003) Depression in late life: Review and commentary. *Journal of Gerontology*, 58, M249-M265.

Boakes RA (1977) Performance on learning to associate a stimulus with positive reinforcement. In: H. Davis, H.M.B. Hurwitz (Eds.), *Operant-pavlovian interactions*, Erlbaum, Hillsdale, NJ (1977), 67-101.

Bogdan R, Pizzagalli DA (2006) Acute stress reduces reward responsiveness: Implications for depression. *Biological Psychiatry*, 10, 1147-1154.

Bonner D (1995) Treatment resistant depression in the elderly. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 10, 259-264.

Brotto LA, Gorzalka BB, Barr AM (2001) Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *European Journal of Pharmacology*, 424, 203-209.

Brown GW, Harris TO, Hepworth C (1994) Life events and endogenous depression. A puzzle reexamined. *Archives of General Psychiatry*, 51(7), 525-534.

- Bruce ML (2002) Psychosocial risk factors for depressive disorders in late life. *Biological Psychiatry*, 52, 175-184.
- Campbell BA, Haroutunian V (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *Journal of Gerontology*, 36, 338-341.
- Coe LC, Stanton ME, Levine S (1983) Adrenal responses to reinforcement and extinction: Role of expectancy versus instrumental responding. *Behavioral Neuroscience*, 97(4), 654-657.
- Coover GD, Goldman L, Levine S. (1971) Plasma corticosterone increases produced by extinction of operant behavior in rats. *Physiology and Behavior*, 6, 261-263
- Cowen PJ (2010) Not fade away: The HPA axis and depression. *Psychological Medicine*, 40, 1-4.
- Davidson RJ, Pizzagalli D, Nitschke JB, Putnam K (2002) Depression: Perspectives from affective neuroscience. *Annual Review of Psychology*, 53, 545-574.
- Dranovsky A, Hen R (2006) Hippocampal neurogenesis: Regulation by stress and antidepressants. *Biological Psychiatry*, 59, 1136-1143.
- Ferster CB (1973) A functional analysis of depression. *American Psychologist*, 28(10), 857-870.
- Flutterm M, Dalm S, Oitzl, MS (2000) A refined method for sequential blood sampling by tail incision in rats. *Laboratory Animals*, 34, 372-378.
- Gage FH, Dunnett SB, Björklund A (1984) Spatial learning and motor deficits in aged rats. *Neurobiology of Aging*, 5, 43-48.
- Gallagher M, Burwell RD (1989) Relationship of age-related decline across several behavioral domains. *Neurobiology of Aging*, 10, 691-708.
- Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE (2005) Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behavioral Brain Research*, 156, 105-114.
- Gold PW, Drevets WC, Charney DS (2002) New insights into the role of cortisol and the glucocorticoid receptor in severe depression. *Biological psychiatry*, 52, 381-385.
- Gotlib IH, Joormann J (2010) Cognition and depression: Current status and future directions. *Annual Reviews in Clinical Psychology*, 6, 285-312.
- Gourley SL, Kiraly DD, Howell JL, Olausson P, Taylor JR (2008a) Acute hippocampal brain-derived neurotrophic factor restores motivational and forced swim performance after corticosterone. *Biological Psychiatry*, 64, 884-890.
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (2008b) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biological Psychiatry*, 63, 353-359.
- Gourley SL, Taylor JR (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodent. *Current Protocols in Neuroscience*, chapter 9, unit-9.32.

Hammen C (2005) Stress and depression. *Annual Review of Clinical Psychology*, 1, 293-319.

Hinkelmann K, Moritz S, Botzenhardt J, Muhtz C, Wiedemann K, Kellner M, Otte C (2012) Changes in cortisol secretion during antidepressive treatment and cognitive improvement in patients with major depression: A longitudinal study. *Psychoneuroendocrinology*, 37, 685-692.

Holmes A, Wellmann CL (2009) Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33, 773-783.

Huston JP, Schulz D, Topic B (2009) Toward an animal model of extinction-induced despair: Focus on aging and physiological indices. *Journal of Neural Transmission*, 116, 1029-1036.

Huston JP, van den Brink J, Komorowski M, Huq Y, Topic B (2012) Antidepressants reduce extinction-induced withdrawal and biting behaviors: A model for depressive-like behavior. *Neuroscience*, 210, 249-257.

Huston JP, de Souza Silva MA, Komorowski M, Schulz D, Topic B (2013) Animal models of extinction-induced depression: Loss of reward and its consequences. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.016>.

