

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von  
Epilepsiemodellen: Untersuchungen im  
elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell bei Ratten**

von Isabel Leonie Seiffert

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von  
Epilepsiemodellen: Untersuchungen im  
elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell bei Ratten**

von

Isabel Leonie Seiffert

aus Mainz

München 2019



Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Departement  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka



Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Nikolai Klymiuk

Tag der Promotion: 27.Juli 2019



*Meinen Eltern*





---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Epilepsien .....</b>	<b>3</b>
1.1.	Definition und Prävalenz.....	3
1.2.	Klassifizierung.....	4
1.3.	Komorbiditäten.....	5
1.4.	Relevanz und Anforderungen an Tiermodellen in der Epilepsieforschung .....	6
1.5.	Temporallappenepilepsie und deren Tiermodelle.....	8
<b>2.</b>	<b>Belastungseinschätzung in Tierversuchen.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Ethik von Tierversuchen.....	12
2.2.	Stress und Belastung .....	14
<b>3.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen.....</b>	<b>15</b>
3.1.	Heimkäfigverhalten .....	16
3.2.	Grabverhalten .....	18
3.3.	Soziale Interaktion .....	19
3.4.	Open-Field-Test.....	20
3.5.	Angstassoziierte Verhaltenstest.....	21
3.5.1.	Black-and-white-Box.....	21
3.5.2.	Elevated-Plus-Maze.....	22
3.6.	Anhedonie-assoziiertes Verhalten.....	23
3.7.	Grimace-Scale und Irwin-Score .....	24
<b>4.</b>	<b>Biochemische Parameter.....</b>	<b>25</b>
4.1.	Corticosteron.....	25
4.1.1.	Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM) .....	28
4.1.2.	Corticosteron in Serumproben .....	28
4.1.3.	Corticosteron in Haarproben .....	29
4.2.	Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF).....	29
4.3.	Creatinkinase (CK) .....	31
4.4.	Sexualzyklus.....	32
<b>5.</b>	<b>Physiologische Parameter.....</b>	<b>33</b>
5.1.	Erfassung physiologischer Parameter .....	33
5.2.	Circadianer Rhythmus und Aktivität .....	34
5.3.	Herzfrequenz (HR) und Herzratenvariabilität (HRV).....	36

---

<b>III.</b>	<b>ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>43</b>
<b>2.</b>	<b>Elektrisches Post-SE-Modell.....</b>	<b>46</b>
2.1.	Elektrodenimplantation .....	46
2.2.	Elektrische Dauerstimulation .....	48
2.3.	Anfallsüberwachung .....	50
2.4.	Video- und EEG-Aufzeichnung .....	50
<b>3.</b>	<b>Telemetrie Messungen.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Transmitterimplantation .....	51
3.2.	Datenaufzeichnung.....	53
3.3.	Datenanalyse .....	54
3.3.1.	Circadiane Aktivität, Herzfrequenz (HR) und Herzratenvariabilität (HRV) .....	54
3.3.2.	Telemetrische EEG-Auswertung.....	55
<b>4.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>57</b>
4.1.	Heimkäfiverhalten .....	57
4.2.	Burrowing-Test .....	58
4.3.	Sozialer Interaktionstest .....	59
4.4.	Open-Field-Test.....	59
4.5.	Angstassoziiertes Verhalten .....	60
4.5.1.	Black-and-white-Box.....	60
4.5.2.	Elevated-Plus-Maze.....	60
4.6.	Saccharin-Präferenz-Test.....	61
4.7.	Allgemeinbefinden .....	61
<b>5.</b>	<b>Biochemische Analysen .....</b>	<b>61</b>
5.1.	Corticosteron.....	62
5.1.1.	Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM) .....	62
5.1.2.	Corticosteron in Serumproben .....	62
5.1.3.	Corticosteron in Haarproben .....	63
5.2.	Nebennieren .....	64
5.3.	Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF) .....	64
5.4.	Creatinkinase (CK) .....	65
5.5.	Zyklusstand.....	65
<b>6.</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>66</b>
6.1.	Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse (PCA) .....	66

---

<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Elektrisches Post-SE-Modell</b> .....	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen</b> .....	<b>68</b>
2.1.	Heimkäfigverhalten .....	69
2.2.	Burrowing-Test .....	71
2.3.	Sozialer Interaktionstest .....	74
2.4.	Open-Field-Test.....	75
2.5.	Angstassoziiertes Verhalten .....	79
2.5.1.	Black-and-white-Box.....	79
2.5.2.	Elevated-Plus-Maze.....	81
2.6.	Saccharin-Präferenz-Test.....	84
2.7.	Allgemeinbefinden und Körpergewicht.....	84
<b>3.</b>	<b>Biochemische Analysen</b> .....	<b>87</b>
3.1.	Corticosteron.....	88
3.1.1.	Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM) .....	88
3.1.2.	Corticosteron in Serumproben .....	89
3.1.3.	Corticosteron in Haarproben .....	89
3.2.	Nebennieren .....	90
3.3.	Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF) .....	90
3.4.	Creatinkinase (CK) .....	91
3.5.	Zyklusstand.....	91
<b>4.</b>	<b>Telemetrie Messungen</b> .....	<b>92</b>
4.1.	Circadiane Aktivität .....	92
4.2.	Herzfrequenz (HR).....	93
4.3.	Zeitabhängige Herzratenvariabilität (HRV) .....	95
4.4.	Frequenzbasierte Herzratenvariabilität .....	100
<b>5.</b>	<b>Korrelationsmatrix- und Hauptkomponentenanalyse</b> .....	<b>101</b>
5.1.	Korrelationsmatrixanalyse .....	101
5.2.	Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	105
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>109</b>
<b>1.</b>	<b>Belastungseinstufung des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells</b> ..	<b>110</b>
1.1.	Kurz- und langfristige Belastung durch die Elektrodenimplantation .....	110
1.2.	Belastungseinstufung ab dem Status epilepticus .....	112
<b>2.</b>	<b>Einsatz von Telemetrie-Transmittern und deren Einflüsse</b> .....	<b>124</b>
<b>3.</b>	<b>Schlussfolgerung</b> .....	<b>127</b>

---

4.	Limitationen und Ausblick.....	129
VII.	ZUSAMMENFASSUNG .....	133
VIII.	SUMMARY .....	135
IX.	LITERATURVERZEICHNIS .....	137
X.	ANHANG .....	167
1.	Geräte.....	167
2.	Software.....	169
3.	Lösungen, Medikamente und Substanzen .....	169
4.	Modifizierter Irwin Score.....	172
5.	Korrelationsmatrixanalyse .....	175
XI.	DANKSAGUNG.....	191

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	MEZ	Mitteeuropäische Zeit
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	MESZ	Mitteeuropäische Sommerzeit
ADH	Antidiuretisches Hormon	mg	Milligramm
ANOVA	Varianzanalyse	ml	Milliliter
ANS	Autonomes Nervensystem	ms	Millisekunde
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	n	Stichprobenumfang
BLA	Basolaterale Amygdala	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
bpm	Schläge pro Minute	nm	Nanometer
BWB	Black-and-White-Box	OF	Open Field
CK	Creatinkinase	OP	Operation
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon	p	Signifikanzniveau
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	PCA	Hauptkomponentenanalyse
EEG	Elektroenzephalogramm	pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
EKG	Elektrokardiogramm	RB	Rennen und Springen
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	RMSSD	<i>root mean square differences of successive R-R intervals</i>
EPM	Elevated-Plus-Maze	RR-I	Schlag-zu-Schlag-Intervall
FCM	Fäkale Corticosteronmetaboliten	rpm	Umdrehungen pro Minute
GG	Grundgesetz	s.c.	Subkutan
HC	Hippocampus	SDNN	Standardabweichung der NN-Intervalle
HF/LF	Hoher Frequenzbereich/ niedriger Frequenzbereich	SE	Status epilepticus
HPA-Achse	Hypothalamus- Hypophysen- Nebennieren-Achse	SSSE	Selbst erhaltender Status epilepticus
HR	Herzfrequenz	SEM	Standardfehler
HRV	Herzratenvariabilität	SUDEP	Plötzlicher, unerwarteter Tod bei Epilepsiepatienten
i.p.	Intraperitoneal	TierSchG	Tierschutzgesetz
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie	TierSch-VersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
IVETF	<i>International Veterinary Epilepsy Task Force</i>	ZNS	Zentrales Nervensystem
M	Molare Masse	3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
		°C	Grad Celsius

---

Die in dieser Arbeit verwendete männliche Form bezieht sich immer zugleich auf die weiblichen und männlichen Personen. Zugunsten der Lesbarkeit wurde auf eine Doppelbezeichnung im Folgenden verzichtet.

## I. EINLEITUNG

Bei Epilepsie handelt es sich um eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen (ENGLAND et al. 2012; LIDSTER et al. 2016). Weltweit sind nach der Weltgesundheitsorganisation (WHO) daran ca. 50 Millionen Menschen erkrankt (WORLD-HEALTH-ORGANIZATION 2019). Auch in der Veterinärmedizin ist Epilepsie die häufigste Neurologische Erkrankung bei Hunden und Katzen (PACKER u. VOLK 2015). Der Begriff *Epilepsie* bezeichnet ein zusammengefasstes Krankheitsbild, charakterisiert durch spontane, wiederauftretende epileptische Anfälle und die daraus resultierenden neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Begleiterscheinungen (KANNER 2017; SCHEFFER et al. 2017). Entwickelt sich aus einem initialen Gehirnschaden eine Epilepsieerkrankung, beginnt ab diesem epileptogenen Insult der chronische, fortlaufende Prozess der Epileptogenese (PITKANEN et al. 2015). Zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine präventiven Therapiemöglichkeiten, um die Epileptogenese im Ansatz zu unterdrücken (DE OLIVEIRA et al. 2018). Im Rahmen medikamentöser Therapie kann eine symptomatische Unterdrückung von epileptischen Anfällen mit Antiepileptika erreicht werden. Dreißig Prozent der mit Antiepileptika behandelten Patienten zeigen jedoch keine ausreichende Unterdrückung von Anfällen. In diesen Fällen wird die Epilepsieerkrankung als pharmakoresistent kategorisiert (WORLD-HEALTH-ORGANIZATION 2019). Das übergreifende Ziel der Epilepsieforschung ist es, die pathophysiologischen Mechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene zu verstehen, um darauf aufbauend therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung und Vorbeugung von epileptischen Anfällen, Komorbiditäten und der Epileptogenese bestimmen zu können (LIDSTER et al. 2016). Bei der Entwicklung von Antiepileptika stellen Tiermodelle, meist an Mäusen oder Ratten, eine Notwendigkeit dar (LOSCHER 2011).

Im Rahmen der EU-Richtlinie 2010/63 und deren Umsetzung in das deutsche Recht durch die Tierschutz-Versuchstierverordnung wird eine Belastungseinstufung von Tiermodellen gefordert. Diese Belastungseinstufung soll auf evidenzbasierten aktuellen Daten gründen und die Umsetzung des 3R-Prinzips (*Refinement, Reduction, Replacement*) gewährleisten. Im Rahmen der DFG Forschergruppe ‚Severity assessment in animal based research‘ (DFG - FOR 2591) sollen Empfehlungen für Belastungseinstufungen von ausgewählten Tiermodellen durch die Identifizierung und Validierung von Belastungsparametern evidenzbasiert entwickelt werden. Eine objektive und umfassende Erhebung von Schmerzen, Leiden und Schäden von Tieren in den Tiermodellen ist dafür unabdingbar. In der vorliegenden Dissertation werden sowohl Verhaltensänderungen als auch biochemische sowie physiologische Parameter zu modellspezifischen Zeitpunkten des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells nach BRANDT et al. (2003) bei Ratten



---

erfasst und evaluiert. Die angewandten Methoden wurden standardisiert, um einen modellübergreifenden Vergleich der Belastungen von Tieren in Epilepsiemodellen zu ermöglichen. Basierend auf den modellübergreifenden Ergebnissen soll eine transparente Empfehlung für die Priorisierung von Epilepsiemodellen für Behörden und Wissenschaftler erarbeitet werden. Ein weiteres Ziel ist die Identifizierung von Parametern, die für eine Routineüberwachung bei Tiermodellen mit Epilepsie angewendet werden können. Damit soll eine Abschätzung der Belastung der Tiere ermöglicht werden, um schließlich den Tierschutz in der Epilepsieforschung nachhaltig zu fördern.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Epilepsien

#### 1.1. Definition und Prävalenz

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE), 1909 gegründet, hat gemeinsam mit dem Internationalen Büro für Epilepsie (*International Bureau for Epilepsy*, IBE) 2005 eine offizielle Definition für Epilepsie und epileptische Anfälle für den humanmedizinischen Bereich veröffentlicht (FISHER et al. 2005). Als *Epilepsie* bezeichnet wird demnach eine Störung (*disorder*) des Gehirns mit einer dauerhaften Prädisposition, epileptische Anfälle zu generieren. Diese Störung kann in neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Begleiterscheinungen resultieren. Ein epileptischer Anfall ist ein transientes Ereignis mit Symptomen einer übersteigerten oder synchronen Aktivität des neuronalen Netzwerkes. Aufgrund von Schwierigkeiten bezüglich der Praktikabilität dieser Definition hat die ILAE 2014 diesbezüglich Modifikationen vorgenommen (FISHER et al. 2014). Demzufolge wird Epilepsie nicht mehr als Störung, sondern als Krankheit (*disease*) definiert. Eine Epilepsieerkrankung nach der ILAE liegt dann vor, wenn ein Individuum:

- a) zwei nicht provozierte Anfälle in einem Abstand von mehr als 24 Stunden zeigt,
- b) nach einem nicht provozierten Anfall mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 60 % innerhalb der nächsten zehn Jahre einen weiteren Anfall erleidet oder
- c) mit Epilepsie diagnostiziert wurde.

Darüber hinaus wird die Krankheit Epilepsie als überwunden anerkannt, wenn der Patient entweder dem Alter einer altersabhängigen Epilepsie entwachsen ist oder zehn Jahre mit Antiepileptika, respektive fünf Jahre ohne eine Einnahme von Antiepileptika anfallsfrei ist.

Im Hinblick auf die Veterinärmedizin hat der Internationale veterinärmedizinische Arbeitsausschuss für Epilepsie (*International Veterinary Epilepsy Task Force*, IVETF) die Begrifflichkeiten der caninen Epilepsie definiert, um eine standardisierte Terminologie in der Praxis und der Wissenschaft zu sichern (BERENDT et al. 2015). Demnach wird Epilepsie analog zu der humanmedizinischen Definition als Krankheit des Gehirns bezeichnet, charakterisiert durch eine dauerhafte Prädisposition, epileptische Anfälle zu generieren. Ein Tier gilt als an Epilepsie erkrankt, wenn mindestens zwei nicht provozierte epileptische Anfälle mit einem Mindestabstand von 24 Stunden aufgetreten sind. Weiterhin differenziert die IVETF zwischen reaktiven Anfällen, allen paroxysmalen

Veränderungen und epileptischen Anfällen im Speziellen. Epileptische Anfälle sind nicht provozierte synchrone Erregungszustände des Gehirns, die sich in meist selbstlimitierenden kurzen Ereignissen mit unkontrollierbaren motorischen Dysfunktionen und Verhaltensveränderungen äußern (FISHER et al. 2005).

Beim Menschen liegt die Prävalenz der Epilepsie schätzungsweise zwischen 0,4 und 1 % (PITKANEN u. LUKASIUK 2009; PACKER et al. 2014). In den USA sind ca. 2,2 Millionen Menschen erkrankt und jährlich werden 150 000 Menschen neu mit Epilepsie diagnostiziert (England 2012). Die medizinischen Behandlungskosten belaufen sich dabei auf 9,6 Milliarden US-Dollar pro Jahr.

In der Veterinärmedizin stellt Epilepsie bei Hunden mit 0,6 – 0,75 % die häufigste neurologische Erkrankung dar (PACKER u. VOLK 2015). Die Prädisposition, an Epilepsie zu erkranken, ist rassespezifisch (HULSMeyer et al. 2015). HESKE et al. (2014) erhoben in einer Studie, dass 0,42 % aller in Schweden versicherten Hunde zwischen 1995 und 2006 aufgrund von Epilepsie euthanasiert wurden oder daran verstorben sind. Auch bei Katzen stellt Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen dar (SMITH BAILEY u. DEWEY 2009).

## 1.2. Klassifizierung

Epilepsie ist ein heterogenes Krankheitsbild (PITKANEN et al. 2015; BEHR et al. 2016). Um einerseits eine geeignete Therapiewahl und eine Prognose über den Krankheitsverlauf des einzelnen Patienten treffen zu können und andererseits die potentiellen Auslöser von Anfällen und Begleiterscheinungen vorhersagen zu können, ist eine Klassifizierung unerlässlich.

Für die Humanmedizin aktualisierte die ILAE die Klassifizierung von 1981 im Jahr 2017 auf den neusten wissenschaftlichen Stand (SCHEFFER et al. 2017). Die Diagnostik beruht auf den klinischen Symptomen während des Anfalls. Aufzeichnungen des Elektroenzephalogramms (*electroencephalogram*, EEG) haben eine unterstützende Funktion (ILAE 2018). Das nun dynamische Klassifizierungssystem für die Diagnostik von Epilepsiesyndromen stellt ein klinisches Schlüsselinstrument in drei Ebenen dar, um die Anfälle eines Individuums adäquat bewerten und in das Krankheitsbild Epilepsie einordnen zu können. Als Erstes wird der Anfallstyp durch seinen Ursprung bestimmt: *fokal*, *generalisiert* oder *unbekannt*. *Fokal* beschreibt eine Anfallsentstehung limitiert auf eine Hemisphäre, *generalisiert* bedeutet, dass der Anfall bilateral in den Hemisphären entstanden ist (Berg 2010). Im nächsten Schritt wird der Epilepsietyp basierend auf den vorhandenen Anfallstypen diagnostiziert. Der Epilepsietyp kann sich im Hinblick auf fokale, generalisierte, kombiniert generalisierte und fokale sowie unbekannte Epilepsie

unterscheiden. Die 2017 neu hinzugefügte Gruppe der kombinierten Epilepsie erfasst Patienten, die fokale und generalisierte Anfälle aufweisen. Abschließend wird, ausgehend von dem Epilepsietyp, dem Alter beim ersten Anfall und weiteren Informationen, gegebenenfalls eine Diagnose bezüglich eines Epilepsiesyndroms gestellt. Dies kann dabei helfen, die Ätiologie der Erkrankung besser einzuschätzen und die geeigneten Antiepileptika zu wählen. Die ILAE hat keine formale Klassifikation bezüglich Epilepsiesyndromen veröffentlicht (SCHEFFER et al. 2017). Anerkannte Epilepsiesyndrome sind beispielsweise das Lennox-Gastaut-Syndrom oder das Dravet-Syndrom (ILAE 2018).

In der Veterinärmedizin wird die canine Epilepsie auf Basis des ätiologischen Ursprungs und des Anfallstyps klassifiziert (BERENDT et al. 2015). Somit kann eine bei Hunden in der Regel nicht praktikable EEG-Ableitung und die Kenntnisse über das Bewusstsein während des Anfalls bei der Klassifizierung vernachlässigt werden. Aus ätiologischer Sichtweise werden die idiopathische Epilepsie und die strukturelle Epilepsie unterschieden. Die idiopathische Epilepsie wird in drei Subgruppen untergliedert: genetische Epilepsie mit einem Gendefekt, Verdacht auf genetische, stammbaumassoziiert Epilepsie und Epilepsie mit unbekannter Herkunft. Die strukturelle Epilepsie hingegen wird durch pathologische Veränderungen, unter anderem bedingt durch Infektionen, Entzündungsgeschehen oder Traumata, ausgelöst.

### 1.3. Komorbiditäten

Epilepsieerkrankte Menschen und Tiere benötigen in der Regel eine chronische Behandlung mit Antiepileptika. Die zu diesem Zeitpunkt existierenden Antiepileptika können die Generierung von epileptischen Anfällen unterdrücken. Dabei verhindern diese jedoch nicht den progressiven Fortschritt der Epileptogenese (LOSCHER 2002). Bei 30 % aller mit Antiepileptika behandelten Patienten kann allerdings aufgrund einer Pharmakoresistenz gegenüber den aktuell verfügbaren Antiepileptika keine Anfallsfreiheit erreicht werden (WORLD-HEALTH-ORGANIZATION 2019).

Die Lebensqualität von Patienten wird durch die Erkrankung an Epilepsie und die daraus resultierende eingeschränkte Teilnahme am aktiven Leben gemindert (DEVINSKY et al. 1995; ELGER et al. 2017). Ein hohes Verletzungsrisiko bis hin zu einem plötzlichen, unerwarteten Versterben während des Anfalls als häufigste Todesursache (*sudden unexpected death in epilepsy*, SUDEP) stellt bei Epileptikern eine allgegenwärtige Belastung dar (LAMBERTS et al. 2012). Auch die Unvorhersehbarkeit der Anfälle schränkt die Patienten im täglichen Leben ein (MCKEE u. PRIVITERA 2017). Weitere auftretende Komorbiditäten können die Lebensqualität von Patienten mit Epilepsie merklich beeinträchtigen. In der Humanmedizin sind neurobiologische, kognitive und psychologische

Krankheitsbilder anerkannte Begleiterscheinungen bei Patienten mit Epilepsie. Daher wurden diese 2005 in der Definition von Epilepsie der ILAE inkludiert (FISHER et al. 2005; FISHER et al. 2014). Die häufigsten Begleiterscheinungen sind Stimmungsschwankungen, Angststörungen und Depressionen (KANNER 2017), aber auch motorische Defizite, Schlafstörungen, Autismus und gastrointestinale Veränderungen wurden erfasst (PITKANEN et al. 2015; SCHEFFER et al. 2017). Komorbiditäten können den Verlauf der Epileptogenese beeinflussen. Sie korrelieren positiv mit einem erhöhten Risiko einer Entwicklung einer pharmakoresistenten Epilepsie (HITIRIS et al. 2007; PETROVSKI et al. 2010; KANNER 2017).

In der Veterinärmedizin sind emotionale und kognitive Begleiterscheinungen bei an Epilepsie erkrankten Hunden bisher zwar nur geringfügig untersucht (PACKER u. VOLK 2015). Dennoch gibt es Studien, die ein erhöhtes Angst- und Aggressionsverhalten auch bei Hunden mit Epilepsie erfassen (SHIHAB et al. 2011). Für die Besitzer hat der Erhalt einer guten Lebensqualität oft eine höhere Priorität, als eine Anfallsfreiheit zu erreichen (HULSMeyer et al. 2015). Der Alltag vieler Patientenbesitzer wird durch die lebenslange medizinische Versorgung ihrer Hunde und die Unvorhersehbarkeit der Anfälle ihrer Tiere beeinträchtigt.

Um die Belastung durch die Epilepsie zu minimieren, ist es notwendig, die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Epileptogenese und Iktogenese zu verstehen (POTSCHKA u. BRODIE 2012). Der Begriff *Epileptogenese* bezeichnet die neuronalen und molekularen Prozesse, die ab einer initialen Gehirnschädigung einsetzen und zu der Ausbildung von epileptischen Anfällen führen (PITKANEN u. LUKASIUK 2009). Als *Iktogenese* wird die Anfallsentstehung bezeichnet. Aufbauend auf den Kenntnissen über die zugrundeliegenden Mechanismen der Erkrankung, beschäftigen sich viele Wissenschaftler fortlaufend mit der Entwicklung neuer Therapieansätze (SHARMA et al. 2018).

#### **1.4. Relevanz und Anforderungen an Tiermodellen in der Epilepsieforschung**

Das übergreifende Ziel der Epilepsieforschung ist es, die pathologischen Mechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene zu verstehen. Darauf aufbauend können dann neue therapeutische Zielstrukturen für die Behandlung und Vorbeugung von epileptischen Anfällen, Komorbiditäten und der Epileptogenese bestimmt werden (LIDSTER et al. 2016; PITKÄNEN et al. 2017).

Neben Tiermodellen wird in der In-vitro-Forschung auch mit Hippocampus-Zellkulturen gearbeitet. Bei einer chirurgischen Intervention bei Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie können die Hippocampusbiopsien für Kulturen gewonnen werden. Diese pharmakoresistenten Hippocampuskulturen unterliegen einer hohen Heterogenität sowohl

bei der Iktogenese, als auch der Epileptogenese. Die erhöhte Varianz der Kulturen erschwert die Auswertung der Ergebnisse (PITKANEN u. LUKASIUK 2009; A. J. BECKER 2018). Zudem kann in diesen Proben kein systemischer Effekt der Erkrankung berücksichtigt werden. Eine Bestätigung der Erkenntnisse in Tiermodellen als nächste Ebene ist unabdingbar (PITKANEN et al. 2015). Tiermodelle ermöglichen bei einem homogenen Insult Einblicke in die pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese, der epileptischen Anfälle und der Komorbiditäten von Patienten mit Epilepsie (LIDSTER et al. 2016). In den letzten achtzig Jahren wurden durch die Verwendung verschiedener Tiermodelle in der Epilepsieforschung fundamentale Erkenntnisse über die pathophysiologischen Mechanismen der Epileptogenese und Iktogenese gewonnen (LOSCHER 2011). Bei der Entwicklung neuer Antiepileptika stellen Tiermodelle, meist an Mäusen oder Ratten, bisher noch eine Notwendigkeit dar (LOSCHER 2011).

An Tiermodelle werden hohe Anforderungen gestellt, da sie das Krankheitsbild des Menschen möglichst exakt abbilden sollen. Bei Epilepsie im Speziellen handelt es sich dabei um das klinische Erscheinungsbild, die Pharmakokinetik sowie die EEG- und pathophysiologischen Modifikationen (LOSCHER 2017). In den chronischen Modellen wird zudem eine hohe Anfallsfrequenz gefordert (BARKER-HALISKI et al. 2015). Schließlich kann durch eine Reduktion der Anfallsfrequenz eine angewendete Medikation auf ihre Wirksamkeit überprüft werden. Keines der derzeit verfügbaren Tiermodelle kann den Anforderungen vollständig gerecht werden. Daher ist es relevant, ein Tiermodell zu wählen, das im Hinblick auf die entsprechende Fragestellung am besten geeignet ist (PITKANEN u. LUKASIUK 2011; LOSCHER 2017).

In der tierexperimentellen Forschung wird grundlegend zwischen Modellen für Epilepsie und Modellen für epileptische Anfälle unterschieden (LOSCHER 2011). Bei Anfallsmodellen wird akut ein epileptischer Anfall chemisch (Pentylentetrazol) oder elektrisch (*maximal electroshock seizure*, MES) induziert. Epilepsiemodelle hingegen sind chronische Modelle und werden durch spontane, wiederkehrende epileptische Anfälle charakterisiert. Dabei liegt den spontanen Anfällen ein verändertes neuronales Netzwerk zugrunde. Dieses wird, durch einen chemischen oder elektrischen Insult in gesunden Tieren ausgelöst oder ist genetisch in transgenen Tieren (Dravet-Syndrom, GAERS) bedingt. Chronische Modelle werden bei Fragestellungen bezüglich der Epileptogenese verwendet. Akute Modelle werden derzeit unter anderem für die Vorselektion von neuen potentiellen Antiepileptika eingesetzt (LOSCHER 2011). Die Erforschung von pharmakoresistenten Epilepsien und deren Behandlungen mit neuen Antiepileptika benötigen chronische Modelle mit spontanen Anfällen oder Modelle mit wiederholtem Auslösen von Anfällen und keine akuten Modelle (LOSCHER 2002; POTSCHKA 2012).

### 1.5. Temporallappenepilepsie und deren Tiermodelle

Temporallappenepilepsie (*temporal lobe epilepsy*, TLE) ist mit 62,2 % die beim Menschen häufigste Form von fokaler Epilepsie (BEHR et al. 2016; A. J. BECKER 2018). Sie wird als eine progressive Erkrankung beschrieben (PITKANEN et al. 2015). Die fokalen oder generalisierten epileptischen Anfälle haben dabei ihren Ursprung in den Temporallappen (Schläfenlappen). Diese breiten sich bei generalisierten Anfällen über beide Hemisphären aus (A. J. BECKER 2018). Als Folge stellen Sklerosen im Hippocampus sowie neuropathologische Veränderungen der Hippocampusformation die häufigste Konsequenz der TLE dar (A. J. BECKER 2018). Der Hippocampus ist neben der Amygdala ein Teil des limbischen Systems. Er übernimmt die Aufgabe der Überführung von dem Kurz- in das Langzeitgedächtnis durch die Ausbildung neuer Verbindungen zwischen vorhandenen Nervenzellen (Synaptische Plastizität). Damit trägt der Hippocampus maßgeblich zu Lernprozessen und der Gedächtnisfunktion bei (NISSINEN et al. 2000). Liegt eine Beeinträchtigung der Neuronen im Hippocampus vor, kann es zu einer Störung der Lernprozesse und Gedächtnisfunktionen kommen (NANINCK et al. 2015). Bereits erlernte Inhalte bleiben jedoch bestehen, dies wird als anterograde Amnesie bezeichnet. Die Amygdala, auch *Mandelkern* oder *Corpus amygdaloideum* genannt, stellt einen kontralateralen Komplex aus Kerngebieten des Limbischen Systems dar. Sie umfasst das Gebiet der Nuclei centralis und medialis, des basolateralen Komplexes (basolaterale Amygdala, BLA) und des Nucleus corticalis (JANAK u. TYE 2015). Über die Amygdala werden die Entstehung und die Äußerungen von Emotionen reguliert. Im Speziellen ist hier die Angst- und Furchtreaktion zu nennen. Bereits 1936 zeigten Klüver und Bucy durch eine bilaterale Temporallappenektomie bei Rhesusaffen einen Zusammenhang zwischen dem Verhalten und der Gedächtnisleistung mit dem Amygdalakomplex und dem Hippocampus (KLÜVER u. BUCY 1997). Die Tiere zeigten eine reduzierte Aggressivität, weniger Furcht und ein reduziertes Verteidigungsverhalten nach der Temporallappenektomie. Weitere Emotionen wie Wut oder Freude und der Sexualtrieb werden ebenfalls über die Amygdala reguliert. PITKANEN et al. (1998) legten bereits dar, dass bei 10 – 30 % der an TLE erkrankten Kinder und Erwachsenen eine uni- oder bilaterale Schädigung der Amygdala nach einem SE vorzufinden ist. Im Einzelnen ist die BLA durch Neuronenverluste und eine Gliosis, also eine Vermehrung der Gliazellen, geprägt (PITKANEN u. LUKASIUK 2009).

