

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Sexualforschung, Sexualmedizin und forensische Psychiatrie

Prof. Dr. med. Peer Briken

## **Effekte von Östradiol auf physiologische, behaviourale und subjektive Angstsymptome in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten und randomisierten Verhaltensstudie.**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg.

Vorgelegt von:

Sawis Nouri  
aus Heidelberg

Hamburg 2022

**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:  
11.01.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:  
Prof. Dr. Volker Harth**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:  
Prof. Dr. Johannes Fuss**

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Artikel in gedruckter Originalversion: *“Effects of circulating estradiol on physiological, behavioural, and subjective correlates of anxiety: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial”*, Seite 4
2. Zusammenfassende Darstellung der Publikation mit Literaturverzeichnis, Seite 12
3. Kurzfassung, Seite 28
4. Erklärung des Eigenanteils, Seite 29
5. Danksagung, Seite 30
6. Lebenslauf, Seite 31
7. Eidesstattliche Erklärung, Seite 32



## Effects of circulating estradiol on physiological, behavioural, and subjective correlates of anxiety: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial

Sawis Nouri<sup>a,b,1</sup>, Sarah V. Biedermann<sup>c,1</sup>, Gina Joue<sup>d</sup>, Matthias K. Auer<sup>e</sup>, Tobias Sommer<sup>d,1</sup>, Johannes Fuss<sup>a,b,\*,1</sup>

<sup>a</sup> Institute of Forensic Psychiatry and Sex Research, University of Duisburg-Essen, Virchowstraße 174, 45147 Essen, Germany

<sup>b</sup> Human Behavior Laboratory, Institute for Sex Research, Sexual Medicine and Forensic Psychiatry, Center of Psychosocial Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>c</sup> Department of Psychiatry and Psychotherapy, Center of Psychosocial Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>d</sup> Institute of Systems Neuroscience, Center of Experimental Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistraße 52, 20246 Hamburg, Germany

<sup>e</sup> Medizinische Klinik and Poliklinik IV, Klinikum der Universität München, LMU München, 80539 Munich, Germany

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Sex hormones  
Estrogen  
Progesterone  
Testosterone  
Elevated plus maze

### ABSTRACT

Anxiety-related behaviours as well as the prevalence of anxiety disorders show a large sex difference in humans. Clinical studies in humans as well as behavioural studies in rodents suggest that estradiol may have anxiolytic properties. In line with this, anxiety symptoms fluctuate with estradiol levels along the menstrual cycle. However, the influence of estradiol on subjective, behavioural, as well as physiological correlates of anxiety has never been systematically addressed in humans.

We ran a double-blind, randomized, placebo-controlled study (N = 126) to investigate the effects of estradiol on anxiety in men and women. In healthy volunteers, circulating estradiol levels were elevated through estradiol administration over two consecutive days to simulate the rise in estradiol levels around ovulation. Subjective, behavioral, as well as, physiological correlates of anxiety were assessed using a virtual reality elevated plus-maze (EPM).

Estradiol treatment reduced the physiological stress response with blunted heart rate response and lower cortisol levels compared to placebo treatment in both sexes. In contrast, respiration frequency was only reduced in women after estradiol treatment. Behavioural measures of anxiety as well as subjective anxiety on the EPM were not affected by estradiol treatment. In general, women showed more avoidance and less approach behavior and reported higher subjective anxiety levels on the EPM than men.

These results highlight the limited anxiolytic properties of circulating levels of estradiol in humans, which influence physiological markers of anxiety but not approach and avoidance behaviour or subjective anxiety levels.

### 1. Introduction

Higher levels of anxiety and anxiety disorders in women and the fact that anxiety levels fluctuate during the menstrual cycle (Farage et al., 2008) suggest that female hormones, especially estradiol, are implicated in anxiety (Seeman, 1997). Indeed, studies in women have found increased symptoms of anxiety (e.g. irritability, sleeplessness, excessive worry) in periods when estradiol levels are expected to be low (e.g. premenstrual or postmenopausal) (Golub, 1976; Sahingoz et al., 2011).

Moreover, estradiol administration can reduce anxiety in some clinical populations (Ahokas et al., 2001; Gleason et al., 2015; Misra et al., 2013), even though this finding has not been consistently reported (Demetrio et al., 2011; Schmidt et al., 1998).

Some studies have also assessed the role of estradiol in anxiety and stress regulation on a physiological level. Here, results indicate that high estrogen levels might blunt both the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and the sympathoadrenal activity (SA) in women as well as in men (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a, 1995). However,

\* Corresponding author at: Institute of Forensic Psychiatry and Sex Research, University of Duisburg-Essen, Virchowstraße 174, 45147 Essen, Germany.  
E-mail address: [johannes.fuss@uni-due.de](mailto:johannes.fuss@uni-due.de) (J. Fuss).

<sup>1</sup> S.N. and S.V.B. share first authorship; T.S. and J.F. share last authorship

these studies do not agree on how estradiol affects anxiety regulation in men (Kirschbaum et al., 1996b).

Research on fear conditioning also suggests that estrogens play a role in sex-specific fear responses (Peyrot et al., 2020). It has been proposed that estrogen levels play an essential role in emotional learning processes in general, with high levels ultimately leading to unfavourable effects during fear acquisition (e.g., facilitating initial fear acquisition) but are beneficial during extinction processes (e.g., enhancing extinction and extinction memory recall) (Merz et al., 2018). For example, naturally and exogenously administered estradiol improved extinction memory and recall (Milad et al., 2009; Chang et al., 2009). Consistent with rodent studies indicating that gonadal hormones influence the consolidation of extinction memory, exogenous administration of estradiol to women has also been shown to increase the consolidation of extinction memory (Milad et al., 2010; Graham et al., 2013). Moreover, high estradiol levels in women are associated with higher activation of brain regions underlying fear learning and extinction during conditioning, extinction and recall (Hwang et al., 2015). This corroborates previous studies in ovariectomized mice that found that high doses of exogenous estradiol enhanced fear learning (Tomihara et al., 2009), regardless of treatment duration (acute or chronic) (Matsumoto et al., 2018).

Growing interest in the impact of sex hormones on anxiety has also led to studies investigating anxiety-related behavior in rodents. Rodents in the proestrous phase, when estrogen levels reach the peak in an estrous cycle, showed significantly reduced anxiety-like behaviour compared to rodents in other stages of the estrous cycle (Frye et al., 2000; Marcondes et al., 2001; Walf et al., 2009a). Moreover, administration of estrogen showed anxiolytic effects on rodent behaviour (Kastenberger et al., 2012; Walf et al., 2009b; Walf and Frye, 2005). Inconsistencies in results are mostly explained by variation in dosage, paradigm used, and species tested (Borrow and Handa, 2017; Donner and Lowry, 2013; Kastenberger et al., 2012; Mora et al., 1996; Walf and Frye, 2005), but overall, evidence from both animal and human studies suggests that estradiol might have anxiolytic properties. However, translational studies on the role of estradiol in anxiety have been limited in scope. Clinical studies have investigated the long-term effect of estradiol therapy only specifically in populations with estradiol deficiency (Đoković et al., 2015; Gleason et al., 2015; Misra et al., 2013). Preclinical studies have compared anxiety changes with different menstrual cycle phases as well as estradiol administration, but estradiol was only administered in low doses (Kirschbaum et al., 1996b; Moos et al., 1969; Silverman et al., 1974). A particular limitation that the current paper will address is that studies in human subjects have thus far only assessed anxiety using self-reports or physiological reactions to anxiogenic stimuli (Gleason et al., 2015; Kirschbaum et al., 1996b; Lahmeyer et al., 1982; Lindheim et al., 1992). This complicates comparisons with animal research where anxiety is mostly measured behaviourally using paradigms such as the Elevated Plus Maze (EPM) or the Dark-light Box and Open field test (Donner and Lowry, 2013). Such behavioural studies in rodents have repeatedly shown that estradiol can also affect anxiety-related behaviours (see above), an aspect which has not been shown in humans even though most anxiety disorders have a strong impact on actual behaviour (such as avoidance), which would suggest that behavioural outcomes are particularly important for research on the biomechanisms of anxiety (Donner and Lowry, 2013; Kastenberger et al., 2012; Walf et al., 2009b; Walf and Frye, 2005) and for affected patients. Thus, investigating changes in the behavioural, subjective, as well as physiological indicators of anxiety with circulating estradiol levels may help elucidate the impact of circulating estradiol levels on human anxiety.

Moreover, previous research was mostly performed only in women (Golub, 1976; Sahingoz et al., 2011; Gleason et al., 2015; Misra et al., 2013; Ahokas et al., 2001; Demetrio et al., 2011; Schmidt et al., 1998; Kirschbaum et al., 1996a, Đoković et al., 2015; Moos et al., 1969; Silverman et al., 1974; Lahmeyer et al., 1982; Lindheim et al., 1992), with

only a few studies performed in men (Del Rio 1994, Kirschbaum et al., 1996b) or both sexes (Kirschbaum et al., 1995). This is an important limitation in the generalisability of previous research as sex hormones affect men differently to women (Barker and Galea, 2009). Sex differences in the changes in anxiety responses with estrogen levels might be due to sex-specific estrogen receptor expression or signalling in brain regions involved in anxiety such as the hippocampus, the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis (Yokosuka et al., 1997; Zuloaga et al., 2014; Bender et al., 2017; Llorente et al., 2020). To test for sex-dependent effects on anxiety given similarly elevated E2 levels was one goal of the current study.

Therefore, we ran a double-blind, randomized, placebo-controlled study to investigate the effects of administering a high-dose of estradiol in men and women. In healthy volunteers, circulating estradiol levels were elevated through estradiol administration over two consecutive days to simulate the rise in estradiol levels around ovulation. Anxiety was assessed using the recently developed elevated plus maze (EPM) translated for humans, which is sensitive to anxiolytic as well as anxiogenic compounds (Biedermann et al., 2017). Based on previous animal and human research, we hypothesised that estradiol would reduce subjective anxiety as well as physiological responses in men and women as they performed the EPM. We additionally hypothesised that estradiol administration would increase approach and decrease avoidance behaviour. Since recent research also suggests a relation between anxiety and progesterone (Reynolds et al., 2018) as well as testosterone levels (Chen et al., 2021), we were also interested in correlations between hormone and anxiety levels.

## 2. Methods

### 2.1. Participants and procedures

Healthy, female and male volunteers (N = 137) were recruited through electronic and physical bulletin boards, mainly on the university campus but also in other public spaces. Female volunteers were naturally and regularly cycling, tested in their early follicular phase (i.e. within the first 7 days after onset of menstruation when their estradiol, progesterone and testosterone levels are supposed to be at the lowest and comparable to levels in men) and had not used any contraception or medication containing hormones within 3 months prior to their participation in the study. Menstrual cycle timing was determined by self-reports and forward counting, then verified by saliva hormone concentrations of estradiol and progesterone levels.

All subjects reported to be free of neurological or psychiatric disorders, were not regular users of recreational drugs or central nervous system medication, did not smoke more than two cigarettes per week, were not obese (BMI less than 30), and had no family history of coagulopathy. Three participants were excluded for not following task instructions, four participants were excluded for familiarity with the task, and another three participants were excluded due to technical problems. After hormone analysis, another female participant had to be excluded because her hormone levels indicated that she was not in her early follicular phase.

This resulted in 126 participants, 33 male volunteers receiving estradiol (M = 26.1 y, SE = 0.6 y, range = 19.8 – 33.7 y) and 31 male volunteers receiving placebo (M = 26.2 y, SE = 0.7 y, range = 19.3 – 35 y) as well as 29 female volunteers receiving estradiol (M = 26.2 y, SE = 0.8 y, range = 18.4 – 35.1 y), and 33 female volunteers receiving placebo (M = 26.5 y, SE = 0.7 y, range = 20.4 – 34.8 y). Volunteers were randomly assigned, double-blind, to estradiol or placebo groups. Volunteers gave written informed consent according to the Declaration of Helsinki and received financial compensation for their participation. Ethics approval was obtained from the Ethics Committee of the Medical Association of Hamburg.

Participants in the test group took estradiol orally on two consecutive days. The second dose was administered on the morning of day two, 10 h

before behavioural testing on the virtual-reality EPM. Male test participants received two doses of 6 mg estradiol. This dosage was chosen to bring their estradiol levels to a level comparable to within the highest natural physiological range in women. Female test participants received two doses of 4 mg, with the same administration schedule. All control volunteers received identical capsules containing placebo instead of estradiol on the same schedule.

Participants completed the following personality and anxiety questionnaires on day one before taking the first dose of estradiol: State-Trait Anxiety Inventory (STAI) (Skapinakis, 2014), Sensation Seeking Scale V (SSSV) (Zuckerman et al., 1978), and Acrophobia Questionnaire (AQ) (Cohen, 1977). State anxiety and side-effects of medication were also assessed 5 min before behavioural testing. Directly after behavioural testing on day two, participants completed a simulator sickness questionnaire (Kennedy et al., 1993) and the iGroup presence questionnaire (Schubert et al., 1999) to assess side effects and the subjective immersion experience of the virtual reality environment, respectively. Participants rated their anxiety level on the EPM on a scale from 0 (no anxiety) to 9 (very strong anxiety). In a partner study, approximately 90 min before behavioural testing on the EPM, participants took part in an fMRI and behavioural study assessing spatial perception and memory. These results will be reported elsewhere.