Ising M, Horstmann S, Kloiber S, Lucae S, Binder EB, Kern N, Künzel HE, Pfennig A, Uhr M, Holsboer F (2007) Combined dexamethasone/corticotrophin releasing hormone test predicts treatment response in major depression—a potential biomarker? *Biological Psychiatry*, 62, 47-54.

Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE (2006) Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behavioral Brain Research*, 168, 280-288.

Jucker M, Oettinger R, Bättig K (1988) Age-related changes in working and reference memory performance and locomotor activity in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, 50, 24-36.

Kawasaki K, Iwasaki T (1997) Corticosterone levels during extinction of runway response in rats. *Life Sciences*, 61(17), 1721-1728.

Keck ME, Hatzinger M, Wotjak CT, Landgraf R, Holsboer F, Neumann ID (2000) Ageing alters intrahypothalamic release patterns of vasopressin and oxytocin in rats. *European Journal of Neuroscience*, 12, 1487-1494.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA (1999) Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 156, 837-841.

Kling A, Mjörndal T, Rantapää-Dahlqvist S (2013) Glucocorticoid treatment increases density of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors in humans. *Psychoneuroendocrinology*, 38, 1014-1020.

Koike H, Iijima M, Chaki S (2013) Effects of ketamine and LY341495 on the depressive-like behavior of repeated corticosterone-injected rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 107, 20-23.

Komorowski M, Huston JP, Klinghegel I, Paulat J, Sackers J & Topic B. (2012) Distance from source of reward as a marker for extinction-induced "despair": Modulation by the antidepressants clomipramine and citalopram. *Neuroscience*, 223, 152-162.

- Kumar P, Waiter G, Ahearn T, Milders M, Reid I, Steele JD (2008) Abnormal temporal difference reward-learning signals in major depression. *Brain*, 131, 2084-2093.
- Kraaij V, Arensman E, Spinhoven P (2002) Negative life events and depression in elderly persons: a meta-analysis. *Journal of Gerontology: Psychosocial Sciences*, 57(B), 87-94.
- Lewinsohn PM (1974) A behavioral approach to depression. In R.J. Friedman, & M.M. Katz (Eds.), *The Psychology of Depression: Contemporary Theory and Research* (pp. 157–85). New York: Wiley.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20, 9104-9110.
- Mazure CM (1998) Life stressors as risk factors in depression. *Clinical Psychology: Science and Practice*, 5(3), 291-313.
- McEwen BS (1999a) Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20, 49-70.
- McEwen BS (1999b) Stress and hippocampal plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, 22, 105-122.
- Meneses A (2003) A pharmacological analysis of an associative learning task: 5-HT<sub>1</sub> to 5-HT<sub>7</sub> receptor subtypes function on a Pavlovian/instrumental autoshaped memory. *Learning & Memory*, 10, 363-372.
- Miller DB, O'Callaghan JP (2005) Aging, stress and the hippocampus. *Stress, Neuropeptides and Age-Related Diseases*, 4, 123-140.
- Mizoguchi K, Ishige M, Aburada M, Tabira T (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: Involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119, 887-897.
- Mroczek DK, Almeida DM (2004) The effect of daily stress, personality, and age on daily negative affect. *Journal of Personality*, 72, 355-378.
- Olausson P, Kiraly DD, Gourley SL, Taylor JP (2013) Persistent effects of chronic exposure to corticosterone on reward related learning and motivation in rodents. *Psychopharmacology*, 225(3), 569-577.
- Ottenbreit ND, Dobsen KS (2004) Avoidance and depression: The construction of the Cognitive Behavioral Avoidance Scale. *Behavior Research and Therapy*, 42, 293-313.
- Papini MR, Dudley RT (1997) Consequences of surprising reward omission. *Reviews of General Psychology*, 1, 175-197.
- Papini MR (2003) Comparative psychology of surprising nonreward. *Brain, Behavior and Evolution*, 62, 83-95.
- Pariante CM, Lightman SL (2008) The HPA-axis in major depression: Classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31, 464-468.
- Port RL, Murphy HA, Magee RA (1996) Age-related impairment in instrumental conditioning is restricted to initial acquisition. *Experimental Aging Research*, 22, 73-81.
- Riegle GS (1973) Chronic stress effects on adrenocortical responsiveness in young and aged rats. *Neuroendocrinology*, 11, 1-10.