Die in der Wissenschaft aktuell am weitesten verbreiteten chronischen Tiermodelle (bei Ratten) für TLE sind das Amygdala-Kindling-Modell und Post-Status-Epilepticus-Modelle (Post-SE-Modelle) (LOSCHER 2002; A. J. BECKER 2018). Das Kindling-Modell beschreibt eine regelmäßige, fokale elektrische Stimulation von einer limbischen Struktur, in der Regel der Amygdala, wodurch bei einer minimalen Stromschwelle epileptische Anfälle induziert werden (GODDARD 1967). Die Schwere und Dauer der Anfälle nehmen mit zu-

nehmender Stimulation zu und die Empfindlichkeit gegenüber der elektrisch induzierten Krampfschwelle wird dauerhaft erniedrigt. Das Kindling-Modell kann für Untersuchungen der beginnenden induzierten Epileptogenese, der Zunahme der Anfallsschwere und deren Schwellenbestimmung sowie zur Untersuchung des direkten Bezuges zwischen dem Verhalten und einem Anfall herangezogen werden (J. A. GORTER et al. 2016).

Post-Status-Epilepticus-Modelle werden durch spontane wiederauftretende Anfälle in ursprünglich gesunden Tieren charakterisiert, denen ein provoziertes verlängerter Status epilepticus (SE) und eine folgende Latenzphase zugrunde liegen (LOSCHER 2002). Der chronische Krankheitsverlauf in diesen Modellen kann im Speziellen in drei Phasen untergliedert werden (WALKER et al. 2016):

- 1) der akute SE als initialer Insult der Erkrankung mit einer folgenden Post-Insult-Phase;
- 2) die Latenzphase mit der Epileptogenese;
- 3) die chronische Phase mit spontanen Anfällen und deren Iktogenese.

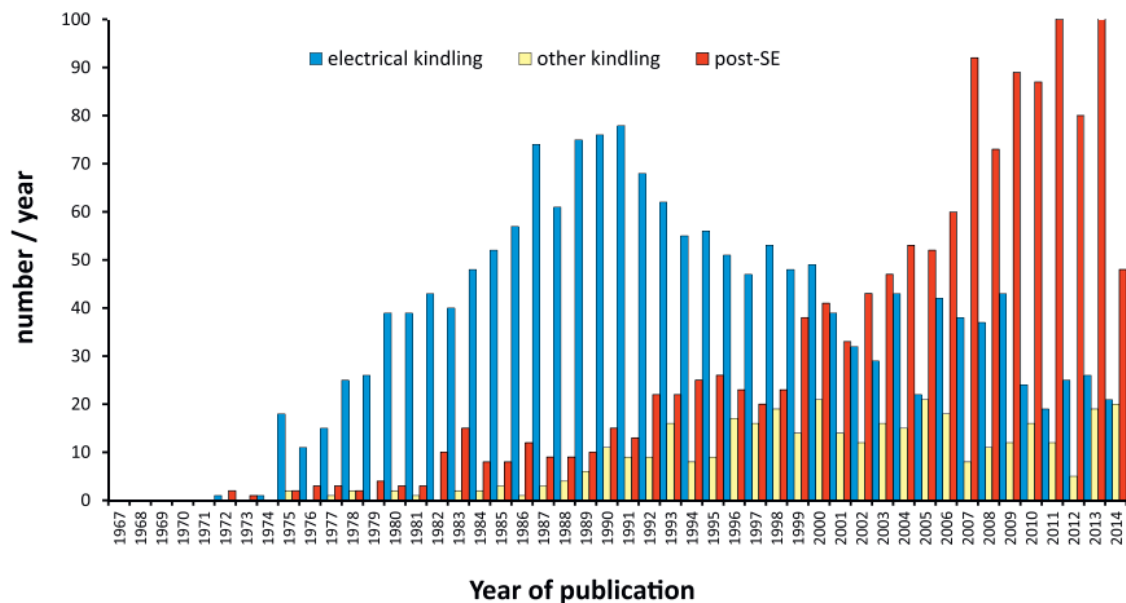
Der selbsterhaltende Status epilepticus (*self-sustained status epilepticus*, SSSE) wird abhängig von dem zugrundeliegenden Tiermodell chemisch durch Chemokonvulsiva oder elektrisch über eine Tiefenstimulationselektrode ausgelöst. Der SSSE kann nach einer gewünschten Zeitspanne mit Diazepam abgestoppt werden (LOSCHER 2002). Dabei kann die Anfallsschwere des SSSE nach BRANDT et al. (2003) als SE-Typ I-III eingeteilt werden. Dies dient als prädiktiver Faktor für die Ausbildung von spontanen Anfällen in der chronischen Phase (BRANDT et al. 2003). Als Resultat des verlängerten SE findet eine Temporallappenschädigung statt. Vor allem die Amygdala, aber auch der Hippocampus ist von den Veränderungen im Zuge der Epileptogenese betroffen (LOSCHER 2002). Das neuronale Netzwerk verändert sich auf zellulärer und molekularer Ebene und dies führt schließlich nach einer Latenzphase zu eigenen spontanen Anfällen während der chronischen Phase (POTSCHKA 2012). Analog zu der TLE bei humanmedizinischen Patienten entstehen Anfälle im Modell primär fokal im Temporallappen. Sie können sich als sekundär generalisierte Anfälle über die Hemisphären ausbreiten (LOSCHER 2002). Seit Beginn der 1990er Jahre steigt die Anzahl an Publikationen über Post-SE-Modelle gegenüber den Publikationen über das Kindling-Modell an (Abbildung (Abb.) 1.) (J. A. GORTER et al. 2016). Post-SE-Modelle bieten während der Latenzphase einen eingrenz- baren Zeitraum für die Untersuchung der Epileptogenese und das Testen von möglichen antiepileptogenen Medikamenten. Die Epileptogenese in dem elektrischen Modell umfasst mit durchschnittlich 49 Tagen bis zu dem Auftreten des ersten Anfalls einen deutlich längeren Zeitraum als in den chemischen Modellen (J. A. GORTER et al. 2016). Dies simuliert die teilweise Jahre andauernde Epileptogenese bei Humanpatienten. Mit diesem verlängerten Zeitraum in dem elektrischen Post-SE-Modell wird ein längerer Applikations-



intervall für die Erforschung der Epileptogenese gewährleistet (BRANDT et al. 2003; J. A. GORTER et al. 2016). Weiterhin können die Post-SE-Modelle in der chronischen Phase für Pharmakoresistenz-Studien und die Entwicklung von Antiepileptika verwendet werden (LOSCHER 2011; J. A. GORTER et al. 2016).

*J.A. Gorter et al. / Journal of Neuroscience Methods xxx (2015) xxx-xxx*

### Kindling and post-SE publications 1967 -2014



**Abbildung 1:** Anzahl der Publikationen in der TLE-Forschung pro Jahr von 1967 bis 2014. Farbige Balken stellen die verschiedenen Tiermodelle dar: elektrische Kindling-Modelle (blau), andere Kindling-Modelle (gelb) und Post-Status-Epilepticus-Modelle (rot). Abbildung nach J. A. GORTER et al. (2016) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier

Pilocarpin oder Kainsäure können durch die vorwiegend einmalige systemische oder fokale Applikation einen SE induzieren. Kainsäure bindet an einem Subtyp der Glutamatrezeptoren und wirkt stark exzitatorisch (LOSCHER 2002). Pilocarpin hingegen wirkt als Agonist gegenüber den Acetylcholin-Rezeptoren des muscarinergen Typs und hat eine stark cholinerge Wirkung. Das Pilocarpin-Modell ist mit verschiedenen Modifikationen eines der am häufigsten genutzten Tiermodelle in der Epilepsieforschung (BRANDT et al. 2016; LIDSTER et al. 2016). Die Prämedikation des Antagonisten Lithium-Methylscopolamin zwölf Stunden vor der Pilocarpin-Applikation hebt die periphere cholinerge Wirkung von Pilocarpin auf und potenziert die konvulsive Aktivität (BRANDT et al. 2016). Folglich kann in dem Lithium-Pilocarpin-Modell eine geringere Dosis an Pilocarpin eingesetzt und somit eine verminderte Mortalitätsrate erzielt werden (WOLF et al. 2016).

Die elektrisch induzierten Post-Status-Epilepticus-Modelle wurden basierend auf dem Kindling-Modell weiterentwickelt: MCINTYRE et al. (1982) stimulierten Wistar-Ratten, die zuvor eine Kindling-Prozedur durchlaufen hatten für 60 Minuten lang und erreichten dabei einen elektrisch induzierten SE in den Ratten. Aufbauend auf dieser Erkenntnis entwickelten BRANDT et al. (2003) das elektrische Post-SE-Modell mit verschiedenen Modifikationen weiter. Brandt und Kollegen stimulierten zuvor nicht stimulierte weibliche Sprague-Dawley-Ratten 25 Minuten mit 700  $\mu$ A in der BLA. In dieser Ausführung konnte der höchste Prozentsatz an Tieren mit einem Typ III SSSE erzielt werden. Weiterhin konnten BRANDT et al. (2003) bei 83 % der stimulierten Ratten spontane Anfälle in der chronischen Phase detektieren. Um die Mortalität nach dem SE zu reduzieren, ist die Verwendung von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Gegensatz zu männlichen Tieren zu empfehlen (BRANDT et al. 2003). Zusätzlich konnten Brandt und Kollegen zeigen, dass die Veränderungen des neuronalen Netzwerkes der Ratten der Neurodegeneration bei pharmakoresistenten Patienten der Humanmedizin entsprechen. Zwei Tage nach dem SE konnten WALKER et al. (2016) eine ausgeprägte Neurodegeneration im Hippocampus darstellen. Immun- und Inflammationsprozesse waren während der Post-Insult- und Latenzphase überrepräsentiert, in der chronischen Phase lagen dagegen neurodegenerative und proliferative Signalwege vor.

In den heute verwendeten elektrischen Post-SE-Modellen wird in der Regel als Erstes eine Tiefenstimulationselektrode in die Amygdala oder den Hippocampus implantiert (LOSCHER 2002, 2017). Diese kann gleichzeitig sowohl für die Stimulation als auch für eine Ableitung im Rahmen der EEG-Überprüfung verwendet werden (NISSINEN et al. 2000; JA GORTER et al. 2001). In verschiedenen Modifikationen des elektrischen Post-SE-Modells werden abhängig von der Gehirnregion der Implantation unterschiedliche Effekte provoziert: Bei im Hippocampus stimulierten Post-SE-Tieren ist bekannt, dass sie eine deutlich aggressivere und sensiblere Reaktion auf sensorische Stimulation zeigen (J. A. GORTER et al. 2016). Weiterhin bildeten die Hippocampus stimulierten Tiere im Vergleich zu den Tieren, die über die Amygdala stimuliert wurden, in der chronischen Phase weniger spontane Anfälle aus (NISSINEN et al. 2000; JA GORTER et al. 2001). Darüber hinaus hat die Hemisphäre der Elektrodenimplantation in die rechte oder linke BLA einen Einfluss auf Verhaltensänderungen, wie es bereits im Kindling-Modell demonstriert wurde (KALYNCHUK et al. 1998; BARNES u. PINEL 2001). In der vorliegenden Studie soll die Belastung der Tiere in dem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell nach BRANDT et al. (2003), als ein Beispiel der elektrischen Post-SE-Modelle, untersucht werden.

## 2. Belastungseinschätzung in Tierversuchen

### 2.1. Ethik von Tierversuchen

Die Anwendung von Tierversuchen in der biomedizinischen Forschung ist ein stetig diskutiertes Thema. Insbesondere die Einstellung des Menschen gegenüber den Tieren sowie der Umgang mit diesen ist Gegenstand der Tierethik (SCHMIDT 2011). In § 1 des deutschen Tierschutzgesetzes wird der Mensch aktiv in die Verantwortung gezogen, Tiere als Mitgeschöpf anzusehen und zu schützen (2006): „Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“ (Tierschutzgesetz § 1 Satz 2). Es wird eine Gleichstellung der Tiere gefordert. Im darauffolgenden Satz wird das Tier dem Menschen allerdings untergeordnet. Der Mensch darf mit einem für ihn vernünftigen Grund als Voraussetzung Tieren Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen. Demnach nimmt der Mensch eine gesetzlich festgelegte Sonderstellung gegenüber den Tieren ein. Das Wohlbefinden von Tieren als leidensfähigen Lebewesen hängt von der Entscheidungsgewalt des Menschen ab, über die Definition eines vernünftigen Grundes zu urteilen. Die Rahmenbedingungen dieser Entscheidungsgewalt sind in der EU-Richtlinie 2010/63/EU verankert (EUROPEAN-UNION 2010). Diese Richtlinie strebt eine Harmonisierung der geltenden Rechtslagen der einzelnen Mitgliedstaaten an. Zentraler Bestandteil dieser Richtlinie sind die Etablierung und Umsetzung des sogenannten 3R-Prinzips in Tierversuchen. Ziele des 3R-Prinzips sind das Ersetzen von Tierversuchen durch Alternativmethoden (*Replacement*), die Minderung der Anzahl an Versuchstieren (*Reduction*) und die Verbesserung der Durchführung von Tierversuchen im Sinne des Tierwohls (*Refinement*) (SYKES et al. 2012). Das 3R-Prinzip wurde bereits von RUSSELL u. BURCH (1959) beschrieben und ist heute im deutschen Gesetz sowohl in der Tierschutzversuchstier-Verordnung (TierSchVersV) (TIERSCHUTZ-VERSUCHSTIER-VERORDNUNG 2013), welche die EU-Richtlinie 2010/63/EU in deutsches Recht umsetzt, als auch im fünften Abschnitt des Tierschutzgesetzes, § 7 und 7a, verankert. Der NATIONAL RESEARCH COUNCIL (2010) stellte einen Leitfaden zur aktiven Ausführung des 3R-Prinzips vor, um Tierversuche auf ein vernünftiges Maß zu reduzieren. 2002 wurde der Tierschutz im Grundgesetz Art. 20a verankert: „Der Staat schützt auch in Verantwortung für die künftigen Generationen die natürlichen Lebensgrundlagen *und die Tiere* (Hervorhebung durch die Verfasserin) im Rahmen der verfassungsmäßigen Ordnung durch die Gesetzgebung (...).“ Folglich wurde der Tierschutz mit der Verhältnismäßigkeit von Tierversuchen auf eine Rechtsebene gestellt (BORCHERS u. LUY 2009).

Um Tierversuche nach geltendem Recht durchzuführen, muss für jedes Experiment ein

Tierversuchsantrag bei der zuständigen Genehmigungsbehörde gestellt und dieser von ihr grundlegend geprüft werden. Im Antrag muss der angestrebte Erkenntnisgewinn dargelegt und hinsichtlich Verhältnismäßigkeit bewertet werden. Hierfür wird der Nutzen des Versuchszwecks gegen die zu erwartenden Schäden der Tiere abgewogen (BORCHERS u. LUY 2009). Im Einzelnen wird hinterfragt, inwiefern der Erkenntnisgewinn für den wissenschaftlichen Fortschritt notwendig ist und ob er in Bezug auf die zu erwartenden Schäden der Tiere in einem ethisch vertretbaren Verhältnis steht (§ 7a Abs. 2 Satz 3). Ebenfalls muss die Möglichkeit der Durchführung von Alternativmethoden geprüft werden.

Im Sinne des *Refinements* soll die Belastung von Tieren in Tierversuchen erfasst, bewertet und reduziert werden. Im engeren Sinne kann zwischen der experimentellen Belastung und der haltungsbedingten Belastung der Tiere differenziert werden (GAUTHIER u. GRIFFIN 2005). Nach der Richtlinie 2010/63/EU Art. 15 ist bei Antragstellung die Einstufung in das vierstufige Belastungsschema obligatorisch. Die Abstufungen der Belastung sind hierbei als „gering“, „mittel“, „schwer“ oder „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ eingeteilt (EUROPÄISCHES-PARLAMENT 2010). Der Anhang VIII der Richtlinie definiert die Schweregrade näher und gibt Anleitungen für die Schweregradbeurteilung (FORSCHUNG 2010). Verfahren, die dauerhaft „starke Schmerzen, schwere Leiden oder schwere Ängste“ (2010/63/EU Art. 15 Abs. 2) hervorrufen, sind nicht durchzuführen:

*„Aus ethischer Sicht sollte es eine Obergrenze für Schmerzen, Leiden und Ängste geben, die in wissenschaftlichen Verfahren nicht überschritten werden darf. Hierzu sollte die Durchführung von Verfahren, die voraussichtlich länger andauernde und nicht zu lindern- de starke Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste auslösen, untersagt werden.“*

Die TierSchVersV greift das Ziel des *Refinements* in § 31 Abs. 2b auf, indem die Einstufung des Schweregrades „wissenschaftlich begründet darzulegen“ ist. Demnach wird eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung eingefordert. Zusätzlich ist bei der Belastungseinstufung die Berücksichtigung von artspezifischen Verhaltensweisen und Bedürfnissen unverzichtbar (Tierschutzgesetz § 7a Abs. 2 Satz 4 und 5). Je nach artspezifischen Fähigkeiten kann eine Spezies mehr oder weniger unter speziellen Situationen leiden als eine andere. Artspezifische Fähigkeiten bilden somit die Basis für eine Belastungseinstufung eines Tierversuches. Eine Reduktion von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren ist nicht nur in Bezug auf die Tierethik sinnvoll, sondern auch aus wissenschaftlicher Sicht. Stress vor oder während eines Experimentes kann zu unspezifischen Effekten und endokrinologischen oder immunologischen Veränderungen führen (BAUMANS 2005). Dies kann in einer erhöhten Varianz innerhalb der Tiergruppe resultieren (GAUTHIER u. GRIFFIN 2005). Weitergehend führt eine erhöhte Varianz innerhalb der Tiergruppen dazu, dass die Gruppengröße erweitert werden muss, um statistische Unterschiede errechnen zu können. Dies widerspricht dem Prinzip der *Reduction*. Eine

Minderung von Schmerzen bei Labortieren ist somit aus wissenschaftlicher und ethischer Sicht essentiell (BAUMANS 2005). Die Reduktion von Schmerzen setzt eine Erfassung der jeweiligen Schmerzbelastung anhand von Messmethoden voraus. Die Messung und Einschätzung von Schmerzen bei Tieren stellen oft eine Herausforderung dar, da diese ihre Schmerzen und ihr Leiden nicht offensichtlich zeigen, um sich vor möglichen Angreifern zu schützen (JIRKOF et al. 2010). Daher ist die Beschreibung des emotionalen Zustandes eines Tieres immer nur annäherungsweise möglich.

Quantifizierbare Parameter und somit geeignete Messmethoden für die Klassifikation des Schweregrades nach der EU-Richtlinie sind zum aktuellen Zeitpunkt nicht ausreichend erfasst (HAGER et al. 2015). Daher ist es von äußerster Dringlichkeit, den Grad der Schmerzen, Leiden und Schäden, die durch Tierversuche entstehen, näher zu definieren (HAGER et al. 2015). Eine evidenzbasierte Belastungseinstufung mit geeigneten Parametern und Messmethoden ist notwendig, um im Sinne der aktuellen Gesetzeslage Tierversuche durchzuführen sowie der moralischen Sonderstellung des Menschen gerecht zu werden.

## 2.2. Stress und Belastung

Tierversuche dürfen nur durchgeführt werden, wenn es keine adäquate Alternative gibt und die Bedeutung des Erkenntnisgewinns das Leiden der Tiere rechtfertigt (BAUMANS 2005). Wissenschaftler müssen daher in der Lage sein, Schmerzen und Stress der Versuchstiere zu erkennen und zu vermeiden (BAUMANS et al. 1994). Der emotionale Zustand von Tieren, somit auch das Leiden und Stress, kann immer nur annäherungsweise beschrieben werden (LIDSTER et al. 2016). Kenntnisse über die physiologischen Mechanismen des Organismus in Bezug auf Stress stellen dafür eine notwendige Voraussetzung dar.

Bereits SELYE (1936a) entdeckte pathophysiologische Anpassungsreaktionen (*General Adaptation Syndrome*) des Organismus auf Stressoren und gilt damit als Begründer der Stressforschung. In dem dreistufigen Adaptationssyndrom beschreibt SELYE (1936a) erstens die Phase der unspezifischen Alarmreaktion auf physische oder psychische Stressoren, zweitens das Widerstandsstadium, um den Stressor zu überwinden, und schließlich das Erschöpfungsstadium. Letzteres ist charakterisiert durch die Minimierung der aufzuwendenden physiologischen Ressourcen, falls der Stressor nicht bewältigt werden konnte (SELYE u. FORTIER 1950; DAVIES 2016). Stressoren können Umwelteinflüsse oder Reize darstellen, die zu einer Imbalance der Homöostase des Organismus führen können (MOSTL u. PALME 2002). CANNON (1929) prägten den Begriff der Homöostase für die selbstregulierte Aufrechterhaltung von dynamischen Systemen,

wie dem des Hormonhaushaltes. Passt sich das Gleichgewicht des Ausgangszustands an äußere Faktoren wie Stress an, wird dies als *Allotase* bezeichnet (MCEWEN 1998; DAVIES 2016). Stress kann bei Menschen mit Epilepsie einen Auslöser für einen epileptischen Anfall darstellen (MCKEE u. PRIVITERA 2017). Dabei zeigten NOVAKOVA et al. (2017) kürzlich, dass die subjektive Stresseinschätzung der Patienten nicht mit den pathologischen Veränderungen übereinstimmt, die durch epileptische Anfälle und Stress ausgelöst werden. Allerdings ist zwischen positiven Erfahrungen, dem Eustress, und den negativ assoziierten Erlebnissen, dem Distress, zu unterscheiden (MEIER u. NOLL-HUSSONG 2014). Distress bedeutet eine über dem physiologischen Stresslevel liegende Anstrengung, die eine Belastung für das Tier darstellt. Dies ist im Sinne des 3R-Prinzips zu vermeiden (BAUMANS et al. 1994). Erfährt der Mensch oder das Tier Distress reagiert der Organismus mit der unspezifischen Alarmreaktion. Die sofortige Anpassung von Körperfunktionen wird durch das autonome Nervensystem und die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (*hypothalamus-pituitary-adrenal*, HPA) gesteuert, wie in Kapitel II.4.1 beschrieben (SELYE u. FORTIER 1950). Die Alarmreaktion des Körpers im Sinne der Kampf- oder Flucht-Reaktion (*fight-or-flight*) nach CANNON (1914) resultiert neben Veränderungen des Hormonhaushaltes auch in Verhaltensänderungen (ARMARIO et al. 2012; TAYLOR 2016) und einer modifizierten Herzfrequenz (KORTE et al. 1993). Ist der Stressor nicht mehr vorhanden, greift die Rückwärtshemmung des Regelkreislaufs, ausgelöst durch die hohe Serum-Konzentration von Glukokortikoiden. Die HPA-Achse wird deaktiviert, um den Körper in den Zustand der Homöostase zurückzusetzen (LUPIEN et al. 2009). Die Amygdala kann ebenfalls die HPA-Achse aktivieren, allerdings ist in diesem Fall Angst und nicht Stress der Auslöser (LUPIEN et al. 2009). Der Effekt der Aktivierung der HPA-Achse auf den Organismus ist unter anderem abhängig von dem Alter des Individuums. LUPIEN et al. (2009) zeigten, dass wiederholter Stress bei juvenilen Tieren zu einer höheren Freisetzung von Glukokortikoiden führt, als bei eine vergleichbare Belastung bei adulten Tieren. Weiterhin hat chronischer Stress in frühen Lebensabschnitten eine langfristige Veränderung des Gehirns zur Folge. In der adulten Lebensphase können Effekte von chronischem Stress durch einige Wochen mit reduziertem Stress wieder aufgehoben werden. Chronischer Stress in adulten Ratten kann jedoch auch zu einer dendritischen Hypertrophie der basolateralen Amygdala führen und kann weiterhin mit einem erhöhten Angstverhalten korrelieren (LUPIEN et al. 2009).

### 3. Verhaltensuntersuchungen

Charles Darwins fundamentale Beobachtung, dass Tiere Emotionen haben und diese ähnlich dem Menschen ausdrücken können, stellt die Basis jeglicher Verhaltensuntersu-

chungen beim Tier dar (CAMPOS et al. 2013). Menschen und Tiere haben ein emotionales Verhaltensmuster, definiert als Verhaltensreaktion auf einen emotionalen Stimulus (JANAK u. TYE 2015). Daher zeigen auch Labornager analog zum Menschen unter Belastung, Stress oder Angst Veränderungen im Verhaltensmuster. Diese Verhaltensveränderungen lassen sich im Rahmen von Verhaltensuntersuchungen erfassen. Tiermodelle und Verhaltenstests die Angst und Stress untersuchen haben maßgeblich zum Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen beim Menschen und zu der Entwicklung von verschiedenen Wirkstoffen beigetragen (CAMPOS et al. 2013). Erfasste Verhaltensänderungen erlauben unter Umständen Rückschlüsse auf ein modifiziertes neuronales Netzwerk (CAMPOS et al. 2013). Psychische Begleiterscheinungen, Angstzustände und Depressionen gehören zu den häufigsten Komorbiditäten bei Patienten mit Epilepsie (SEO et al. 2013). In einer Studie wurde kürzlich gezeigt, dass 23,1 % der Menschen mit Epilepsie unter einer aktiven Depression leiden (JOSEPHSON u. JETTE 2017). Insbesondere Patienten mit einer Temporallappenepilepsie haben darüber hinaus ein höheres Risiko, eine Depression zu entwickeln (JOSEPHSON u. JETTE 2017). Verschiedene Studien diskutieren eine direkte Wechselbeziehung zwischen der Epilepsieerkrankung und psychiatrischen Begleiterscheinungen (MAZARATI et al. 2008; WILSON u. BAXENDALE 2014). Komorbiditäten, die aufgrund des gleichen Mechanismus basieren, wie die entstanden Epilepsieerkrankungen, sind als fundamentale Manifestation und nicht als sekundäre Nebeneffekte zu verstehen (WILSON u. BAXENDALE 2014). Darauf basierend könnten kognitive Symptome und Verhaltensveränderungen eine dauerhafte Symptome der Erkrankung darstellen, im Gegensatz zu Anfällen, die nur als infrequente Symptome ausgeprägt sind (WILSON u. BAXENDALE 2014).

Auch in Tiermodellen für Epilepsien sind Verhaltensänderungen der Tiere bekannt. MAZARATI et al. (2008) beschreiben die Post-SE-Modelle der Temporallappenepilepsie als Modelle für Komorbiditäten von Epilepsie und Depressionen. Im Pilocarpin-Modell wurden bei den Tieren bereits beim Menschen vorkommende Komorbiditäten und Verhaltensänderungen beschrieben. Solche Modelle ermöglichen die Erforschung der vermuteten Wechselbeziehung zwischen Epilepsie und psychiatrischen Komorbiditäten (SEO et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wird das Verhalten von Ratten im elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell in den folgend aufgeführten Verhaltensuntersuchungen systematisch erfasst.

### **3.1. Heimkäfiverhalten**

Die Aktivität der Tiere kann durch die Beobachtung des Heimkäfiverhaltens mit Beurteilung des Nestbauverhaltens und des Verschmutzungsgrads des Käfigs ermittelt werden (JIRKOF 2014). Das Nestbauverhalten wird als ein hoch motiviertes Verhalten von Nage-

tieren beschrieben (GASKILL et al. 2013). Die Nester können mittels eines Scoring-Systems hinsichtlich ihrer Komplexität evaluiert werden. Eine reduzierte Nestkomplexität kann ein Hinweis darauf sein, dass ein Tier Distress ausgesetzt ist (JIRKOF et al. 2013). Ein Nest bietet den Tieren Schutz vor potenziellen Angreifern und dient der Wärmeisolation (HAGER et al. 2015). Speziell im Rahmen des Reproduktionszyklus spielt das Vorhandensein eines Nests eine relevante Rolle (DEACON 2006a). Die wärmeisolierende Funktion des Nests unterstützt die Jungtiere in der Aufrechterhaltung ihrer konstanten Körpertemperatur (DENENBERG et al. 1969). Ohne ein schützendes Nest verstirbt die Mehrheit der Nachkömmlinge von Kaninchen und Ratten (DENENBERG et al. 1969). Das Nestbauverhalten wird hormonell während der Trächtigkeit durch Östrogen und Progesteron beeinflusst, dennoch bauen neben tragenden Weibchen auch nicht tragende weibliche und männliche Tiere Nester von ähnlicher Größe (DENENBERG et al. 1969; DEACON 2006a). Im Gegensatz zu Mäusen erlernen Ratten die Verwendung von Nestmaterial zum Konstruieren von Nestern. Je früher den Tieren Nestmaterial zur Verfügung gestellt wird, desto mehr Material wird für das Konstruieren des Nestes verwendet und desto weniger wird beschmutzt oder gefressen (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Haben die Tiere in ihrem Heimkäfig Zugriff auf Nestbaumaterial, hat dies einen direkten positiven Einfluss auf das Wohlbefinden von Ratten (RAS. et al. 2002). JIRKOF (2014) diskutierte ein reduziertes Nestbauverhalten bei Tieren mit Stress oder Schmerzen. Weiterhin wurde eine schnellere Wundheilung bei Brandwunden von Ratten festgestellt, wenn Material zum Nestbau in dem Heimkäfig vorhanden war (VITALO et al. 2009). Das Nestbauverhalten kann, genau wie das Grabverhalten, bei Labornagern als Luxusverhalten bezeichnet werden, das ausgeführt wird, wenn die Futter- und Wasseraufnahme sichergestellt ist (JIRKOF 2014; HOHLBAUM et al. 2017). Verschiedene Studien zeigten bereits ein reduziertes Nestbauverhalten vor Ausbruch der krankheitsspezifischen Symptome (CUNNINGHAM et al. 2003; DEACON 2006a). Somit kann ein vermindertes Nestbauverhalten als ein Zeichen von reduziertem Wohlbefinden des Tieres gewertet werden (JIRKOF 2014; HOHLBAUM et al. 2017). GHEYARA et al. (2014) stellten eine negative Korrelation zwischen den detektierten epileptischen Anfällen und dem Nestbauverhalten in dem Maus-Dravet-Syndrom fest. In unserer Arbeitsgruppe untersuchten MÖLLER et al. (2018) das Nestbauverhalten im Kindling-Modell bei Sprague-Dawley-Ratten und empfehlen das Erfassen des Nestbauverhaltens im Rahmen der Routineüberwachung. In dem elektrischen Post-SE-Modell konnten VAN DIJK et al. (2018) aus unserer Arbeitsgruppe nur ein reduziertes Verhalten der stimulierten Tiere in der Post-Insult-Phase detektieren. VAN DIJK et al. (2018) untersuchten ebenfalls die Belastung der Tiere in diesem Modell. Dafür führten VAN DIJK et al. (2018) in der chronischen Phase des Modells ein Bildgebungsverfahren mittels einer Positronen-Emissions-Tomographie in einem kooperierenden Partnerinstitut durch. Die Tiere mussten dafür zeitweilig während der Stu-



die in dem kooperierenden Institut verbracht und gehalten sowie für das eigentliche Bildgebungsverfahren narkotisiert werden. In der chronischen Phase kann demnach in dieser Studie nicht eindeutig zwischen der versuchsspezifischen Belastung und den Einflüssen des Tiertransportes, der unterschiedlichen Haltungsbedingungen und der zusätzlichen Narkose differenziert werden. Um möglichst genau die modellspezifische Belastung evaluieren zu können und Belastungsparameter zu identifizieren, war eine weitere Durchführung des Modells, mit minimalen Stressoren, unabdingbar.