## 2.2. Human EPM

All subjects were tested on the human EPM between 3 and 8 pm (Biedermann et al., 2017), which consists of a physical life-sized wooden platform and its representation matched in position, distances, and material in a virtual environment. The EPM was a cross with arms of equal length (four arms with each arm of length 350 cm, width 30 cm, and elevated 20 cm from the floor) placed in an indoor, experimental room (550 × 550 cm). Participants were guided into the room by an experimenter with eyes closed. They were instructed to open their eyes only after being fitted with a head-mounted display (HTC Vive®, Seattle, USA), which blocked them from seeing the experimental room, and noise cancelling headphones. The virtual reality environment (A+cross®, VirtualRealWorlds.com, Germany) was then started and participants found themselves in a 550 × 550-cm virtual room in first-person view facing a virtual wooden platform (the maze) in shape of a cross (350 × 350 cm) on the ground in front of them. A pre-recorded voice instructed participants to step onto the platform and move to the centre of the platform where they were to wait until their environment changed, after which they were allowed to explore their environment while remaining on the platform. The waiting period lasted 90 s, during which 60 s of baseline measurements were collected. At the end of the waiting period, the behavioural experiment started, and participants no longer found themselves in the virtual room but on a rocky cliff over the sea, still standing in the centre of the maze and facing one of the open arms. In this new environment, the centre of the maze and two arms (closed arms) were supported by a rocky terrain while the other two arms (open arms) were suspended over a deep abyss. Participants were permitted to freely explore the maze for 300 s. At the end of the task, headsets were removed while in the experimental room.

## 2.3. Data recording

Behavioural activity was recorded via the virtual reality tracking system (HTC Vive Base Station®, Seattle, USA) and custom software (A+cross®) (Biedermann et al., 2017).

## 2.4. Psychophysiological measurements

Heart rate (ECG), respiration and skin conductance levels (SCL) were recorded using a BIOPAC MP150 data acquisition system and BioNomadix wireless physiology devices. Acqknowledge 4.4.1 software (Biopac Systems, Goleta, CA, USA) was used for data analysis. The

electrodes for skin conductance Ag/AgCl were attached to the palm of the non-dominant hand 10 min before the behavioural experiment. Thirty seconds before the behavioural paradigm started, baseline levels were recorded and averaged. This averaged baseline was used as the baseline comparison for recordings during behavioural testing which were also averaged over 30-s intervals. Ten SCL datasets had to be excluded due to electrode detachment during behavioural testing. Additionally, 12 ECG data and 5 respiration data were excluded due to poor data quality. To compensate for missing data due to movement artifacts, missing data points were imputed using the average of its preceding and subsequent data points.

## 2.5. Endocrinological measurements

Participants received verbal instructions on the correct use of the Salivette salivary collection kit (Sarstedt AG, Nümbrecht, Germany). Saliva samples were collected 5 min before (T0), directly after (T1), and 15 min (T2) after behavioural testing. The samples were centrifuged and saliva stored at – 80 °C until further analysis. Cortisol was determined by radioimmunoassay (DRG, Marburg, Germany). Inter- and intra-assay coefficients of variation were below 8%, and detection limit was 0.5 ng/mL. Due to insufficient amount of saliva, 31 samples were excluded.

Free circulating testosterone, 17-beta-estradiol, and progesterone were determined through saliva samples collected on both test days. On each day, about 1 mL saliva was collected from participants at three separate time points spaced over an hour to ensure stable readings. On day one, these times were prior to oral administration of estradiol/placebo and served as baseline hormone levels. On day two, these times were in the afternoon/evening about 6–7 h after the intake of the second estradiol/placebo dose. Saliva samples were stored at – 20 °C until they were ready to be analysed using an enzyme immunoassay by IBL (Hamburg, GER).

## 2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and R software (R version 4.0.2). A repeated-measures ANOVA with day (day 1, day 2) as within-subject factor and sex (male, female) and treatment (estradiol, placebo) as between subject factors was used to analyse estrogen saliva samples. Cortisol levels were natural-log transformed to normalise the data and analysed using repeated measures ANOVA with time points (T0–T2) as the within-subject factor. In line with previous research (Biedermann et al., 2017), we expected an increase in cortisol 15 min after exposure to the EPM. Psychophysiological data were analysed using repeated measures ANOVA with the 11 intervals (baseline, 0–30 s, 30–60 s, etc.) as within-subject factors. SCL data were natural-log transformed. Greenhouse-Geisser correction was applied when appropriate. Four ANOVAs with the fixed factors sex (male, female) and treatment (estradiol, placebo) were performed to compare anxiety-like behaviour on the EPM. In line with previous research (Biedermann et al., 2017) time spent on open arms, number of entries onto open arms, latency until first approach to open arms and latency until end of exploration of open arms were used as proxies for anxiety-like behaviour on the EPM. Significance levels of behavioral markers were corrected for multiple comparison by means of Holm's sequential Bonferroni procedure (Holms, 1979). Subjective anxiety was analysed using ANOVA with fixed factors sex (male, female) and treatment (estradiol, placebo). All data are given as mean ± standard error (SEM). Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Effect sizes are given as  $\eta^2_{\text{partial}}$ .

## 3. Results

### 3.1. Estradiol treatment increases circulating estradiol levels

As expected, estradiol treatment significantly increased salivary

estradiol levels on day two in men and women (day \* treatment interaction:  $F_{1116} = 55.89$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.325$ ; see Fig. 1), while progesterone levels were not affected by estradiol treatment (day \* treatment interaction:  $F_{1121} = 0.57$ ,  $P = 0.45$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.005$ ). Estradiol treatment also reduced salivary testosterone levels (day \* treatment interaction:  $F_{1121} = 5.65$ ,  $P = 0.019$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.045$ ).

### 3.2. Activation of the endogenous stress axes

As demonstrated in Fig. 2 behavioural testing activated both endogenous stress systems: the sympathetic nervous system, with increased heart rate (time intervals:  $F_{5,0558.4} = 29.56$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.212$ ), respiration rate (time intervals:  $F_{5,1600.3} = 38.71$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.249$ ) as well as skin conductance levels (time intervals:  $F_{2,4268.1} = 61.57$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.357$ ), as well as, the HPA axis with increased cortisol levels (time intervals:  $F_{1,92} = 8.1$ ,  $P = 0.006$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.081$ ) after the paradigm started. Estradiol treatment diminished some of these physiological responses with significantly blunted heart-rate response compared to placebo (treatment:  $F_{1110} = 6.07$ ,  $P = 0.015$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.052$ ) and lower cortisol levels (treatment:  $F_{1,92} = 7.2$ ,  $P = 0.036$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.047$ ). Respiration frequency was only reduced in women while estradiol increased respiration frequency in men, as reflected by a trend for a treatment \* sex interaction with a small effect size ( $F_{1118} = 3.25$ ,  $P = 0.074$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.027$ ). Estradiol treatment did not affect skin conductance levels (treatment:  $F_{1111} = 0.003$ ,  $P = 0.95$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} < 0.001$ ), while men generally showed higher skin conductance levels (sex:  $F_{1111} = 4.60$ ,  $P = 0.034$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.040$ ).

### 3.3. Anxiety-related behaviour

We found no qualitative differences due to estradiol treatment on EPM exploration paths as indicated by heatmaps (Fig. 3).

This finding was also reflected in the four main behavioural outcomes, i.e., time spent on open arms (treatment:  $F_{1122} = 0.14$ ,  $P = 0.71$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.001$ ), entries onto open arms (treatment:  $F_{1122} = 0.49$ ,  $P = 0.49$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.004$ ), latencies until first approach to open arms (treatment:  $F_{1122} = 1.05$ ,  $P = 0.31$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.009$ ) and latencies until end-exploration of open arms (treatment:  $F_{1122} = 0.69$ ,  $P = 0.41$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.006$ ; see Fig. 4). In line with earlier findings, we found that female subjects showed increased levels of anxiety-like behaviour compared to males: They spent less time on open arms (sex:  $F_{1122} = 30.44$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.200$ ), showed fewer entries onto open arms (sex:  $F_{1122} = 14.33$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.105$ ), higher latencies until first approach to open arms (sex:  $F_{1122} = 15.57$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}}$

$= 0.113$ ) and also higher latencies until end-exploration of open arms (sex:  $F_{1122} = 46.65$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.277$ , see Fig. 4). No interaction effects of sex \* treatment were significant.

### 3.4. Subjective levels of anxiety and other emotions

In line with behavioural data, subjective ratings of anxiety on the EPM were not influenced by estradiol treatment (treatment:  $F_{1119} = 0.18$ ,  $P = 0.67$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.002$ ; Fig. 5), with female participants reporting higher levels of subjective anxiety on the EPM (sex:  $F_{1119} = 7.77$ ,  $P = 0.006$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 0.061$ ; Fig. 5). All participants reported high levels of general presence (Mean =  $1.14 \pm 0.01$ ), spatial presence (Mean =  $5.93 \pm 0.02$ ), involvement (Mean =  $2.60 \pm 0.02$ ), and perceived realism (Mean =  $4.30 \pm 0.02$ ) in the virtual reality environment, which was neither significantly influenced by treatment ( $P_{\text{general presence}} = 0.24$ ,  $P_{\text{spatial presence}} = 0.87$ ,  $P_{\text{involvement}} = 0.36$ ,  $P_{\text{realism}} = 0.11$ ) nor by sex ( $P_{\text{general presence}} = 0.28$ ,  $P_{\text{spatial presence}} = 0.06$ ,  $P_{\text{involvement}} = 0.84$ ,  $P_{\text{realism}} = 0.50$ ). Estradiol treatment also did not affect bodily symptoms in the VR as assessed by the SSQ, while women reported significantly greater nausea (sex:  $F_{1119} = 14.84$ ,  $P < 0.001$ ,  $\eta^2_{\text{partial}} = 1.11$ ), but comparable disorientation and oculomotor symptoms in the VR. None of the questionnaires measuring different constructs related to anxiety (STAI-T, STAI-S, SSSV, AQ) was significantly different between the placebo and estradiol group on sum score or subscale levels (all  $p > 0.1$  in independent sample t-tests).

### 3.5. Correlations between anxiety-related behavior and hormones

We found no correlation between salivary estrogen levels on day 2 and the four behavioral measures of anxiety. However, in women a correlation of salivary testosterone with latency open arm exploration ( $R = -0.29$ ,  $P = 0.024$ ) and time on open arms ( $R = 0.27$ ,  $P = 0.035$ ) was found. In men, we found a positive correlation between salivary progesterone levels and number of entries onto open arms ( $R = 0.31$ ,  $P = 0.014$ ).

## 4. Discussion

In the present study, we found that estradiol treatment blunts the physiological stress response except for skin conductance but did not affect anxiety-related behaviour or subjective reports of anxiety on a human elevated plus maze (EPM) in men and women. Even though estradiol levels seem to have no effect on anxiety and related behaviours on the EPM, we corroborated earlier findings that women generally show more anxious behaviour as well as reported higher subjective

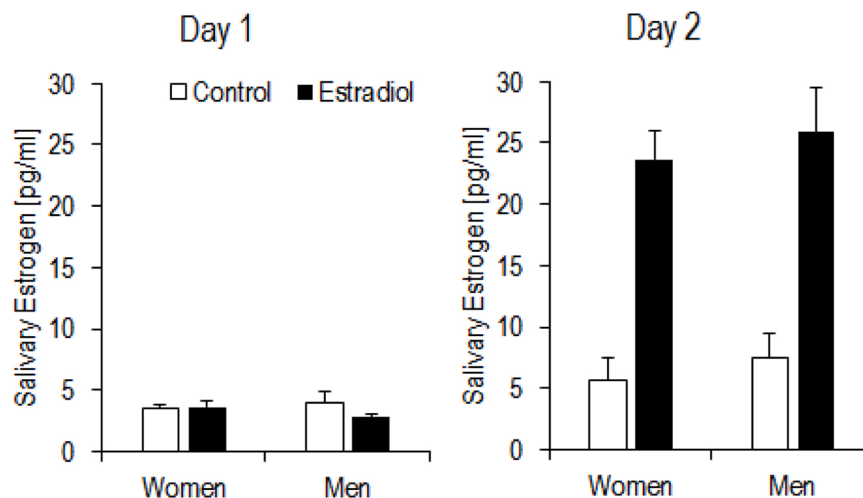


Fig. 1. : Salivary estrogen levels increase after estradiol treatment from day 1 (before intake of estradiol) to day 2. Bars represent Means + SEM.

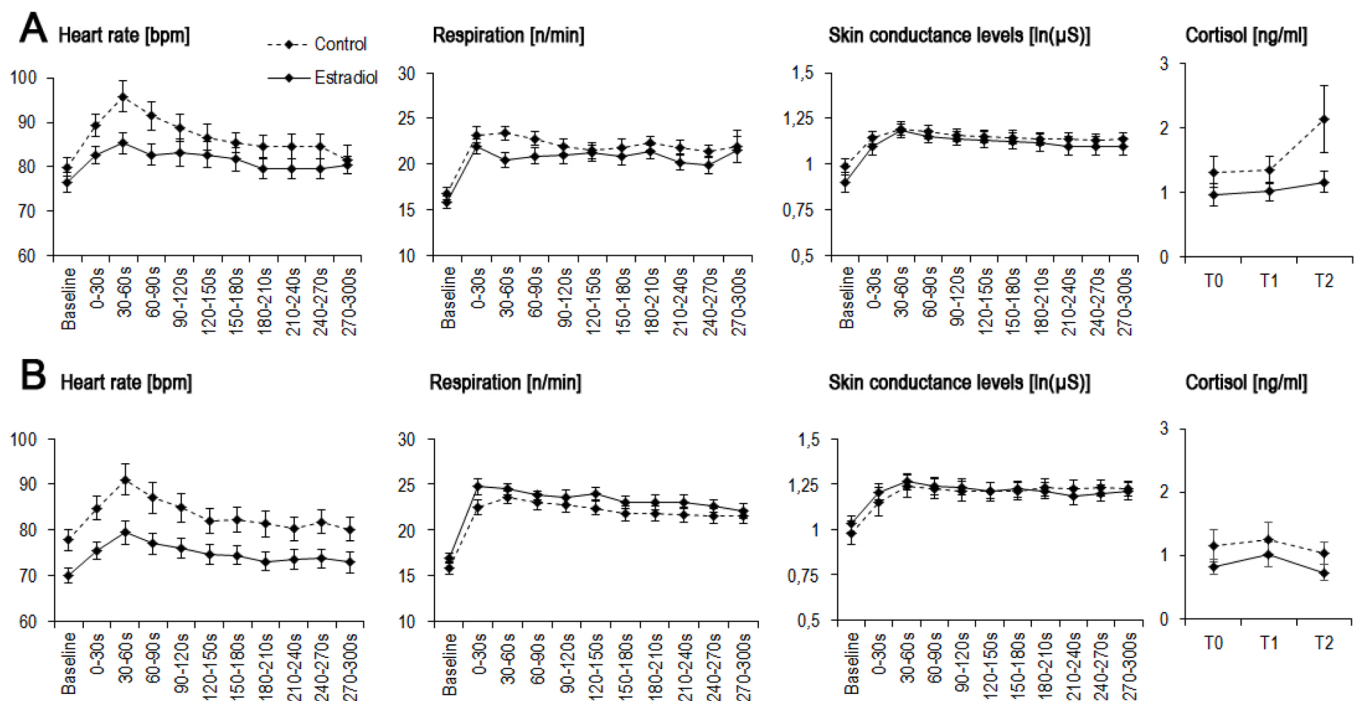


Fig. 2. : Psychophysiological (heart rate, respiration and skin conductance) and endocrine (Cortisol) responses to the elevated plus maze (EPM) in women (A) and men (B) after estradiol and placebo treatment. T0 = five minutes before, T1 = directly after and T2 = 15 min after EPM. Data points represent Means  $\pm$  SEM.