Samuels BA, Leonardo ED, Gadiant R, Williams A, Zhou J, David DJ, Gardier AM, Wong EHF, Hen R (2011) Modeling treatment-resistant depression. *Neuropharmacology*, 61, 408-413.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1983) The adrenocortical stress-response in the aged male rat: Impairment of recovery from stress. *Experimental Gerontology*, 18, 55-64.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986a) The adrenocortical axis in the aged rat: Impaired sensitivity to both fast and delayed feedback inhibition. *Neurobiology of Aging*, 7, 331-335.

Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS (1986b) The neuroendocrinology of stress and aging: The glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocrine Reviews*, 7, 287-301.

Schulz D, Topic B, de Souza Silva MA, Huston JP (2004) Extinction-induced immobility in the water maze and its Neurochemical concomitants in aged and adult rats: A possible model for depression? *Neurobiology of Learning and Memory*, 82, 128-141.

Schulz D, Buddenberg TE, Huston JP (2007a) Extinction-induced "despair" in the water maze, exploratory behavior and fear: Effects of chronic antidepressant treatment *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 624-634.

Schulz D, Huston JP, Buddenberg TE, Topic B (2007b) "Despair" induced by extinction trials in the water maze: Relationship with measures of anxiety in aged and adult rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 309-323.

Solyom L, Miller S (1965) The effect of age differences on the acquisition of operant and classical conditioned responses in rats. *Journal of Gerontology*, 20, 311-314.

Stanford JA, Currier TD, Gerhardt GA (2002) Acute locomotor effects of fluoxetine, sertraline, and nomifensine in young versus aged Fischer 344 rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71, 325-332.

Sterner EY, Kalynchuk LE (2010) Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 34, 777-790.

Stokes PE (1995) The potential role of excessive cortisol induced by HPA hyperfunction in the pathogenesis of depression. *European Neuropsychopharmacology Supplement*, 77-82.

Tang F, Phillips JG (1978) Some age-related changes in pituitary-adrenal function in the male laboratory rat. *Journal of Gerontology*, 33, 377-382.

Thomson F, Craighead M (2008) Innovative approaches for the treatment of depression: Targeting the HPA-axis. *Neurochemical Research*, 33, 691-707.

Topic B, Huston JP, Nametskova K, Zhu SW, Mohammed AH, Schulz D (2008a) Extinction-induced "despair" in aged and adult rats: Links to neurotrophins in frontal cortex and hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 519-526.

Topic B, Oitzl MS, Meijer OC, Huston JP, de Souza Silva MA (2008b) Differential susceptibility to extinction-induced despair and age-dependent alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and neurochemical parameters. *Neuropsychobiology*, 58, 138-153.



Topic B, Kröger I, Vildirasova PG, Huston JP (2012) Indices of extinction-induced “depression” after operant learning using a runway vs. a cued free-reward delivery schedule. *Neurobiology of Learning and Memory*, 98, 329-340.

Walker AJ, Burnett SA, Hasebe K, McGillivray JA, Gray LJ, McGee SL, Walder K, Berk M, Tye SJ (2013) Chronic adrenocorticotrophic hormone treatment alters tricyclic antidepressant efficacy and prefrontal monoamine tissue levels. *Behavioral Brain Research*, 242, 76-83.

Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen H-C (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *European Neuropsychopharmacology*, 21(9), 655-679.

Young EA, Kwak SP, Kottak J (1995) Negative feedback regulation following administration of chronic exogenous corticosterone. *Journal of Neuroendocrinology*, 7, 37-45.

Zhao Y, Ma R, Shen J, Su H, Xing D, Du L (2008) A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. *European Journal of Pharmacology*, 1-2, 113-120.

Zobel AW, Nickel T, Sonntag A, Uhr M, Holsboer F, Ising M (2001) Cortisol response in the combined dexamethasone/CRH test as predictor of relapse in patients with remitted depression: A prospective study. *Journal of Psychiatric Research*, 35, 83-94.

## 7. Figure legend

**Table 1.** Overview of the effects of age, treatment and interactions during the reacquisition and extinction periods in the operant chamber. 0 = no effect, + = increases by age/treatment, - = decreases by age/treatment.

**Fig 1.** The mean distance from the food cup (A), duration (B) and the frequency of goal tracking (C) during extinction. +  $p \leq .05$  for a main effect of age in repeated-measures ANOVA. \$  $p \leq .05$ , #  $p \leq .1$  for a main effect of treatment in repeated-measures ANOVA. \*  $p \leq .05$ , §  $p \leq .1$  compared by t-test.