Neben der Nestkomplexität kann auch der Verschmutzungsgrad eines Nestes beurteilt werden. Anhand einer Skala, des *Level of soiling*, wird beurteilt, in welchem Grad ein Nest mit Kot verschmutzt ist oder ob der entsprechende Bereich überwiegend sauber gehalten wurde (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Dabei verschmutzen Ratten, die von Geburt an das Nestbauverhalten erlernt haben, ihre Nester weniger als Tiere, die erst zu einem späteren Zeitpunkt Kontakt mit Nestbaumaterialien hatten (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Der Verschmutzungsgrad des Nestes bei Ratten in Epilepsiemodellen ist bisher geringgradig untersucht. MÖLLER et al. (2018) beschrieben einen erhöhten Verschmutzungsgrad bei Ratten mit generalisierten Anfällen in dem Kindling-Modell.

### 3.2. Grabverhalten

Die Erfassung des Grabverhaltens im Rahmen des Burrowing-Tests wurde 2001 von DEACON bei Labormäusen beschrieben (DEACON et al. 2001). Innerhalb einer definierten Zeit wird die Menge an Grabmaterial gemessen, die ein Tier aus einem Behältnis mittels koordinierter Bewegung der Vorder- und Hintergliedmaßen heraustransportiert hat (DEACON 2006b). Als Grabmaterial können neben Futterpellets auch andere Materialien wie Kies oder Sand verwendet werden (DEACON 2009). Die Anwendung des Tests ist an keine Futter- oder Trinkwasserrestriktionen gebunden und somit eine nicht invasive Methode, um Störungen im Tier zu detektieren (DEACON 2006b). Das Grabverhalten stellt bei Nagetieren in der freien Wildbahn ein überlebenswichtiges Verhalten dar: Unterirdische Tunnelsysteme bieten Schutz vor Fressfeinden und der Witterung, dienen aber auch der Sicherung der Nachkommen und des Futterreservoirs (DUDEK et al. 1983). Bei Labornagern hingegen wird das Grabverhalten als Luxusverhalten oder hoch motiviertes Verhalten beschrieben, da es ein nicht essentielles Verhalten wie die Futter- und Wasseraufnahme darstellt. Daher kann das Ausüben von Grabverhalten als ein Zeichen von Wohlfühlverhalten verstanden werden (JIRKOF 2014). Unter gesunden Labormäusen zeigen 98 % ein Grabverhalten (JIRKOF et al. 2010). Nach einer Lernphase ist mit einem gesteigerten Grabverhalten zu rechnen (JIRKOF et al. 2013). Das Grabverhalten wurde deshalb in der Versuchstierkunde instrumentalisiert, um Störungen in den Labortieren frühzeitig detektieren zu können. Ein reduziertes Grabverhalten wurde in Modellen für

Alzheimer, systematisches Entzündungsgeschehen und bei Gehirnläsionen als chronisch neuronale oder immunologische Störung interpretiert (DEACON et al. 2003; TEELING et al. 2007; DEACON et al. 2008; JIRKOF et al. 2010). Auch für die milde bis moderate Schmerzerfassung im Rahmen der Routineüberwachung, die bei Labornagern oft eine Herausforderung darstellt, kann der Burrowing-Test Anwendung finden (JIRKOF et al. 2010). JIRKOF und Kollegen (2010) beschrieben bei ungenügender postoperativer Analgesie bei Mäusen ein signifikant reduziertes Grabverhalten im Rahmen des Burrowing-Tests. Der Burrowing-Test zeigte sich auch als sensitive Methode, um die Entstehung von Prionen in mit Scrapie infizierten Mäusen zu detektieren (DEACON et al. 2001). DEACON beschrieb in diesem Zusammenhang den Test als eine empfindliche und objektive Methode, mit kostengünstiger Umsetzung, für die Selektion von infizierten Tieren. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde der Burrowing-Test als sensitiver und robuster Test etabliert und kann bei allen Labortieren, die ein Grabverhalten zeigen, Anwendung finden (DEACON 2006b). In einer vorausgehenden Studie in unserer Arbeitsgruppe detektieren VAN DIJK et al. (2018) bereits bei den stimulierten Tieren des elektrischen Post-SE-Modells ein geringeres Grabverhalten in der Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase. Wie bereits beschrieben konnte in der Studie von VAN DIJK et al. (2018) nicht zwischen dem Einfluss des zusätzlichen Eingriffs der Positronen-Emissions-Tomographie, dem Transport der Tiere in eine andere tierexperimentelle Einrichtung und der modellspezifischen Belastung unterschieden werden.

### 3.3. Soziale Interaktion

Der soziale Interaktionstest wurde bereits im Jahr 1966 von Silverman beschrieben. Er zählt heute zu den am häufigsten genutzten angstassoziierten Verhaltenstests (FILE et al. 2004). Für Ratten und Mäuse stellen in freier Wildbahn das Zusammenleben mit Artgenossen und die sozialen Interaktionen überlebenswichtige Strukturen dar (BEERY u. KAUFER 2015). Im Rahmen des in der Regel zehnminütigen Tests wird die Zeit der sozialen Interaktion zwischen zwei in direktem physischem Kontakt stehenden Tieren gemessen (A. P. SILVERMAN 1966; TOTH u. NEUMANN 2013). Das Sozialverhalten wird dabei als sensitiver Parameter verwendet um autismus-assoziiertes (J. L. SILVERMAN et al. 2010) oder angsthähnliches Verhalten zu erfassen (FILE u. SETH 2003). Zeigt ein Tier ein angsthähnliches Verhalten, sinkt die Zeit in sozialer Interaktion mit dem Partnertier (FILE u. SETH 2003). Um Dominanzverhalten zu vermeiden, sollten Tiere desselben Geschlechtes, Alters und Gewichts gewählt werden (FILE u. SETH 2003). Daher ist es ratsam, Tiere der gleichen Gruppe miteinander zu testen (FILE et al. 2004). Soziale Interaktion ist ein Parameter, der von beiden Interaktionspartnern beeinflusst wird. Ein Interaktionspaar liefert nur ein gemeinsames Ergebnis. Die Qualität der Interaktion ist

in aktives (gegenseitiges Putzen und Beschnupern) und passives (reiner Körperkontakt) Verhalten zu differenzieren (FILE et al. 2004). Unterschiedliche Faktoren haben einen Einfluss auf das Sozialverhalten. Die höchste Interaktionszeit wurde in einer dem Tier vertrauten Umgebung mit geringen Lichtverhältnissen erzielt (FILE et al. 2004). Eine vorherige Isolation von fünf Tagen fördert die soziale Interaktion zwischen den Tieren. Weitere Tests wie der Drei-Kammer-Test (*three-chambered social approach test*) oder ein modifiziertes Y-Maze wurden entwickelt, um das Sozialverhalten des einzelnen Tieres zu bewerten (LAI u. JOHNSTON 2002; NADLER et al. 2004). Im Zuge dieser Tests kann sich jedes Tier entscheiden, ob es eine soziale Interaktion eingehen oder vermeiden möchte (TOTH u. NEUMANN 2013). Autismus-ähnliches Verhalten wird mit Epilepsieerkrankungen assoziiert (BUCKLEY u. HOLMES 2016). Studien zeigten bereits eine verringerte soziale Interaktion nach einem durch Pilocarpin hervorgerufenen SE sowohl in der Latenzphase als auch in der chronischen Phase (SEO et al. 2013; DI LIBERTO et al. 2018). Auch im Amygdala-Kindling-Modell zeigten Ratten eine Reduktion der aktiven sozialen Interaktion (HELFER et al. 1996). Weiterhin hat ein signifikanter Anteil der an Epilepsie erkrankten Menschen Schwierigkeiten, soziale Interaktionen einzugehen (SZEMERE u. JOKEIT 2015). Zudem ist bekannt, dass beim Menschen die empfundene Lebensqualität maßgeblich durch die Qualität und Quantität der sozialen Interaktionen beeinflusst wird.

### 3.4. Open-Field-Test

1934 wurde die Durchführung des *Open-Field-Tests* (Offenfeldtest) durch HALL erläutert (HALL 1934). Mit dem Open Field werden gewöhnlich die lokomotorische Aktivität und das angstassoziierte Verhalten in einem offenen, lediglich seitlich durch eine Wand begrenzten Feldes erfasst (PRUT u. BELZUNG 2003). Der Test basiert auf dem Prinzip, dass Nagetiere als Beutetiere den Aufenthalt im Wandbereich des Offenfeldes als geschützter empfinden (PRUT u. BELZUNG 2003). Dabei orientieren sich die Tiere mit ihren Vibrissen am Wandbereich; dieser Vorgang wird als *Thigmotaxis* bezeichnet. Die Aufenthaltsdauer im Wandbereich und die zurückgelegte Distanz des einzelnen Tieres in dem Offenfeld werden als Indikator für angstassoziiertes Verhalten und lokomotorische Aktivität verwendet (KATZ et al. 1981). Zeigt ein Tier ein angsthähnliches Verhalten, vermeidet es das Zentrum des Offenfeldes, kotet mehr, putzt sich weniger und bewegt sich weniger fort. Eine erhöhte Risikobereitschaft von Tieren ist anhand einer erhöhten Fortbewegung und eines vermehrten Aufrichtens des Oberkörpers um mehr als 45° (*Rearing*) zu bewerten (KATZ et al. 1981). Heutzutage existieren diverse Ausführungen der Apparatur im Hinblick auf die Größe, Form und die Ausleuchtung des offenen Feldes. Auch die Testdauer und Testfrequenz können variieren (PRUT u. BELZUNG 2003). Aufgrund der

simplen Quantifizierung der Parameter und des Verzichts auf einen für das Tier schädlichen Stimulus wird der Test auch unter ethischen Aspekten häufig in der Verhaltensforschung verwendet (VAN DEN BUUSE et al. 2001). Katz legte die unterschiedlichen Effekte von akutem und chronischem Stress im Open-Field-Test dar. Bei akutem Stress zeigte sich eine konstant erhöhte lokomotorische Aktivität, bei chronischem Stress hingegen bewegten sich die Tiere signifikant weniger fort (KATZ et al. 1981). Der Einsatz des Open Fields als Mittel der Wahl zur Bewertung von angstassoziertem Verhalten wird in der Literatur als widersprüchlich diskutiert. Demnach zeigte der Einsatz von Anxiolytika nicht immer die erwarteten Effekte (PRUT u. BELZUNG 2003). Eine erhöhte lokomotorische Aktivität konnte bereits in Post-SE-Modellen festgestellt werden. WOLF et al. (2016) stellten eine hyperlokomotorische Aktivität bei Ratten im Pilocarpin-Modell nach einer Futterrestriktion fest. Bei Betrachtung aller Ergebnisse dieser Studie vermuten WOLF et al. (2016) die Ursache dieser Veränderung in einer Verbindung zwischen der TLE und psychiatrischen Komorbiditäten, denen ein verändertes neuronales Netzwerk zugrunde liegt. Auch VAN DIJK et al. (2018) konnten eine hyperlokomotorische Aktivität in dem elektrischen Post-SE-Modell bestätigen. INOSTROZA et al. (2012) konnten sowohl bei den epileptischen Tieren im Lithium-Pilocarpin-Modell ein niedriges als auch im Kainat-Modell ein reduziertes angstassoziertes Verhalten im Open Field erfassen. Da die Ergebnisse mit der gemessenen Plasma-Corticosteron-Konzentration korrelierten, diskutierten INOSTROZA et al. (2012) das angstassozierte Verhalten als Reflektion der Aktivität der HPA.

### **3.5. Angstassozierte Verhaltenstest**

Angst- und Stressmodelle basieren auf Konfliktsituationen, in denen sich das Tier zwischen gegensätzlichen Motivationen entscheiden muss. CAMPOS et al. (2013) unterscheiden zwischen ethologischen und konditionierten Verhaltensuntersuchungen. Erstere erfassen das spontane und unbestrafte Verhalten der Tiere in einmalig durchgeführten Untersuchungen, beispielsweise mit den Methoden der *Black-and-white-Box* und des *Elevated-Plus-Maze*. Konditionierte Verhaltenstests setzen hingegen eine Lernphase und somit eine wiederholte Durchführung voraus, in der das Tier in der Regel einer Bestrafung oder Stress ausgesetzt ist. Derzeit stellt kein angstassoziertes Verhaltenstest die Gesamtheit der Emotionen eines Tieres vollständig dar. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit, mehrere aufeinander abgestimmte Tests anzuwenden, um angstassoziertes Verhalten zu detektieren (A. RAMOS et al. 2008).

#### **3.5.1. Black-and-white-Box**

Die Black-and-white-Box oder auch Light-and-dark-Box wurde 1980 von CRAWLEY erst-

mals beschrieben und etabliert (CRAWLEY u. GOODWIN 1980). Es handelt sich um einen Test auf angstassoziierten Verhalten, der das spontane Explorationsverhalten von nachtaktiven Nagetieren in einer aus zwei Kompartimenten bestehenden Apparatur erfasst. Das Prinzip des Versuches beruht auf dem Konflikt zwischen der instinktiven Aversion von Nagetieren gegen helle, offene Areale und dem spontanen Explorationsverhalten in unbekanntem Terrain (BOURIN u. HASCOET 2003). Die Testapparatur besteht aus einer dunklen, geschlossenen Kammer und einer doppelt so großen hellen und offenen Kammer. Die Kompartimente sind mittels eines Durchgangs für das Tier miteinander verbunden. Während einer definierten Zeitspanne von meist fünf Minuten wird die Latenzzeit bis zum ersten Übergang in die dunkle Kammer erfasst sowie die Gesamtanzahl aller Übergänge zwischen den Kammern. Auch die absolute Aufenthaltsdauer in der aversiven, hellen Kammer stellt einen Parameter des Tests dar (CAMPOS et al. 2013). Bei einem ausgeprägt angstassoziierten Verhalten ist die Aufenthaltsdauer in der hellen Kammer geringer sowie der erste Übergang in die dunkle Kammer reduziert. Die Erfassung der lokomotorischen Aktivität in einem separaten Test ist für die Black-and-white-Box essentiell. Eine erhöhte basale lokomotorische Aktivität wird sonst als ein gesteigertes Explorationsverhalten verstanden und dies führt zu einem falsch positiven Ergebnis (CAMPOS et al. 2013). Der Einfluss von verschiedenen Stressoren auf das angstassoziierte Verhalten wurde von SANCHEZ (1997) mittels der Black-and-white-Box verglichen. ADAMEC et al. (2004) konnten in dem Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten keinen Effekt in der Black-and-white-Box erfassen. MÖLLER et al. (2018) stellten hingegen eine reduzierte Aufenthaltsdauer der Tiere mit generalisierten Anfällen gegenüber den naiven Kontrolltieren fest. In vorausgegangen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde bereits bei dem Lithium-Pilocarpin-Modell ein geringeres angstassoziiertes Verhalten der epileptischen Tiere festgestellt (DI LIBERTO et al. 2018). Bei der Durchführung des elektrischen Post-SE-Modells in unserer Arbeitsgruppe konnten VAN DIJK et al. (2018) bis auf eine erhöhte Latenzzeit der epileptischen Tiere bis zu dem ersten Übertritt in das geschlossene Kompartiment keine weiteren Veränderungen erfassen.

### 3.5.2. Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze (EPM) ist einer der am häufigsten verwendeten angstassoziierten Verhaltenstests bei Labornagern (ONGERTH et al. 2014). Erstmals wurde es durch HANDLEY u. MITHANI (1984) beschrieben und es wurde von PELLOW u. FILE (1986) weiterführend validiert (PELLOW u. FILE 1986; CAMPOS et al. 2013). Der Test basiert auf dem Konflikt zwischen dem natürlichen Explorationsverhalten in unbekanntem Terrain und der instinktiven Angst vor ungeschützten, hellen Erhöhungen ohne Möglichkeiten des Rückzugs vor Raubtieren (FILE et al. 2004). Hierfür kommt eine über dem Boden erhöht angebrachte kreuzförmige Plattform mit zwei gegenüberliegenden offenen und zwei ge-

geschlossenen Armen zum Einsatz. Nagetiere mit einem erhöhten angstassoziierten Verhalten meiden die offenen Arme und halten sich vermehrt in den geschlossenen Armen auf, in denen sie fortlaufend mit den Vibrissen ihre Umgebung abtasten können. Um ausschließlich das spontane, unbeeinflusste Angstverhalten der Tiere zu messen, ist es ratsam, den Test pro Tier nur einmalig durchzuführen (FILE et al. 2004). Die Risikobereitschaft der Tiere wird über verschiedene Parameter gemessen. Eine erhöhte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen lässt nach FILE et al. (2004) auf ein risikofreudiges Verhalten schließen. Dieser Effekt kann durch pharmakologisch wirksame anxiolytische oder anxiogene Substanzen beeinflusst werden und wird im Rahmen von analogen Medikamentenstudien seit PELLOW u. FILE (1986) genutzt (RODGERS u. DALVI 1997). Positionen wie *Stretching* oder *Head-Dips* werden ebenfalls als Kriterien der Risikobereitschaft definiert (BLANCHARD u. BLANCHARD 1989). *Stretching* beschreibt das Strecken des Kopfes oder des Vorderkörpers vor dem Übertritt in einen risikoassoziierten Bereich. Unter dem Begriff *Head-Dips* wird das Herunterbeugen des Tieres von den offenen Armen verstanden. In Studien des elektrischen Post-SE-Modells konnte bei Ratten in der chronischen Phase bereits eine erhöhte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen der Apparatur beobachtet werden (BRANDT et al. 2006; VAN DIJK et al. 2018).

### 3.6. Anhedonie-assoziiertes Verhalten

Mittels des Saccharin-Präferenz-Tests wird das Verhalten im Hinblick auf eine Anhedonie beurteilt werden. Der Begriff *Anhedonie* bezeichnet die Unfähigkeit, Freude zu empfinden, und stellt ein Kardinalsymptom bei an Depressionen erkrankten Menschen dar (KLEIN et al. 2015). Bei Ratten und Mäusen können über den Konsum von gesüßtem Futter Rückschlüsse auf die Emotionen gezogen werden. Gesunde Tiere bevorzugen instinktiv gesüßtes gegenüber ungesüßtem Futter oder Trinkwasser (KLEIN et al. 2015). Bei dem Saccharin-Präferenz-Test steht jedem Tier neben normalem Futter und Trinkwasser auch gesüßtes Trinkwasser ad libitum zur Verfügung. Konsumiert ein Tier bei insgesamt gleicher Flüssigkeitsaufnahme weniger gesüßtes Wasser, kann auf ein anhedonie-assoziiertes Verhalten zurückgeschlossen werden. (KLEIN et al. 2015; CHEN et al. 2016). Hierfür wird dem Trinkwasser Zucker (Sucrose) oder Süßstoff (Saccharin) zugesetzt. Um den Konsum unabhängig von der Energiezufuhr testen zu können, ist es empfehlenswert, das kalorienarme Saccharin zu verwenden (A. MAZARATI et al. 2007). MADSEN u. AHMED (2015) zeigten, dass Ratten Wasser, angereichert mit 0,2 % Saccharin, sogar gegenüber Drogen von denen ein hohes Suchtpotential ausgeht, wie Kokain oder Heroin, präferieren. Im Gegensatz zu anderen Verhaltenstests kann der Saccharin-Präferenz-Test im Heimkäfig stattfinden. Dies bietet den Vorteil, mögliche Einflussfaktoren während der Testdurchführung minimieren zu können (KLEIN et al. 2015). Depressionen stellen eine

der häufigsten Komorbiditäten bei Menschen mit Epilepsie dar (KANNER 2017). Auch in Epilepsiemodellen bei Nagetieren belegen verschiedene Studien ein depressionsähnliches Verhalten. KLEIN et al. (2015) interpretierte bei zwei Status-Epilepticus-Modellen bei der Maus, dem Pilocarpin- und dem Kainat-Modell das Verhalten der Tiere anhand des Saccharin- und Sucrose-Präferenz-Tests als anhedonie-assoziiert. Auch bei Ratten wurde sowohl im Lithium-Pilocarpin-Modell (MAZARATI et al. 2008) wie auch in unserer Arbeitsgruppe im elektrischen SE-Modell (VAN DIJK et al. 2018) ein reduzierter Saccharin-Konsum festgestellt. Im Amygdala-Kindling-Modell konsumierten die Ratten direkt nach den Stimulationen signifikant weniger gesüßtes Trinkwasser (CHEN et al. 2016). Vier Wochen nach der letzten Stimulation zeigte sich jedoch wieder ein erhöhter Konsum (A. MAZARATI et al. 2007). Bei dem Vergleich der beiden Post-SE-Modelle, des Lithium-Pilocarpin-Modells und des Kainat-Modells, bei Ratten konnten INOSTROZA et al. (2012) nur bei den Pilocarpin-induzierten epileptischen Tieren einen geringeren Saccharin-Konsum detektieren.

### 3.7. Grimace-Scale und Irwin-Score

Der Grimace-Scale ist eine Methode zur Quantifizierung der Schmerzen von Ratten und Mäusen anhand der Gesichtsmimik (SOTOCINAL et al. 2011). Bereits Darwin hatte die Vermutung, dass Tiere ähnlich dem Menschen ihren Gesichtsausdruck nutzen, um ihre Emotionen auszudrücken (DARWIN 1872; SOTOCINAL et al. 2011). Heutzutage sind validierte Grimace-Scales für diverse Tierarten verfügbar (DALLA COSTA et al. 2014; DI GIMINIANI et al. 2016; HÄGER et al. 2017). SOTOCINAL et al. (2011) überprüfte den Rat-Grimace-Scale (RGS) für Ratten. Mit dem RGS werden vier verschiedene Einheiten erfasst: die Vollständigkeit der Augenöffnung, die Nase und die Wangenwölbungen sowie die Position der Ohren und der Vibrissen (LEUNG et al. 2016). Jede Einheit kann zwischen den Skalenpunkten 0 und 2 bewertet werden, wobei 0 für keine schmerzassoziierte Veränderung der jeweiligen Einheit steht. OLIVER et al. (2014) bestätigten weiterhin die Zuverlässigkeit des RGS auch in heterogenen Versuchsgruppen und bezeichneten es als gute Methode zur Erfassung des akuten Schmerzes bei Ratten. Ein detailliertes Handbuch für die korrekte Erfassung des RGS steht kostenlos zur Verfügung (NC3RS.ORG).

Der Irwin-Score stellt eine systematische Methode dar, die eine Quantifizierung der Verhaltens- und physiologischen Parameter ermöglichen (IRWIN 1968; FONCK et al. 2015). Ursprünglich wurde dieser Score verwendet, um Effekte des zentralen Nervensystems nach einer Wirkstoffapplikation zu erfassen (ROUX et al. 2005; FONCK et al. 2015). Zum heutigen Zeitpunkt wird der Irwin-Score in verschiedenen Modifikationen auch unabhängig von einer Wirkstoffapplikation bei Ratten und Mäusen verwendet (GROTICKE et al. 2007). Um bei neurologischen Modellen den Allgemeinzustand des Tieres zu erfassen,

werden zusätzliche Parameter gemessen, die auf neuropathologischen Defizite hinweisen. MÖLLER et al. (2018) konnten bei Ratten im Amygdala-Kindling-Modell keine Änderung des Irwin-Scores feststellen.

## 4. Biochemische Parameter

Nach dem in Kapitel II 2 beschriebenen Adaptationssyndrom nach SELYE (1936a) reagiert der Körper mit Anpassungsreaktionen auf physische oder psychische Stressoren durch die Ausschüttung von Hormonen. Dadurch soll eine gesteigerte Reaktionsfähigkeit des Körpers erzielt werden. Hormone, die bei akutem oder chronischem Stress in einer veränderten Konzentration vorliegen, werden als *Stressmarker* bezeichnet. Im Einzelnen sind hierbei Glucocorticoide im Zusammenhang mit einer Aktivierung der HPA-Achse sowie Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF) und Oxytocin einschließlich des Sexualzyklus zu nennen (C. BECKER et al. 2015; MINHAS et al. 2016).

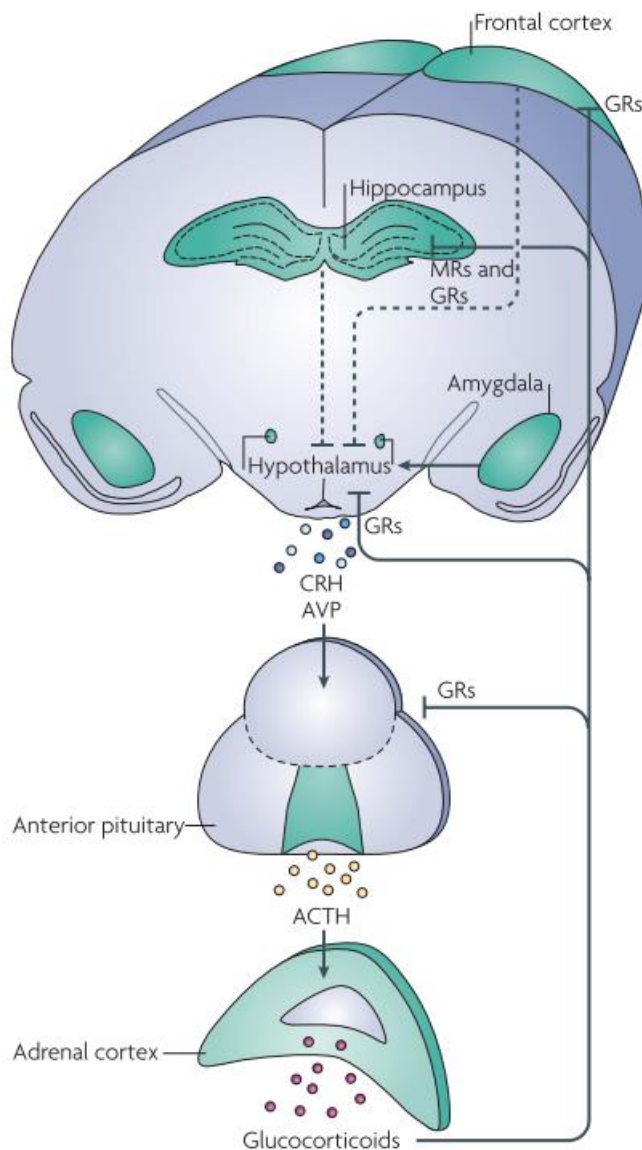
### 4.1. Corticosteron

Das Hauptglucocorticoide bei Nagetieren ist das Steroidhormon Corticosteron (SCORRANO et al. 2015). Bei Menschen und nicht menschlichen Primaten hingegen stellt Cortisol das vorherrschende Glucocorticoide dar. Corticosteron und seine Metaboliten bzw. Cortisol regulieren die Adaptation des Organismus an einen Stressor (SCORRANO et al. 2015). Anhand der Konzentration der Glucocorticoide wird das Stressniveau erfasst. Dabei kann jedoch nicht zwischen positivem (Eustress) oder negativem (Distress) Stress unterschieden werden (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2008; MEIER u. NOLL-HUSSONG 2014). Stress- und Angstempfindungen werden durch den präfrontalen Cortex und die BLA verarbeitet. Diese Empfindungen führen über den Hypothalamus zu einer Aktivierung der HPA-Achse (TRIPATHI et al. 2019). Dabei stellt der Hypothalamus eine Schnittstelle zwischen dem neuronalen und dem endokrinen System dar (SELYE u. FORTIER 1950): Das antidiuretische Hormon (ADH) und das Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) werden aus einem Kerngebiet des Hypothalamus, dem Nucleus paraventricularis, über das hypophysäre Portalvenensystem zu der Hypophyse transportiert (BELDA et al. 2015; GREEN u. MCCORMICK 2016; TRIPATHI et al. 2019). Die basophilen Zellen der Hypophyse werden aktiviert und setzen das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) in der Blutbahn frei (LUPIEN et al. 2009). Ein erhöhter ACTH-Spiegel bewirkt eine vermehrte Sekretion von Glucocorticoiden aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde (LUPIEN et al. 2009; BELDA et al. 2015). Bei Ratten stellt Corticosteron einen Großteil der Glucocorticoide dar (GREEN u. MCCORMICK 2016). Diese gehören



zu den Steroidhormonen und wirken annähernd ubiquitär im Körper über intrazelluläre Glucocorticoid-Rezeptoren (LUPIEN et al. 2009). Eine hohe Glucocorticoid Serum-Konzentration fördert die Rückwärtshemmung des Regelkreislaufs. Die HPA-Achse wird rückreguliert, um den Körper in den Zustand der Homöostase zurückzusetzen. Der Effekt der Aktivierung der HPA-Achse auf den Körper hängt neben dem Alter (*siehe Kapitel II, 2.2*) auch von der Dauer der hohen Corticosteron-Einwirkung ab (LUPIEN et al. 2009). Durch die Aktivierung der HPA-Achse wird in akuten Stresssituationen die körperliche Fitness gesteigert: Um die Ressourcen zu mobilisieren, wird sowohl die Glucose-Verfügbarkeit durch eine zunehmende Gluconeogenese verbessert als auch die Konzentration von freien Fettsäuren im Blut gesteigert und die Muskeldurchblutung erhöht (REYNAERT et al. 1976; LUPIEN et al. 2009; FRANK et al. 2013). KORTE et al. (1993) stellten eine erhöhte Herzfrequenz und einen gestiegenen Blutdruck nach der Applikation von CRH bei Ratten fest. Eine chronische Stressbelastung und eine damit verbundene dauerhaft erhöhte Cortisol-Konzentration führen zu einer Hypertrophie der Nebenniere (SELYE 1936b). Die körperliche Leistung hingegen reduziert sich durch Immunsuppression und Gewebsatrophien (MOSTL u. PALME 2002). Des Weiteren führt chronischer Stress bei Ratten neben einer dendritischen Hypertrophie der basolateralen Amygdala auch zu einem verminderten Effekt der Rückwärtshemmung des Regelkreislaufes (LUPIEN et al. 2009; MAHAR et al. 2014). Die Glucocorticoid-Rezeptoren erfahren eine Resistenz bei einer dauerhaft erhöhten Corticosteron-Konzentration. Wird ein Tier wiederholt dem gleichen Stressor ausgesetzt, findet eine Desensibilisierung oder Habituation an den Stressor statt (DEUTSCH-FELDMAN et al. 2015). In dem Zustand der Homöostase, ohne einen vorhandenen Stressor, ist die Glucocorticoid-Konzentration niedriger und wird in Schüben annähernd einmal pro Stunde freigesetzt (GREEN u. MCCORMICK 2016). Die endogene Corticosteron- bzw. Corticosteron-Produktion und der daraus resultierende Serumspiegel unterliegen bei Mensch und Tier dem circadianen Rhythmus (LÖSCHER et al. 2014). Der entsprechende Hoch- bzw. Tiefpunkt ist zu Beginn und Ende der aktiven Phase zu erwarten (GREEN u. MCCORMICK 2016). Beim Menschen werden am Morgen die maximalen Werte erreicht, bei Nagetieren sind am Abend die höchsten Corticosteron-Werte zu erfassen (SCORRANO et al. 2015). Aufgrund einer chronischen Stressbelastung kann die stündliche Freisetzung von Glucocorticoiden gesteigert sein. Der circadiane Rhythmus kann folglich abflachen oder auch völlig verschwinden. Nach einer Freisetzung von Corticosteron sind die Rezeptoren kurzzeitig vermindert sensibel. In dieser Phase sind milde Stressoren kein Auslöser für eine weitere Corticosteron-Sekretion (BELDA et al. 2015). Auch Geschlechtshormone haben einen Einfluss auf die Aktivität der HPA-Achse. Estrogene (*estrogens*) aktivieren die HPA-Achse, hingegen vermindern Androgene die Aktivität (GREEN u. MCCORMICK 2016). Epileptische Anfälle können zu einer direkten Aktivierung der HPA-Achse und damit zu einem erhöhten Corticosteron-Wert

führen (O'TOOLE et al. 2014). HOOPER et al. (2018) stellten zudem eine Korrelation zwischen Corticosteron-Konzentration und einer erhöhten Anfallsfrequenz und depressionsähnlichen Verhaltensänderungen bei Mäusen in dem Pilocarpin-Modell fest.