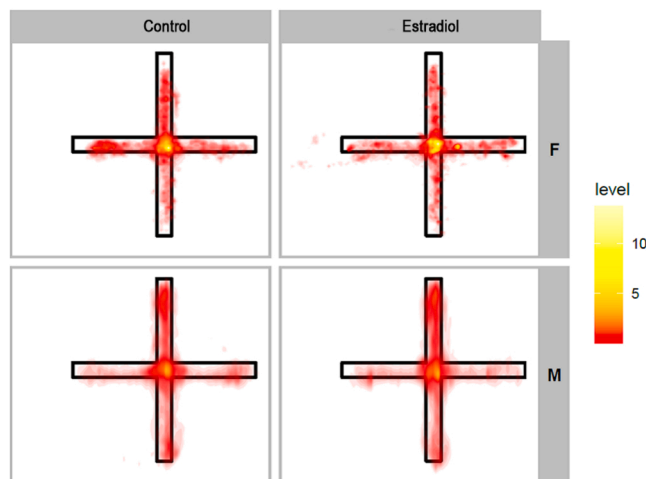


Fig. 3. : Heatmaps depicting the exploration of the EPM show a sex difference in exploration of the end of open arms and time spent in the centre of the EPM but no effect of estradiol treatment. Open arms are in north-south direction and closed arms in east-west direction.

anxiety compared to men on the EPM. An acute increase of circulating estradiol levels does not seem to play a major role in this sex difference in anxiety-related behaviour and perception.

Our finding of a blunted cortisol and heart rate response after estradiol treatment is in line with some of the previous research investigating estradiol's effects on psychophysiological responses to stress. Kirschbaum et al. found women using oral contraceptives (OC) to show blunted cortisol responses in bicycle ergometry as well as in social stress tests (Kirschbaum et al., 1996a). In men, however, they found estradiol to exaggerate hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis and sympathoadrenal activity (SA) responses (ACTH, cortisol, norepinephrine) to social stress (Kirschbaum et al., 1996b), an effect we did not find in the present study. Although our results have limited generalisability to

social stress (see discussion below), in a recent study in transgender individuals, we could show that long-term reversal of the natural sex-hormonal milieu is accompanied by significant changes in HPA-axis reactivity assessed by the Dex/CRH-Test (Fuss et al., 2019) that were however independent of measures of anxiety.

In line with our present findings, Del Rio et al. found SA responses (epinephrine, norepinephrine, blood pressure) to social stress were blunted in men after estradiol treatment (Del Rio et al., 1994). Interestingly, we found that skin conductance levels were not affected by estradiol treatment, in contrast to previous studies that have reported that estradiol also blunts SCL responses (Wegerer et al., 2014; White and Graham, 2018). It is important to note, that there are critical methodological differences between earlier studies and ours. First, in previous research, estradiol was either delivered to men transdermally and only at a lower dosage of 0.1 mg per day over two consecutive days (keeping in mind the higher bioavailability of transdermal estradiol), or women took estradiol orally over a longer period of time as OC (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a, 1996b, 1995). In our study, however, participants received a rather high dose of orally administered estradiol over two consecutive days (total dose of 12 mg for men and 8 mg for women) to simulate the hormonal milieu around ovulation. Secondly, the sample size of the present study is larger than those of earlier reports which had samples between 12 and 64 participants (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a, 1996b, 1995).

While our physiological data build on earlier findings linking estradiol to the physiological stress response, this is the first study to assess the impact of estradiol on actual human behaviour as well as subjective anxiety to a non-social stressor. In contrast, in rodent studies, high estrogen levels were frequently correlated with anxiolytic-like behaviour on the EPM as well as in other predominantly non-social behavioural paradigms (Kastenberger et al., 2012; Marcondes et al., 2001; Walf et al., 2009b, 2009a; Walf and Frye, 2005), and inconsistencies in results were explained by variances in the applied dose, paradigm used, or species tested (Borrow and Handa, 2017; Donner and Lowry, 2013; Kastenberger et al., 2012; Mora et al., 1996; Walf and Frye, 2005). Moreover, in humans, low estradiol levels were found correlated with greater behavioural avoidance during exposure treatment (Graham et al.,



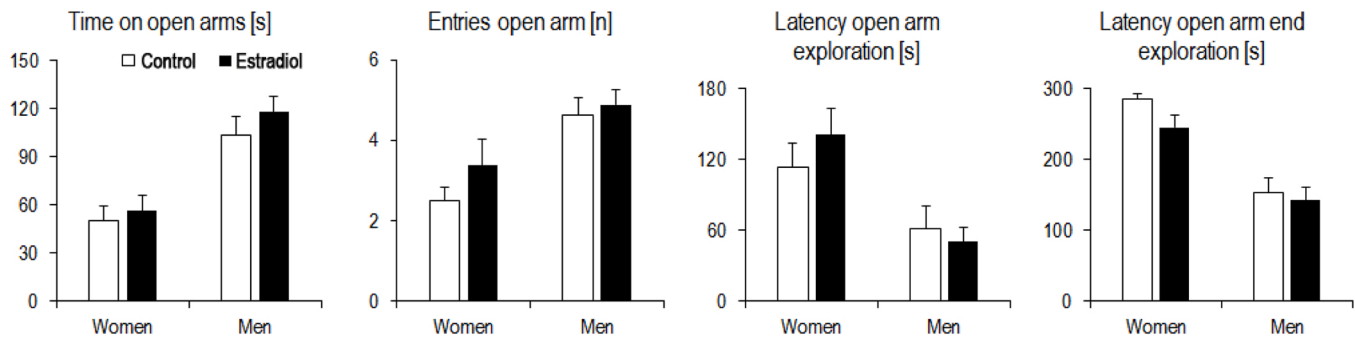


Fig. 4. : Behavioral data for men and women with estradiol and placebo treatment on the EPM demonstrating no effects of estradiol treatment but large sex differences. Bars represent Means + SEM.

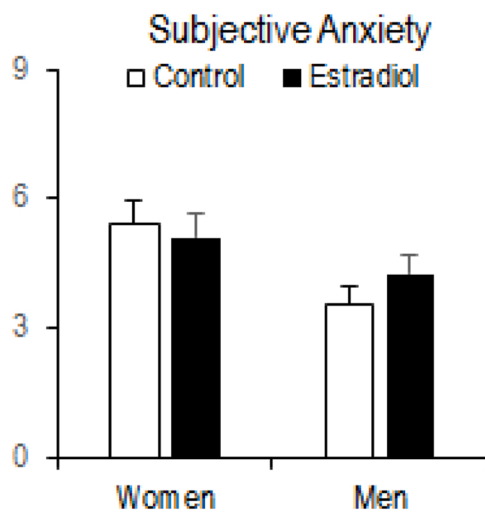


Fig. 5. : Subjective anxiety levels for men and women with estradiol and placebo treatment on the EPM demonstrating no effects of estradiol treatment but sex differences. Bars represent Means + SEM.

2018). In contrast, data on subjective reports on anxiety are somewhat inconsistent. While subjective anxiety during a stress-inducing speech task (White and Graham, 2018) and an unconditioned stimulus expectancy during fear extinction therapy (White and Graham, 2016) was not related to estradiol levels, other studies involving fear extinction and exposure treatment found low estradiol levels to be associated with constructs that may be related to anxiety levels, such as greater self-reported fear (White and Graham, 2018) or heightened threat expectancy (Li and Graham, 2016). We expected an anxiolytic effect of estradiol based on these human and rodent data. The lack of any behavioural and subjective experience with estradiol in a task that is sensitive to both anxiogenic as well as anxiolytic compounds is therefore surprising and challenges the view that the physiological increase of circulating estradiol levels around ovulation has a biologically significant effect on human anxiety and can explain preovulatory anxiolysis in women (Gottschalk et al., 1962; Ivey and Bardwick, 1968; Lahmeyer et al., 1982; Moos et al., 1969; Silverman et al., 1974). Moreover, recent research demonstrates an association between state as well as attachment anxiety and progesterone levels in women (Reynolds et al., 2018). In the present study we found no correlation between behavioural and subjective correlates of anxiety and progesterone levels in women but in men. We can, however, not exclude the possibility that the blunted stress response of the SA and HPA through estradiol might alter stress sensitivity in women in the peri-ovulatory phase over time.

Sex hormones might play an important role in anxiety-related behaviour, as we found a significant effect of sex on anxiety-related behaviour and subjective anxiety levels, a finding which corroborates

findings from other studies (McLean and Anderson, 2009). Here, we investigated acute changes in circulating estradiol levels, which might not alter brain structure and function leading to anxiety-related responses like long-term exposure to estradiol might. For example, in animal studies, long-term administration of estrogen (Barker and Galea, 2008; Diotel et al., 2013; Ormerod et al., 2004; Sheppard et al., 2019) as well as withdrawal (Green and Galea, 2008; Zhang et al., 2016) has been shown to impact hippocampal neurogenesis, where hippocampal neurogenesis has repeatedly been linked to anxiety-related behaviours (Fuss et al., 2010a, 2010b; Revest et al., 2009). Therefore, we are currently assessing anxiety-related behaviours on the EPM in a population of transgender people undergoing hormonal therapy to assess the impact of long-term exposure to estrogen as well as testosterone in humans. However, other biological systems may also be involved. Rodent studies suggest an influence of estrogen levels on cerebral serotonin levels and function (Imwalle et al., 2005) and an involvement with oxytocin signalling (Kudwa et al., 2014). Additionally, there are differences in estrogen receptor expression and sex-specific signalling in brain regions involved in anxiety such as the hippocampus, the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis (Yokosuka et al., 1997; Zuloaga et al., 2014; Bender et al., 2017; Lorente et al., 2020). Even though there is as of yet no clear dose-response function of estrogens with anxiety (Borrow and Handa, 2017), dose-dependent effects of estrogen on amygdala morphology (Fan et al., 2008) and activation (Hwang et al., 2015) and on anxiety (Kastenberger et al., 2012) have been found. Moreover, anxiolytic properties of estrogens have been observed in rats on the EPM and associated with monoamine levels in anxiety-related brain structures (e.g. serotonin and dopamine levels in the frontal cortex, hippocampus, caudate, putamen, nucleus accumbens) (Pandaranandaka et al., 2006). In addition to such biological factors, sociocultural and environmental factors have been suggested to account for sex differences in anxiety-related behaviours (for an overview see (McLean and Anderson, 2009)). For example, recent animal studies highlight differences in anxiety-related behavioural strategies (Shansky, 2018) showing that, at least in rodents, females tend to use different, partly more measured evaluation strategies than males. To investigate such subtler differences, we visualised maze movement as heat maps in addition to the four behavioral markers derived from animal research. However, these heatmaps showed similar findings to the classic outcome parameters. It is nevertheless important to note that male expression of anxiety is less socially accepted in the narrative of traditional gender role concepts. Therefore, some researchers argue that men might tend to underreport anxiety (Pierce and Kirkpatrick, 1992) while exhibiting bravery, more functional coping mechanisms, and a high openness to risk. A strong predictor for avoidance behaviour, for example, is experienced self-efficacy in coping with potential threats (Emmelkamp and Felten, 1985; McLean and Anderson, 2009). Given the suggestion that women report less self-efficacy than men (Buchanan and Selmon, 2008), or that girls may receive less reinforcement in their upbringing for confronting dangerous or fearful situations (Bem, 1981; Golombok and Fivush,

1998), the behavioural difference between the sexes observed in our study might also be influenced by such sociocultural factors. It is thus possible, that male participants in our study underreported anxiety and showed less anxiety-related behavior, while feeling rather anxious, e.g. for sociopsychological reasons. It is possible that with a more detailed observation of individual behavior (e.g. head movements, freezing etc.) more subtle differences might be observed on the human EPM when comparing women and men. Such further analyses may be particularly important in a task that confronts participants with a threatening situation (an abyss) where they can exhibit bravery in front of the experimenter. It must therefore be kept in mind that we used the EPM as a translational behavioural test for anxiety-related behaviour, which cannot necessarily be transferred to other forms of anxiety (such as social anxiety). Another limitation in translating rodent behavioral studies to humans is human laboratory studies tend to be less immersed, and humans can reflect upon an artificial setting and use self-control to modulate behavior. Such self-control might blunt the influence of certain molecules on behavior. However, in our previous research, we found that anxiogenic as well as anxiolytic compounds influence human behavior on the human EPM comparable to rodent behavior (Biedermann et al., 2017)."

In conclusion, this large randomized and placebo-controlled experiment on the one hand demonstrates that exogenous estradiol blunts physiological reactions to a situation which elicits anxiety, but suggests on the other hand that it has little or no effect on subjective anxiety as well as anxiety-related behaviour in contrast to rodent studies. Therefore, circulating estradiol does not seem to play an important role in the peri-ovulatory anxiolysis in women, at least when levels are increased over a short time period.