**Fig 2.** Mean duration of a single rear (A) and frequency of sign tracking (B) during extinction (+SEM). +  $p \leq .05$  for a main effect of age, #  $p \leq .1$  for a main effect of the treatment in repeated-measures ANOVA. \*  $p \leq .05$  and §  $p \leq .1$  compared to control group in t-test.

**Fig 3.** Mean plasma levels of CORT (A,B) and ACTH (C,D; +SEM) in aged (A,C) and adult (B,D) rats. Samples were taken before and 10, 60, 120 and 180 minutes after restraining. \*  $p \leq .05$  §  $p \leq .1$  compared to control group in t-test. \$  $p \leq .05$  for a main effect of treatment in repeated-measures ANOVA.

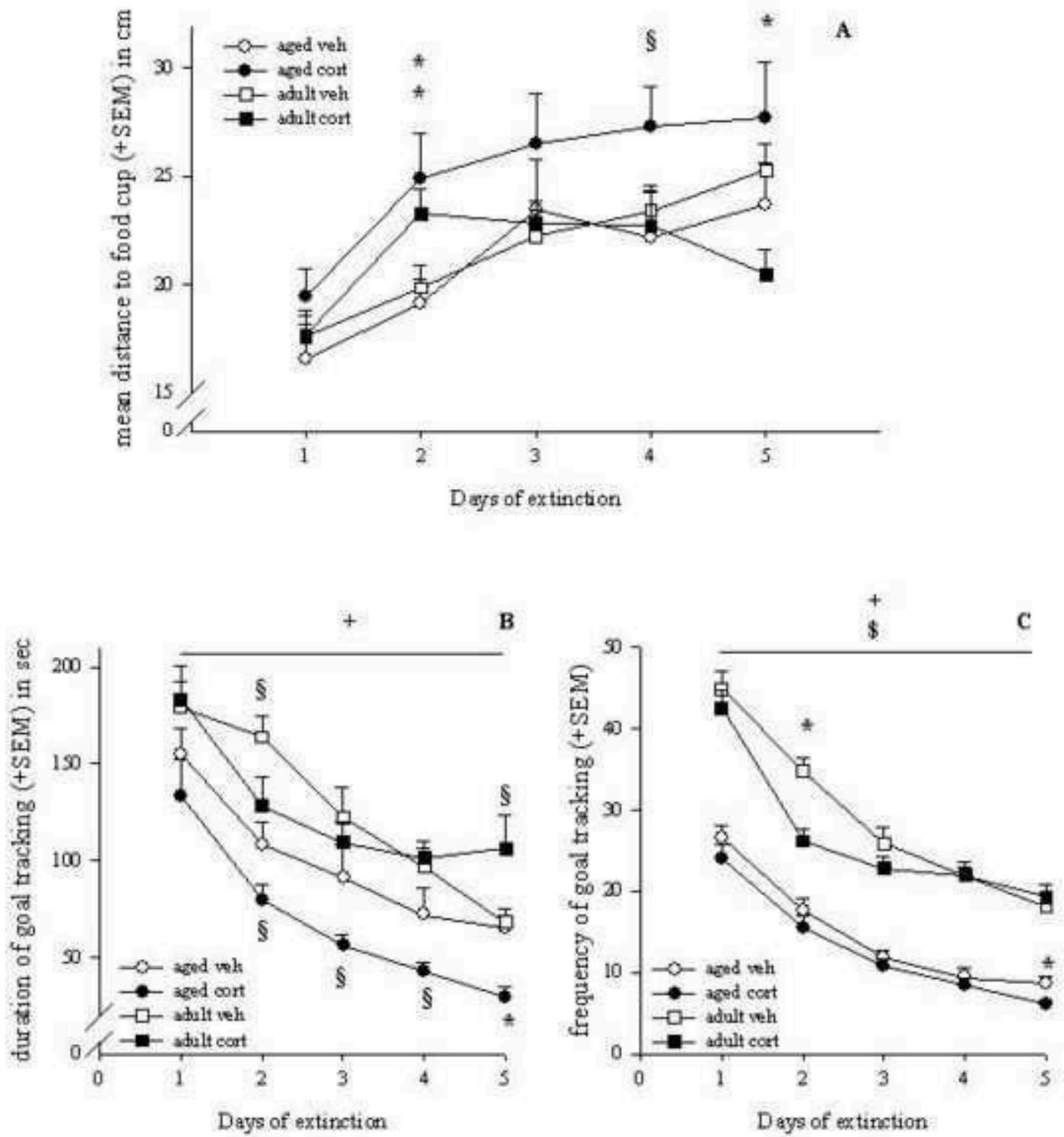