**Abbildung 2:** Physiologischer Vorgang bei Stress. Bei der Stressantwort stellt die HPA-Achse ein Schlüsselement als Schnittstelle zwischen dem neuronalen und dem endokrinen System dar. Wird eine stressbehaftete Situation erlebt, aktiviert der Hypothalamus über das Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) und Vasopressin (AVP) die Hirnanhangsdrüse. Diese sezerniert daraufhin Glucocorticoide (in Abb. als GR abgekürzt) in die Blutbahn. Ein hoher Glucocorticoid-Spiegel fördert den Feedbackmechanismus, um die Stressreaktion des Körpers zurück zu regulieren. Abbildung nach LUPIEN et al. (2009) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Corticosteron und seine Metaboliten können in verschiedenen Proben gemessen werden: Haare, Körperflüssigkeiten und Exkrete lassen sich hierzu verwenden (MOSTL u. PALME 2002).

#### 4.1.1. Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM)

In Kotproben kann die Konzentration von Glucocorticoid-Metaboliten über ein Enzymimmunoassay (ELISA) ermittelt werden (MOSTL u. PALME 2002; LEPSCHY et al. 2007). Dabei handelt es um eine nichtinvasive Methode, um die Aktivität der HPA-Achse zu erfassen, ohne dabei ein Risiko einzugehen, durch die Probenahme selbst Stress zu induzieren. Dies stellt den besonderen Vorteil der Kotprobenuntersuchung gegenüber der invasiven Blutabnahme dar. Die Analyse kann daher unbedenklich zu mehreren Zeitpunkten während eines Versuches durchgeführt werden (LEPSCHY et al. 2007). Die Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten (FCM) korreliert zeitversetzt mit der Konzentration des Corticosteron im Plasmas (THANOS et al. 2009). Die durch die Leber verstoffwechselten Corticosteron-Metaboliten (CM) werden über die Gallenflüssigkeit in das Duodenum sezerniert (LEPSCHY et al. 2010). Über den Kot werden 80 % von Corticosteron und seinen Metaboliten ausgeschieden (CAVIGELLI et al. 2005). Entsprechend der Aktivität des Tieres variieren die Darmmobilität und somit die Ausscheidung zwischen sieben bis neun Stunden bei Ratten (THANOS et al. 2009) und vier bis zehn Stunden bei Mäusen (TOUMA et al. 2003). Kurzzeitige Änderungen des Corticosteron-Spiegels, wie sie bei akutem Stress vorkommen, können daher nur bedingt über einzelne Messzeitpunkte erfasst werden. Dadurch ist diese Methodik für die Erfassung von akuten Einflüssen limitiert. Zusätzlich ist der genaue Zeitpunkt der Probenentnahme zu beachten, da sich der circadiane Rhythmus der Corticosteron-Konzentration entsprechend dem Plasma auch im Kot widerspiegelt (THANOS et al. 2009). Die Erfassung der Konzentration der FCM stellt eine sensitive Methode dar, um chronischen Stress in einer nichtinvasiven Vorgehensweise zu erfassen (THANOS et al. 2009). Im Urin können Glucocorticoid-Metaboliten ebenfalls nachgewiesen werden. Die in der Regel kleinen Mengen können hierbei die Auswertung der Corticosteronmetaboliten limitieren (LEPSCHY et al. 2007).

#### 4.1.2. Corticosteron in Serumproben

Die Messung des Plasma-Corticosteron-Konzentration ist eine Standardmethode, um die Stressreaktion bei Nagetieren zu erfassen (THANOS et al. 2009). Dabei handelt es sich um eine invasive Methode. Die Probengewinnung selbst kann Stress induzieren und zu einem veränderten Corticosteron-Wert führen (THANOS et al. 2009). Aus diesem Grund ist diese Methode nicht für eine frequente Erfassung der Corticosteron-Konzentration geeignet. Bei der Probennahme sind die natürlichen Schwankungen innerhalb des circadianen Rhythmus zu beachten (THANOS et al. 2009). Bei der Bewertung der Plasma-Corticosteron-Konzentration müssen sowohl das Geschlecht – weibliche Tiere haben höhere Corticosteron-Werte – als auch der Stamm berücksichtigt werden (DEUTSCH-

FELDMAN et al. 2015). DEUTSCH-FELDMAN et al. (2015) zeigten eine größere Streuung der Corticosteron-Konzentration bei Sprague-Dawley-Ratten im Vergleich zu Lewis-Ratten. Maximalkonzentrationen von Glucocorticoiden im Plasma werden bereits 15 bis 30 Minuten nach dem akuten Stressor erreicht (BELDA et al. 2015). A. M. MAZARATI et al. (2009) untersuchten die Corticosteron-Plasma-Konzentration in dem Post-SE-Modell ausgelöst durch Pilocarpin. Hierbei korrelierte die Corticosteron-Konzentration positiv mit dem depressionsähnlichen Verhalten.

#### 4.1.3. Corticosteron in Haarproben

Corticosteron und andere im Blut befindliche Hormone werden über die Haarwurzel in wachsende Haare eingelagert (KIRSCHBAUM et al. 2009; STALDER u. KIRSCHBAUM 2012). DAVENPORT et al. (2006) demonstrierten, dass die Konzentration von Glucocorticoiden in Haaren mit der durch Stress induzierten Aktivierung der HPA-Achse korreliert. Die Analyse von Haarproben bietet eine nichtinvasive, retrospektive Methode für die Erfassung der kumulativen Langzeitaktivierung der HPA-Achse bei Ratten (SCORRANO et al. 2015). Stressoren, die während des Haarwachstums aufgetreten sind, werden sensitiv erfasst (MEYER u. NOVAK 2017). Die Konzentration von Steroidhormonen in den Haaren kann durch verschiedene Messtechniken festgestellt werden: mittels Enzym-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA), Immunoassays mit Chemiluminescence oder mit Varianten der Chromatographie (GAO et al. 2013). Haaranalysen finden auch bei der Erfassung der Langzeit-Stressbelastung bei Menschen Anwendung. Ebenfalls in der tierexperimentellen Forschung wurde die Corticosteron-Konzentration in nachwachsenden Haaren als Parameter für die Erfassung von Langzeitbelastungen verwendet (ERICKSON et al. 2017).

#### 4.2. Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF)

Das Protein Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF) gehört neben drei weiteren Hormonen zu den Neurotrophen und nimmt bei allen Wirbeltieren eine zentrale Rolle in neurophysiologischen Prozessen ein (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009; AL-QUDAH u. AL-DWAIRI 2016). BDNF reguliert als Wachstumsfaktor die Bildung und Neu-modulation von Neuronen sowie deren synaptischen Verbindungen und schützt die bereits existierenden Neuronen durch die Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität.

Synthetisiert wird BDNF überwiegend in exzitatorischen Nervenzellen (DIENI et al. 2012). Die vom Zellkern transkribierte BDNF mRNA (*messenger ribonucleic acid*) wird im endoplasmatischen Retikulum zu dem vorläufigen BDNF-Protein (pro-BDNF) translatiert. Anschließend wird das pro-BDNF entweder im Golgi-Apparat direkt in Vesikel verschlossen oder zuvor in die *mature*-BDNF-Form umgewandelt (GREENBERG et al. 2009). Beide

Isoformen sind biologisch aktive Varianten, die lebenslänglich nebeneinander existieren. Pro-BDNF bindet und aktiviert den Rezeptor p75 und ist vor allem in der pränatalen und postnatalen Gehirnentwicklung stark exprimiert (GREENBERG et al. 2009). Das Protein *mature*-BDNF überwiegt in der Regel im adulten Gehirn. Diese Isoform bindet an den Tropomyosin-Kinase-Rezeptor B (trkB), der den Erhalt von existierenden Nervenzellen sowie deren Differenzierung fördert und die synaptische Plastizität aufrechterhält (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009). Bei einer Membrandepolarisation werden beide Isoformen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Sie binden dort an die jeweiligen Rezeptoren (AL-QUDAH u. AL-DWAIRI 2016). BDNF ist maßgeblich durch seine Neuroprotektion am Erhalt von Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems beteiligt. Als Wachstumsfaktor ist *mature*-BDNF essentiell für die Entwicklung des Gehirns, im Speziellen des Neocortex und des Hippocampus (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009). Das Protein beeinflusst positiv die Neurogenese im Hippocampus, der wiederum die HPA-Achse und somit die Reaktion auf Stress reguliert (MAHAR et al. 2014). Ein Anstieg von BDNF, zum Beispiel nach einem Insult, fördert die Bildung von neuronalen Bahnen und unterstützt damit die Kognition und Gedächtnisleistung (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009).

Seitdem das Protein von BARDE et al. (1982) erstmals aus Schweinegehirnen isoliert wurde, gilt es als eines der relevantesten Neurotrophine (VASCONCELOS et al. 2015). Die Konzentration von BDNF im Serum reflektiert die Konzentration im Gehirn und kann daher als Biomarker für die Abschätzung von pathologischen Prozessen herangezogen werden (KUNDAKOVIC et al. 2015). Eine verminderte BDNF-Konzentration wurde bereits sowohl im Zusammenhang mit Depressionen als auch mit neuronalen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Huntington festgestellt (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009; DIENI et al. 2012; MATSUOKA et al. 2015). Auch in Bezug auf die Stressadaptation wird BDNF neben Glucocorticoiden und Katecholaminen als ein wesentlicher Biomarker diskutiert (VASCONCELOS et al. 2015). C. BECKER et al. (2015) stellten bei Sprague-Dawley-Ratten fest, dass ein Stressor die BDNF-Serum-Konzentration erniedrigt. Eine geringe Verfügbarkeit von BDNF führt wiederum zu einem Zelluntergang im Hippocampus und CA3 (M. A. SMITH et al. 1995). Auch in Bezug auf epileptische Anfälle spielt BDNF eine bedeutende Rolle: Sprague-Dawley-Ratten mit einer erniedrigten BDNF-Konzentration vor einem SE sind anfälliger für die Entwicklung einer Epilepsie und von Komorbiditäten. Nach einem epileptischen Anfall ist die BDNF-mRNA für ca. zwölf Stunden im Hippocampus signifikant erhöht, von dem Protein selbst ist bis zu vier Tage nach dem Anfall eine gesteigerte Konzentration nachzuweisen (DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN 2009; MEHRABI et al. 2018). Dieser Effekt wurde bei dem Kindling-Modell sowie nach einem SE, induziert durch Pilocarpin, nachgewiesen (DEVIN K BINDER 2004; XU et al. 2018). IUGHETTI et al. (2018) beschreiben bei Patienten mit Epilepsie eine

mögliche Korrelation zwischen einer erhöhten Serum-BDNF-Konzentration und dem Schweregrad der Erkrankung.

### 4.3. Creatinkinase (CK)

Bei der Creatinkinase (CK) handelt es sich um ein ubiquitär im Körper vorkommendes Enzym, welches die Energiequelle Adenosintriphosphat durch Phosphorylierung regeneriert (BRUHN et al. 2011). Es existieren vier verschiedene Isoformen der Creatinkinase mit jeweils zwei möglichen Untereinheiten des Gehirntyps (*brain type*, B) und des Muskeltyps (*muscle type*, M) (DÖRNER 2009):

- a.) Die CK des Gehirntyps (CK-BB) kommt hauptsächlich im zentralen Nervensystem vor.
- b.) Die CK mit einer M- und einer B-Untereinheit (CK-MB) ist überwiegend in der Herzmuskulatur vorhanden und gilt als Biomarker für einen Myokardinfarkt.
- c.) Eine Isoform mit zwei M-Untereinheiten (CK-MM) ist vorwiegend in der Skelettmuskulatur nachzuweisen.
- d.) Bei der letzten Form der CK handelt es sich um ein Isoenzym, das ubiquitär in den Mitochondrien vorkommt (umtCK oder CK-MiMi) (GRAHAM S. SMITH et al. 2013).

Nach einer Muskelzerstörung kann die Creatinkinase in das Blutplasma gelangen und wird schließlich über die Leber und Niere abgebaut (GRAHAM S. SMITH et al. 2013). Ein geringgradiger Anstieg der CK-Konzentration im Serum ist daher ein physiologischer Vorgang bei leichter körperlicher Aktivität. Findet hingegen ein pathologischer Zerfall von Skelett- oder Herzmuskulatur (Rhabdomyolyse) statt, steigt die CK-MM- bzw. die CK-MB-Konzentration auf das 5- bis 50-Fache des Basalwertes an (NASS et al. 2017).

In der Humanmedizin wurde bei circa 35 % der fokalen Anfälle sowie circa 45 % der generalisierten tonisch-klonischen Anfälle ein erhöhter Creatinkinase-Serumwert festgestellt (NASS et al. 2017). Die Maximalkonzentration wird 24 bis 72 Stunden nach dem Anfall erreicht (NEUFELD et al. 1997; NASS et al. 2017). Speziell um tonisch-klonische epileptische Anfällen und nichtepileptische Ereignisse voneinander zu differenzieren, wird CK als ein Parameter mit einer moderaten Sensitivität von 14,6 – 87,5 % und einer hohen Spezifität von 85 – 100 % eingesetzt (NASS et al. 2017; SIMANI et al. 2018). Aufgrund der moderaten Sensitivität kann ein epileptischer Anfall bei einem niedrigen Serumspiegel nicht ausgeschlossen werden (BRIGO et al. 2015). Nur erhöhte Creatinkinasekonzentrationen sind klinisch relevant und können bei der Diagnostik kritisch berücksichtigt werden (WYLLIE et al. 1985; BRIGO et al. 2015). Ein erhöhter CK-Wert kann ein Indiz für eine hohe Anfallsfrequenz und damit einhergehend für eine erhöhte Muskelzerstörung sein.

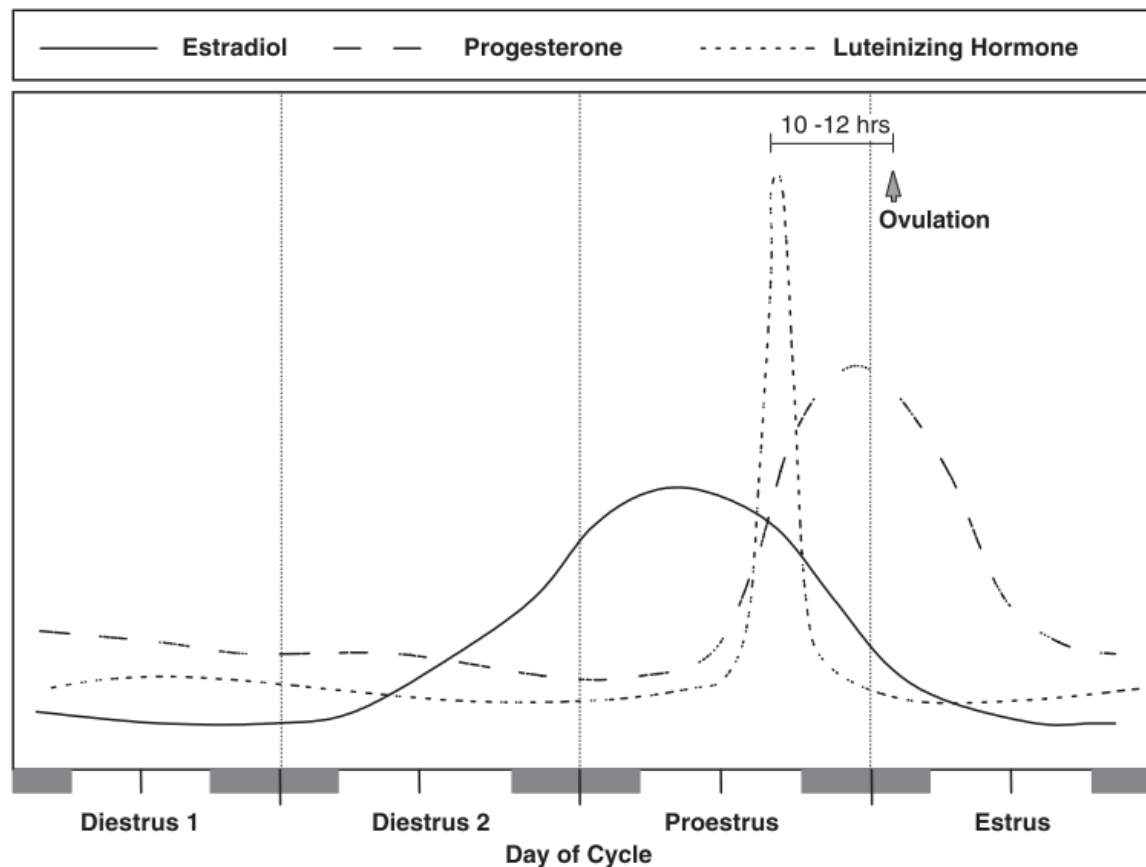
#### 4.4. Sexualzyklus

Der Sexualzyklus einer Ratte umfasst vier bis fünf Tage und besteht aus vier Phasen: dem Proöstrus, dem Östrus, gefolgt vom Metöstrus und dem Diöstrus (GOLDMAN et al. 2007). Der Zyklus wird durch die weiblichen Geschlechtshormone Estradiol, Progesteron und luteinisierendes Hormon (LH) wie in Abbildung 3 dargestellt reguliert. Der Sexualzyklus hängt mit der HPA-Achse und dadurch mit der Stressreaktion zusammen. Zum einen haben die Geschlechtshormone einen direkten Einfluss auf die HPA-Achse: Estradiol verstärkt die ACTH-Sensitivität und folglich die Serumkonzentration von Corticosteron, während ein Stressor vorhanden ist. Zusätzlich wird bei einer hohen Estradiol-Konzentration die Zeitspanne bis zum Erreichen des Basalwertes von Corticosteron nach dem Überwinden des Stressors verlängert (GREEN u. MCCORMICK 2016). Zum anderen beeinflusst der Sexualzyklus den circadianen Rhythmus von Corticosteron: Im Proöstrus ist die Maximalkonzentration von Corticosteron doppelt so hoch wie im Metöstrus und im Östrus (CAVIGELLI et al. 2005). Androgene, männliche Geschlechtshormone hingegen haben einen hemmenden Effekt auf die HPA-Achse. Sie führen zu einem beschleunigten Erreichen des Corticosteron-Basalwertes (GREEN u. MCCORMICK 2016). Des Weiteren kann chronischer Stress mit einer dauerhaft aktivierten HPA-Achse bei Menschen und Ratten zu einer Infertilität führen (KIRBY et al. 2009). Daher ist es sinnvoll, im Rahmen der Stresserfassung den Zyklusstand zu ermitteln, um eine korrekte Interpretation zu ermöglichen (KIRBY et al. 2009). Anhand eines Ausstrichs einer Vaginalzytologie kann der Sexualzyklus in drei Phasen anhand der vorherrschenden Zellart und Zellgröße differenziert werden (GOLDMAN et al. 2007; BRANDT et al. 2016):

- a.) Der eintägige Proöstrus ist an runden Epithelzellen mit Zellkern erkennbar.
- b.) Im Östrus liegen für ein bis zwei Tage vorwiegend irregulär geformte Zellen ohne Zellkern vor.
- c.) Zuletzt ist der Diöstrus durch eine hohe Zahl an Leukozyten und durch wenige nichtgranulierte Epithelzellen ohne Zellkern für ein bis zwei Tage zu erkennen.

Der Metöstrus beschreibt den Übergang zu der Phase des Diöstrus mit leicht erhöhter Leukozytenzahl und ist daher anhand eines Vaginalesstriches schwer von dem Diöstrus zu unterscheiden (GOLDMAN et al. 2007).

Im Rahmen von Epilepsiemodellen der TLE bei Ratten wurde ebenfalls der Einfluss des weiblichen Sexualzyklus auf die Entwicklung einer Epilepsie diskutiert. In dem Amygdala-Kindling-Modell wurde kein Einfluss zwischen dem Sexualzyklus und der Anfallsempfindlichkeit festgestellt (WAHNSCHAFFE u. LOSCHER 1992). BRANDT et al. (2016) zeigten, dass der Sexualzyklus zu dem Zeitpunkt der Status-Epilepticus-Induktion bei weiblichen Ratten im Lithium-Pilocarpin-Modell die Variabilität in der chronischen Phase nicht erhöht. Allerdings wurde eine signifikant höhere Dosis an Pilocarpin bei Tieren im Proöstrus und Östrus benötigt, um einen SE zu induzieren (BRANDT et al. 2016).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Sexualzyklus bei der Ratte. Der Verlauf der Serum-Hormon-Konzentration von Estradiol, Progesteron und LH sind einem vier Tage andauernden Sexualzyklus bei der Ratte in einer Tag-Nacht-Skala dargestellt. Die Hellphasen sind durch die weißen Balken, die Dunkelphasen anhand der grauen Balken angedeutet. Die Ovulation findet circa 10–12 Stunden nach der LH-Maximalkonzentration statt. Aufgrund der nicht eindeutigen Differenzierung zwischen Metöstrus und Diöstrus bei Nagetieren werden diese Phasen in der Abbildung als Diöstrus 1 und 2 zusammengefasst. Abbildung nach GOLDMAN et al. (2007). Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

## 5. Physiologische Parameter

### 5.1. Erfassung physiologischer Parameter

Neben Verhaltens- und biochemischen Parametern können Stress und Belastung auch zu weiteren pathologischen Veränderungen in der Aktivität, dem circadianen Rhythmus und der Herzratenvariabilität führen (KEENEY et al. 2001; ARRAS et al. 2007). Die Erfassung dieser Parameter stellt in der veterinärmedizinischen Forschung, wenn kein zusätzlicher Stress induziert werden soll, eine Herausforderung dar (ZEHENDNER et al. 2013). Kabelgebundene Aufzeichnungen bedingen entweder die Einschränkung der Bewegungsfreiheit des Tiere bis hin zu einer Narkotisierung der Tiere (CESAROVIC et al. 2011). Um dies zu umgehen, wurden in den letzten Jahrzehnten vermehrt Radiotelemet-



rie-Messungen eingesetzt, um physiologische Parameter wie das EEG, Elektrokardiogramm (EKG), Elektromyogramm (EMG), Blutdruck, Körperkerntemperatur oder die Aktivität zu erfassen (CESAROVIC et al. 2011). Radiotelemetrie ist eine drahtlose Übertragung von Messsignalen mittels Radiowellen von einem Sender, dem Telemetrie-Transmitter, auf einen Empfänger. Das Wort *Telemetrie* ist aus den griechischen Wörtern für ‚fern‘ und ‚messen‘ zusammengesetzt. Die Transmitter werden in der Versuchstierkunde in der Regel s. c. oder i. p. in das Tier implantiert. Der größte Vorteil der Telemetrie gegenüber konventionellen Messverfahren besteht in der Elimination von zusätzlichem Stress durch Handling, Bewegungseinschränkungen oder eine Anästhesie (LEON et al. 2004). Die Tiere sind frei beweglich und eine zusätzliche Einschränkung durch eine Verbindung mit einem Kabel und den damit einhergehenden fixierenden Charakter entfällt (LUNDT et al. 2016). Die hoch sensitiven telemetrischen Aufzeichnungen können sowohl parallel zu einer Versuchsdurchführung stattfinden als auch während der Abwesenheit von Personal und somit für die Tiere in ungestörten, stressreduzierten Alltagssituationen (ARRAS et al. 2007; CESAROVIC et al. 2011; LUNDT et al. 2016). In dieser Kombination werden die Stressoren reduziert und der zu untersuchende Effekt kann möglichst isoliert erfasst werden. Die Variabilität zwischen den Tieren könnte dadurch minimiert werden und es kann eine geringere Anzahl an Tieren verwendet werden (CESAROVIC et al. 2011). Folglich wird diskutiert, durch den Gebrauch eines Telemetrie-Messverfahrens im Sinne des 3R-Konzeptes die Belastung der verwendeten Tiere vermindern zu können (*Refinement*) (LUNDT et al. 2016). LIDSTER et al. (2016) empfehlen daher, bei langfristigen elektrophysiologischen Aufzeichnungen die Priorisierung von Telemetrie-Transmittern gegenüber der Kabelaufzeichnung. Als Nachteil der Verwendung von Telemetrie-Transmittern wird eine invasive Operation für die Implantation der Transmitter sowie ein ungünstiges Verhältnis zwischen dem Volumen und dem Gewicht des Implantats speziell bei kleinen Tieren diskutiert (LEON et al. 2004). Um die Erfassung physiologischer Parameter weiter zu optimieren, arbeiten Wissenschaftler aus unserer nationalen Forschungsgemeinschaft (DFG - FOR 2591) an einem langwelligen Infrarot-Kamerasystem (CZAPLIK et al. 2017; HOCHHAUSEN et al. 2018). In Zukunft soll durch diese nichtinvasive Methode die Körpertemperatur, Atemfrequenz und sogar die Herzfrequenz erfasst werden können.

## 5.2. Circadianer Rhythmus und Aktivität

Physiologische Prozesse in Lebewesen passen sich fortlaufend an ändernde Umweltsituationen und Einflüsse an. Wiederkehrende Umweltereignisse wie jahreszeitliche oder tägliche Licht- und Temperaturschwankungen führen zu physiologischen Rhythmen. Mit dem circadianen Rhythmus werden alle physiologischen Vorgänge beschrieben, die eine

Periodenlänge von 24 Stunden haben (STEPHAN u. ZUCKER 1972). Der Begriff *circadian* kommt aus dem Lateinischen und bedeutet ‚etwa‘ (*circa*) und ‚Tag‘ (*dies*) (SOLLARS u. PICKARD 2015). Bei Säugetieren unterliegen verschiedene Prozesse der inneren Uhr: Schlaf, Aktivität, Körpertemperatur und Zellzyklus (HOFSTRA u. DE WEERD 2008; STRZYZ 2017). Auch in der Pflanzenwelt sind circadiane Vorgänge zu beobachten, wie die Öffnung und Schließung von Blüten oder die Aufrichtung der Blätter (SOLLARS u. PICKARD 2015). Das zentrale Steuerelement für den endogenen circadianen Rhythmus bei Säugetieren ist der *Nucleus suprachiasmaticus* (HOFSTRA u. DE WEERD 2008). Dieser liegt dorsal vom *Chiasma opticum*, der Kreuzung des Sehnervs, und dient als Schnittstelle des photoneuroendokrinen Systems (VADNIE u. MCCLUNG 2017). Photosensible Ganglien der Retina leiten die Information des Lichteinfalls an den *Nucleus suprachiasmaticus* weiter, der durch bilaterale Verbindungen zu dem Hypothalamus die endogene Hormonfreisetzung steuert (QUIGG et al. 2001). Dieser Mechanismus ist abhängig von der Wellenlänge, Lichtintensität, Dauer und dem Zeitpunkt der Exposition (HOFSTRA u. DE WEERD 2008). Weitere nicht lichtempfindliche Zellen des *Nucleus suprachiasmaticus* generieren regelmäßig eigene spontane neurale Aktivität über elektrische und molekulare Rhythmen (VADNIE u. MCCLUNG 2017). Die Frequenz dieser Rhythmen sind sowohl bei tages- als auch bei nachtaktiven Tieren in der Hellphase gesteigert. Allerdings sind diese Rhythmen schwächer und instabiler als die derlichtsensiblen Zellen (VADNIE u. MCCLUNG 2017).