## Funding

This work was supported by a grant by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG-grant SO-952/8-1 to T.S.).

## Disclosure

The authors declare that they have no competing interests.

## CRediT authorship contribution statement

S.N. data acquisition, analysis, interpretation, and draft preparation; S.V.B. analysis, and interpretation, and draft preparation; G.J. data acquisition, analysis, and draft preparation; M.K.A. interpretation of data and critical revision; T.S. conceptualization, study design, and critical revision; J.F. conceptualization, design, data analysis, and draft preparation.

## References

- Ahokas, A., Kaukoranta, J., Wahlbeck, K., Aito, M., 2001. Estrogen deficiency in severe postpartum depression: successful treatment with sublingual physiological 17beta-estradiol: a preliminary study. *J. Clin. Psychiatry* 62 (5), 332–336.
- Barker, J.M., Galea, L.A.M., 2008. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152 (4), 888–902. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.071>.
- Barker, J.M., Galea, L.A., 2009. Sex and regional differences in estradiol content in the prefrontal cortex, amygdala and hippocampus of adult male and female rats. *General and comparative endocrinology* 164 (1), 77–84.
- Bem, S.L., 1981. Gender schema theory: a cognitive account of sex typing. *Psychol. Rev.* 88 (4), 354–364.
- Bender, R.A., Zhou, L., Vierk, R., Brandt, N., Keller, A., Gee, C.E., Schäfer, M.K., Rune, G. M., 2017. Sex-dependent regulation of aromatase-mediated synaptic plasticity in the basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 37 (6), 1532–1545.
- Biedermann, S.V., Biedermann, D.G., Wenzlaff, F., Kurjak, T., Nouri, S., Auer, M.K., Wiedemann, K., Briken, P., Haaker, J., Lonsdorf, T.B., Fuss, J., 2017. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol.* 15 (1), 125. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0463-6>.
- Borrow, A.P., Handa, R.J., 2017. Estrogen receptors modulation of anxiety-like behavior. *Vitam. Horm.* 103, 27–52. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.08.004>.

- Buchanan, T., Selmon, N., 2008. Race and gender differences in self-efficacy: assessing the role of gender role attitudes and family background. *Sex. Roles* 58 (11), 822–836. <https://doi.org/10.1007/s11199-008-9389-3>.
- Chang, Y.J., Yang, C.H., Liang, Y.C., Yeh, C.M., Huang, C.C., Hsu, K.S., 2009. Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear extinction in rats through estrogen receptor  $\beta$ . *Hippocampus* 19 (11), 1142–1150.
- Chen, C.V., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2021. Testosterone works through androgen receptors to modulate neuronal response to anxiogenic stimuli. *Neurosci. Lett.* 753, 135852.
- Cohen, D.C., 1977. Comparison of self-report and overt-behavioral procedures for assessing acrophobia. *Behav. Ther.* 8 (1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0005-7894\(77\)80116-0](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(77)80116-0).
- Del Rio, G., Velardo, A., Zizzo, G., Avogaro, A., Cipolli, C., Della Casa, L., Marrama, P., MacDonald, I.A., 1994. Effect of estradiol on the sympathoadrenal response to mental stress in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79 (3), 836–840. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.3.8077370>.
- Demetrio, F.N., Rennó, J., Gianfaldoni, A., Gonçalves, M., Halbe, H.W., Filho, A.H.G.V., Gorenstein, C., 2011. Effect of estrogen replacement therapy on symptoms of depression and anxiety in non-depressive menopausal women. *Arch. Women's Ment. Health* 14 (6), 479–486. <https://doi.org/10.1007/s00737-011-0241-3>.
- Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M., Anglade, I., Kah, O., Pellegrini, E., 2013. Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Horm. Behav.* 63 (2), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.003>.
- Doković, D.D., Jović, J.J., Đoković, J.D., Knežević, M.Ž., Djukić-Dejanović, S., Ristić-Ignjatović, D.I., 2015. Effects of hormone replacement therapy on depressive and anxiety symptoms after oophorectomy. *Med. Glas. Off. Publ. Med. Assoc. Zenica-Doboj. Cant. Bosnia Herzeg.* 12 (1), 79–85.
- Donner, N.C., Lowry, C.A., 2013. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflug. Arch.: Eur. J. Physiol.* 465 (5), 601–626. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>.
- Emmelkamp, P.M.G., Felten, M., 1985. The process of exposure in vivo: cognitive and physiological changes during treatment of acrophobia. *Behav. Res. Ther.* 23 (2), 219–223. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(85\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0005-7967(85)90034-8).
- Fan, L., Hanbury, R., Pandey, S.C., Cohen, R.S., 2008. Dose and time effects of estrogen on expression of neuron-specific protein and cyclic AMP response element-binding protein and brain region volume in the medial amygdala of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 88 (2), 111–126.
- Farage, M.A., Osborn, T.W., MacLean, A.B., 2008. Cognitive, sensory, and emotional changes associated with the menstrual cycle: a review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 278 (4), 299. <https://doi.org/10.1007/s00404-008-0708-2>.
- Frye, C.A., Petralia, S.M., Rhodes, M.E., 2000. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and  $\alpha$ 5 $\alpha$ -THP. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67 (3), 587–596.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N.M.B., Hensley, F.W., Weber, K., Hellweg, R., Gass, P., 2010a. Deletion of running-induced hippocampal neurogenesis by irradiation prevents development of an anxious phenotype in mice. *PLOS ONE* 5 (9), e12769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012769>.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N.M.B., Vogt, M.A., Touma, C., Pacifici, P.G., Palme, R., Witzemann, V., Hellweg, R., Gass, P., 2010b. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20 (3), 364–376. <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>.
- Fuss, J., Claro, L., Ising, M., Biedermann, S.V., Wiedemann, K., Stalla, G.K., Briken, P., Auer, M.K., 2019. Does sex hormone treatment reverse the sex-dependent stress regulation? A longitudinal study on hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis activity in transgender individuals. *Psychoneuroendocrinology* 104, 228–237. <https://doi.org/10.1016/j.psneuen.2019.02.023>.
- Gleason, C.E., Dowling, N., Wharton, W., Manson, J.E., Miller, V.M., Atwood, C.S., Brinton, E.A., Cedars, M.I., Lobo, R.A., Merriam, G.R., Neal-Perry, G., Santoro, N.F., Taylor, H.S., Black, D.M., Budoff, M.J., Hodis, H.N., Naftolin, F., Harman, S.M., Asthana, S., 2015. Effects of hormone therapy on cognition and mood in recently postmenopausal women: findings from the randomized, controlled KEEPS-cognitive and affective study. *PLoS Med.* 12 (6), e1001833. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001833>.
- Golombok, S., Fivush, R., 1998. Gender development. In: Freeman, H., Pullen, I., Stein, G., Wilkenson, G. (Eds.), *Seminars in psychosocial disorders*.
- Golub, S., 1976. The magnitude of premenstrual anxiety and depression. *Psychosom. Med.* 38 (1), 4–12. <https://doi.org/10.1097/00006842-197601000-00002>.
- Gottschalk, L.A., Kaplan, S.M., Gleser, G.C., Winget, C.M., 1962. Variations in magnitude of emotion: a method applied to anxiety and hostility during phases of the menstrual cycle. *Psychosom. Med.* 24 (3), 300–311.
- Graham, B.M., Milad, M.R., 2013. Blockade of estrogen by hormonal contraceptives impairs fear extinction in female rats and women. *Biol. Psychiatry* 73 (4), 371–378.
- Graham, B.M., Li, S.H., Black, M.J., Öst, L., 2018. The association between estradiol levels, hormonal contraceptive use, and responsiveness to one-session-treatment for spider phobia in women. *Psychoneuroendocrinology* 90, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.psneuen.2018.02.019>.
- Green, A.D., Galea, L.A.M., 2008. Adult hippocampal cell proliferation is suppressed with estrogen withdrawal after a hormone-simulated pregnancy. *Horm. Behav.* 54 (1), 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.02.023>.
- Holms, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand. J. Stat* 65–70.
- Hwang, M.J., Zsido, R.G., Song, H., Pace-Schott, E.F., Miller, K.K., Lebron-Milad, K., Marin, M.F., Milad, M.R., 2015. Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. *BMC Psychiatry* 15 (1), 1–12.

- Imwalle, D.B., Gustafsson, J.Å., Rissman, E.F., 2005. Lack of functional estrogen receptor  $\beta$  influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiol. Behav.* 84 (1), 157–163.
- Ivey, M.E., Bardwick, J.M., 1968. Patterns of affective fluctuation in the menstrual cycle. *Psychosom. Med.* 30 (3), 336–345.
- Kastenberger, I., Lutsch, C., Schwarzer, C., 2012. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol. *Psychopharmacology* 221 (3), 527–535. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2599-3>.
- Kennedy, R.S., Lane, N.E., Berbaum, K.S., Lilienthal, M.G., 1993. Simulator sickness questionnaire: an enhanced method for quantifying simulator sickness. *Int. J. Aviat. Psychol.* 3 (3), 203–220. [https://doi.org/10.1207/s15327108ijap0303\\_3](https://doi.org/10.1207/s15327108ijap0303_3).
- Kirschbaum, C., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1995. Preliminary evidence for reduced cortisol reactivity to psychological stress in women using oral contraceptive medication. *Psychoneuroendocrinology* 20 (5), 509–514.
- Kirschbaum, C., Platte, P., Pirke, K.M., Hellhammer, D., 1996a. Adrenocortical activation following stressfull exercise: further evidence for attenuated free cortisol responses in women using oral contraceptives. *Stress Med.* 12 (3), 137–143. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1700\(199607\)12:3<137::AID-SMI685>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1700(199607)12:3<137::AID-SMI685>3.0.CO;2-C).
- Kirschbaum, C., Schommer, N., Federenko, I., Gaab, J., Neumann, O., Oellers, M., Rohleder, N., Untiedt, A., Haker, J., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1996b. Short-term estradiol treatment enhances pituitary-adrenal axis and sympathetic responses to psychosocial stress in healthy young men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (10), 3639–3643. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855815>.
- Kudwa, A.E., McGivern, R.F., Handa, R.J., 2014. Estrogen receptor  $\beta$  and oxytocin interact to modulate anxiety-like behavior and neuroendocrine stress reactivity in adult male and female rats. *Physiol. Behav.* 129, 287–296.
- Lahmeyer, H.W., Miller, M., Deleon-Jones, F., 1982. Anxiety and mood fluctuation during the normal menstrual cycle. *Psychosom. Med.* 44 (2), 183–194.
- Li, S., Graham, B.M., 2016. Estradiol is associated with altered cognitive and physiological responses during fear conditioning and extinction in healthy and spider phobic women. *Behav. Neurosci.* 130 (6), 614–623. <https://doi.org/10.1037/bne0000166>.
- Lindheim, S.R., Legro, R.S., Bernstein, L., Stanczyk, F.Z., Vijod, M.A., Presser, S.C., Lobo, R.A., 1992. Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 167 (6), 1831–1836.
- Llorente, R., Marraudino, M., Carrillo, B., Bonaldo, B., Simon-Areces, J., Abellanas-Pérez, P., Rivero-Aguilar, M., Fernandez-Garcia, J.M., Pinos, H., Garcia-Segura, L.M., Collado, P., 2020. G protein-coupled estrogen receptor immunoreactivity fluctuates during the estrous cycle and show sex differences in the amygdala and dorsal hippocampus. *Front. Endocrinol.* 11, 537.
- Marcondes, F.K., Miguel, K.J., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C., 2001. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.* 74 (4–5), 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5).
- Matsumoto, Y.K., Kasai, M., Tomihara, K., 2018. The enhancement effect of estradiol on contextual fear conditioning in female mice. *PLoS One* 13 (5), e0197441.
- McLean, C.P., Anderson, E.R., 2009. Brave men and timid women? a review of the gender differences in fear and anxiety. *Clin. Psychol. Rev.* 29 (6), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2009.05.003>.
- Merz, C.J., Kinner, V.L., Wolf, O.T., 2018. Let's talk about sex differences in human fear conditioning. *Curr. Opin. Behav. Sci.* 23, 7–12.
- Milad, M.R., Igoe, S.A., Lebron-Milad, K., Novales, J.E., 2009. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience* 164 (3), 887–895.
- Milad, M.R., Zeidan, M.A., Contero, A., Pitman, R.K., Klibanski, A., Rauch, S.L., Goldstein, J.M., 2010. The influence of gonadal hormones on conditioned fear extinction in healthy humans. *Neuroscience* 168 (3), 652–658.
- Misra, M., Katzman, D.K., Estella, N.M., Eddy, K.T., Weigel, T., Goldstein, M.A., Miller, K.K., Klibanski, A., 2013. Impact of physiologic estrogen replacement on anxiety symptoms, body shape perception, and eating attitudes in adolescent girls with anorexia nervosa: data from a randomized controlled trial. *J. Clin. Psychiatry* 74 (8), 765–771. <https://doi.org/10.4088/JCP.13m08365>.
- Moos, R.H., Kopell, B.S., Melges, F.T., Yalom, I.D., Lunde, D.T., Clayton, R.B., Hamburg, D.A., 1969. Fluctuations in symptoms and moods during the menstrual cycle. *J. Psychosom. Res.* 13 (1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(69\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0022-3999(69)90017-8).
- Mora, S., Dussaubat, N., Díaz-Véliz, G., 1996. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21 (7), 609–620.
- Ormerod, B.K., Lee, T.T.Y., Galea, L.A.M., 2004. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128 (3), 645–654. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.039>.
- Pandaranandaka, J., Poonyachoti, S., Kalandakanond-Thongsong, S., 2006. Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiol. Behav.* 87 (4), 828–835.
- Peyrot, C., Brouillard, A., Morand-Beaulieu, S., Marin, M.F., 2020. A review on how stress modulates fear conditioning: let's not forget the role of sex and sex hormones. *Behav. Res. Ther.* 129, 103615.
- Pierce, K.A., Kirkpatrick, D.R., 1992. Do men lie on fear surveys? *Behav. Res. Ther.* 30 (4), 415–418. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(92\)90055-L](https://doi.org/10.1016/0005-7967(92)90055-L).
- Revest, J.-M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.-V., Abrous, D.N., 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Mol. Psychiatry* 14 (10), 959–967. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.15>.
- Reynolds, T.A., Makhanova, A., Marcinkowska, U.M., Jasienska, G., McNulty, J.K., Eckel, L.A., Nikonova, L., Maner, J.K., 2018. Progesterone and women's anxiety across the menstrual cycle. *Horm. Behav.* 102, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.008>.
- Sahingoz, M., Uguz, F., Gezgin, K., 2011. Prevalence and related factors of mood and anxiety disorders in a clinical sample of postmenopausal women. *Perspect. Psychiatr. Care* 47 (4), 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1744-6163.2010.00296.x>.
- Schmidt, P.J., Nieman, L.K., Danaceau, M.A., Adams, L.F., Rubinow, D.R., 1998. Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. *N. Engl. J. Med.* 338 (4), 209–216. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801223380401>.
- Schubert, T., Friedmann, F., Regenbrecht, H., 1999. Embodied presence in virtual environments. In: Paton, R. (Ed.), *Visual Representations and Interpretations*. Springer, London, pp. 268–278.
- Seeman, M.V., 1997. Psychopathology in women and men: focus on female hormones. *Am. J. Psychiatry* 154 (12), 1641–1647. <https://doi.org/10.1176/ajp.154.12.1641>.
- Shansky, R.M., 2018. Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls. *Curr. Opin. Neurobiol.* 49, 95–98.
- Sheppard, P.A.S., Choleris, E., Galea, L.A.M., 2019. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Mol. Brain* 12 (1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0442-7>.
- Silverman, E.M., Zimmer, C.H., Silverman, F.H., 1974. Variability of stutterers' speech disfluency: the menstrual cycle. *Percept. Mot. Skills* 38 (3), 1037–1038. <https://doi.org/10.2466/pms.1974.38.3c.1037>.
- Skapinakis, P., 2014. Spielberger state-trait anxiety inventory. In: Michalos, A.C. (Ed.), *Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research*. Springer, Netherlands, Dordrecht, pp. 6261–6264.
- Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.Å., Pfaff, D.W., Ogawa, S., 2009. Effect of ER- $\beta$  gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiol. Behav.* 96 (2), 300–306.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2005. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30 (7), 1288–1301. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300708>.
- Walf, A.A., Koonce, C., Manley, K., Frye, C.A., 2009a. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behav. Brain Res.* 196 (2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.016>.
- Walf, A.A., Paris, J.J., Frye, C.A., 2009b. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology* 34 (6), 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004>.
- Wegerer, M., Kerschbaum, H., Blechert, J., Wilhelm, F.H., 2014. Low levels of estradiol are associated with elevated conditioned responding during fear extinction and with intrusive memories in daily life. *Neurobiol. Learn. Mem.* 116, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.10.001>.
- White, E.C., Graham, B.M., 2016. Estradiol levels in women predict skin conductance response but not valence and expectancy ratings in conditioned fear extinction. *Neurobiol. Learn. Mem.* 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.011>.
- White, E.C., Graham, B.M., 2018. Low estradiol is linked to increased skin conductance, but not subjective anxiety or affect, in response to an impromptu speech task. *Psychoneuroendocrinology* 98, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.023>.
- Yokosuka, M., Okamura, H., Hayashi, S., 1997. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor- $\alpha$  immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J. Comp. Neurol.* 389 (1), 81–93.
- Zhang, Z., Hong, J., Zhang, S., Zhang, T., Sha, S., Yang, R., Qian, Y., Chen, L., 2016. Postpartum estrogen withdrawal impairs hippocampal neurogenesis and causes depression- and anxiety-like behaviors in mice. *Psychoneuroendocrinology* 66, 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.013>.
- Zuckerman, M., Eysenck, S., Eysenck, H.J., 1978. Sensation seeking in England and America: cross-cultural, age, and sex comparisons. *J. Consult. Clin. Psychol.* 46 (1), 139–149. <https://doi.org/10.1037//0022-006x.46.1.139>.
- Zuloaga, D.G., Zuloaga, K.L., Hinds, L.R., Carbone, D.L., Handa, R.J., 2014. Estrogen receptor  $\beta$  expression in the mouse forebrain: age and sex differences. *J. Comp. Neurol.* 522 (2), 358–371.