figure 1

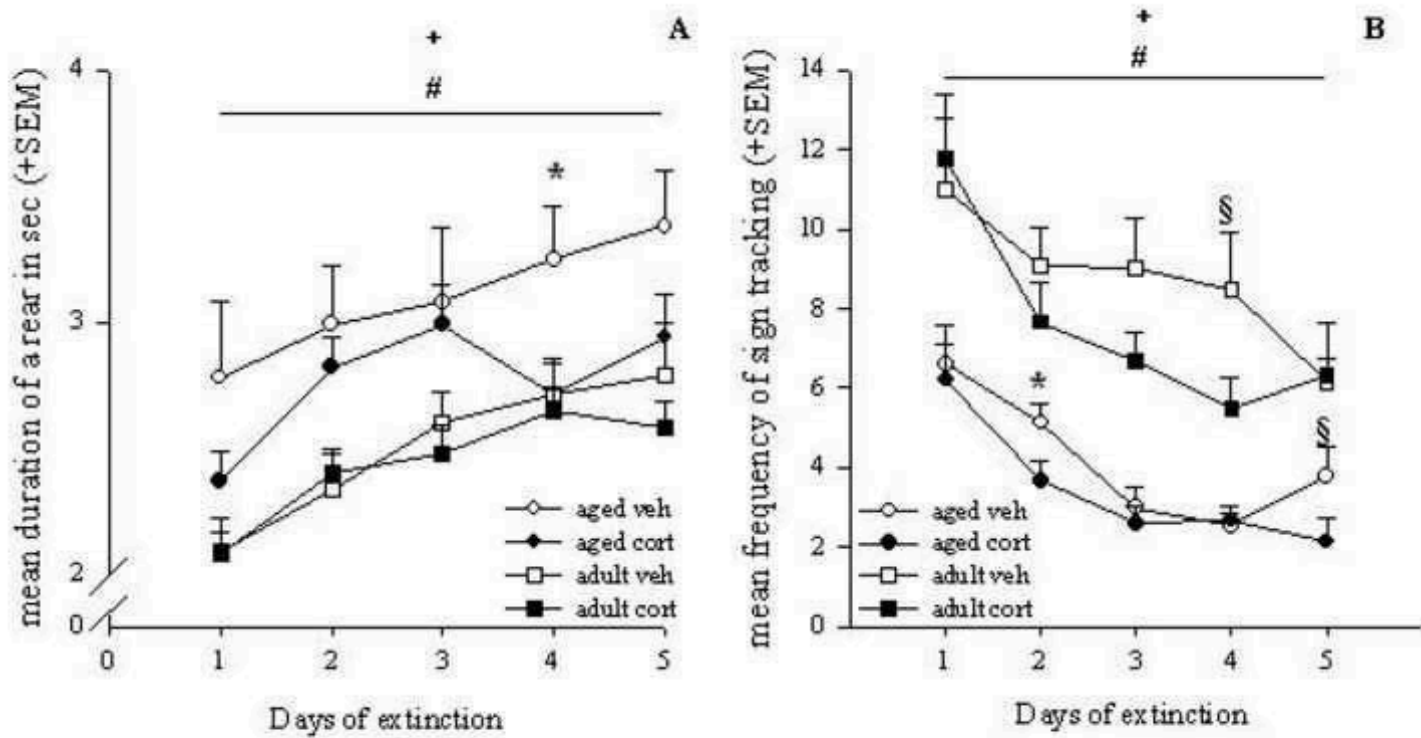


figure 2

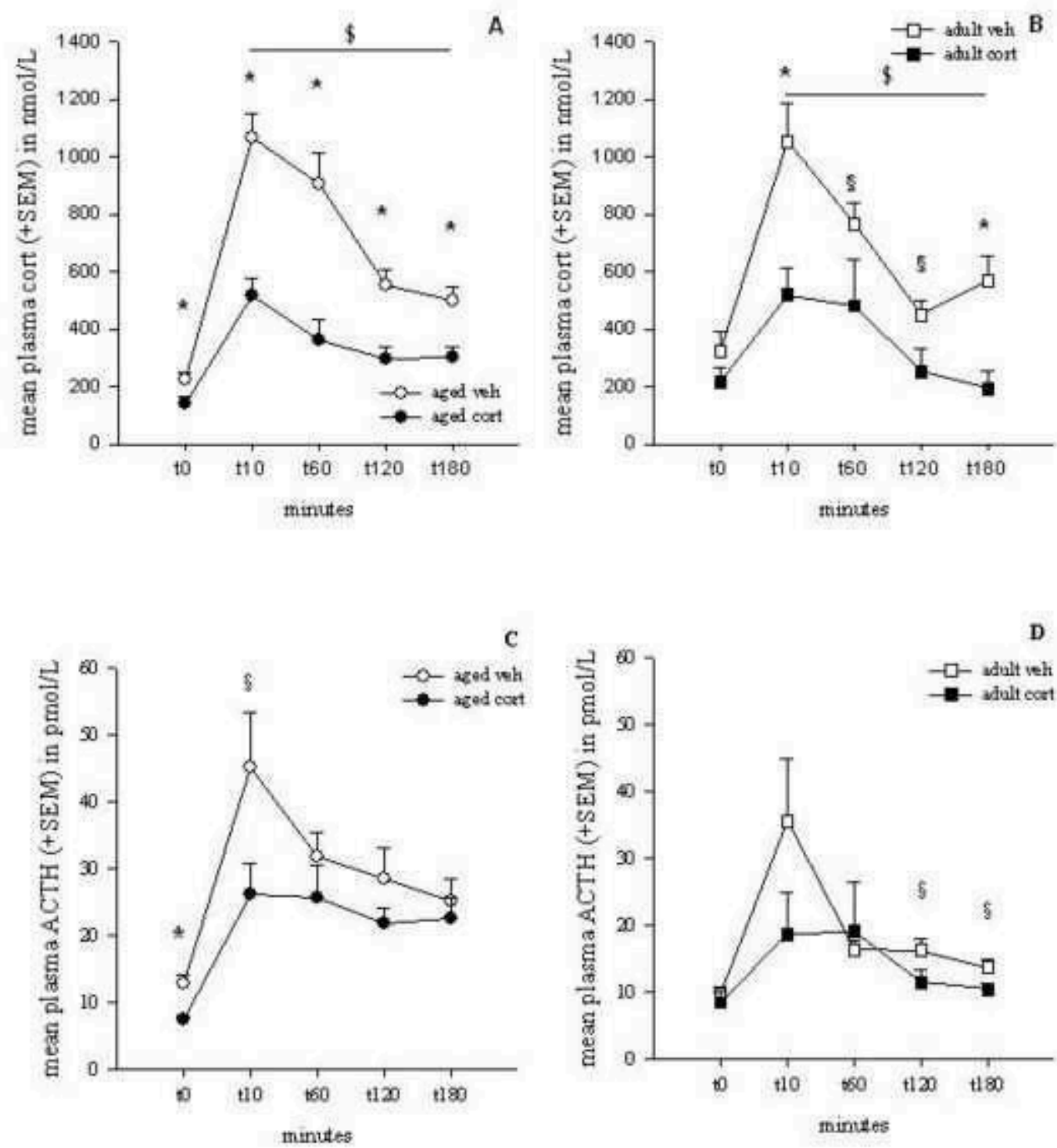


figure 3

	Acquisition			Extinction		
	Age	Cort	Interaction	Age	Cort	Interaction
<b>Beam breaks</b>	-	0	0	-	0	0
<b>Latency</b>	0	0	0	+	0	0
<b>Distance moved</b>	-	0	0	-	0	0
<b>Rearing</b>						
<i>frequency</i>	-	0	0	-	0	0
<i>duration</i>	-	0	0	-	0	0
<i>mean duration</i>				+	-	0
<b>Sign tracking</b>						
<i>frequency</i>	-	0	0	-	-	0
<i>duration</i>	-	0	0	-	0	0
<b>Goal tracking</b>						
<i>frequency</i>	-	0	0	-	-	time*cort, time*age
<i>duration</i>	-	0	0	-	-	time*cort*age
<b>Withdrawal</b>						
<i>frequency</i>	-	0	0	-	0	time*cort
<i>duration</i>	0	0	0	0	0	0
<b>Distance to FC</b>	-	0	0	0	-	0
<hr/>						
<b>CORT</b>						
<i>baseline</i>	+/0	-	0			
<i>post-stress</i>	0	-	time*cort			
<b>ACTH</b>						
<i>baseline</i>	0	-	age*cort			
<i>post-stress</i>	+	0	0			

table 1

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter der Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" verfasst zu haben.

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

**Düsseldorf, den 17.12.2013**

**Dipl. Psych. Mara Komorowski**