Durch die Implantation eines Telemetrie-Transmitters ist es möglich, die lokomotorische Aktivität des Tiers konstant zu erfassen (CESAROVIC et al. 2011). Entfernt sich der Transmitter durch Bewegung des Tieres von dem Empfänger, verändert sich die Signalstärke. Aus der Änderung der Position sowie der Geschwindigkeit kann auf die Aktivität des Tieres zurückgeschlossen werden (GIRAL et al. 2011).

Verschiedene Faktoren können eine Verschiebung des circadianen Rhythmus initiieren. Einerseits kann eine verlängerte Lichtexposition zu dessen Verschiebung führen, andererseits kann der Rhythmus auch durch Depressionen oder eine dauerhafte Stressbelastung flacher ausfallen. Dies kann eine Verschiebung des Aktivitäts- und Schlafmusters, der Körpertemperatur und der Herzfrequenz (*heart rate*, HR) bewirken (VADNIE u. MCCLUNG 2017). CESAROVIC et al. (2011) zeigten, dass Mäuse nach einer Operation eine erhöhte HR und reduzierte lokomotorische Aktivität aufweisen. In einem chronischen Tumormodell hingegen erscheint der circadiane Rhythmus der HR und Körpertemperatur abgeflacht, die charakteristischen Peaks während der Nachtphase sind nicht mehr zu erkennen. Auch die lokomotorische Aktivität ist gemindert (CESAROVIC et al. 2011). Auch QUIGG et al. (2001) demonstrierten eine Verschiebung der Körpertemperatur im Rahmen des circadianen Rhythmus bei Ratten im Kindling-Modell.

### 5.3. Herzfrequenz (HR) und Herzratenvariabilität (HRV)

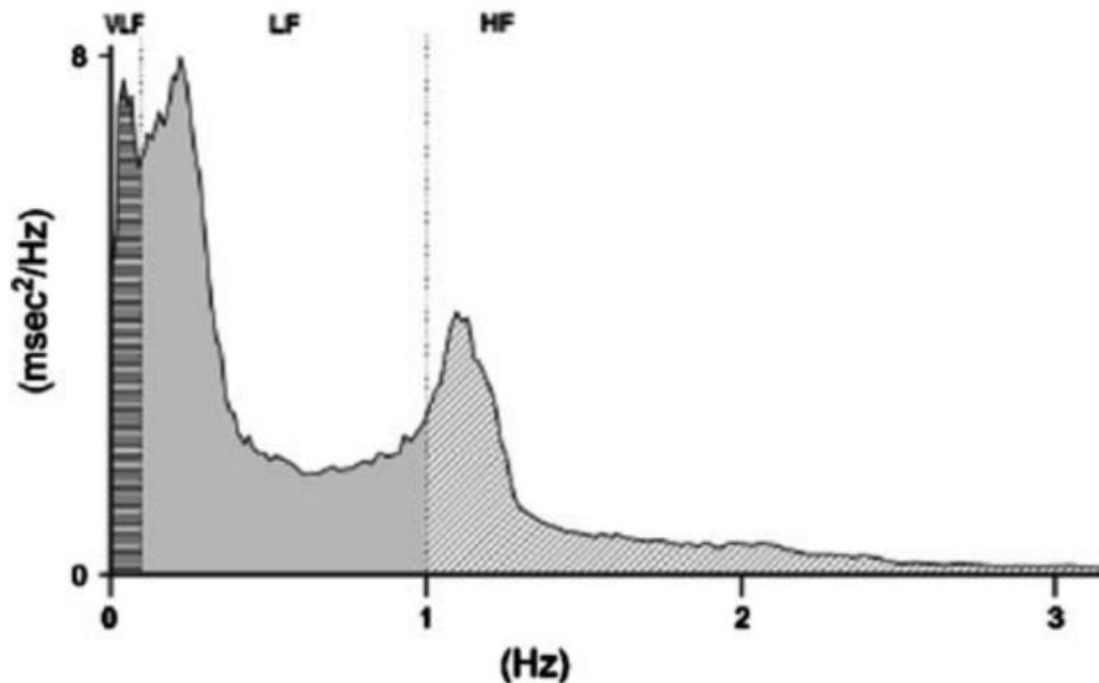
Die akkurate Erfassung der Parameter des kardialen Systems in Labornagern wird speziell in kardiovaskulären, pharmakologischen und toxikologischen Studien gefordert (CESAROVIC et al. 2011). Dabei basieren die Analysen der HR auf möglichst artefakt-freien Aufnahmen des EKG wie z. B. durch telemetrische Aufzeichnungen. Das EKG stellt in zeitlicher Abhängigkeit die Potenzialänderung der elektrischen Erregungsausbreitung als Summenvektor in den Herzmuskelfasern dar. Die entstehende EKG-Kurve weist unterschiedliche Wellen auf: Die P-Welle beschreibt die Depolarisation der Vorhöfe, die Erregungsausbreitung für die Hauptkammerkontraktion wird durch den QRS-Komplex graphisch dargestellt. Abschließend findet die Repolarisation statt, die der T-Welle entspricht (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Die Spannungsänderungen können über verschiedene Ableitungen erfasst werden. Abhängig von den Ableitungspunkten werden verschiedene Formen der EKG-Ableitung unterschieden. Bei der bipolaren Ableitung I, II und III nach Einthoven handelt es sich um eine der gängigsten EKG-Ableitungen.

Die HR wird über die Anzahl der Hauptkammerkontraktionen, dargestellt durch die R-Zacken pro Minute, definiert (*beats per minute*, bpm). Bei Ratten liegen die physiologischen Werte zwischen 200 bis 500 bpm (ERHARDT et al. 2012). Entsprechend der vorliegenden Umweltsituation passt das autonome Nervensystem (ANS), bestehend aus dem Parasympathikus und dem Sympathikus, die HR an. Der Sinusknoten, lokalisiert im rechten Vorhof, ist der primäre, elektrische Taktgeber der Herzmuskelkontraktionen. Die Entladungsfrequenz des Sinusknotens wird fortlaufend durch den Parasympathikus oder Sympathikus beeinflusst. Der Parasympathikus führt in Ruhesituationen über den *Nervus vagus* und den Transmitter Acetylcholin zu einer reduzierten HR. Der Sympathikus hingegen steigert unter Belastung über die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin die Herzfrequenz (KORESH et al. 2016). Steigt die HR durch den Sympathikus an, verkürzt sich der zeitliche Abstand zwischen zwei R-Zacken (RR-Intervalle, RR-I oder Normal-zu-Normal-Intervall, NNI). Die RR-I werden in Millisekunden (ms) gemessen und ihre Änderung wird als Herzratenvariabilität (*heart rate variability*, HRV) beschrieben (KORESH et al. 2016). Folglich kann die HRV als Parameter zur Erfassung der Änderung des ANS zwischen dem Sympathikus und dem Parasympathikus herangezogen werden (STEIN et al. 2006). Die Herzratenvariabilität kann zeitabhängig oder frequenzbedingt analysiert werden (THIREAU et al. 2008).

Ersteres umfasst die Änderung der RR-Intervalle über einen Zeitraum von mehreren Stunden oder Tagen auf Grundlage einer deskriptiven statistischen Auswertung (THIREAU et al. 2008). Im Rahmen der zeitbasierten HRV-Analyse können verschiedene Parameter unterschieden werden. SDNN entspricht dem Mittelwert der Standardabweichung aller RR-Intervalle (*mean standard deviation for all R-R intervals*) (NOVAK et al.

2015). RMSSD (*root mean square differences of successive R-R intervals*) stellt die Quadratwurzel der Änderung der RR-Intervalle dar und erfasst die Vagus vermittelnde HRV (BAYSAL-KIRAC et al. 2017).  $NN_x$  beschreibt die Anzahl aller RR-Intervalle, deren Differenz zu dem vorangegangenen RR-Intervall die Länge eines regulären QT-Intervalls überschreitet. Abhängig von der zu analysierenden Spezies muss der x-Wert angepasst werden. Beim Menschen beträgt dieser über 50 ms, bei der Ratte  $> 9$  ms und bei der Maus  $> 6$  ms (BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Der Prozentsatz aller durch  $NN_x$  beschriebenen Intervalle wird durch  $pNN_x$  dargestellt.

Die frequenzbedingte Analyse basiert auf kurzen, artefaktfreien EKG-Abschnitten. Es wird die Differenz der Änderung zweier aufeinander folgender RR-Intervalle in verschiedene Frequenzbereiche unterteilt: hohe Frequenzen (*high frequency*, HF), niedrige Frequenzen (*low frequency*, LF) und sehr niedrige Frequenzen (*very low frequency*, VLF) (KORESH et al. 2016). Die Frequenzbereiche wurden von der RAWENWAAIJ-ARTS et al. (1993) im humanmedizinischen Bereich wie folgt definiert: HF  $> 0,15$  Hz, LF 0,04–0,15 Hz. ROWAN et al. (2007) empfehlen Werte für die Frequenzanalyse für Ratten (LF: 0,1–1,0 Hz; HF: 1,0–3,5 Hz) und Mäuse (LF: 0,1–1,5 Hz; HF: 1,5–5,0 Hz). Für andere Tierarten gibt es bisher keine offizielle Berechnungsgrundlage. Aufgrund der hohen Artefakt-Anfälligkeit der sensiblen Analyse von HF und LF sind die Auswertungen der Frequenzanalyse auf Ruhephasen und daher kurze EKG-Abschnitte von wenigen Minuten limitiert (CHAMPEROUX et al. 2018). Im Rahmen einer Spektralanalyse wird, wie in Abbildung 4 veranschaulicht, die Summe der RR-Intervalle eines Frequenzbereiches in einem definierten Zeitabschnitt errechnet. Die zwei meistgenutzten Berechnungen der Spektralanalyse sind die Methoden *fast Fourier transform analysis* (FFT) und *autoregressive modelling* (CHAMPEROUX et al. 2018). RR-Intervalle werden bei 1 Hz generiert und die Power (Millisekunden<sup>2</sup>/Hz) des jeweiligen Frequenzbereiches wird durch die Fläche unter der Kurve dargestellt (ROWAN et al. 2007). Darauf aufbauend wird das Verhältnis zwischen LF und HF (LF/HF) genutzt, um Aussagen über die sympathisch-vagale Balance zu treffen. Diese kann für die Risikobewertung eines plötzlichen Herztodes oder SUDEP herangezogen werden (NOVAK et al. 2015; CHAMPEROUX et al. 2018).



**Abbildung 4:** Darstellung des Power-Spektrums der HRV bei Ratten basierend auf der FFT-Methode. Die drei voneinander isolierten Höchstwerte entsprechen der VLF, LF und der HF. Die gestrichelten Linien stellen die angepassten Grenzwerte der Frequenzbereiche bei Ratten dar (VLF < 0,1 Hz, VLF 0,1–1,0 Hz; HF > 1,0). Die totale Power (*total power*, TP) der Spektralkomponenten wird durch die Fläche unter der Kurve in Millisekunden<sup>2</sup>/Hz repräsentiert. Abbildung von ROWAN et al. (2007) mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Die HRV ist ein an den circadianen Rhythmus angepasster physiologischer Parameter, der die Wirkungsweise von Sympathikus und Parasympathikus darstellt (ROWAN et al. 2007). Die HF wird hauptsächlich durch die respiratorische Sinusarrhythmie geprägt. Durch die Ein- und Ausatmung unterliegt die HR physiologischen Schwankungen, vermittelt durch den Parasympathikus (GEISLER et al. 2013). Die LF hingegen wird überwiegend durch rhythmische Schwankungen der sympathisch regulierten Druckrezeptoren herbeigeführt. Eine zusätzliche parasympathische Beteiligung wird nicht ausgeschlossen (CHAMPEROUX et al. 2018). Die Bandbreite der VLF ist noch nicht näher weiteren physiologischen Vorgängen zuzuordnen (KORESH et al. 2016). Eine wechselseitige Beeinflussung beider Systeme, des Sympathikus und des Parasympathikus, wird diskutiert (AKSELROD et al. 1981).

Abweichungen der physiologischen HRV in der zeitabhängigen sowie der frequenzbasierten Analyse gelten als negativ prognostizierende Faktoren und stehen in direkter Korrelation mit dem medizinischen Zustand (ROWAN et al. 2007; THIREAU et al. 2008). Eine verminderte HRV tritt sowohl bei herzkranken Patienten als auch bei Patienten mit einer Epilepsie auf. Niedrige RMSSD-Werte wurden bei Patienten mit Vorhofflimmern, kardiovaskulären Erkrankungen oder Herzversagen festgestellt (NOVAK et al. 2015).

BAYSAL-KIRAC et al. (2017) stellten signifikant niedrigere SDNN-, RMSSD- und pNN<sub>x</sub>-Werte bei Humanpatienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie fest. In diesem Zusammenhang wird auch das Risiko, an einem SUDEP zu versterben, diskutiert. Eine gesteigerte HR und eine verminderte HRV können einen der zugrundeliegenden Mechanismen von SUDEP darstellen (BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Aufgrund dieses bedeutenden prädisponierenden Faktors wurde in der Humanmedizin eine Empfehlung für eine Standardanalysetechnik herausgegeben (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996). THIREAU et al. (2008) empfehlen die Entwicklung einer standardisierten Methode für die Erfassung und Analyse von HRV bei Nagetieren, die sich bisher aufgrund der hohen HR als problematisch erwiesen hat. Bei Sprague-Dawley-Ratten demonstrierten BEALER et al. (2011) eine Woche nach einem SE einen verminderten RMSSD-Wert. Auch eine erhöhte HR und ein verlängertes QT-Intervall wurden bei Ratten zwei Wochen nach einem SE erfasst (BREWSTER et al. 2016). Durch das Auslösen eines SE wird das ANS aktiviert und somit die kardiale Erregbarkeit akut und langfristig verändert. Während des SE kann das Herz akut destabilisiert werden. BREWSTER et al. (2016) diskutierten, dass in der Latenzphase nach einem SE kardiale Umbauprozesse, die weiterhin persistieren, zu elektrophysiologischen Veränderungen des Herzens und seinen Parametern führen können. Kardiale Veränderungen, die in der chronischen Phase bei Ratten im Rahmen eines Epilepsiemodells gefunden wurden, entsprechen den kardialen Veränderungen in Patienten mit Epilepsie (BREWSTER et al. 2016).



### III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen von Epilepsieerkrankungen sind noch nicht vollständig verstanden (POTSCHKA u. BRODIE 2012). Um die Grundlagen der Epileptogenese, der pharmakoresistenten Epilepsien sowie der Komorbidität dieser Erkrankung besser zu verstehen und darauf aufbauend neue Therapieansätze zu entwickeln, sind derzeit tierexperimentelle Untersuchungen in der Epilepsieforschung unumgänglich (LOSCHER 2017). Bei der Auswahl eines für die Fragestellung geeigneten Tiermodells muss neben den wissenschaftlichen Forderungen auch der Tierschutz berücksichtigt werden. Jede Manipulation an einem Tier kann mit Schmerzen, Leiden oder Schäden einhergehen. Diese potentielle Belastung der Tiere ist im Sinne des in der EU-Richtlinie 2010/63 geforderten 3R-Prinzips und der Tierschutz-Versuchstierverordnung zu minimieren. In tierexperimentellen Forschungseinrichtungen können epileptische Anfälle nicht nur in Epilepsiemodellen, sondern auch bei Tiermodellen anderer Erkrankungen, bei Zuchtlinien oder bei der toxikologischen Testung von neuen Substanzen auftreten. Tiermodelle an Mäusen und Ratten stellen in der Forschung der Temporallappenepilepsie die am häufigsten verwendeten Forschungsmethoden dar (LIDSTER et al. 2016). Beide Tierarten sind Beutetiere und versuchen, ihre Schmerzen vor potentiellen Angreifern zu verbergen. Dies erschwert eine objektive Einschätzung der vorherrschenden Belastung dieser Tierarten. Um der gesetzlichen Forderung nach einer evidenzbasierten Belastungseinstufung von Tierversuchen und folglich dem Tierschutz in der tierexperimentellen Forschung gerecht zu werden, muss eine Grundlage aus objektiv ermittelten und beweisgestützten Methoden geschaffen werden. Dabei ist eine umfassende Untersuchung notwendig und die speziesspezifischen Verhaltensweisen, die biochemischen und physiologischen Veränderungen sind zu berücksichtigen.

In der vorliegenden Dissertation wurde die Belastung in dem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell nach BRANDT et al. (2003) bei Ratten umfassend und objektiv untersucht. Basierend auf den zu den versuchsspezifischen Zeitpunkten ermittelten Daten, wurde eine Empfehlung für eine Belastungseinstufung des gesamten Tiermodells formuliert. Dafür wurden Verhaltensuntersuchungen sowie Veränderungen der biochemischen und physiologischen Parameter in zwei Versuchsreihen erfasst. In der ersten Versuchsreihe wurden die Verhaltensuntersuchungen und die biochemischen Parameter von elektrodenimplantierten und stimulierten Tieren mit denen von zwei Kontrollgruppen, einer naiven und einer elektrodenimplantierten Gruppe, verglichen. Zudem konnte durch die elektrodenimplantierten, nicht stimulierten Tiere zusätzliche Effekte, aufgrund dieser Implantation detektiert werden. In einer weiteren Teilstudie, der zweiten Versuchsreihe, wurden allen Tieren eine Elektrode und ein Telemetrie-Transmitter implantiert, um auch



die physiologischen Parameter detektieren zu können. Weiterhin wurde ein Teil dieser Tiere stimuliert. Die Werte der anderen Tiere wurden als Kontrollgruppe für vergleichende Analysen herangezogen. Neben der Erfassung der physiologischen Parameter konnte bei dieser zweiten Versuchsphase die EEG-Anfallsüberwachung bei den frei beweglichen Ratten im Heimkäfig stattfinden. Der Einsatz von Telemetrie-Transmittern wird oft als *Refinement*-Maßnahme diskutiert und sollte diesbezügliche in der vorliegenden Arbeit weitergehend untersucht werden. Aufgrund der zusätzlichen Transmitterimplantation bei den Tieren der zweiten Versuchsreihe, konnte ein Einfluss der Transmitter auf die Belastung nicht ausgeschlossen werden.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Empfehlung für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells bei Ratten zu formulieren. Anhand dieser transparenten und evidenzbasierten Einschätzung sollen Wissenschaftler und Behörden bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodells in Hinblick auf die Fragestellung und das Tierwohl unterstützt werden. Damit soll die Belastung von Versuchstieren in der Epilepsieforschung nachhaltig minimiert werden. Weiterhin sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Welche kumulative Gesamtbelastung kann für das Modell empfohlen werden?
- Welche Belastungseinstufung kann für die Implantation einer Tiefenstimulationselektrode vorgeschlagen werden?
- Welche Verhaltens-, biochemischen und physiologischen Veränderungen können in der Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase erfasst werden?
- Können einzelnen Parameter als Kandidaten für die Routineüberwachung empfohlen werden?
- Stellt die Verwendung von Telemetrie-Transmittern anstatt der herkömmlichen Kabel-Ableitung im Rahmen der zweiwöchigen EEG-Erfassung eine *Refinement*-Maßnahme dar?

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Die vorliegende Studie wurde im Rahmen des von der Regierung von Oberbayern genehmigten Tierversuchsantrages AZ 55.2-1-54-2532-105-16 und im Einklang mit der EU-Richtlinie 2010/63/EU und den ARRIVE-Guidelines (KILKENNY et al. 2010) durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden 63 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (200–224 g, Envigo, Horst, Niederlande) verwendet, die in einer offenen Tierhaltung mit einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus (Hellphase von 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ, entsprechend 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ) gehalten wurden. Die Raumtemperatur lag konstant zwischen 20 und 24 °C, die Luftfeuchtigkeit betrug zwischen 45 und 60 %.

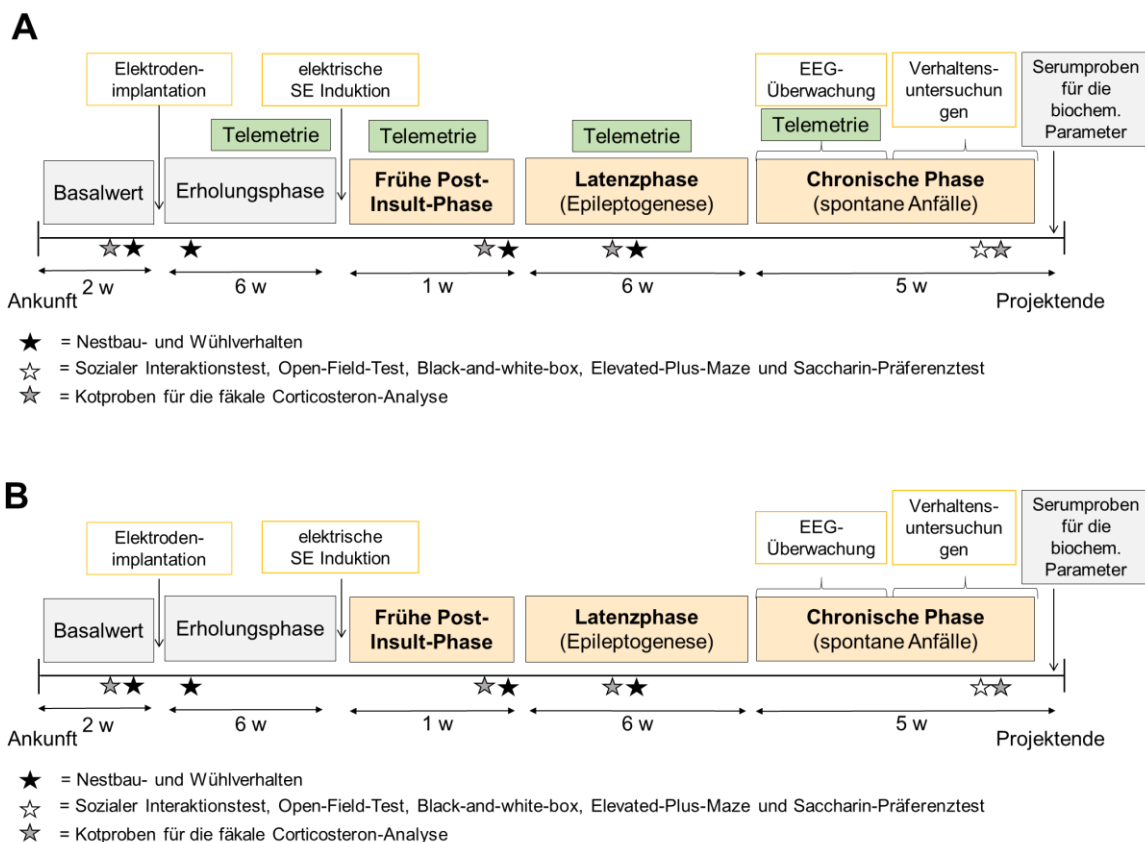
Während der gesamten Versuchsspanne von 26 Wochen wurden die Tiere aufgrund der implantierten Tiefenstimulationselektrode einzeln in ‚Makrolon Käfigen Typ III hoch‘ (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Ssniff Rattenfutter (Ssniff R/M Haltung Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser als Trinkwasser waren stets ad libitum für die Tiere zugänglich. Bei dem wöchentlichen Umsetzen in einen frischen Käfig mit Weichholzgranulat (Grade 5; Altromin GmbH, Lage, Deutschland) sowie 14 g Nestbaumaterial (Enviro Dri<sup>®</sup>) wurden das Trinkwasser und Futter erneuert.

Am Tag der Ankunft erhielten die ca. 12 Wochen jungen Tiere eine Rasur im Nackenbereich, um im Verlauf des Versuches Haarproben einer definierten Zeitspanne entnehmen zu können. In einer anschließenden mindestens einwöchigen Adaptationsphase mit täglichem Handling der Tiere fand eine Eingewöhnung in die neuen Haltungsbedingungen statt.

Während der gesamten Dauer der Studie wurde der Allgemeinzustand der Tiere täglich erfasst und mit Hilfe eines durch die Regierung von Oberbayern genehmigten Evaluationsbogens bewertet. Überschritt bei einem reduzierten Allgemeinzustand die Bewertung eines Tieres einen höchstzulässigen Einzel- oder Summenscore, wurde das Tier tierartgerecht mit Pentobarbital (600 mg/kg i.p, Narcoren<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) euthanasiert. Zusätzlich wurde das Gewicht der Tiere sowie der Grimace-Scale und der Irwin-Score (Anhang 4.) mindestens einmal pro Woche erfasst.

Die Versuchsdurchführung fand in zwei zeitlich getrennten Teilstudien statt (Abbildung 5). In der ersten Versuchsreihe der Studie wurden insgesamt 44 Tiere in drei Versuchsgruppen randomisiert (<https://www.randomizer.org/>) verwendet. Die naive Gruppe umfasste 12

Tiere, die keinen Eingriff erhielten. Den 14 Tieren der Sham-Gruppe und den 18 Tieren der SE-Gruppe wurde eine Tiefenstimulationselektrode in die basolaterale Amygdala implantiert. Postoperativ wurde ein Tier aus gesundheitlichen Gründen euthanasiert und zwei Tiere der Sham-Gruppe verloren im Verlauf der Studie das Implantat und wurden aus den statistischen Analysen exkludiert. In der zweiten Teilstudie, der zweiten Versuchsreihe erhielten alle 19 Ratten ebenfalls eine BLA-Tiefenstimulationselektrode sowie randomisiert zugeteilt subkutan einen HD-x02-Telemetrie-Transmitter, um das EKG, das EEG und die Aktivität der Tiere erfassen zu können. Aufgrund dieser zweiten Versuchsreihe konnten zwar die physiologischen Parameter erfasst werden, jedoch ein Einfluss durch die Transmitterimplantation nicht vollständig ausgeschlossen werden. In beiden Versuchsreihen wurde der gleiche Studienaufbau eingehalten. Bis auf die zusätzlichen telemetrischen Aufzeichnungen, der zweiten Versuchsreihe und den unterschiedlichen EEG-Anfallsüberwachungen, wurden in beiden Versuchsreihen die gleichen Versuche und Proben zu den analogen Zeitpunkten erfasst.



**Abbildung 5:** Zeitlicher Verlauf der vorliegenden Studie des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells. (A) Versuchsaufbau der ersten Versuchsreihe mit drei Versuchsgruppen: Naive, Sham- und SE-Gruppe. (B) Versuchsaufbau der zweiten Versuchsreihe inklusive der telemetrischen Aufzeichnungen des EKG, EEG und der Aktivität. Die Versuchsgruppen umfassten eine Sham- und eine SE-Gruppe. In beiden Versuchsreihen wurden Verhaltensuntersuchungen durchgeführt sowie biochemische Parameter zu den gleichen Zeitpunkten bestimmt.

Zwei Tiere dieser Versuchsreihe mussten nach der Implantation aus gesundheitlichen Gründen euthanasiert werden. Die SE-Gruppe umfasste hier elf Ratten, die Sham-Gruppe sechs. Die Tiere der SE-Gruppen beider Versuchsreihen wurden sieben Wochen nach der jeweiligen Implantation elektrisch stimuliert. Dadurch wurde ein SE ausgelöst, der die Versuchsphasen wie sie J. A. GORTER et al. (2016) bereits definierten, induziert. Diese werden in der vorliegenden Arbeit im Einzelnen systematisch untersucht: Die Post-Insult-Phase erstreckt sich von dem SE selbst bis einschließlich zum Ende der ersten Woche nach dem SE. In dieser Phase sollte die Belastung der Tiere durch den elektrisch ausgelösten Status epilepticus erfasst werden. Die anschließende Epileptogenese wird durch die Latenzphase von einer bis sieben Wochen nach dem Insult definiert. Um die Phase der Epileptogenese möglichst isoliert betrachten zu können, wurde als Untersuchungszeitpunkt in dieser Phase der Tag genau vier Wochen nach dem elektrischen Insult gewählt. BRANDT dokumentierte bereits, dass die Tiere im elektrischen Post-SE-Modell im Durchschnitt 49 Tage nach dem Insult den ersten epileptischen Anfall exprimieren. Damit hat sich die Epilepsieerkrankung manifestiert und die Tiere haben die chronische Phase des Modells erreicht. In dieser Phase ist eine Anfallsüberwachung der Tiere notwendig, um die Anfallsaktivität der einzelnen Tiere zu detektieren und damit das Modell zu überprüfen. Stimulierte Tiere, die nachweislich keinen generalisierten epileptischen Anfall zeigten, wurden ab dem SE von der statistischen Analyse exkludiert. Diese Tiere erfüllten nicht die Anforderungen des Modells. Elektrisch stimulierte Tiere werden im Folgenden in der Post-Insult- und der Latenzphase ausschließlich als *Post-SE-Tiere* und ab der chronischen Phase als *Tiere mit Epilepsie* bezeichnet. Zu jedem Zeitpunkt wurden so viele Untersuchungen wie möglich durchgeführt, ohne dabei ein Risiko einzugehen, Folgeuntersuchungen zu beeinflussen. Mit dem Auftreten des ersten epileptischen Anfalls und der damit einhergehenden Manifestation der Erkrankung wird der Zeitraum ab der achten Woche nach dem SE als die chronische Phase definiert.