## **Zusammenfassende Darstellung der Publikation**

In der beiliegenden Publikation haben wir untersucht, ob und wie sich eine kurzfristige Anhebung der Östradiolspiegel im menschlichen Organismus auf dessen Angst auswirkt. Angst haben wir hier auf drei unterschiedlichen Ebenen zu erfassen versucht: auf Verhaltensebene mit Hilfe des Elevated Plus-Maze (EPM), auf subjektiver Ebene anhand von Fragebögen, sowie auf körperlicher Ebene anhand physiologischer Stressmarker. Anlass zu einer solchen Untersuchung gab die Frage, ob der physiologisch beschriebene Östradiolanstieg im weiblichen Zyklus, kurz vor der Ovulation, mit angstlösenden Wirkungen einhergeht. Dass der weibliche Zyklus und damit auch die zyklischen Hormonschwankungen, die den weiblichen Zyklus physiologisch definieren, mit ebenso zyklischen Gemütsschwankungen einhergehen, ist eine Überlegung, die in der Medizin bereits seit der Antike diskutiert wird (Rodin, 1992). Östradiol im Besonderen wird tatsächlich auch über den weiblichen Zyklus hinaus als Angst- und Stress-regulierendes Element diskutiert. In Studien an gesunden Proband/innen konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Östradiol einen inhibitorischen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HNN) Achse wie auch auf das Sympathoadrenerge (SA) System haben kann (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1995). Allerdings gibt es ebenfalls Daten aus Versuchen an männlichen Probanden, die an dieser Stelle, im Widerspruch zu den oben genannten Studien, eine Aktivierung nahelegen (Kirschbaum et al., 1996b). In klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Östradiolapplikation, bei Krankheitsbildern, welche mit Angstsymptomatik und verminderten Östradiolspiegeln einhergehen, angstlösend wirken kann (Ahokas et al., 2001; Gleason et al., 2015; Misra et al., 2013). Außerdem legen Studien aus der humanen Verhaltensforschung nahe, dass Östradiol einen Einfluss auf Angstkonditionierungs- und Dekonditionierungsprozesse haben kann (Peyrot et al., 2020). Bei der initialen Konditionierung scheinen hohe Östradiolspiegel die Angstschwelle zu senken, gleichwohl sie die Dekonditionierung zu erleichtern scheinen (Merz et al., 2018; Milad et al., 2009). Des Weiteren beschreiben Ergebnisse aus Studien an Nagetieren eine anxiolytische Wirkung von exogen verabreichten Östradiol, wie auch bei physiologisch erhöhten Östradiolspiegeln im Rahmen des Östradiolzyklus (Frye et al., 2000; Kastenberger et al., 2012; Marcondes et al., 2001; Walf et al., 2009b; Walf et al., 2009a; Walf and Frye, 2005). Abweichende Ergebnisse werden vor allem durch Variationen in der verabreichten Dosis, der untersuchten Spezies und des angewandten Angstparadigmas zu erklären versucht (Borrow and Handa, 2017; Donner and Lowry, 2013; Kastenberger et al., 2012; Mora et al., 1996; Walf and Frye, 2005), wobei die allgemeine Studienlage aus Tier- und Humanstudien ein anxiolytisches Potenzial erhöhter Östradiolspiegel

nahelegt. Allerdings scheint uns die Aussagekraft der aktuellen Studienlage eingeschränkt. Klinische Studien haben vor allem Ergebnisse zur Langzeittherapie mit Östradiol vorgelegt und dabei lediglich Patientinnen mit Östradiolmangel in Betracht gezogen (Đoković et al., 2015; Gleason et al., 2015; Misra et al., 2013). Vorklinische Studien haben zwar sowohl den Einfluss physiologischer Östradiolspiegelschwankungen, als auch künstlich erhöhter Östradiolspiegel über einen kurzen Zeitraum untersucht, allerdings in vergleichsweise niedrigen Dosen und recht kleinen Studienpopulationen (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1996b; Kirschbaum et al., 1995; Moos et al., 1969; Silverman et al., 1974). Vor allem aber scheinen die Erkenntnisse aus den vorliegenden Humanstudien kaum vergleichbar mit denen der Tierversuche, da diese sich vor allem auf Verhaltensdaten aus entsprechenden Angstparadigmen (beispielsweise EPM, Open-Field Test) beziehen, während jene im Menschen sich auf physiologische Stressparameter und Daten aus subjektiven Angstfragebögen stützen (Donner and Lowry, 2013; Gleason et al., 2015; Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1996b; Kirschbaum et al., 1995; Lahmeyer et al., 1982; Lindheim et al., 1992). Daher erscheint uns die Vergleichbarkeit und Möglichkeit zur Translation der Erkenntnisse auf diesem Gebiet eingeschränkt. Darüber hinaus wurden bisherige Humanstudien zu dieser Fragestellung vor allem in weiblichen Studienpopulationen durchgeführt (Ahokas et al., 2001; Demetrio et al., 2011; Đoković et al., 2015; Gleason et al., 2015; Golub, 1976; Kirschbaum et al., 1996a; Lahmeyer et al., 1982; Lindheim et al., 1992; Misra et al., 2013; Moos et al., 1969; Sahingoz et al., 2011; Schmidt et al., 1998; Silverman et al., 1974) und nur wenige Studien zogen hier männliche Probanden in Betracht (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996b; Kirschbaum et al., 1995). Daher haben wir uns entschlossen eine doppelblinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie, an gesunden, männlichen und weiblichen Proband/innen durchzuführen, um den Einfluss einer kurzfristigen und hochdosierten Östradioladministration auf Angsterleben und -verhalten zu untersuchen. Die Östradiolspiegel wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen auf ein Niveau erhöht, das dem physiologischen Östradiolspiegel kurz vor der Ovulation entspricht. Zusätzlich zu subjektiven Angstfragebögen und physiologischen Parametern haben wir Daten auf Verhaltensebene erhoben, durch die Anwendung des humanen EPM, einer für Humanstudien geeigneten Modifikation des in Tierstudien bereits seit Jahrzehnten etablierten, angstsensitiven Verhaltensparadigmas (Biedermann et al., 2017). Entsprechend der Studienlage haben wir nach Östradiolgabe eine reduzierte Angstantwort auf subjektiver, physiologischer und behavioraler Ebene erwartet. Aufgrund aktueller Forschungsergebnisse, welche eine Beziehung zwischen sowohl

Progesteron (Reynolds et al., 2018) als auch Testosteron und Angst diskutieren, haben wir diese Korrelationen im Rahmen unserer Untersuchung ebenfalls ins Auge gefasst (Chen et al., 2021). Nach Ausschluss von 11 Proband/innen aufgrund von Prozessfehlern sind wir in unserer Studie mit einem Datensatz von 126 gesunden Proband/innen verblieben. 33 männliche und 29 weibliche Probanden nahmen unter Östradiolapplikation an der Studie teil, während 31 männliche und 33 weibliche Probanden ein Placebo erhielten. Alle Teilnehmer wurden randomisiert und doppel-blind auf Interventions- und Kontrollgruppe verteilt. Alle weiblichen Probanden befanden sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung am Anfang der Follikelphase ihres Zyklus und haben innerhalb der letzten 3 Monate vor Versuchsbeginn keine Kontrazeptiva oder andere hormonhaltige Medikamente appliziert. Der Zykluszeitpunkt der Probandinnen wurde durch Selbstauskunft erhoben und anschließend durch Speichelproben endokrinologisch verifiziert. Teilnehmern der Interventionsgruppe wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 1, Tag 2) oral Östradiol appliziert. Männliche Teilnehmer erhielten 6mg Östradiol pro Tag, während weibliche Teilnehmer 4mg pro Tag erhielten. Die Dosen wurden so gewählt, um den höchstmöglichen physiologischen Östradiolspiegel zu erreichen, der bei Frauen im gebärfähigen Alter vorkommt. An Tag 1 beantworteten alle Teilnehmer/innen die folgenden Fragebögen vor der initialen Östradiolapplikation: State-Trait Anxiety Inventory (STAI) (Skapinakis, 2014), Sensation Seeking Scale V (SSSV) (Zuckerman et al., 1978), Acrophobia Questionnaire (AQ) (Cohen, 1977) An Tag 2 wurden die Probanden auf dem EPM getestet. Unmittelbar vor dieser Testung an Tag 2 beantworteten alle Proband/innen nochmals den State-Teil des STAI sowie einen Fragebogen zur Erfassung möglicher Nebenwirkungen einer Östradiolapplikation. Unmittelbar nach der Testung wurde das simulator sickness questionnaire (Kennedy et al., 1993), iGroup presence questionnaire (Schubert et al., 1999) und ein weiterer, selbstkonzipierter Fragebogen zur Erfassung subjektiv empfundener Angst beantwortet. Das EPM besteht aus einem lebensgroßen, flach auf dem Boden liegenden Holzkreuz (4 Arme von je 350cm Länge, 30cm Breite und 20cm Höhe) und einer exakt entsprechenden virtuellen Simulation dieses Holzkreuzes samt des Versuchsraums (550cm x 550cm), welche den Probanden über eine Virtual-Reality Brille (HTC Vive®, Seattle) vermittelt wurde. Die Probanden wurden mit geschlossenen Augen in den Versuchsraum begleitet, wo ihnen die Brille aufgesetzt wurde. Erst dann sollten sie die Augen wieder öffnen. So sollte sichergestellt werden, dass die Teilnehmer ausschließlich die virtuelle Umgebung wahrnehmen, also zunächst den virtuellen Versuchsraum und das EPM. Die Probanden wurden instruiert auf das Kreuz zu steigen und sich in dessen Zentrum zu bewegen, wo sie anschließend 90 Sekunden (s) verharren sollten, bis die virtuelle Umgebung, in welcher das EPM sich befindet, plötzlich

wechselt. Nach dieser Wartezeit wechselte die virtuelle Umgebung des EPM automatisch von dem Versuchsraum auf eine Bergspitze. Zwei der Arme gingen über einen offenen Abgrund hinaus (offene Arme) während die anderen beiden Arme von felsigen Wänden geschützt waren (geschlossene Arme). Diese Periode hielt 300s an und während dieser Zeit war es den Probanden gestattet sich frei auf dem EPM zu bewegen. Nach dieser Zeit wechselte die virtuelle Umgebung automatisch wieder in den Versuchsraum. Unmittelbar vor dem Versuch wurden etwaige Nebenwirkungen der Hormonapplikation sowie das aktuelle Angstempfinden via Fragebogen ermittelt. Unmittelbar nach dem Test wurden mögliche Nebenwirkungen der Virtual-Reality Brille erfragt sowie die Intensität der Immersion in die virtuelle Umgebung. Außerdem sollten die Teilnehmer bewerten, wie ängstlich sie sich auf dem EPM gefühlt hatten. Die Verhaltens- bzw. Bewegungsdaten wurden mithilfe von Bewegungssensoren (HTC Vive Base Station®, Seattle, USA) und einer Versuchsspezifischen Software (A+ cross®, VirtualRealWorlds.com, Germany) aufgezeichnet. Während des Versuchs wurden Daten zur Herzfrequenz, Atemfrequenz und Hautleitfähigkeit mit Hilfe eines mobilen Aufzeichnungssystems erfasst (BIOPAC MP150, BioNomadix wireless physiology devices). Zur Analyse dieser Daten haben wir die Anwendung Acqknowledge 4.4.1 (Biopac Systems, Goleta CA, USA) verwendet. Speichelproben zur Cortisolbestimmung wurden 5min vor (t0), unmittelbar nach Abschluss (t1) und 15min nach Abschluss des Versuchs (t3) von den Versuchsteilnehmern gesammelt. Hierbei kam das Salivette Salivary Collection Kit (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) zum Einsatz. Alle Teilnehmer wurden über die korrekte Anwendung der Speichelgewinnung instruiert. Speichelproben zur Bestimmung der Testosteron-, 17-beta-estradiol- und Progesteronspiegel wurden an beiden Versuchstagen gewonnen. Diese Proben wurden an Tag 1 vor der initialen Östradiol- bzw. Placebogabe gewonnen und an Tag 2 nachmittags etwa 7 Stunden nach der Einnahme der zweiten Dosis. Für die statistische Auswertung kamen die Programme IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) und R (R Version 4.0.2) zur Anwendung.

Wie erwartet führte die Östradioleinnahme zu einem signifikanten Anstieg der Östradiolwerte an Tag 2, bei Männern wie bei Frauen. Östradioleinnahme führte außerdem zu verringerten Testosteronwerten, während die Progesteronspiegel durch Östradiolbehandlung unberührt blieben. Die Exposition der Versuchsteilnehmer gegenüber dem EPM führte nach Versuchsbeginn zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Herz- und Atemfrequenz, Hautleitfähigkeit) wie auch der HHN-Achse (Cortisolspiegel). Östradioleinnahme inhibierte diese Antworten teilweise. Wir konnten eine signifikant verringerte Herzfrequenz und verringerte Cortisolspiegel im Vergleich zur Placebogruppe

beobachten. Die Atemfrequenz reduzierte sich lediglich bei Frauen nach Östradioleinnahme, während diese bei Männern zu einem Frequenzanstieg führte. Ein Einfluss der Östradiolapplikation auf die Hautleitfähigkeit konnte nicht beobachtet werden. Was die Verhaltensebene unserer Studie betrifft, so konnten wir keine qualitativen Unterschiede nach Östradiolgabe in den Bewegungsmustern auf dem EPM feststellen. Die vier Hauptparameter, die hier ins Auge gefasst wurden, sind: Verweildauer auf offenen Armen, Häufigkeit des Betretens offener Arme, Latenzzeit bis zum ersten Betreten offener Arme und Latenzzeit bis zur Endexploration offener Arme. Korrespondierend mit früheren Ergebnissen hat sich auch in diesem Versuch gezeigt, dass weibliche Versuchsteilnehmer mehr Angstverhalten (engl. anxiety-like behaviour) demonstrierten, sich also in der Exploration des EPM zurückhaltender verhielten, als die männlichen Probanden. Frauen verbrachten weniger Zeit auf den offenen Armen, betraten diese weniger häufig, zeigten eine höhere Latenz bis zum ersten Betreten offener Arme, wie auch bis zur Endexploration ebendieser. Diese Beobachtungen spiegeln sich auch in den subjektiven Daten zur Angstempfindung wider: weibliche Teilnehmerinnen gaben stärkeres Angstempfinden an als männliche Probanden, während sich kein Einfluss von Östradiolgabe auf das Angstempfinden nachweisen ließ. Alle Teilnehmer/innen gaben eine hohe Immersion in die virtuelle Umgebung und das virtuelle Geschehen an. Obwohl wir keine Korrelation zwischen Östradiol und Angstverhaltensparametern finden konnten, ist anzumerken, dass wir bei Frauen mit höheren Speicheltestosteronwerten eine längere Verweildauer auf den offenen Armen und kürzere Latenzzeit bis zur Endexploration der offenen Arme beobachten konnten. Außerdem zeigte sich bei unseren männlichen Probanden eine Korrelation zwischen Speichelprogesteronwerten und der Häufigkeit des Betretens offener Arme.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir zwar eine teilweise Inhibition der Stressantwort auf physiologischer Ebene nach Östradiolgabe beobachten konnten, nicht jedoch einen Einfluss auf subjektive Angstempfindung oder gar Angstverhalten. Nichtsdestotrotz ließ sich hier die frühere Beobachtung reproduzieren, dass Frauen generell mehr Angstverhalten auf dem EPM demonstrieren und auch in subjektiven Fragebögen stärkere Angstempfindung in Bezug auf die EPM-Erfahrung angeben (Biedermann et al., 2017). Eine kurzfristige Anhebung der Östradiolspiegel scheint bei diesem Geschlechtsunterschied keine Rolle zu spielen. Unsere Beobachtung eines verminderten Anstiegs von Herzfrequenz und Cortisolspiegeln nach Östradiolgabe passt zu früheren Studienergebnissen zur Untersuchung des Einflusses von Östradiol auf psychophysiologische Stressantworten. So beobachteten Kirschbaum et al. bei Frauen während der Behandlung mit oralen Kontrazeptiva, eine verminderte Cortisolantwort



auf körperliche Anstrengung und auf sozialen Stress (Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1995). In einer Untersuchung an Männern hingegen wurden verstärkte HNN- und SA-Antworten beobachtet (Kirschbaum et al., 1996b), eine Beobachtung, welche wir in unserer Studie nicht reproduzieren konnten. Im Kontrast hierzu kamen Del Rio et al. 1994 allerdings zu ähnlichen Ergebnissen wie wir heute, als sie eine verminderte SA-Antwort bei Männern nach Östradiolgabe verzeichneten (Del Rio et al., 1994). Allerdings ist die Vergleichbarkeit der genannten Studien mit der unsrigen, aufgrund entscheidender methodischer Unterschiede eingeschränkt. Zum einen wurden in früheren Untersuchungen an Männern kleinere Östradioldosen von 0,1mg pro Tag verwendet, welche allerdings transdermal verabreicht wurden (höhere Bioverfügbarkeit) (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996b). Untersuchungen an Frauen wurden unter Langzeitexposition gegenüber Östradiol, welche in Form oraler Kontrazeptiva eingenommen wurden, durchgeführt (Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1995). In unserer Untersuchung hingegen wurde mit einer hohen Dosis von 12mg Östradiol bei Männern bzw. 8mg Östradiol bei Frauen gearbeitet, um den Anstieg des Östradiolspiegels um den Zeitpunkt der Ovulation zu simulieren. Zum anderen ist die Studienpopulation unserer Untersuchung mit 126 Teilnehmer/innen um ein Vielfaches größer, als in den hier zum Vergleich herangezogenen Studien welche 12-64 Proband/innen zählen (Del Rio et al., 1994; Kirschbaum et al., 1996a; Kirschbaum et al., 1996b; Kirschbaum et al., 1995). Es ist fraglich, inwieweit sich zu unseren Beobachtungen auf Verhaltensebene Vergleiche zu anderen Studien ziehen lassen, da wir hier die bislang erste Untersuchung vorstellen, welche den Einfluss von Östradiol auf Angstverhalten (auf einen nicht-sozialen Stressor) beim Menschen ins Auge fasst. In Untersuchungen an Nagetieren, wurden hohe Östradiolspiegel weitgehend mit einer Anxiolyse in Verbindung gebracht, die sich im Verhalten der Tiere auf dem EPM, wie auch im Rahmen anderer Angstparadigmen widerspiegelt (Kastenberger et al., 2012; Marcondes et al., 2001; Walf et al., 2009b; Walf et al., 2009a; Walf and Frye, 2005). Abweichende Ergebnisse zu diesen Studien werden regelhaft auf Unterschiede in der verabreichten Östradioldosis, der untersuchten Spezies und des verwendeten Paradigmas zurückgeführt (Borrow and Handa, 2017; Donner and Lowry, 2013; Kastenberger et al., 2012; Mora et al., 1996; Walf and Frye, 2005). Aufgrund mangelnder behavioristischer Humanstudien auf diesem Feld, sehen wir uns genötigt hier Studien aus der Angstkonditionierung bzw. Dekonditionierung zum Vergleich heranzuziehen, welche ebenfalls subjektives Angsterleben wie auch Vermeidungsverhalten untersuchen, Ebenen, auf die auch wir uns in der hier vorliegenden Studie beziehen. Hier erscheinen die Daten allerdings ebenfalls recht widersprüchlich, mit Studien, die keinen Zusammenhang zwischen Östradiolspiegeln und

subjektivem Angsterleben beobachten können (White and Graham, 2018, 2016) bis hin zu Studien, die verringerte Östradiolspiegel sowohl mit einem ausgeprägteren Vermeidungsverhalten (Graham et al., 2018) als auch einer gesteigerten Bedrohungserwartung (Threat Expectancy) (Li and Graham, 2016) in Verbindung bringen. Nach Sichtung dieser Daten aus Tier- und Humanstudien erwarteten wir einen anxiolytischen Effekt in unserer Studie, ausgelöst durch kurzfristig erhöhte Östradiolspiegel. In Ermangelung entsprechender Verhaltenskorrelationen, wie auch Korrelationen zum subjektiven Erleben, in einem nachweislich angstsensitiven Verhaltensparadigma wie dem EPM erscheint uns die Annahme einer anxiolytischen Wirkung in Folge des kurzfristigen Östradiolspiegelanstiegs um den Zeitpunkt der Ovulation fragwürdig (Gottschalk et al., 1962; Ivey and Bardwick, 1968; Lahmeyer et al., 1982; Moos et al., 1969; Silverman et al., 1974). Bemerkenswerterweise stellen Reynolds et al. 2018 allerdings eine bei Frauen beobachtete Korrelation zwischen Progesteronwerten und dem Auftreten von Angst vor (Reynolds et al., 2018). Einen solchen Zusammenhang konnten wir bei Frauen in dieser Studie zwar nicht beobachten, dafür allerdings bei Männern, obgleich unser Fokus hier auf einen möglichen Zusammenhang zu erhöhten Östradiolwerten lag. Zuletzt lassen die von uns hier erhobenen Daten nicht den Ausschluss zu, dass die durch erhöhte Östradiolspiegel schwächer zum Ausdruck kommenden physiologischen Stressantworten, im Verlauf zu einer verringerten Stresssensitivität bei Frauen in der periovulatorischen Phase führen können. Weiterhin ist fraglich, wie es zu dem von uns wiederholt beobachteten signifikanten Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Angstempfindung bzw. dem Angstverhalten kommt, ein Zusammenhang, der auch von anderen Autoren aufgegriffen und diskutiert wird (McLean and Anderson, 2009). Wir haben hier lediglich die Auswirkungen eines akuten Östradiolspiegelanstiegs untersucht, welcher vermutlich keine bedeutenden Veränderungen der Hirnaktivität und -struktur hervorruft, wie sie möglicherweise von einer Langzeitexposition gegenüber Östradiol hervorgerufen werden könnte. In Tierstudien beispielsweise konnte eine Beeinflussung der hippocampalen Neurogenese sowohl durch Langzeitöstradiolgabe (Barker and Galea, 2008; Diotel et al., 2013; Ormerod et al., 2004; Sheppard et al., 2019) wie auch durch Langzeitöstradiolentzug (Green and Galea, 2008; Zhang et al., 2016) beobachtet werden, während die hippocampale Neurogenese wiederholt mit Angstverhalten in Zusammenhang gebracht wurde (Fuss et al., 2010a; Fuss et al., 2010b; Revest et al., 2009). Eine Verhaltensstudie auf dem EPM an transgeschlechtlichen Menschen, die eine hormonelle Geschlechtsumwandlung unter Langzeitöstrogenapplikation durchlaufen, könnte hier entsprechende Informationen zur Translatierbarkeit liefern. Östradiol steht allerdings auch mit anderen physiologischen