Während der elektrischen Stimulation verstarben vier Tiere der ersten und zwei Tiere der zweiten Versuchsreihe. Zusätzlich mussten zwei Tiere der SE-Gruppe der ersten Versuchsreihe aus gesundheitlichen Gründen zu Beginn der chronischen Phase frühzeitig euthanasiert werden. Weiterhin konnte jeweils bei zwei Tieren der SE-Gruppen beider Versuchsreihen weder Handling-assoziiert noch während der EEG-Erfassung ein generalisierter Anfall detektiert werden. Diese Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen. Die Tiere der Sham-Gruppen dienten als Kontrollgruppe und wurden, abgesehen von dem elektrischen Insult, identisch zu der SE-Gruppe behandelt.

Am Ende der Projekte wurde den Tieren zur Euthanasie Pentobarbital (600 mg/kg i. p., Narcoren<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) appliziert. Dafür erhielten die Tiere mindestens 30 Minuten vor der Euthanasie Metamizol (50 mg/kg

oral, Vetalgin<sup>®</sup>, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland) verdünnt in 0,2%iger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Sobald die Atmung ausgesetzt hatte, wurden die Tiere entlang der Linea alba eröffnet. Die Nebennieren wurden beidseits entnommen und das Gewicht wurde separat mit einer Feinwaage (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) ermittelt. Mit Hilfe einer stumpfen Nadel wurde Herzblut für die Plasmagewinnung extrahiert. Anschließend fand die Perfusionsfixierung der Tiere statt, um eine schnelle Fixierung des Gehirns über das natürliche Gefäßsystem gewährleisten zu können. Hierfür wurde eine Knopfkanüle im linken Herzventrikel Richtung Aortenbogen platziert, um vorerst zehn Minuten 0,9 prozentige Kochsalzlösung, dann weitere 17 Minuten vierprozentige Paraformaldehyd-Lösung in das Gefäßsystem zu leiten. Um einen Abfluss während der Perfusion zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof eingeschnitten. Schließlich wurden die Gehirne aller Tiere entnommen und für einen weiteren Tag in der vierprozentigen Paraformaldehyd-Lösung bei 4 °C postfixiert. Nachfolgend wurden die Gehirne bis zum Absinken in einer 30-prozentigen Sucrose-Lösung gelagert, um sie abschließend mit Isopentan (2-Methylbutan, Honeywell, Offenbach, Deutschland) und flüssigem Stickstoff (Linde AG Gases Division, Pullach, Deutschland) in dem Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium, Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) einzufrieren zu können. Die Gehirne wurden bei -80 °C gelagert und für die Überprüfung der korrekten Lokalisation der Elektrode geschnitten. Sie wurden zusätzlich in einem weiteren Projekt verwendet, das nicht Teil dieser Studie war.

## **2. Elektrisches Post-SE-Modell**

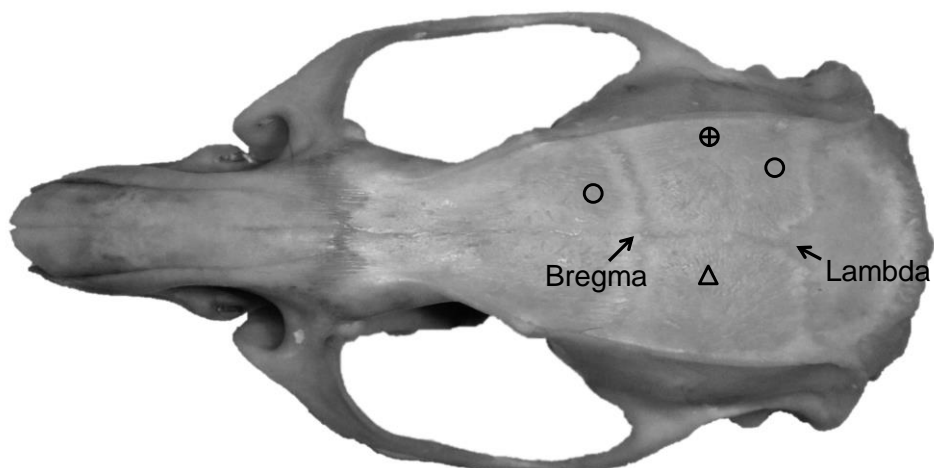
### **2.1. Elektrodenimplantation**

Bipolare Ableitungs- und Stimulationselektroden aus rostfreiem und mit Teflon ummanteltem Stahl, wurden mittels stereotaktischer Operationstechnik in die rechte basolaterale Amygdala (BLA) implantiert.

Folgende Medikamente wurden im Rahmen der Operation angewendet: Meloxicam (1 mg/kg, Metacam<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) wurde sowohl mindestens 30 Minuten vor der Operation als auch 24 Stunden postoperativ nach dem Eingriff subkutan (s. c.) appliziert um eine Analgesie zu gewährleisten. Eine zusätzliche, lokale Anästhesie erhielten die Tiere in Narkose zehn Minuten vor dem Eingriff durch die s. c. Applikation von 1 ml Bupivacain (Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1:200 000), Jenapharm<sup>®</sup>, mibe GmbH, Brehna, Deutschland) unter die Kopfhaut. Über einen Zeitraum von acht Tagen, beginnend einen Tag vor der Implantation, fand die antibiotische Versor-

gung der Tiere zweimal täglich durch 0,1 ml Marbofloxacin s. c. (1 mg/kg, Marbocyl<sup>®</sup> FD 1 %, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland) statt. Die Injektionsnarkose mittels Chloralhydrat (360 mg/kg gelöst in 20 ml 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland) wurde intraperitoneal (i. p.) appliziert. Um im Stadium der chirurgischen Toleranz operieren zu können, fand die Überwachung der Narkosetiefe vor und während der Operation durch Überprüfung der Lid-, Korneal- und Zwischenzehenreflexe statt. Falls nötig wurde mittels der Applikation von 0,3 ml Chloralhydrat i. p. die Narkosetiefe aufrechterhalten. Mittels einer Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) wurden die Augen der Tiere während des Eingriffes vor Austrocknung geschützt.

Die Haare wurden sowohl im Implantationsbereich, kaudal von den Ohren bis zum nasalen Augenwinkel als auch im Nacken in einem 2 x 2 cm großen Bereich rasiert. Beim Einspannen der Tiere in den Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) mit der Oberkieferhalterung auf 3,5 mm ventral wurde die Implantationsstelle desinfiziert. Nach Eröffnung der Haut mit einem Skalpell und dem Freipräparieren der Schädeldecke erfolgte die Implantation der bipolaren, mit Teflon ummantelten Ableitungs- und Tiefenstimulationselektrode in die basolaterale Amygdala. Ausgehend vom Bregma, der rostralen Schnittstelle der Knochennähte des Schädels, wurde nach dem stereotaktischen Atlas von PAXINOS u. WATSON (2005) die Lokalisation der Elektrode ermittelt (anteriorposterior -2,2 mm, lateral +4,7 mm und dorsoventral +8,5 mm). Die Elektrode wurde im nächsten Schritt über ein dort gebohrtes Loch durch die Schädeldecke in die Gehirnregion implantiert. Mittels zweier Fixationsschrauben aus rostfreiem Stahl, angebracht wie in Abbildung 6 zu erkennen, wurde die Elektrode an der Schädeldecke dauerhaft befestigt. An einer dritten Schraube, der Elektrode gegenüberliegend, wurde die Erdung fixiert. Anschließend fand die dauerhafte Fixierung der Elektrode und aller Schrauben untereinander in zwei Paladurschichten (Paladur<sup>®</sup>, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) statt. Die erste Schicht enthielt zusätzlich 2,1-prozentiges Gentamicinsulfat (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), um das Infektionsrisiko zu reduzieren. Bei der zweiten Paladurschicht wurde darauf geachtet, eine glatte Oberfläche entstehen zu lassen, um das Verhaken des Implantats und somit das Verletzungsrisiko für das Tier zu minimieren. Die Wundränder wurden abschließend aufgefrischt und mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien) in Einzelheften verschlossen. Etwa zehn Tage nach dem Eingriff wurden die Einzelhefte mittels eines Fadenziehmessers und Pinzette gezogen.



- ⊕ Ableitungs- und Stimulationselektrode
- Fixationsschrauben
- Δ Erdungsschraube

**Abbildung 6:** Rattenschädel mit Abbildungen der Position der Stimulations- und Ableitungselektrode sowie der Fixations- und Erdungsschrauben; Foto mit freundlicher Genehmigung von Dr. Thomas Licko.

## 2.2. Elektrische Dauerstimulation

In den folgenden Untersuchungen wurde das SE-BLA-Modell nach BRANDT et al. (2003) verwendet, um einen sich selbst erhaltenden Status epilepticus (SSSE) in insgesamt 29 Ratten zu induzieren. Unmittelbar vor der Stimulation wurde das Gewicht der Tiere ermittelt sowie ein basales EEG aufgenommen. Für die 18 Tiere der ersten Versuchsphase wurde das EEG durch das Verbinden der Elektrode über ein zweiadriges isoliertes Kabel an den Adapter des Elektroenzephalographen aufgezeichnet. Anschließend wurden die Tiere einzeln in mit Zellstoff ausgepolsterte Glasaquarien (60 cm x 40 cm x 40 cm) gesetzt und über ein Kabel mit dem Stimulationsapparat (Accupulser Modell A310C und Stimulus Isolator Modell A310C, World Precision Instruments, Berlin) verbunden. Bei den elf Tieren der zweiten Versuchsphase konnte das EEG konstant über die Receiver-Platten, die unterhalb des Glasaquariums platziert wurde, während der gesamten Dauer der Stimulation aufgezeichnet werden. Im Anschluss an die basale EEG-Aufzeichnung fand in beiden Versuchsphasen die 25-minütige elektrische Dauerstimulation durch biphasische Einzelpulsserien (positiv-negativ geladene Rechteckimpulse) bei einer Stromstärke von 700  $\mu\text{A}$  und einer Frequenz von 50 Hz statt. Die Tiere blieben nach der Stimulation für weitere 3 Stunden und 35 Minuten ohne Kabel in den mit Zellstoff ausgepolsterten Glasaquarien. Nach den vier Stunden im SSSE erhielten die Tiere 10 mg/kg

Diazepam (Diazepam-ratiopharm<sup>®</sup>, 10mg/ 2ml Injektionslösung) i. p. um einen Abbruch des Status epilepticus zu erreichen. In Fünf-Minuten-Abständen wurde das EEG kontrolliert, um den genauen Zeitpunkt des Abbruchs des SE bestimmen zu können. Konnte 60 Minuten nach der Diazepam-Injektion noch eine Anfallsaktivität in einem EEG eines Tieres erkannt werden, wurde diesem wiederholt Diazepam mit der gleichen Dosis i. p. appliziert.

Während der gesamten SE-Dauer von vier Stunden wurden die Tiere von Fachpersonal überwacht, das die Anfallsschwere konstant visuell nach RACINE (1972) beurteilte und protokollierte. Um einen SSSE im EEG zu bestätigen, musste im Anschluss an die Stimulation im EEG eine mindestens doppelte Amplitudenhöhe gegenüber dem Basal-EEG im Elektroenzephalographen festgestellt werden. Nach dem Ablauf der vier Stunden wurde das EEG erneut auf eine Anfallsaktivität überprüft, wodurch ein SSSE nachgewiesen wurde. Die Anfallsaktivität während des SSSE wurde abschließend im Hinblick auf die visuelle Anfallsschwere, die Aufrechterhaltung der Anfallsaktivität sowie die Überprüfung im EEG evaluiert. Darauf basierend fand die Einteilung der Anfallstypen in SSSE-Typen I–III statt, wie in Abbildung 7 nach BRANDT et al. (2003) dargestellt.

SSSE-Typ		Anfallsstadien	Anfallscharakteristika	
Typ I	Typ II	<i>Stadium I</i>	Schwacher Faziaklonus (stereotypes Schnüffeln, Schließen des ipsilateralen Auges), Immobilität	Fokale Anfallsaktivität
		<i>Stadium II</i>	Starker Faziaklonus (Kaubewegungen, Kopfnicken)	
		<i>Stadium III</i>	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Typ III		<i>Stadium IV</i>	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes	Generalisierte Anfallsaktivität
		<i>Stadium V</i>	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes, Verlust der Stellreflexe (Überfallen nach hinten)	

**Abbildung 7:** Übersicht der Anfallsstadien und SSSE-Typen definiert nach BRANDT et al. (2003). Zuordnung der Anfallscharakteristika zu den einzelnen Anfallsstadien sowie darauf basierende Bewertung der Anfallsaktivität und Einteilung der SSSE-Typen.

Bis zum Erlangen des vollen Bewusstseins wurde die Körpertemperatur der Tiere durch beheizte Wärmematten aufrechterhalten und die Vitalfunktionen wurden fortlaufend kontrolliert. Körperwarme Ringerlactat-Lösung (Ri-Lac<sup>®</sup>, Hartmann B.Braun Vet Care,



Metsungen, Deutschland) wurde am Tag der Stimulation anschließend in einer Dosierung von maximal 10 ml s. c. und i. p. injiziert sowie am Folgetag in einer von 5 ml s. c. In den folgenden drei Tagen wurden die Tiere mit angerührtem hoch kalorischen Brei (HiPP, Gute-Nacht-Brei, Hafer-Apfel) und aufgeweichten Pellets dreimal täglich beigefüttert, bis die Tiere eigenständig Futter aufnahmen. In den ersten sieben Tagen nach der Stimulation wurden die Tiere engmaschig kontrolliert, dabei wurden das Gewicht, der Grimace-Scale und der modifizierte Irwin-Score täglich protokolliert.

### **2.3. Anfallsüberwachung**

In der chronischen Phase erfolgte eine 14-tägige kontinuierliche Anfallsüberwachung in der achten und neunten Woche nach der Dauerstimulation mit Video- und EEG-Aufzeichnungen, um spontane epileptische Anfälle detektieren und klassifizieren zu können. Dies diente dem Nachweis der erfolgreichen Umsetzung des Epilepsiemodells nach BRANDT et al. (2003). Die Methode der EEG-Anfallsüberwachung unterschied sich zwischen den beiden Versuchsreihen. Die Tiere der Sham- und der SE-Gruppe der ersten Versuchsreihe saßen während dieses Zeitraumes einzeln in Glasaquarien (35 cm x 40 cm x 40 cm) mit Einstreu-Granulat (Rehofix, Ssniff GmbH, Soest, Deutschland). Trinkwasser und Sniff-Rattenfutter waren ad libitum zugänglich. Die Tiere wurden zweimal täglich kontrolliert. Nach sieben Tagen fand eine Reinigung des gesamten Glasaquariums statt. In der zweiten Versuchsreihe konnte mittels telemetrischer Aufzeichnungen des EEGs die Anfallsüberwachung in den Heimkäfigen stattfinden. Die EEG-Aufzeichnungen und die Video-Überwachung der zweiten Versuchsreihe sind in Abschnitt IV.3.2 genauer erläutert. Generalisierte epileptische Anfälle, die während des Handlings oder außerhalb der 14-tägigen Anfallsüberwachung auftraten, wurden in beiden Versuchsreihen separat protokolliert. Im weiteren Verlauf der Studie wurden nur Tiere der SE-Gruppen beider Versuchsreihen ab dem Zeitpunkt der elektrischen Induktion berücksichtigt, bei denen Anfälle in der chronischen Phase während der Video- und EEG-Anfallsüberwachung detektiert oder während des Handlings beobachtet wurden.

### **2.4. Video- und EEG-Aufzeichnung**

Für die EEG-Aufzeichnung der ersten Versuchsreihe wurden folgende Einheiten benötigt: (1) ein analoger Digitalwandler (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd, Hastings, UK); (2) ein Kanalverstärker-Aufzeichner (Animal Bio Amp, ADInstruments Ltd, Hastings, UK) und (3) ein Computer mit einer entsprechenden EEG-Auswertungssoftware (Labchart 5 für Windows). Um die EEGs ableiten zu können, wurden die Elektroden der Tiere über ein zweiadriges, ummanteltes Kabel mit einem im Deckel des Aquariums integrierten An-

schluss verbunden. Ein im Anschluss integrierter Telefon-Kabel-Entwirrer gewährleistete den Tieren Bewegungsfreiheit, ohne dabei die Kabel zu verdrehen. Erdungs-Krokodilklemmen am Verstärker verminderten das Hintergrundrauschen in der EEG-Aufzeichnung. Folgende Einstellungen wurden am Programm *Labchart 5* selbst vorgenommen: Für die Abtastrate wurden 200 Hz gewählt mit einer Filtereinstellung von 0,1 Hz bei dem High-Pass-Filter und 60 Hz für den Low-Pass-Filter. Durch das Einstellen des ‚Notch-Filters‘ konnte der Frequenzbereich des Netzstroms bei 50 Hz berücksichtigt werden.

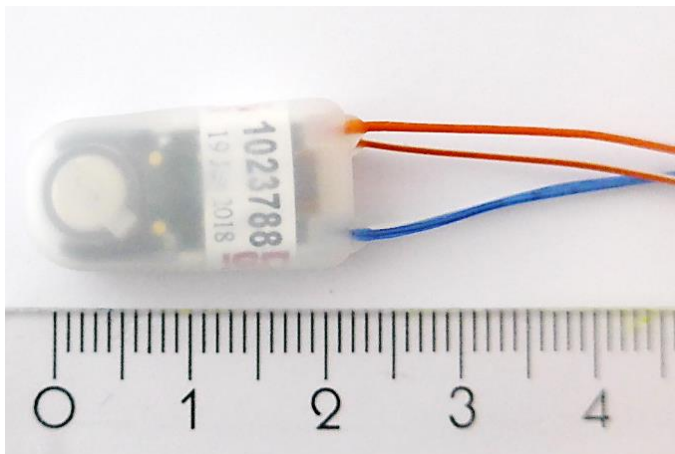
Simultan zu der EEG-Aufzeichnung fand auch eine Video-Aufzeichnung statt. Die Tiere der ersten Versuchsphase wurden hierfür von CCD-Kameras (Conrad Electronic GmbH, München, Deutschland) mit Infrarotempfindlichkeit in den Glasaquarien 14 Tage lang erfasst. Maximal sechs Tiere wurden von einer Kamera in Schwarz-weiß-Aufzeichnung aufgenommen. In der vorliegenden Studie wurden die vier Kameras für insgesamt 26 Tiere benutzt. Das Videomaterial wurde automatisch über eine interne RAID (*redundant array of independent discs*) abgespeichert. Die Analysen des Videomaterials erfolgten über das Programm *Digi-Protect Searcher 6.275 beta* (ABUS Security-Tech, Affing, Deutschland).

Die Auswertung der Aufzeichnungen für die Anfallsdetektion wurde primär anhand der Videoaufzeichnungen durchgeführt, da nur dadurch eine Klassifizierung der Anfälle möglich ist. Bei der Anfallsbestimmung wurden der jeweilige Anfallszeitpunkt, die Anfallsdauer und -schwere erfasst.

### **3. Telemetrie Messungen**

#### **3.1. Transmitterimplantation**

In der zweiten Versuchsreihe der vorliegenden Studie wurden ‚HD-X 02‘-Telemetrie-Transmitter der Firma DSI (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA), wie in Abbildung 8 dargestellt, verwendet. Diese Transmitter messen ein Volumen von 1,7 cc und wiegen 2,2 g. Es können zwei verschiedene Signalqualitäten mit je zwei Ableitungskabeln gemessen werden. Zwei orangefarbene Kabel dienten der EKG-Messung über die Brustmuskulatur, die zwei blauen Kabel wurden mit einer Tiefenstimulationselektrode verbunden und erfassten das EEG. Es kann durch eine weiß-farbige Steifung des negativen Kabels zwischen dem positiven und negativen Kabel unterschieden werden.



**Abbildung 8:** ‚HD-X 02‘-Telemetrie-Transmitter der Firma DSI (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA).

Die Transmitter wurden im Rahmen dieser Arbeit subkutan in die linke Flanke implantiert. Mittels eines Magneten konnten die Transmitter in den Tieren aktiviert sowie deaktiviert werden. Der jeweilige Zustand wurde anhand eines Radios überprüft: Befand sich ein aktivierter Transmitter in der Nähe, war ein durchgehender Ton hörbar. Die Implantation der Transmitter erfolgte bei allen 19 Tieren der zweiten Versuchsreihe am Tag der Elektrodenimplantation, die im direkten Anschluss an die Transmitterimplantation stattfand. Die Tiere wurden mit der gleichen Allgemeinanästhesie, Analgesie und Antibiose versorgt wie bei der in Abschnitt IV.2.1 beschriebenen Elektrodenimplantation. Zusätzlich wurden den narkotisierten Tieren die Haare im gesamten Implantationsbereich entfernt und es wurde eine lokale Anästhesie mit Bupivacain (Bupivacain 0,5 %; Jenapharm, Deutschland) s. c. an allen rasierten Hautstellen zehn Minuten präoperativ appliziert. Dieses Vorgehen entspricht der Empfehlung von DSI. Der Implantationsbereich für den Transmitter umfasste je ein circa 2 x 2 cm großes Feld am linken lateralen Abdomen und in dem Bereich zwischen dem linken Rippenbogen und dem Brustbein. Auch die Verbindungslinien zwischen dem linken lateralen Abdomen und dem Kopf sowie dem Brustbein wurden 0,5 cm breit rasiert. Zu Beginn des Eingriffes wurde in Bauchlage der Telemetrie-Transmitter selbst implantiert. Hierfür wurde ein ca. 2 cm langer Hautschnitt kaudal vom linken Schulterblatt mit Hilfe eines Skalpells gesetzt. Anschließend erfolgte eine stumpfe Präparation mit einer Schere, um eine circa 3 cm lange und 2 cm breite, subkutane Tasche darzustellen. Vor dem Versenken des Transmitters in der Tasche wurde dieser mit isotonischer NaCl-Lösung gespült und zuvor entsprechend der Anleitung der Firma DSI sterilisiert. Anschließend fand die Implantation der EKG-Kabel statt: Mittels eines stumpfen Trokars wurde ein subkutaner Tunnel zu dem linken Rippenbogen und Brustbein präpariert, durch das anschließend die orangefarbenen Kabel für die EKG-Ableitung geführt wurden. Bei diesem Vorgang wurden die Tiere in Rückenlage verbracht. Das positive Kabel wurde zum linken

Rippenbogen geführt, das negative zum linken Brustbein. Die jeweilige Hautstelle war mit einem circa 1 cm langen Hautschnitt zu eröffnen. An den Enden der Kabel wurde ein circa 5 mm langer Abschnitt von der Isolation befreit, um dort die EKG-Signale messen zu können. Dieser Abschnitt des Kabels wurde mittels einer Kanüle (20Gx1 HS-Einmal Injektionskanülen, Henry Schein®, Melville, USA) durch die Brustmuskulatur geführt und intramuskulär mit einem nicht resorbierbaren Faden (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien) dauerhaft befestigt. Abschließend wurden die Hautinzisionen mit Einzelheften verschlossen. Zwecks der weiterführenden Implantation der Kabel für die EEG-Ableitung wurden die Tiere erneut in Brustlage gebracht. Von der Tasche ausgehend, wurde ein subkutaner Tunnel bis zu der kranialen Schädelbasis präpariert und die blauen Ableitungskabel wurden hindurchgeführt. Im Anschluss fand die Tiefenelektrodenimplantation in den Stereotakten statt wie in Abschnitt IV.2.1 beschrieben. Vor der Implantation der Tiefenstimulationselektrode wurde das positive Kabel mit dem Draht der Elektrode verbunden. Ein circa 0,5 cm langer Abschnitt der Isolation der Elektrode sowie des Kabels des Transmitters wurde entfernt. Anschließend wurde der unisolierte Teil des Drahts mehrfach um den unisolierten Teil der Elektrode gewickelt, um eine sichere Signalübertragung gewährleisten zu können. An dem negativen Kabel wurde ebenfalls ein Teil der Isolierung entfernt und mit der kaudalen Fixationsschraube verdrillt. Die Verbindungen sowie die Elektrode wurden im Rahmen der Elektrodenimplantation mit Paladur® fixiert und isoliert. Alle Wundränder wurden am Ende des Eingriffes aufgefrischt und mit Einzelheften verschlossen. Zehn Tage postoperativ erfolgte das Ziehen der Fäden mit Hilfe eines Fadenziehmessers.

### 3.2. Datenaufzeichnung

Mittels der HD-X02 Transmitter konnten in der zweiten Versuchsreihe sowohl das EEG als auch das EKG und die Aktivität der frei beweglichen Tiere im Heimkäfig aufgezeichnet werden. Die Signale wurden von dem jeweiligen Transmitter des Tieres über Radiowellen an die zugeordnete Receiver-Platte (RPC-1, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) gesendet. Von dort erfolgte die Informationsweiterleitung an die Matrix (MX 2.0, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA), welche die Radiowellen in ein digitales Signal übersetzte. Schließlich wurden die gesammelten Signale der Tiere über einen Switch (Cisco Small Business Switch, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) an den Aufzeichnungscomputer gesendet, auf dem das Signal mit der entsprechenden Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) abgebildet und gespeichert werden konnte. Das EKG der Tiere wurde nach der bipolaren Ableitung II nach Einthoven dargestellt. Das EEG wurde mit einer Aufzeichnungsrate von 1000 Hz erfasst. Die Aktivität errechnete sich aus der Änderung

der Distanz des Transmitters zu der Receiver-Platte und wird als Anzahl pro Minute angegeben (*counts per minute*, cpm). Das EEG, das EKG und die Aktivität der Tiere wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten mindestens 48 Stunden lang aufgezeichnet (siehe Abbildung 6 in Kapitel IV. 1). Eine basale Messung fand an den zwei Tagen vor der Stimulation statt. In der Post-Insult-Phase wurden am fünften und am sechsten Tag nach dem elektrisch induzierten SE die Parameter detektiert. Weiterhin erfolgte eine Aufzeichnung während der Latenzphase, vier Wochen nach dem Status epilepticus. Mit Beginn der chronischen Phase wurden in der achten Woche nach dem SE die Parameter der Sham-Gruppe für 48 Stunden aufgezeichnet. Die Parameter der SE-Gruppe wurden hingegen für 14 Tage dokumentiert, um eine Anfallsdetektion im Rahmen der Video- und EEG-Überwachung sicherzustellen. Zu allen vier Messzeitpunkten wurden alle Tiere zusätzlich mit einer Videokamera (Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) überwacht.

### 3.3. Datenanalyse

Die telemetrisch erfassten Daten der Aktivität, des EKG und des EEG wurden separat analysiert.

#### 3.3.1. Circadiane Aktivität, Herzfrequenz (HR) und Herzratenvariabilität (HRV)

Die Aktivität der Tiere wurde mit Ponemah<sup>®</sup> (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) automatisch analysiert und exportiert. Die aufgezeichneten EKG-Daten wurden ebenfalls mit der Software Ponemah<sup>®</sup> (Ponemah Software 6.41, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) analysiert. Für die Analyse des EKGs mussten die R-Zacken eindeutig identifiziert werden. Dafür wurden die EKG-Sequenzen durch die Software mit einer automatischen R-Zacken-Erkennung, mit den gewählten Einstellungen wie in Abbildung 9 dargestellt, voranalysiert. Anschließend wurde jede zu analysierende EKG-Sequenz manuell kontrolliert und wenn nötig die Voreinstellungen individuell angepasst. Dieser Vorgang war unumgänglich, um gewährleisten zu können, dass die EKG-Analysen ausschließlich auf artefaktfreien EKG-Sequenzen mit korrekt identifizierten R-Zacken, wie in Abbildung 10 dargestellt, basieren. Undeutliche EKG-Sequenzen, bei denen die R-Zacke nicht identifiziert werden konnte, wurden aus der Analyse exkludiert. Darauf aufbauend wurden die HR, das NN-Intervall sowie die HRV-Parameter mit der Software über den gesamten Zeitraum in Fünf-Minuten-Sequenzen analysiert und in eine Excel-Tabelle exportiert. Für die frequenzbasierte HRV-Analyse wurden drei 3-Minuten-Sequenzen ohne Artefakte und mit einer minimalen Aktivität zu sechs Zeitpunkten (9, 12, 15, 21, 24, 3 Uhr) pro Tier und Messzeitpunkt ausgewählt. Durch die Anwendung eines Filters (LF= 0,1–1,0, HF= 1,0–3,5) konnten die Daten aus

Ponemah<sup>®</sup> exportiert werden. Die telemetrischen Daten wurden anhand einer dreifaktoriellen Varianzanalyse berechnet, um Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, den Versuchsphasen und der Hell- und Dunkelphase zu ermitteln. Die individuellen Vergleiche wurden mit Hilfe der Falscherkennungsrate nach der Benjamini-Hochberg-Korrektur berechnet. Die graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der telemetrischen Daten beruht auf dem R-Paket ‚ggplot‘. Die Glättung der Linien beruht auf der Loss-Regression mit einem Spektrum von 0,15. Bei den dargestellten Kastengrafiken (Boxplots) beträgt die Länge der Whisker maximal das 1,5-Fache des Interquartilsabstands (IQR).

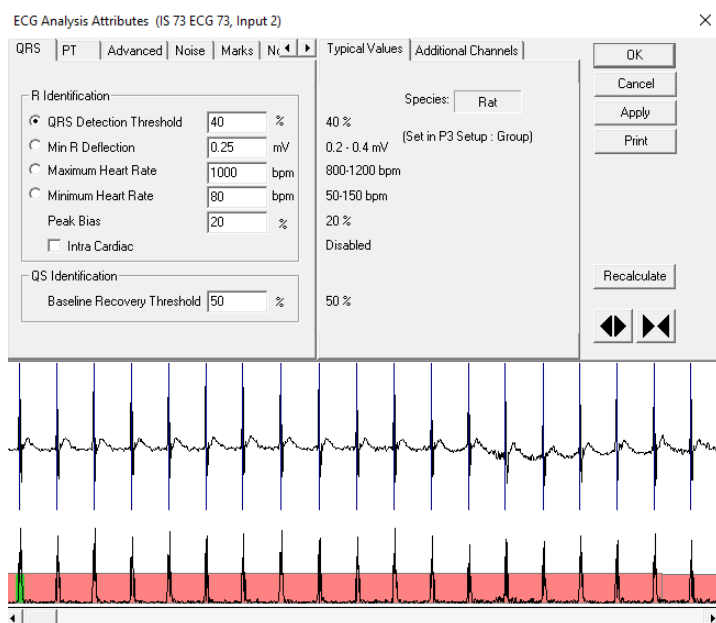


Abbildung 9: Einstellungen der individuellen R-Zacken-Erkennung in der Analysesoftware Ponemah<sup>®</sup> 6.41.