Prozessen in Verbindung, die mit Angst- und Stressregulation assoziiert sind. So wird in Tierstudien ein Einfluss von Östradiol auf den zerebralen Serotoninstoffwechsel (Imwalle et al., 2005) und den Oxytocinsignalweg (Kudwa et al., 2014) diskutiert. Präzise Dosis-Antwort Funktionen zwischen Östradiol und Angst konnten bisher nicht formuliert werden (Borrow and Handa, 2017), aber dosisabhängige Effekte von Östrogenen auf Angstverhalten (Kastenberger et al., 2012) und die Morphologie der Amygdala (Fan et al., 2008) wie auch auf ihre Aktivität (Hwang et al., 2015) wurden in Tierstudien beobachtet. Anxiolytische Eigenschaften von Östrogenen, die in einer Population von Ratten auf dem EPM beobachtet werden konnten, wurden mit dem Monoaminstoffwechsel und Hirnregionen in Beziehung gesetzt, die an der Angstverarbeitung beteiligt sind (Pandaranandaka et al., 2006). Neben diesen physiologischen Faktoren werden auch soziokulturelle und andere Umweltfaktoren zur Erklärung von eventuellen Geschlechtsunterschieden in der Angstprozeption bzw. im Angstverhalten herangezogen (McLean and Anderson, 2009). Kürzlich wurde beispielsweise bezugnehmend auf Tierstudien hervorgehoben, dass zumindest bei einer Reihe von Nagetieren, Weibchen dazu neigen würden auf andere, zum Teil bedächtigere Verhaltensstrategien zurückzugreifen als deren männliche Artgenossen um mit als bedrohlich empfundenen Situationen umzugehen (Shansky, 2018). Um eventuelle subtilere Unterschiede in den Verhaltens- bzw. Bewegungsdaten unserer Studienteilnehmer/innen sichtbar machen zu können, haben wir, über die klassischen Verhaltensmarker hinaus, welche wir aus der Tierforschung übernommen haben, Heat Maps erstellt, welche die Bewegungen der Teilnehmer/innen bildhaft veranschaulichen. Allerdings ließen sich auch in diesen Mustern keine anderen Beobachtungen machen, die sich von denen aus den klassischen Parametern abgrenzen würden. Nichtsdestotrotz ist es im Hinblick auf die Analyse solcher Daten unerlässlich sich dessen zu vergegenwärtigen, dass das Empfinden von Angst und das zum Ausdruck bringen von Ängsten mit traditionellen Männlichkeitskonzeptionen kollidieren. Es wird diskutiert ob Männer aus diesem Grund dazu neigen ihre Ängste in Befragungen herunterzuspielen bzw. weniger zuzugeben (Pierce and Kirkpatrick, 1992) und sich stattdessen mutig und risikofreudig zu präsentieren. Das würde bedeuten, dass männliche Teilnehmer in unserer Studie dazu neigten in den subjektiven Fragebögen weniger Angst zuzugeben und sich auf dem EPM entsprechend genötigt fühlten, weniger Angst zu zeigen bzw. sich mutig zu geben. McLean und Hope konnten in einer 2010 veröffentlichten Studie allerdings kein Herunterspielen von subjektiver Angst seitens männlicher Teilnehmer eines Verhaltensexperiments registrieren (McLean and Hope, 2010). Mithilfe einer differenzierteren und genaueren Beobachtung von individuellem Verhalten auf dem EPM (z.B. Bewegungen des Kopfes, zeitweises Erstarren, usw.) wäre es

allerdings vielleicht möglich subtilere Unterschiede in der Angstexpression zu erfassen. Solche feineren Beobachtungen könnten, vor allem bei einer Aufgabestellung, in welcher die Teilnehmer/innen mit einer bedrohlich wirkenden Umgebung konfrontiert werden, in welcher sie Mut demonstrieren können (hier ein tiefer Abgrund), von entscheidender Wichtigkeit sein. Des Weiteren möchten wir darauf hinweisen, dass ein starker Prädiktor dafür wie vermeidend sich jemand gegenüber bedrohlich wirkenden Situationen verhält, die Selbstwirksamkeit sein kann, die man in solchen Situationen bisher an sich erfahren hat (Emmelkamp and Felten, 1985; McLean and Anderson, 2009). Im Lichte der Annahme betrachtet, dass Frauen weniger Selbstwirksamkeit von sich berichten als Männer (Buchanan and Selmon, 2008) oder, dass Mädchen in ihrer Erziehung möglicherweise weniger ermutigt werden sich gefährlichen und furchteinflößenden Situationen zu stellen (Bem, 1981; Golombok and Fivush, 1998), scheint es durchaus nicht unwahrscheinlich, dass der Geschlechtsunterschied im Angstverhalten, welchen wir in der hier dargestellten Untersuchung beobachten konnten, Ausdruck von soziokulturellen Faktoren ist. Darüber hinaus ist es wichtig sich vor Augen zu halten, dass wir das EPM vor allem genutzt haben, um eine translationale Verhaltensstudie zu Angstverhalten durchzuführen, welche nicht notwendigerweise auf andere Formen von Angst (z.B. sozialer Angst) übertragen werden kann. Das EPM ist so konzipiert, dass es einen Annäherungs-Vermeidungs Konflikt (Approach-Avoidance Conflict) provoziert. Es werden also zwei Triebe, Neugierde und Selbsterhaltung, gegenübergestellt und aus der Beobachtung des Verhaltens lässt sich die situative Ängstlichkeit ableiten. Wesenhaft für das EPM ist die Provokation von Höhenangst. (Biedermann et al., 2017; Carobrez and Bertoglio, 2005). Die Translation von Studien an Nagetieren auf den Menschen ist allerdings vermutlich schon dadurch eingeschränkt, dass der Versuchsaufbau in Humanstudien oft weniger immersiv ist als für Tiere, da Menschen die Künstlichkeit einer artifiziellen Situation in der Regel vor Augen haben und über mehr Selbstkontrolle verfügen, um ihr Verhalten zu modulieren. So könnte eine entsprechende Selbstkontrolle möglicherweise auch den Einfluss gewisser Moleküle auf das Verhalten bzw. Empfinden verbergen. Nichtsdestotrotz konnten wir in einer anderen Studie beobachten, dass sowohl anxiolytische wie auch anxiogene Substanzen menschliches Verhalten auf dem EPM in vergleichbarer Weise beeinflussen wie auch bereits in Tierstudien (Biedermann et al., 2017). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier dargestellte großangelegte doppelblind randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie zwar eine teilweise Inhibition physiologischer Stressantworten durch eine kurzzeitige Anhebung des Östradiolspiegels beobachten lässt, aber, im Gegensatz zu entsprechenden Tierstudien, keine Unterstellung anxiolytischer Effekte auf subjektiver bzw. Verhaltensebene zulässt. Deshalb scheint sich die Annahme einer kurzzeitigen

Anxiolyse um den Zeitpunkt der Ovulation herum jedenfalls nicht durch den kurzzeitigen Östradiolanstieg erklären zu lassen, welcher die Ovulation begleitet.

### **Literaturverzeichnis**

- Ahokas, A., Kaukoranta, J., Wahlbeck, K., Aito, M., 2001. Estrogen deficiency in severe postpartum depression: Successful treatment with sublingual physiologic 17beta-estradiol: a preliminary study. *The Journal of clinical psychiatry* 62, p. 332–336.
- Barker, J.M., Galea, L.A.M., 2008. Repeated estradiol administration alters different aspects of neurogenesis and cell death in the hippocampus of female, but not male, rats. *Neuroscience* 152, p. 888–902. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.071>.
- Bem, S.L., 1981. Gender schema theory: A cognitive account of sex typing. *Psychological Review* 88, p. 354–364.
- Biedermann, S.V., Biedermann, D.G., Wenzlaff, F., Kurjak, T., Nouri, S., Auer, M.K., Wiedemann, K., Briken, P., Haaker, J., Lonsdorf, T.B., Fuss, J., 2017. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC biology* 15, p. 125. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0463-6>.
- Borrow, A.P., Handa, R.J., 2017. Estrogen Receptors Modulation of Anxiety-Like Behavior. *Vitamins and hormones* 103, p. 27–52. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.08.004>.
- Buchanan, T., Selmon, N., 2008. Race and Gender Differences in Self-efficacy: Assessing the Role of Gender Role Attitudes and Family Background. *Sex Roles* 58, p. 822–836. <https://doi.org/10.1007/s11199-008-9389-3>.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29, 1193–1205. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.017>.
- Chen, C.V., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2021. Testosterone works through androgen receptors to modulate neuronal response to anxiogenic stimuli. *Neuroscience Letters* 753, 135852. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135852>.
- Cohen, D.C., 1977. Comparison of self-report and overt-behavioral procedures for assessing acrophobia. *Behavior Therapy* 8, p. 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0005-7894\(77\)80116-0](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(77)80116-0).
- Del Rio, G., Velardo, A., Zizzo, G., Avogaro, A., Cipolli, C., Della Casa, L., Marrama, P., MacDonald, I.A., 1994. Effect of estradiol on the sympathoadrenal response to mental stress in normal men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 79, p. 836–840. <https://doi.org/10.1210/jcem.79.3.8077370>.

- Demetrio, F.N., Rennó, J., Gianfaldoni, A., Gonçalves, M., Halbe, H.W., Filho, A. H. G. V., Gorenstein, C., 2011. Effect of estrogen replacement therapy on symptoms of depression and anxiety in non-depressive menopausal women. *Archives of Women's Mental Health* 14, p. 479–486. <https://doi.org/10.1007/s00737-011-0241-3>.
- Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M., Anglade, I., Kah, O., Pellegrini, E., 2013. Effects of estradiol in adult neurogenesis and brain repair in zebrafish. *Hormones and behavior* 63, p. 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.04.003>.
- Đoković, D.D., Jović, J.J., Đoković, J.D., Knežević, M.Ž., Djukić-Dejanović, S., Ristić-Ignjatović, D.I., 2015. Effects of hormone replacement therapy on depressive and anxiety symptoms after oophorectomy. *Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina* 12, p. 79–85.
- Donner, N.C., Lowry, C.A., 2013. Sex differences in anxiety and emotional behavior. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 465, p. 601–626. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1271-7>.
- Emmelkamp, P.M.G., Felten, M., 1985. The process of exposure in vivo : cognitive and physiological changes during treatment of acrophobia. *Behaviour Research and Therapy* 23, p. 219–223. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(85\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0005-7967(85)90034-8).
- Fan, L., Hanbury, R., Pandey, S.C., Cohen, R.S., 2008. Dose and Time Effects of Estrogen on Expression of Neuron-Specific Protein and Cyclic AMP Response Element-Binding Protein and Brain Region Volume in the Medial Amygdala of Ovariectomized Rats. *Neuroendocrinology* 88, 111–126. <https://doi.org/10.1159/000129498>.
- Frye, C.A., Petralia, S.M., Rhodes, M.E., 2000. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 67, p. 587–596.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N. M. B., Hensley, F.W., Weber, K., Hellweg, R., Gass, P., 2010a. Deletion of Running-Induced Hippocampal Neurogenesis by Irradiation Prevents Development of an Anxious Phenotype in Mice. *PLOS ONE* 5, e12769. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012769>.
- Fuss, J., Ben Abdallah, N. M. B., Vogt, M.A., Touma, C., Pacifici, P.G., Palme, R., Witzemann, V., Hellweg, R., Gass, P., 2010b. Voluntary exercise induces anxiety-like behavior in adult C57BL/6J mice correlating with hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, p. 364–376. <https://doi.org/10.1002/hipo.20634>.

- Gleason, C.E., Dowling, N., Wharton, W., Manson, J.E., Miller, V.M., Atwood, C.S., Brinton, E.A., Cedars, M.I., Lobo, R.A., Merriam, G.R., Neal-Perry, G., Santoro, N.F., Taylor, H.S., Black, D.M., Budoff, M.J., Hodis, H.N., Naftolin, F., Harman, S.M., Asthana, S., 2015. Effects of Hormone Therapy on Cognition and Mood in Recently Postmenopausal Women: Findings from the Randomized, Controlled KEEPS-Cognitive and Affective Study. *PLoS medicine* 12, e1001833. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001833>.
- Golombok, S., Fivush, R., 1998. Gender development, in: H. Freeman, I. Pullen, G. Stein, & G. Wilkenson (Eds.), *Seminars in psychosexual disorders*.
- Golub, S., 1976. The Magnitude of Premenstrual Anxiety and Depression. *Psychosomatic Medicine* 38, p. 4–12. <https://doi.org/10.1097/00006842-197601000-00002>.
- Gottschalk, L.A., Kaplan, S.M., Gleser, G.C., Winget, C.M., 1962. Variations in Magnitude of Emotion: A Method Applied to Anxiety and Hostility During Phases of the Menstrual Cycle. *Psychosomatic Medicine* 24, p. 300–311.
- Graham, B.M., Li, S.H., Black, M.J., Öst, L., 2018. The association between estradiol levels, hormonal contraceptive use, and responsiveness to one-session-treatment for spider phobia in women. *Psychoneuroendocrinology* 90, p. 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.02.019>.
- Green, A.D., Galea, L.A.M., 2008. Adult hippocampal cell proliferation is suppressed with estrogen withdrawal after a hormone-simulated pregnancy. *Hormones and behavior* 54, p. 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.02.023>.
- Hwang, M.J., Zsido, R.G., Song, H., Pace-Schott, E.F., Miller, K.K., Lebron-Milad, K., Marin, M.-F., Milad, M.R., 2015. Contribution of estradiol levels and hormonal contraceptives to sex differences within the fear network during fear conditioning and extinction. *BMC Psychiatry* 15, 295. <https://doi.org/10.1186/s12888-015-0673-9>.
- Imwalle, D.B., Gustafsson, J.-Å., Rissman, E.F., 2005. Lack of functional estrogen receptor  $\beta$  influences anxiety behavior and serotonin content in female mice. *Physiology & behavior* 84, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.002>.
- Ivey, M.E., Bardwick, J.M., 1968. Patterns of Affective Fluctuation in the Menstrual Cycle. *Psychosomatic Medicine* 30, p. 336–345.
- Kastenberger, I., Lutsch, C., Schwarzer, C., 2012. Activation of the G-protein-coupled receptor GPR30 induces anxiogenic effects in mice, similar to oestradiol. *Psychopharmacology* 221, p. 527–535. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2599-3>.
- Kennedy, R.S., Lane, N.E., Berbaum, K.S., Lilienthal, M.G., 1993. Simulator Sickness Questionnaire: An Enhanced Method for Quantifying Simulator Sickness. *The International*