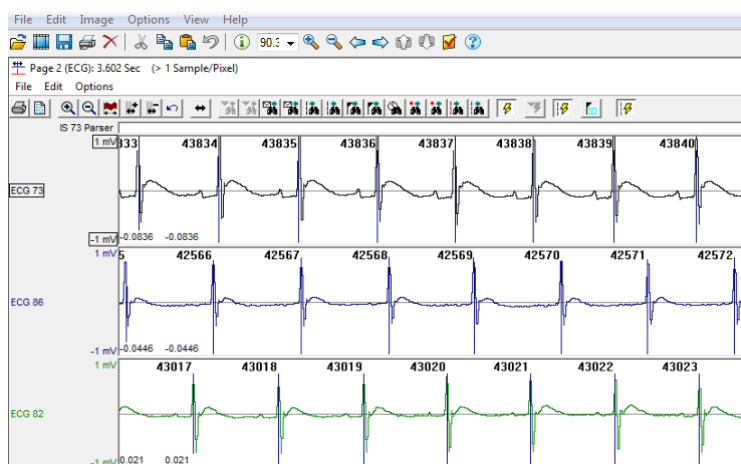


Abbildung 10: Anwendung der R-Zacken-Erkennung in Ponemah<sup>®</sup> 6.41.

### 3.3.2. Telemetrische EEG-Auswertung

Die telemetrisch erfassten EEG-Daten wurden mittels der Software NeuroScore (NeuroScore<sup>TM</sup> Version 3.0, Copyright © Data Sciences International) analysiert. Um einen

Anfall zu detektieren, wurde die automatisierte Anfallsdetektion mit den Einstellungen wie in Abbildung 11 dargestellt genutzt. Anschließend wurden die Anfälle videobasiert klassifiziert sowie die Anfallsdauer und Frequenz ermittelt. Die Anfallserkennung wurde bereits zuvor in einem anderen Teilprojekt innerhalb unserer Arbeitsgruppe überprüft. Dabei konnte jeder klinische Anfall auch im EEG nachgewiesen werden.

The image shows two panels from the Neuroscore software interface. The first panel, titled '1 Protocol Properties - IS 75', contains fields for 'Name' (IS 75), 'Category', and 'Description'. Below these are checkboxes for 'Fail protocol if any detector fails' and three radio buttons for storage options: 'Store as global protocol, available for all recordings' (selected), 'Store as recording protocol, available for this recording only', and 'Store as subject protocol, available when recordings with this subject id are open'. The second panel, titled '2 Spike Trains', has two tabs: 'General Properties' and 'Input Signals'. Under 'Spike Detection', there are two radio buttons: 'Dynamic Threshold' and 'Absolute Threshold' (selected). The 'Dynamic Threshold' section includes 'Threshold Ratio' (3), 'Maximum Ratio' (20), and 'Minimum Value' (100  $\mu\text{V}$ ). The 'Absolute Threshold' section includes 'Threshold Value' (450  $\mu\text{V}$ ) and 'Maximum Value' (1000  $\mu\text{V}$ ). Below these are 'Minimum Spike Duration' (0,01 ms) and 'Maximum Spike Duration' (100000 ms). A checkbox 'Mark individual spikes' is checked. The 'Spike Trains' section includes 'Minimum Spike Interval' (0,01 s), 'Maximum Spike Interval' (0,5 s), 'Minimum Train Duration' (3 s), 'Train Join Interval' (3 s), and 'Minimum Number of Spikes' (10). A checkbox 'Enable 1Hz HP Filter' is unchecked.

**Abbildung 11:** Einstellungen der individuellen EEG-Analyse in Neuroscore für die automatische Detektion von Anfallsaktivitäten im EEG.

## 4. Verhaltensuntersuchungen

Die Verhaltensuntersuchungen fanden in beiden Versuchsreihen stets zwischen 7:00 und 13:00 Uhr statt. Einzelne Untersuchungen konnten im Laufe der Studie wiederholt durchgeführt werden, wie der Burrowing-Test und die Tests zum Heimkäfigverhalten. Weiterführende Verhaltensuntersuchungen sollten nur einmalig in der chronischen Phase erfasst werden, um das spontane, unbeeinflusste Verhalten der Tiere ermitteln zu können. Im Einzelnen handelt es sich um den Open-Field-Test, die Black-and-white-Box, das Elevated-Plus-Maze und den sozialen Interaktionstest. Die Reihenfolge der untersuchten Verhaltenstests wurde an die Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe von MÖLLER et al. (2018) in dem Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten angelehnt. Diese war in der chronischen Phase folgende: Sozialer Interaktionstest, Burrowing, Open Field, Black-and-white-Box, Elevated-Plus-Maze sowie Saccharin-Präferenztest. Die Verhaltensuntersuchungen im Open Field, in der Black-and-white-Box und im Elevated-Plus-Maze sowie die soziale Interaktion erfolgten in einem speziellen, schallisolierten Verhaltensraum. Die Versuchsaapparaturen befanden sich jeweils in der Mitte des Raumes. Sie wurden durch schwarze Vorhänge von der restlichen Umgebung und anderen Tieren abgegrenzt. Alle Tiere wurden mindestens 30 Minuten vor Start des Tests in den Untersuchungsraum verbracht, damit sie sich an die neue Umgebung adaptierten. Die dem Test entsprechenden Licht- und Temperaturverhältnisse waren zu diesem Zeitpunkt bereits voreingestellt und wurden auch während der Testabläufe nicht mehr verändert. Die Lichtverhältnisse konnten an den jeweiligen Test optimal mittels positionier- und dimmbarer Lampen (Spot Light Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) und eines Luxmeters (Voltcraft® MS 1300, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland) angepasst werden. Die Tiere wurden während der Verhaltensuntersuchungen über eine Kamera (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) gefilmt. Das Filmmaterial wurde mit einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Nach jedem Versuchsdurchgang mit einem Tier wurde der jeweilige gesamte Versuchsaapparat mit 0,1 % Essigsäure gereinigt, um mögliche Gerüche des vorherigen Tieres zu neutralisieren. Die Reihenfolge der getesteten Tiere war in jedem Verhaltenstest randomisiert (<https://www.randomizer.org/>). Nur, den Tieren bekannte Mitarbeiter führten die Tests verblindet durch. Hier soll darauf verwiesen werden, dass eine Verblindung zwischen elektrodenimplantierten und naiven Tieren nicht möglich ist.

### 4.1. Heimkäfigverhalten

Die Erfassung des Nestbauverhaltens erfolgte in Anlehnung an die Beschreibung von VAN LOO u. BAUMANS (2004) und JIRKOF et al. (2013). Die Tiere erhielten einmal wö-



chentlich einen frischen Käfig mit Weichholz-Granulat und 14 g Nestbaumaterial (Enviro-Dri<sup>®</sup>, Claus GmbH, Friedensau 11, D-67117 Limburgerhof). Wie unsere Arbeitsgruppe kürzlich zeigte, kann die Zeit zwischen 7:00 und 9:00 Uhr als der optimale Messzeitpunkt zur Erfassung der Nestkomplexität für die jeweiligen Tagesscores gelten (MÖLLER et al. (2018)). Wie sich während einer basalen Messreihe herausstellte, in der die Nester täglich bewertet wurden, konnte der höchste Nestscore am fünften Tag nach dem Umsetzen dokumentiert werden. Daran angelehnt wurde im gesamten Verlauf der Studie am fünften Tag nach dem Umsetzen die Nestkomplexität zwischen 7:00 und 9:00 Uhr erfasst. Die Beurteilung der Nestkomplexität erfolgte anhand eines Bewertungssystems: 0 = das Nestmaterial ist unbearbeitet oder über den ganzen Käfig verteilt, 1 = das Nestmaterial ist ausschließlich in einem abgegrenzten Bereich des Käfigs vorzufinden und wurde zu einem flachen Nest bearbeitet, 2 = ein leicht eingedrücktes Nest ist vorhanden und 3 = ein tiefes, höhlenartiges Nest. Die Erfassung des Nestbauverhaltens ist eine etablierte Methode und hat sich in der tierexperimentellen Forschung als ein einfacher, in den meisten Tiereinrichtungen durchführbarer, mit minimalem Aufwand verbundener Test erwiesen.

Zusätzlich wurde der Verschmutzungsgrad des Nests im Rahmen des Soiling-Tests immer an dem siebten Tag nach dem Umsetzen mittels eines Bewertungssystems erfasst. Es wurden Scores von 1 bis 3 vergeben, wobei 1 einen sauberen, 2 einen leicht verschmutzten und 3 einen stark verschmutzten Nestbereich beschreibt.

#### 4.2. Burrowing-Test

Bei dem Burrowing-Test nach RUTTEN et al. (2014) wird das natürliche Wühl- und Grabverhalten von Nagetieren getestet, das sich die Tiere instinktiv in einer Gewöhnungsphase aneignen. Die Tiere saßen zur Habituation eine Stunde lang einzeln in einem Marcolon-Typ-IV-Käfig mit Zellstoff als Unterlage bei 15-20 Lux. Anschließend wurde pro Käfig eine eigens dafür angefertigte Plastikröhre (32 cm lang x 10 cm Ø, an der offenen Seite um 6 cm erhöht) mit 2500 g Kies (Quartz hell, Körnung 2 – 4 mm, ORBIT GmbH, Usingen, Deutschland) befüllt hinzugegeben. In weiteren 60 Minuten hatten die Tiere Zeit, Kies aus der Röhre herauszugraben. Dabei wurde die Zeit bis zur Ausführung der ersten Grabbewegung erfasst. Nach Ablauf der 60 Minuten wurde die verbleibende Kiesmenge in den Röhren gemessen, um daraus die Menge an herausgegrabenem Kies ermitteln zu können. Um das Grabverhalten zu steigern, erfolgte zu Beginn des Versuches eine Gewöhnungsphase. Diese erstreckte sich über fünf Tage mit einer abschließenden Basalmessung am letzten Tag. Am ersten Tag des Burrowing-Tests erhielten die Tiere nach der Habituationszeit für weitere 60 Minuten eine leere Röhre in den Testkäfig. An Tag zwei bis fünf wurde der Test wie oben beschrieben mit einer mit 2500 g Kies befüllten Röhre durchgeführt. Die Ergebnisse des fünften Tages dienten als Basal-

messung. Tiere, die weniger als 500 g aus der Röhre herausgebuddelt hatten, wurden im weiteren Verlauf der Auswertung exkludiert. Der Kies wurde zwischen den Durchgängen mit 0,1 % Essigsäure gereinigt und anschließend mit Leitungswasser durchgespült, um mögliche Gerüche des vorangegangenen Tieres zu eliminieren.

#### 4.3. Sozialer Interaktionstest

Zur Untersuchung des sozialen Verhaltens gegenüber Artgenossen wurde der soziale Interaktionstest nach HÖLTER et al. (2015) und FILE et al. (2004) durchgeführt. Dabei wurde die Qualität der sozialen Interaktion zwischen zwei Tieren aus der gleichen Versuchsgruppe für zehn Minuten in einem Makrolon-Käfig Typ IV (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) bei zwölf Lux erfasst. Die Qualität der sozialen Interaktion wurde zwischen aktivem, passivem und aggressivem Verhalten differenziert und separat erfasst. Aktives Verhalten wurde als gegenseitiges Beschnupern oder Fellpflege sowie direkter Körperkontakt definiert. Saßen oder lagen die Tiere dicht nebeneinander, ohne direkten Körperkontakt zu haben, oder zeigten parallel an den gleichen Stellen Interesse, wurde dies als ein passives Verhalten erfasst. Als aggressives Verhalten wurden Drohungen, Kampfsituationen oder Beißen gewertet. Um mögliches Dominanzverhalten zu umgehen, wurden die Tiere eines Testpaares nach vergleichbarem Gewicht ausgewählt. Es erfolgte an den zwei Tagen vor Versuchsdurchführung eine Habituation an die Versuchsbedingungen. Dafür wurden die Tiere einzeln für zehn Minuten in einen Typ-IV-Käfig bei den entsprechenden Lichtverhältnissen verbracht. An dem dritten Tag wurden die Tierpaare parallel in den Käfig gesetzt. Die Zeit, welche die Tiere in der jeweiligen sozialen Interaktion verbrachten, wurde von Personal gestoppt, das verblindet war.

#### 4.4. Open-Field-Test

Mit dem Open-Field-Test wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere in der chronischen Phase des Versuchs ermittelt. Hierfür wurde das schwarze, kreisförmig begrenzte Open Field, mit einem Durchmesser von 85 cm und einer Höhe von 25 cm, gleichmäßig mit 10 – 20 Lux beleuchtet. Damit sollte das Erzeugen von angstassoziiertem Verhalten bei den Tieren vermieden werden. Jedes Tier wurde einzeln für 10 Minuten in die Versuchsarena verbracht. Um zu gewährleisten, dass alle Tiere von demselben Ausgangspunkt starteten, wurden die Tiere mit einem Abstand von circa 10 cm zum Rand mit Blickrichtung zum Zentrum des Open Fields gesetzt. Mit Hilfe der Software EthoVision® (Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) wurde die Arena des Open Fields in drei verschiedene Zonen unterteilt: die äußere Zone, eine mittlere Zone mit 81 % des Durchmessers und eine innere Zone mit 58 % des Durchmessers. Die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Zonen,

die Durchschnittsgeschwindigkeit und die immobile Zeit der Tiere wurden automatisch über das Programm ermittelt. Eine Person, die den Versuchsgruppen gegenüber verblindet war, erfasste manuell die Frequenz der Aufrichtvorgänge.

#### **4.5. Angstassoziiertes Verhalten**

Das angstassoziierte Verhalten wurde mit Hilfe der Black-and-white-Box und des Elevated-Plus-Maze einmalig während der chronischen Phase für beide Versuchsreihen ermittelt.

##### **4.5.1. Black-and-white-Box**

Mit Hilfe der Black-and-white-Box erfolgte das Erfassen des angstassoziierten Verhaltens in der chronischen Phase. Die Versuchsanlage bestand aus einer schwarzen, nach oben geschlossenen Box (39 x 20 x 39 cm) und einer weißen, nach oben geöffneten Box (39 x 39 x 39 cm). Beide Kompartimente waren durch einen 10 x 10 cm großen, geschlossenen Durchgang miteinander verbunden. Die weiße Box wurde mit 50 Lux beleuchtet. Jedes Tier wurde individuell für 5 Minuten in der weißen Box platziert, dem Eingang der schwarzen Box zugewandt. Mit EthoVision wurden die Latenzzeit bis zum ersten Übertritt in die schwarze Box, die Aufenthaltsdauer in beiden Kompartimenten und die Gesamtanzahl der Übertritte zwischen diesen gemessen. Manuell wurde die Anzahl der Streckvorgänge aus der schwarzen Box heraus (*stretching postures*) von einer Person ermittelt, die den Versuchsgruppen gegenüber verblindet war.

##### **4.5.2. Elevated-Plus-Maze**

Das Elevated-Plus-Maze entspricht einer um 83 cm erhöhten, kreuzförmigen Apparatur mit vier 50 cm langen und 14 cm breiten Armen, die in ein 14 x 14 cm großes, quadratisches Zentrum münden. Zwei gegenüberliegende Arme bilden mit 32 cm hohen Wänden geschlossene Arme und wurden mit zehn Lux beleuchtet. Die beiden offenen Arme wurden mit einer Lichtintensität von 20 Lux ausgeleuchtet. Jedes Tier wurde einzeln für 5 Minuten in das Zentrum des EPM platziert, mit dem Kopf in die Richtung zu dem gleichen, offenen Arm. Folgende Parameter wurden automatisch über die EthoVision-Software detektiert: die Durchschnittsgeschwindigkeit, die Zeitdauer in den offenen und geschlossenen Armen sowie im Zentrum, die Zeitdauer im äußeren Drittel der offenen Arme und die Frequenz der Übergänge von den offenen in die geschlossenen Arme. Darüber hinaus wurden die Häufigkeit des Hinunterbeugens des Kopfes über den Rand des EPMs hinaus (*head dips*) sowie Streckvorgänge in die offenen Arme hinein (*stretching postures*) manuell und verblindet erfasst.

#### **4.6. Saccharin-Präferenz-Test**

Der Saccharin-Präferenz-Test wurde nach dem Protokoll von KLEIN et al. (2015) durchgeführt. Der Test erstreckte sich über vier Tage, an denen die Tiere jeweils zwei Trinkflaschen (700 ml, 70 x 70 mm eckig, Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland) mit je 500 Gramm Flüssigkeit erhielten. Am ersten und dritten Tag befand sich in beiden Trinkflaschen Wasser, um die Trinkwassermenge für jedes Tier pro Tag ermitteln zu können. Am Tag zwei wurde die linke Trinkflasche anstatt mit Wasser mit 500 Gramm 0,1-prozentiger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) befüllt. Am vierten Tag wurde hingegen die rechte Trinkflasche mit der Saccharin-Lösung versetzt, um einen Effekt einer präferierten Trinkflaschenseite zu umgehen. Die vom Tier konsumierte Menge wurde jeweils nach 24 Stunden über die in den Flaschen zurückgebliebene Flüssigkeit errechnet.

#### **4.7. Allgemeinbefinden**

Zusätzlich zu der täglichen Inaugenscheinnahme der Tiere im Rahmen der gesetzlichen Mindestanforderungen wurde das Allgemeinbefinden der Tiere über den gesamten Verlauf der Studie anhand des Körpergewichtes, des Irwin-Scores und des Grimace-Scales mindestens einmal in der Woche bewertet. In der Post-OP-Phase sowie der Post-Insult-Phase wurden die genannten Parameter der Tiere täglich dokumentiert. Mit Hilfe des Irwin-Scores werden sowohl das Allgemeinbefinden als auch neurologische Defizite erfasst. Je höher der gemessene Irwin-Score ausfällt, desto stärker sind diese Veränderungen zu werten. Das Körpergewicht und der modifizierte Irwin-Score (Anhang 4.) wurden in der Regel am Vormittag im Zuge des wöchentlichen Umsetzens in einen frischen Käfig erfasst. Vor dem Umsetzen konnte in einer ruhigen Atmosphäre der Grimace-Scale der Tiere beurteilt werden.

### **5. Biochemische Analysen**

Biochemische Parameter sollen in der vorliegenden Studie als objektive Parameter zu den modellspezifischen Zeitpunkten geprüft werden. Um durch eine invasive Probennahme iatrogen gesetzten Stress während des laufenden Versuches zu vermeiden, wurden die Serumproben und die Proben für die Vaginalzytologie einmalig am Ende des Versuches gewonnen. Während des Versuches wurden die biochemischen Proben auf die Analyse von Corticosteron-Metaboliten in Kotproben beschränkt.

## 5.1. Corticosteron

### 5.1.1. Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM)

Kotproben wurden zu fünf Zeitpunkten in der vorliegenden Studie gesammelt, um Corticosteron und dessen Metaboliten durch eine nichtinvasive Methode erfassen zu können. Als basaler Messwert dienten die Kotproben, die am Tag der Implantation erfasst wurden. Anschließend wurden Kotproben von den Tieren aller Versuchsgruppen zwei Tage sowie eine und vier Wochen nach dem elektrischen Insult sowie einen Tag vor der Euthanasie gesammelt. Um das Zeitfenster des Kotabsatzes einzugrenzen, wurden die Tiere am Morgen der Messzeitpunkte zwischen 7:00 und 9:00 Uhr in einen frischen Käfig gesetzt. In dem folgenden Zeitraum von drei Stunden wurde der abgesetzte Kot eingesammelt. Anschließend wurden die Proben bei -20 °C bis zu der Analyse gelagert. Die Analyse der Corticosteronmetaboliten bestand aus einer Extraktion und einer Bestimmung. Für die Extraktion wurden die Kotproben im Trockenstand bei 60 °C gelagert, bis kein Wasser mehr enthalten war. Mit einem Spatel wurden die Proben anschließend zermahlen und aus je 0,1 g Probe mittels 2 ml von 80-prozentigem Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) das Corticosteronmetaboliten extrahiert. Hierfür wurde das Gemisch für 30 Minuten auf einem Schüttler (Multi-Vortex, RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) bei Raumtemperatur platziert und im Folgenden für zehn Minuten bei 3 500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde im Speziallabor von Prof. Dr. Rupert Palme (Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie des Departments für Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, Österreich) in Kooperation für die Forschungsgruppe (DFG - FOR 2591) weiterführend analysiert. Dabei wurden 5 µl des Überstandes jeder Probe mit 495 µl Essigsäure vermischt und mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (EIA) konnte die Konzentration der FCM bestimmt werden. Der verwendete EIA (5 $\alpha$ -Pregnan-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-Triol-20-one EIA) wurde durch LEPSCHY et al. (2010) entwickelt und beschrieben. Im Rahmen dieser Studie wurde die FCM über den Kot ermittelt, da die kleinen Urinmengen bei Ratten die Auswertung limitieren und die Probengewinnung in dem verwendeten Heimkäfig mit Einstreu nicht adäquat gewährleistet werden kann (LEPSCHY et al. 2007). Auf die Verwendung eines metabolischen Käfigs sollte verzichtet werden, um keinen zusätzlichen Stress zu induzieren.

### 5.1.2. Corticosteron in Serumproben

Invasive Probennahmen, wie die Gewinnung der Serumproben, wurden auf das Ende des Versuches, einen Tag vor der Euthanasie, reduziert. Um die circadianen Veränderungen in den Serumproben zu reduzieren, erfolgte die Probenentnahme zwischen 9:00 und

10:30 Uhr. Die benötigte Allgemeinanästhesie für die retroorbitale Blutentnahme wurde mit 4 % Isofluran (Isofluran CP<sup>®</sup>, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) mit einem Präzisionsdampfer (Träger-Werk A.G. Lübeck) in einer Plexiglasröhre (Innendurchmesser 7 cm, Länge 22 cm) eingeleitet. Mit 1,5 % Isofluran wurde für die Dauer der Blutentnahme die Anästhesie aufrechterhalten. Das Blut wurde durch eine Punktion mit einer Glaskapillare (Mikroröhrchen, Innendurchmesser 1,1-1,2 mm) in dem nasalen Augenwinkel gewonnen und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 30 µl Antiprotease (Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) aufgefangen. Entsprechend der Empfehlung der GV-SOLAS wurde die maximale Blutentnahmemenge (10 % des Blutvolumens bei Ratten) nicht überschritten. Abschließend wurde die Kapillare aus dem Augenwinkel entfernt und mit Hilfe eines Tupfers wurde sanft Druck auf den Augenwinkel ausgeübt, um eine Nachblutung zu verhindern. Die Blutprobe ruhte für 45–60 Minuten bei Raumtemperatur, um sie anschließend bei 3 500 rpm und 4 °C für 10 Minuten zu zentrifugieren und so die Serumproben durch den Überstand zu gewinnen. Bis zu der Analyse von Corticosteron, CK und BDNF wurden die Serumproben bei -80 °C gelagert.

Für die Auswertung der Corticosteron-Konzentration in den Serumproben wurde der kommerziell erwerbliche ELISA-Test (Corticosteron rat/mouse ELISA, DEV9922, Demeditec, Kiel, Deutschland) entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet. Im Doppelansatz wurden die Standards, die Kontrollen und die Proben auf die 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zwei Stunden lang wurden der Inkubationsbuffer und das Enzymkonjugat auf dem Plattenschüttler (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei 600 rpm inkubiert, bevor die Mikrotiterplatte durch viermaliges Waschen gereinigt wurde. Anschließend wurde jedes Well mit der Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) versetzt und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Reaktion mit der Stopplösung (Salzsäure 2N) unterbrochen und die optische Dichte der Probe wurde bei einer Wellenlänge 450 nm anhand des ELISA-Messgeräts (Gen 5 microplate reader, Biotek; Gen 5 Imager Software, Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) ausgelesen. Die Werte der Standards wurden als Standardkurve im sigmoidalen Kurvenverlauf dargestellt. Basierend auf diesem Kurvenverlauf wurde die Corticosteron-Konzentration der Proben errechnet. Die zu erwartenden Corticosteron-Normalwerte liegen am Morgen bei 53,9–332,1 ng/ml bei weiblichen Ratten (Produktanleitung).

### 5.1.3. Corticosteron in Haarproben

Am Tag der Ankunft wurden alle Tiere in einem 2 x 2 cm großen Areal im Nacken rasiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass bei künftigen Probenahmen die nachgewachsenen Haare ausschließlich die Corticosteron-Konzentration, die im experimentellen Zeitraum

eingelagert wurde, enthielten. Am Tag der Implantation wurden die nachgewachsenen Haare aller Tiere, einschließlich der naiven Tiere, in dem gleichen Bereich abrasiert. Diese Proben wurden für die Corticosteron-Basalmessung sichergestellt. Abschließend wurden die Haare an dem Tag der Perfusion erneut in dem gleichen Areal abrasiert und gesammelt. Die zweite Probe repräsentiert die gesamte Zeitspanne der versuchsbedingten und modellspezifischen Prozeduren und der damit verbundenen Corticosteron-Konzentration. Alle Haarproben wurden bis zu der Analyse im Speziallabor (Clemens Kirschbaum, Dresden LABservice GmbH, Dresden, Deutschland) vor Lichteinstrahlung geschützt. Mittels einer Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie fand die Analyse nach einem Protokoll von GAO et al. (2013) statt. Eine definierte Menge der mit Isopropanol gereinigten und mindestens zwölf Stunden getrockneten Haarproben wurde für 18 Stunden bei 45 °C mit Methanol versetzt. Anschließend wurde der Alkohol in einem Stickstoffkondensator bei 65 °C verdampft und die Proben wurden mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Schließlich konnte die Konzentration von Corticosteron in den Haarproben mittels der Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie ermittelt werden.

### **5.2. Nebennieren**

Die Nebennieren wurden vor der Perfusion der Tiere beidseits entnommen. Das Gewicht beider Nebennieren wurde separat mit einer Feinwaage (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) ermittelt.

### **5.3. Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF)**

Die Analyse der BDNF-Konzentration in den Serumproben erfolgte im Labor des Kooperationspartners Prof. Rainer Hellweg (Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Berlin, Deutschland). Bei der von HELLWEG et al. (2003) beschriebener Methodik für die Analyse von BDNF handelt es sich um einen hochsensitiven und hochspezifischen ELISA (Promega Inc., Mannheim, Deutschland). Die im Verhältnis 1:20 verdünnten Serumproben mit einem Probenpuffer wurden über Nacht bei 4 °C in einer monoklonalen mit Anti-BDNF-Antikörper (1:750) beschichteten Well-Mikrotiterplatte inkubiert. Nach vier folgenden Waschvorgängen wurden die Proben zentrifugiert. Der gewonnene Überstand konnte im gleichen Verhältnis mit 0,1-prozentiger NP-40-Lösung versetzt werden. 50 µl jeder Probe wurden im Doppelansatz erneut über Nacht bei 4 °C inkubiert und durchliefen am nächsten Tag wiederholt vier Waschschritte. Anschließend wurden 50 µl des polyklonalen Anti-BDNF-Antikörpers für zwei Stunden hinzugegeben. Nach einem erneuten viermaligen Waschvorgang wurde jedes Well mit 50 µl des Anti-Huhn-IgY-alkalische-Phosphatase-Konjugats versetzt und für 1,5 Stunden bei Raumtem-

peratur inkubiert. Nach einem abschließenden Waschprozess wurde mit 50 µl des Atto-Phos-Substrats (Boehringer Mannheim, Deutschland) die Enzymreaktion gestartet. Abschließend wurde die Enzymreaktion gestoppt und die Akkumulation der Extinktion konnte bei einer Wellenlänge von 440 nm mittels eines Mikrotiterplatten-Fluorometers (Labsystems Fluoroskan II, GMI Inc., MN, USA) detektiert werden. Die Konzentration von BDNF in den Serumproben wurde anhand der Regressionsgeraden der Standardkurve ermittelt. Die BDNF-Normalkonzentration in Serumproben von Ratten liegt nach SARTORIUS et al. (2009) bei 1100 pg/ml.

#### 5.4. Creatinkinase (CK)

Die Bestimmung der Creatinkinase-Konzentration in den Serumproben erfolgte über die Messung der katalytischen Aktivität der CK in der Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland. Mittels eines Hochdurchsatzgerätes (Cobas Integra<sup>®</sup> 400 plus System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde die Konzentration anhand der Routinebestimmung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (BERGMEYER et al. 1977) ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration basiert auf der katalysierenden Eigenschaft von CK, welche in Form einer kaskadenartigen Reaktion überprüft wird. Je mehr NADPH+H<sup>+</sup> als Endprodukt bei einer Wellenlänge von 340 nm nachgewiesen werden kann, desto höher war die katalytische Aktivität der CK in der Ausgangsprobe. Durch den Umrechnungsfaktor von U/L x 0,0167 = µkat/L wurde die CK-Konzentration bestimmt. Der Messbereich deckte ein Spektrum von 7-2000 U/L ab (ROCHE 2008).

#### 5.5. Zyklusstand

Am Ende des Versuches sollte der Zyklusstand ermittelt werden. Die Vaginalzytologie wurde unter Allgemeinanästhesie mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung mittels eines sterilen, mit 0,9 % Natriumchlorid-Lösung befeuchteten Wattetupfers gewonnen. Der Tupfer wurde vorsichtig in die Vagina des Tieres eingeführt und durch leichte Drehbewegungen wurden Zellen und Vaginalschleim auf den Tupfer übertragen. Durch das anschließende Ausrollen des Tupfers ohne Druck auf einem Objektträger konnte das Material gewonnen werden. Die getrockneten Abstriche wurden mit einer Diff-Quick-Färbung (Diff-Quick<sup>®</sup> Schnellfärbeset, Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Die Auswertung wurde von Frau Dr. Otzdorff in der chirurgischen und gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Deutschland, durchgeführt. Der Zyklusstand der Tiere konnte anhand der vor-



liegenden Zelltypen in dem Vaginalabstrich zwischen Östrus und Diöstrus differenziert werden.