- Journal of Aviation Psychology 3, p. 203–220.  
[https://doi.org/10.1207/s15327108ijap0303\\_3](https://doi.org/10.1207/s15327108ijap0303_3).
- Kirschbaum, C., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1995. Preliminary evidence for reduced cortisol responsivity to psychological stress in women using oral contraceptive medication. *Psychoneuroendocrinology* 20, p. 509–514.
- Kirschbaum, C., Platte, P., Pirke, K.M., Hellhammer, D., 1996a. Adrenocortical activation following stressful exercise: Further evidence for attenuated free cortisol responses in women using oral contraceptives. *Stress Med.* 12, p. 137–143.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1700\(199607\)12:3<137:AID-SMI685>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1700(199607)12:3<137:AID-SMI685>3.0.CO;2-C).
- Kirschbaum, C., Schommer, N., Federenko, I., Gaab, J., Neumann, O., Oellers, M., Rohleder, N., Untiedt, A., Hanker, J., Pirke, K.M., Hellhammer, D.H., 1996b. Short-term estradiol treatment enhances pituitary-adrenal axis and sympathetic responses to psychosocial stress in healthy young men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 81, p. 3639–3643. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.10.8855815>.
- Kudwa, A.E., McGivern, R.F., Handa, R.J., 2014. Estrogen receptor  $\beta$  and oxytocin interact to modulate anxiety-like behavior and neuroendocrine stress reactivity in adult male and female rats. *Physiology & behavior* 129, 287–296.  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.004>.
- Lahmeyer, H.W., Miller, M., Deleon-Jones, F., 1982. Anxiety and Mood Fluctuation During the Normal Menstrual Cycle. *Psychosomatic Medicine* 44, p. 183–194.
- Li, S., Graham, B.M., 2016. Estradiol is associated with altered cognitive and physiological responses during fear conditioning and extinction in healthy and spider phobic women. *Behavioral neuroscience* 130, p. 614–623. <https://doi.org/10.1037/bne0000166>.
- Lindheim, S.R., Legro, R.S., Bernstein, L., Stanczyk, F.Z., Vijod, M.A., Presser, S.C., Lobo, R.A., 1992. Behavioral stress responses in premenopausal and postmenopausal women and the effects of estrogen. *American journal of obstetrics and gynecology* 167, p. 1831–1836.
- Marcondes, F.K., Miguel, K.J., Melo, L.L., Spadari-Bratfisch, R.C., 2001. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & behavior* 74, p. 435–440. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00593-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00593-5).
- McLean, C.P., Anderson, E.R., 2009. Brave men and timid women? A review of the gender differences in fear and anxiety. *Clinical Psychology Review* 29, p. 496–505.  
<https://doi.org/10.1016/j.cpr.2009.05.003>.



- McLean, C.P., Hope, D.A., 2010. Subjective anxiety and behavioral avoidance: Gender, gender role, and perceived confirmability of self-report. *Journal of Anxiety Disorders* 24, p. 494–502. <https://doi.org/10.1016/j.janxdis.2010.03.006>.
- Merz, C.J., Kinner, V.L., Wolf, O.T., 2018. Let's talk about sex ... differences in human fear conditioning. *Current Opinion in Behavioral Sciences* 23, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2018.01.021>.
- Milad, M.R., Igoe, S.A., Lebron-Milad, K., Novales, J.E., 2009. Estrous cycle phase and gonadal hormones influence conditioned fear extinction. *Neuroscience* 164, 887–895. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.09.011>.
- Misra, M., Katzman, D.K., Estella, N.M., Eddy, K.T., Weigel, T., Goldstein, M.A., Miller, K.K., Klibanski, A., 2013. Impact of physiologic estrogen replacement on anxiety symptoms, body shape perception, and eating attitudes in adolescent girls with anorexia nervosa: Data from a randomized controlled trial. *The Journal of clinical psychiatry* 74, p. 765–771. <https://doi.org/10.4088/JCP.13m08365>.
- Moos, R.H., Kopell, B.S., Melges, F.T., Yalom, I.D., Lunde, D.T., Clayton, R.B., Hamburg, D.A., 1969. Fluctuations in symptoms and moods during the menstrual cycle. *Journal of Psychosomatic Research* 13, p. 37–44. [https://doi.org/10.1016/0022-3999\(69\)90017-8](https://doi.org/10.1016/0022-3999(69)90017-8).
- Mora, S., Dussaubat, N., Díaz-Véliz, G., 1996. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21, p. 609–620.
- Ormerod, B.K., Lee, T.T.Y., Galea, L.A.M., 2004. Estradiol enhances neurogenesis in the dentate gyri of adult male meadow voles by increasing the survival of young granule neurons. *Neuroscience* 128, p. 645–654. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.06.039>.
- Pandaranandaka, J., Poonyachoti, S., Kalandakanond-Thongsong, S., 2006. Anxiolytic property of estrogen related to the changes of the monoamine levels in various brain regions of ovariectomized rats. *Physiology & behavior* 87, 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.02.002>.
- Peyrot, C., Brouillard, A., Morand-Beaulieu, S., Marin, M.-F., 2020. A review on how stress modulates fear conditioning: Let's not forget the role of sex and sex hormones. *Behaviour Research and Therapy* 129, 103615. <https://doi.org/10.1016/j.brat.2020.103615>.
- Pierce, K.A., Kirkpatrick, D.R., 1992. Do men lie on fear surveys? *Behaviour Research and Therapy* 30, p. 415–418. [https://doi.org/10.1016/0005-7967\(92\)90055-L](https://doi.org/10.1016/0005-7967(92)90055-L).

- Revest, J.-M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P.-V., Abrous, D.N., 2009. Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. *Molecular Psychiatry* 14, p. 959–967. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.15>.
- Reynolds, T.A., Makhanova, A., Marcinkowska, U.M., Jasienska, G., McNulty, J.K., Eckel, L.A., Nikonova, L., Maner, J.K., 2018. Progesterone and women's anxiety across the menstrual cycle. *Hormones and behavior* 102, p. 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.04.008>.
- Rodin, M., 1992. The social construction of premenstrual syndrome. *Social Science & Medicine* 35, 49–56. [https://doi.org/10.1016/0277-9536\(92\)90118-A](https://doi.org/10.1016/0277-9536(92)90118-A).
- Sahingoz, M., Uguz, F., Gezginc, K., 2011. Prevalence and related factors of mood and anxiety disorders in a clinical sample of postmenopausal women. *Perspectives in psychiatric care* 47, p. 213–219. <https://doi.org/10.1111/j.1744-6163.2010.00296.x>.
- Schmidt, P.J., Nieman, L.K., Danaceau, M.A., Adams, L.F., Rubinow, D.R., 1998. Differential behavioral effects of gonadal steroids in women with and in those without premenstrual syndrome. *The New England journal of medicine* 338, p. 209–216. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801223380401>.
- Schubert, T., Friedmann, F., Regenbrecht, H., 1999. Embodied presence in virtual environments., in: Paton R, editor. *Visual Representations and Interpretations*. Springer, London, p. 268–78.
- Shansky, R.M., 2018. Sex differences in behavioral strategies: avoiding interpretational pitfalls. *Current Opinion in Neurobiology* 49, 95–98. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.007>.
- Sheppard, P.A.S., Choleris, E., Galea, L.A.M., 2019. Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents. *Molecular Brain* 12, p. 22. <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0442-7>.
- Silverman, E.M., Zimmer, C.H., Silverman, F.H., 1974. Variability of stutterers' speech disfluency: The menstrual cycle. *Perceptual and motor skills* 38, p. 1037–1038. <https://doi.org/10.2466/pms.1974.38.3c.1037>.
- Skapinakis, P., 2014. Spielberger State-Trait Anxiety Inventory, in: Michalos, A.C. (Ed.), *Encyclopedia of Quality of Life and Well-Being Research*. Springer Netherlands, Dordrecht, p. 6261–6264.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2005. Antianxiety and antidepressive behavior produced by physiological estradiol regimen may be modulated by hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 30, p. 1288–1301. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300708>.

- Walf, A.A., Koonce, C., Manley, K., Frye, C.A., 2009a. Proestrous compared to diestrous wildtype, but not estrogen receptor beta knockout, mice have better performance in the spontaneous alternation and object recognition tasks and reduced anxiety-like behavior in the elevated plus and mirror maze. *Behavioural brain research* 196, p. 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.016>.
- Walf, A.A., Paris, J.J., Frye, C.A., 2009b. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology* 34, p. 909–916. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004>.
- White, E.C., Graham, B.M., 2016. Estradiol levels in women predict skin conductance response but not valence and expectancy ratings in conditioned fear extinction. *Neurobiology of learning and memory* 134 Pt B, p. 339–348. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.011>.
- White, E.C., Graham, B.M., 2018. Low estradiol is linked to increased skin conductance, but not subjective anxiety or affect, in response to an impromptu speech task. *Psychoneuroendocrinology* 98, p. 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.07.023>.
- Zhang, Z., Hong, J., Zhang, S., Zhang, T., Sha, S., Yang, R., Qian, Y., Chen, L., 2016. Postpartum estrogen withdrawal impairs hippocampal neurogenesis and causes depression- and anxiety-like behaviors in mice. *Psychoneuroendocrinology* 66, p. 138–149. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2016.01.013>.
- Zuckerman, M., Eysenck, S., Eysenck, H.J., 1978. Sensation seeking in England and America: cross-cultural, age, and sex comparisons. *Journal of consulting and clinical psychology* 46, p. 139–149. <https://doi.org/10.1037//0022-006x.46.1.139>.

## **Kurzfassung / short version**

Um die Hypothese einer physiologisch im Rahmen der Ovulation auftretenden östradiolgesteuerten Anxiolyse zu überprüfen, haben wir in einem virtuellen Verhaltensexperiment untersucht, wie sich eine kurze Anhebung der Östradiolspiegel über zwei konsekutive Tage auf Angstverhalten, subjektive Angst und psychophysiologische Stressantworten, die oft mit Angst einhergehen auswirkt. Obwohl wir beobachten konnten, dass Östradiol den Anstieg der Herzfrequenz und der Cortisolausschüttung hemmt, ließ sich kein Einfluss auf subjektive Angst oder Angstverhalten erkennen. Allerdings ließ sich ein Zusammenhang zwischen Geschlecht und Angstverhalten, sowie subjektiver Angst beobachten. Die Gruppe der weiblichen Teilnehmerinnen verhielt sich signifikant vermeidender auf dem EPM und gab größere subjektive Angstwerte an, als die der männlichen Teilnehmer.

To test the hypothesis of a physiologically occurring estradiol-controlled anxiolysis in context of ovulation, we investigated in a virtual behavioural experiment how a short increase in estradiol levels over two consecutive days affects anxiety-like behaviour, subjective anxiety and psychophysiological stress responses, which are often associated with anxiety. Although we were able to observe an inhibition to the increase in heart rate and cortisol secretion through estradiol, no influence on subjective anxiety or anxiety behaviour could be observed. However, a connection between gender and anxiety-like behaviour, as well as subjective anxiety, could be observed. The group of female participants behaved significantly more avoidant on the EPM and reported greater subjective anxiety scores than the group of males.

## **Erklärung des Eigenanteils**

Hiermit versichere ich, Sawis Nouri, dass ich die folgenden Anteile für die Erstellung der Publikationspromotion „Effekte von Östradiol auf physiologische, behaviourale und subjektive Angstsymptome in einer doppelblinden, placebokontrollierten und randomisierten Verhaltensstudie.“ selbständig erarbeitet habe:

- Literaturrecherche und -auswertung
- Datenerhebung und -aufbereitung, Blut- und Speichelproben wurden durch ein externes Labor analysiert
- Deskriptive Datenauswertung
- Statistische Datenauswertung (ANOVA) unter Anleitung von PD Dr. med. Sarah Biedermann, Bonferroni-Korrektur durch Dr. Gina Joue
- Verfassen des Manuskripts, Überarbeitung durch PD Dr. med. Sarah Biedermann
- Anfertigung der Abbildungen, Heat Maps wurden von Dr. Gina Joue erstellt
- Beantwortung des Review Verfahrens mit Unterstützung von Prof. Dr. med. Johannes Fuss und Dr. rer. nat. Tobias Sommer-Blöchl
- Verfassen der Dissertationsschrift
  
- Die Instrumentenerstellung erfolgte durch PD Dr. med. Sarah Biedermann und Prof. Dr. med. Johannes Fuss
- Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Tobias Sommer-Blöchl und Prof. Dr. med. Johannes Fuss
- Die Rekrutierung der Proband/innen und die Terminplanung erfolgte durch Frau Kira Diermann

## **Danksagung**

Bei meinem Doktorvater, Herrn Johannes Fuss, möchte ich mich herzlichst bedanken für die Ermutigung zu einer experimentellen Forschungsarbeit und zur Anfertigung und Publikation eines wissenschaftlichen Artikels. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Sarah Biedermann und Herrn Johannes Fuss für die freundlichste Betreuung und Unterstützung bei ebendieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bedanken bei Frau Gina Joue, Frau Kira Diermann und Herrn Tobias Sommer-Blöchl für eine freundliche, zuvorkommende und reibungslose Kooperation. Nicht zuletzt möchte ich mich bedanken bei meinen lieben Eltern, die mir alles ermöglicht haben.

## Lebenslauf

Name Sawis Nouri  
Adresse [REDACTED]  
[REDACTED]  
Telefon [REDACTED]  
email [REDACTED]  
Geb. [REDACTED]

### Bildungsweg

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

### Beruflicher Werdegang

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

### Publikationliste

- Biedermann, S.V., Biedermann, D.G., Wenzlaff, F., Kurjak, T., Nouri, S., Auer, M.K., Wiedemann, K., Briken, P., Haaker, J., Lonsdorf, T.B., Fuss, J., 2017. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. BMC biology 15, p. 125. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0463-6>. [Eigenanteil: Datenerhebung und -aufbereitung]
- Nouri, S., Biedermann, S.V., Joue, G., Auer, M.K., Sommer, T., Fuss, J., 2022. Effects of circulating estradiol on physiological, behavioural, and subjective correlates of anxiety: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Psychoneuroendocrinology 138, 105682. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2022.105682>. [Eigenanteil: Datenerhebung, Analyse, Interpretation, Manuskripterstellung]

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....