## 6. Auswertung und Statistik

Für die statistische Auswertung der ermittelten Daten wurde die Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) verwendet. Der Vergleich zwischen den parametrisch verteilten Daten der drei Versuchsgruppen in der ersten Versuchsreihe basiert auf der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*). Die Gruppenunterschiede wurden anschließend anhand eines Post-hoc-Tests mit einer Bonferroni-Korrektur ermittelt. Bei nichtparametrisch verteilten Datensätzen der ersten Versuchsreihe wurde hingegen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um die Datensätze der zweiten Versuchsreihe mit den zwei Versuchsgruppen zu vergleichen, wurde ein ungepaarter t-Test für parametrisch verteilte Daten verwendet. Bei nichtparametrischen Daten wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei den Analysen wurde stets eine Signifikanz bei  $p < 0,05$  angegeben. In den Ergebnissen ist der Mittelwert inklusive des Standardfehlers (*error of the mean*, SEM) angegeben.

### 6.1. Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Berechnung und graphische Darstellung der Korrelationsmatrix nach Spearman erfolgte mit der Software R Version 3.4.33 (R-CORE-TEAM 2016) und Zusatzerweiterungen (R-Packages ‚corrplot2‘ (WEI 2013) und ‚ggplot2‘ (WICKHAM 2010)). Das Skript der Berechnungen und der Darstellung wurden wie von MÖLLER et al. (2019) im Anhang „epi14028-sup-0001-supinfo.docx“ beschrieben durchgeführt.

Die Analyse und die Grafik der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurden über das R-Paket ‚made4‘ erstellt (CULHANE et al. 2005). Um eine Vergleichbarkeit der Datensätze zu gewährleisten, wurden die Daten vor der Analyse zentriert und folgend so skaliert, dass die zu berechnenden Variablen eine Standardabweichung von eins und einen Mittelwert von null aufzeigten. Das Skript der Berechnungen und der Darstellung wurden ebenfalls wie von MÖLLER et al. (2019) im Anhang „epi14028-sup-0001-supinfo.docx“ beschrieben angewendet.

## V. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit werden die stimulierten Tiere in der Post-Insult- und Latenzphase als *Post-SE* und in der chronischen Phase als *Epilepsie* bezeichnet. Die Ergebnisse sind nach den Verhaltensuntersuchungen, den biochemischen Analysen und den telemetrischen Messungen gegliedert. Anschließend werden die Einzelparameter beider Versuchsphasen in der Korrelationsmatrixanalyse und der Hauptkomponentenanalyse vorgestellt.

Die erste Versuchsreihe stellt weiterhin die Tiergruppe dar, bei welcher in der chronischen Phase mit Hilfe der herkömmlichen Kabelableitung das EEG erfasst wurde. Die zweite Versuchsreihe beschreibt die Tiere, welchen neben der Elektrode zusätzlich ein Telemetrie-Transmitter implantiert wurde. Dadurch konnten die physiologischen Parameter ermittelt werden, sowie die EEG-Anfallsüberwachung in den Heimkäfigen stattfinden. Aufgrund der Implantation konnte jedoch eine Beeinflussung der Ergebnisse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

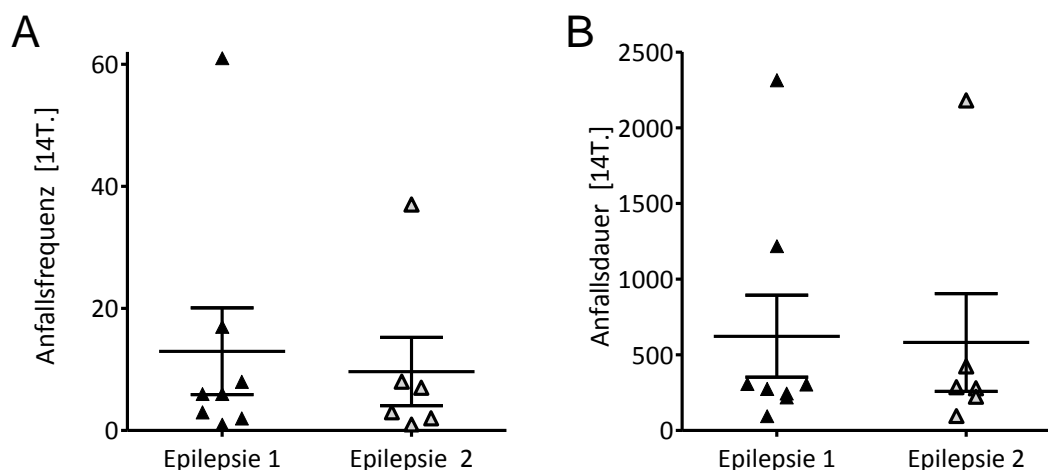
### 1. Elektrisches Post-SE-Modell

Nach der Elektrodenimplantation der ersten Versuchsreihe wurde ein Tier von 32 Tieren (3,1 %) aufgrund von Komplikationen im Wundbereich eingeschläfert. Im Rahmen der Elektroden- und Transmitterimplantation mussten 2 von 19 Tieren (10,5 %) postoperativ aufgrund von Wundkomplikationen und Schwellungen im Transmitterbereich eingeschläfert werden.

Die elektrische Dauerstimulation erfolgte wie in Kapitel IV.2.2 beschrieben. Von insgesamt 29 stimulierten Ratten in beiden Versuchsreihen verstarben 6 Tiere (20,7 %) infolge des elektrisch induzierten Status epilepticus. Die Mehrheit der stimulierten Tiere beider Versuchsreihen entwickelte während des elektrisch induzierten Status epilepticus einen Typ-III-SSSE nach BRANDT et al. (2003). Nur vier Tiere der ersten Versuchsreihe zeigten einen Typ-II-SSSE. Bei 17,25 % der stimulierten Tiere trat während des SSSE ein sprunghaftes Rennen (*running-and-bouncing*) auf. Die chronische Phase erreichten 23 der stimulierten Tiere beider Versuchsreihen. Bei 19 dieser Tiere (82,6 %) konnten spontane, generalisierte epileptische Anfälle während der EEG-Überwachung oder Handling-assoziiert detektiert werden. Damit kann die Durchführung des elektrischen Post-SE-Modells bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten als erfolgreich gewertet werden.

Während der EEG-Anfallsüberwachung konnten bei 8 Tieren der ersten und bei 6 Tieren der zweiten Versuchsreihe generalisierte Anfälle detektiert werden. Die Anfallsaktivität lag

bei einer durchschnittlichen Anfallsfrequenz (Abbildung 12 A) von 13 Anfällen bei der ersten und 12,5 Anfällen bei der zweiten Versuchsreihe innerhalb der 14 Tage. Die mittlere Gesamtdauer (Abbildung 12 B) lag bei 622 s bei der ersten und 581,2 s bei der zweiten Versuchsreihe. Bei 35 % der epileptischen Tiere konnte mindestens einmal ein *running-and-bouncing* in der chronischen Phase beobachtet werden.



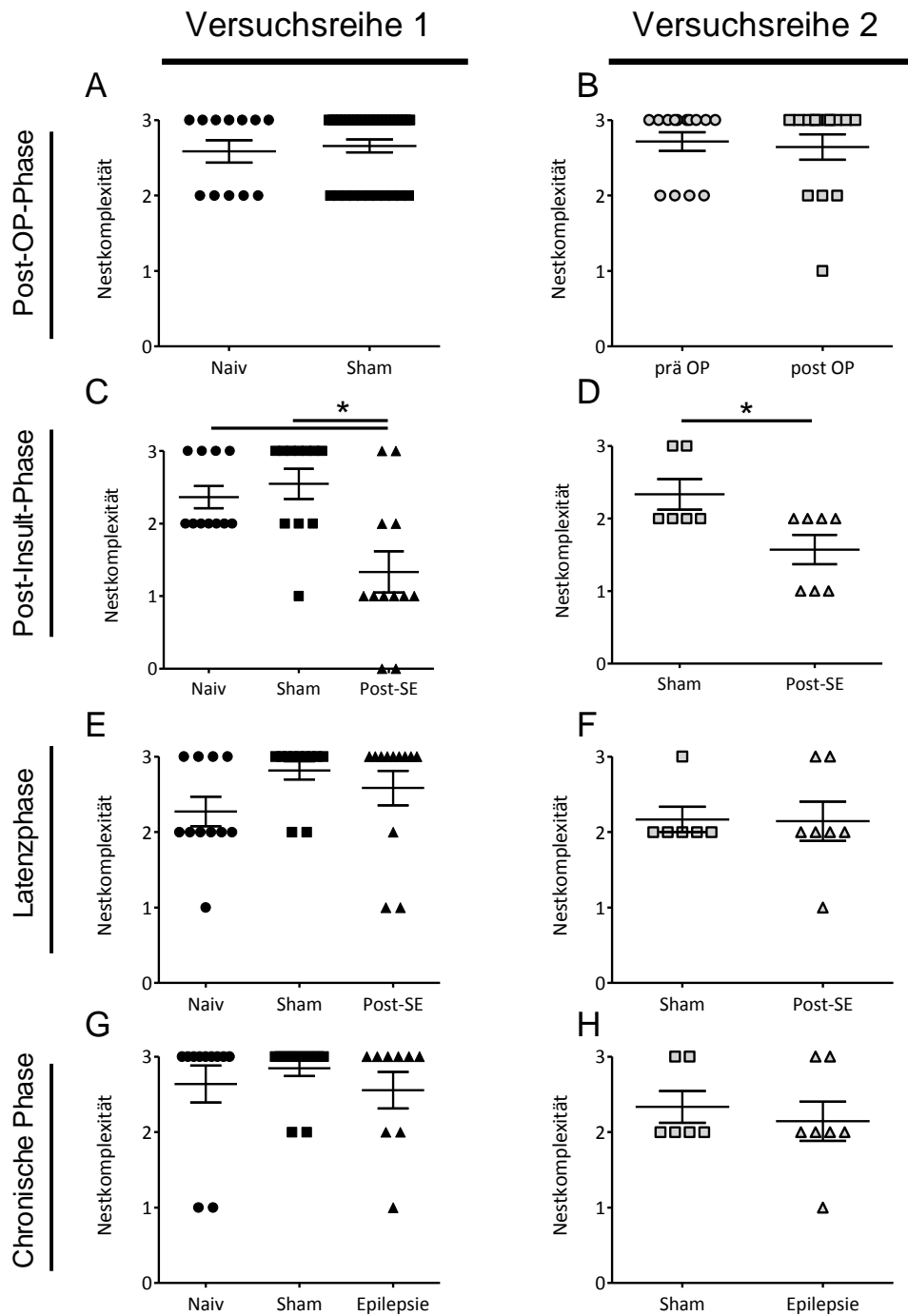
**Abbildung 12:** Anfallsaktivität der epileptischen Tiere der ersten (Epilepsie 1, n = 8) und der zweiten (Epilepsie 2, n = 6) Versuchsreihe während der 14-tägigen EEG-Überwachung. (A) Individuelle Anfallsfrequenz und (B) die individuelle Gesamtdauer aller detektierten Anfälle während der EEG-Überwachung (Mittelwert  $\pm$  SEM).

## 2. Verhaltensuntersuchungen

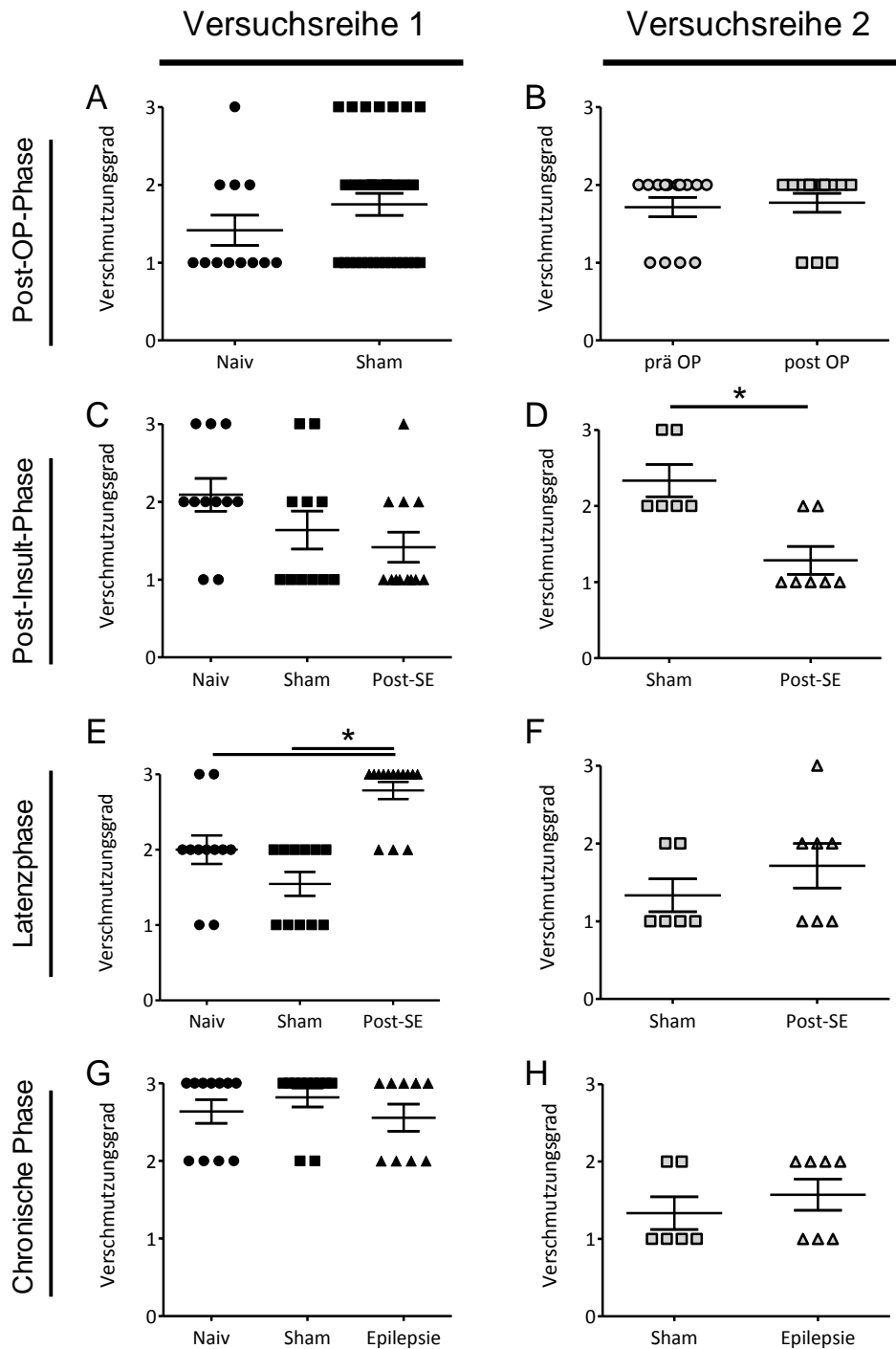
In beiden Versuchsreihen wurden die gleichen Verhaltensuntersuchungen zu identischen Zeitpunkten vorgenommen. Damit soll der Einfluss der zusätzlichen Transmitterimplantation bei der zweiten Versuchsreihe sowie das unterschiedlich ausgeführte EEG-Monitoring ab der chronischen Phase erfasst werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Versuchsreihen nur dann getrennt beschrieben, wenn sich deren Ergebnisse unterscheiden. Das Heimkäfigverhalten, das Grabverhalten und das Allgemeinbefinden wurden sowohl postoperativ als auch in der ersten (Post-Insult-Phase), vierten (Latenzphase) und elften (chronische Phase) Woche nach dem SE untersucht. Die Verhaltensuntersuchungen bezüglich der Lokomotion, des angstassoziierten, sozialen und Präferenzverhaltens wurden ausschließlich in der chronischen Phase durchgeführt. Um einen Vergleich in der Post-OP-Phase der zweiten Versuchsreihe zu ermöglichen, wurden die Ergebnisse mit den Basalwerten derselben Tiere verglichen.

### 2.1. Heimkäfiverhalten

Bei der Auswertung des Heimkäfiverhaltens sind das Nestbauverhalten und der Verschmutzungsgrad des Käfigs zu berücksichtigen. Das Nestbauverhalten (Abb. 13) wurde stets am fünften Tag nach dem Umsetzen in einen frischen Käfig mit neuem Nestbaumaterial bewertet. In beiden Versuchsreihen zeigt sich eine reduzierte Nestkomplexität der stimulierten Tiere in der ersten Woche nach dem SE. Zu den anderen Zeitpunkten, inklusive der chronischen Phase nach dem unterschiedlichen EEG-Monitoring, konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen beider Versuchsreihen festgestellt werden.



**Abbildung 13:** Nestkomplexität während der modellspezifischen Versuchsphasen beider Versuchsreihen. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der ersten Versuchsreihe (Naiv n = 11, Sham n = 13, Post-SE n = 12 und Epilepsie n = 9) (A) Post-OP, (C, p= 0,0048) Post-Insult-Phase, (E) Latenzphase und (G) der chronischen Phase sowie der zweiten Versuchsphase (Sham n = 6, Post-SE und Epilepsie n = 7): (B) Post-OP, (D, p= 0,0399) Post-Insult-Phase, (F) Latenzphase und (H) der chronischen Phase dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* = p< 0,05).

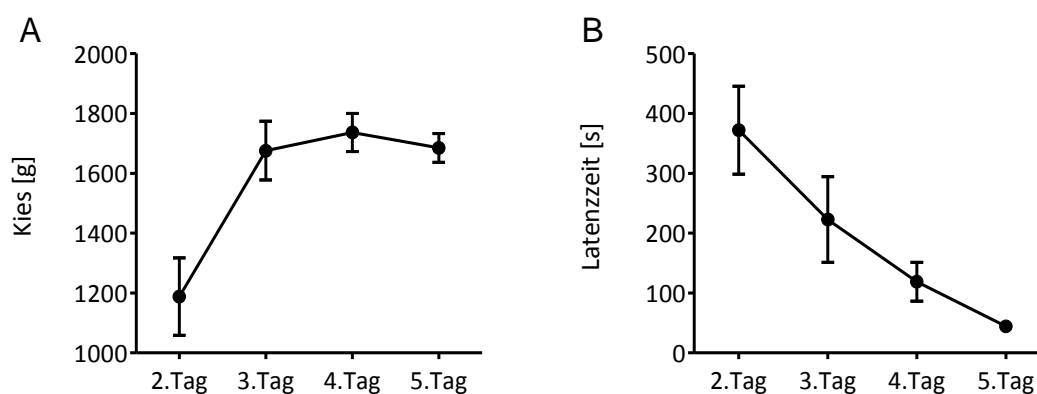


**Abbildung 14:** Verschmutzungsgrad des Nests in beiden Versuchsreihen während der modellspezifischen Versuchsphasen. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der ersten Versuchsreihe (Naiv n = 11, Sham n = 11, Post-SE n = 12 und Epilepsie n = 9) in der (A) Post-OP, (C) Post-Insult, (E, p< 0,0001) Latenz- und (G) chronischen Phase sowie der zweiten Versuchsphase (Sham n = 6, Post-SE und Epilepsie n = 7): in der (B) Post-OP-, (D, p= 0,0104) Post-Insult-, (F) Latenz- und (H) chronischen Phase dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* = p< 0,05).

## 2.2. Burrowing-Test

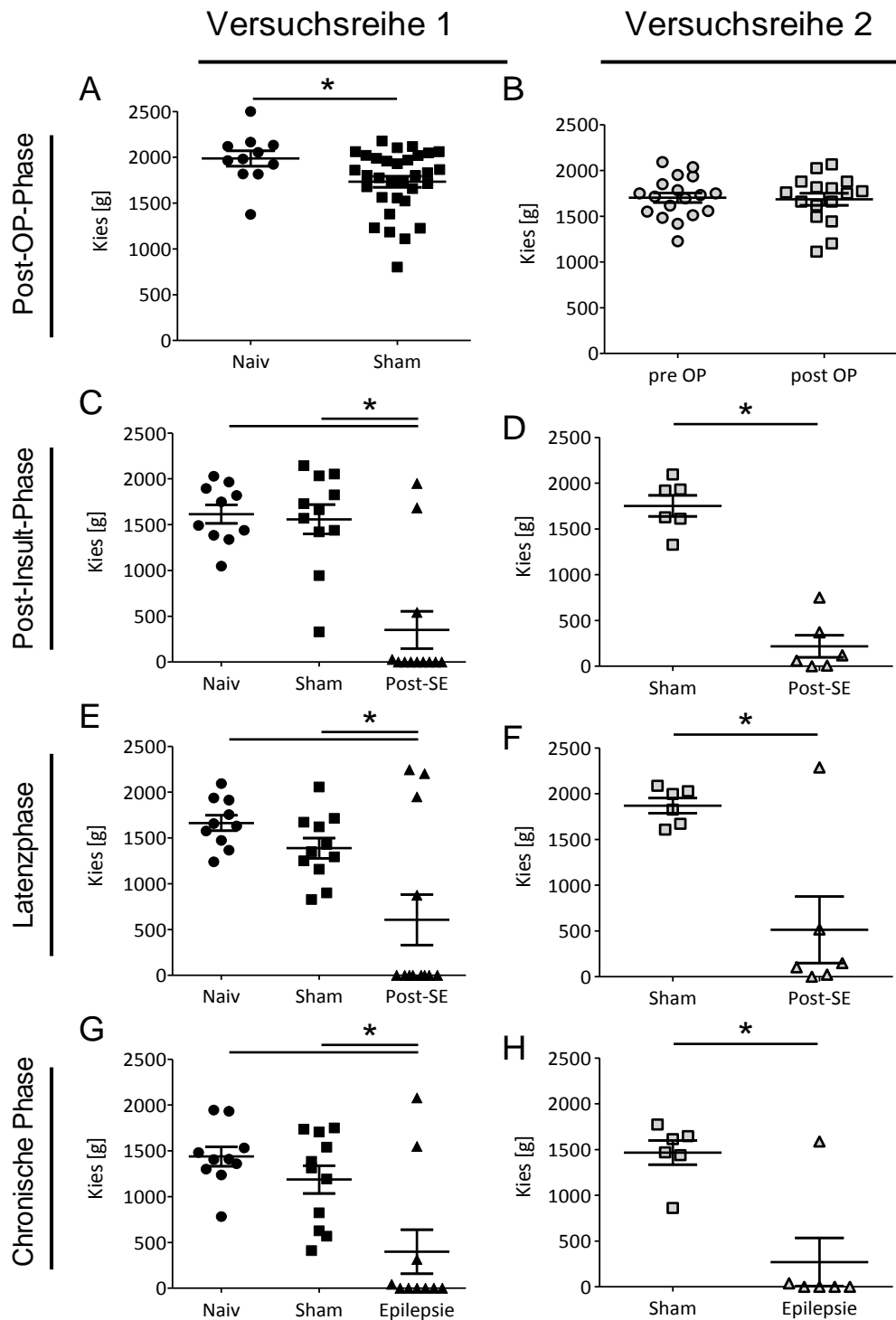
Die Untersuchung des Grabverhaltens erfolgte nach einer Gewöhnungsphase mittels des Burrowing-Tests in beiden Versuchsreihen zu vier Zeitpunkten.

Die Gewöhnungsphase fand jeweils in der Woche vor der Elektrodenimplantation statt. Am fünften Tag wurden die basalen Messwerte der Tiere ermittelt. In beiden Versuchsphasen wurde jeweils ein Tier, aufgrund eines zu geringen Grabverhaltens, von dem Burrowing-Test exkludiert. Im Verlauf der Gewöhnungsphase (Abb. 15) konnten ein Anstieg der Kiesmenge und eine verkürzte Latenzzeit verzeichnet werden. Am fünften Tag sank die herausgegrabene Kiesmenge ein wenig ab, die Latenzzeit verkürzte sich weiterhin.

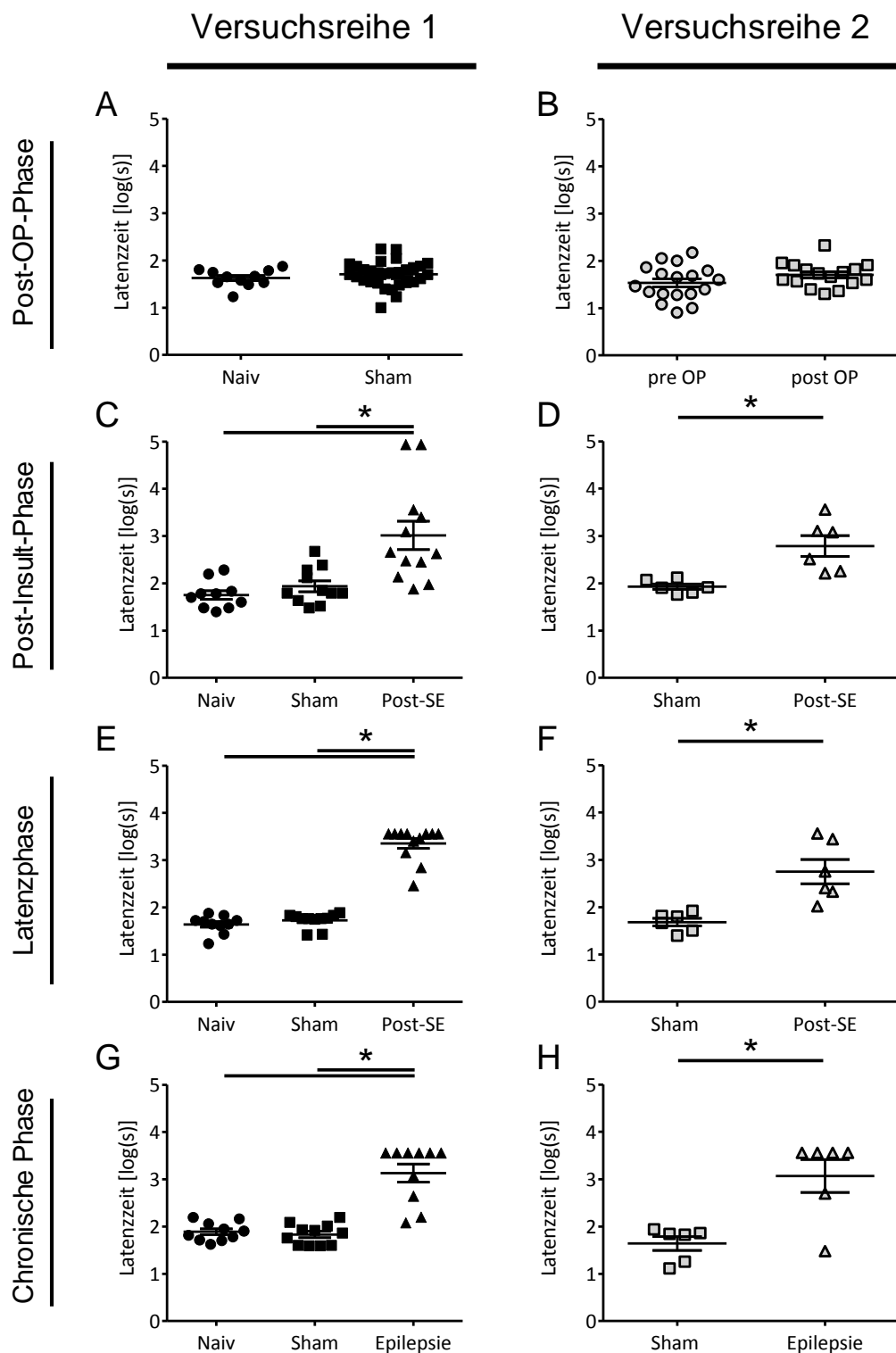


**Abbildung 15** : Gewöhnungsphase der ersten Versuchsreihe (n = 43) in Bezug auf den Burrowing-Test. (A) Menge der herausgegrabenen Kiesmenge pro Tag. (B) Dauer bis zum Vollziehen der ersten Grabbewegung pro Tag (Mittelwert  $\pm$  SEM).

Das trainierte Grabverhalten wurde sowohl in der Post-OP-, der Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase in beiden Versuchsreihen ermittelt (Abb. 16 und 17). In der ersten Versuchsreihe konnte postoperativ eine signifikant reduzierte, gegrabene Kiesmenge bei den elektrodenimplantierten Tieren erfasst werden. Die Latenzzeit ist nicht verändert. Die Tiere der zweiten Versuchsreihe wiesen keinen signifikanten Unterschied zu ihrer Leistung während der Basalmessung auf. An den drei untersuchten Zeitpunkten nach dem SE zeigten die stimulierten Tiere beider Versuchsreihen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen ein signifikant reduziertes Grabverhalten. Die gegrabene Kiesmenge war reduziert und die Latenzzeit bis zur ersten Grabbewegung war erhöht.



**Abbildung 16:** Grabverhalten gemessen anhand der gegrabenen Kiesmenge. Die Grafiken zeigen das Grabverhalten der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 10$ , Sham  $n = 11$ , Post-SE  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 10$ ) in der (A) Post-OP- ( $t(1,41) = 2,229$ ;  $p = 0,0313$ ), (C) der Post-Insult- ( $F(2,30) = 18,93$ ;  $p = 0,0771$ ), (E) der Latenzphase ( $F(2,30) = 8,438$ ;  $p = 0,0012$ ) und (G) der chronischen Phase ( $F(2,28) = 9,477$ ;  $p = 0,0007$ ). Das Grabverhalten der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Post-SE und Epilepsie  $n = 6$ ) wird zu den entsprechenden Zeitpunkten in den Grafiken (B) Post-OP- ( $t(1,32) = 0,2198$ ;  $p = 0,8274$ ), (D) der Post-Insult-phase ( $t(1,10) = 9,245$ ;  $p < 0,0001$ ), (F) der Latenzphase ( $t(1,10) = 3,648$ ;  $p = 0,0045$ ) und (H) der chronischen Phase ( $t(1,10) = 4,063$ ;  $p = 0,0023$ ) dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).



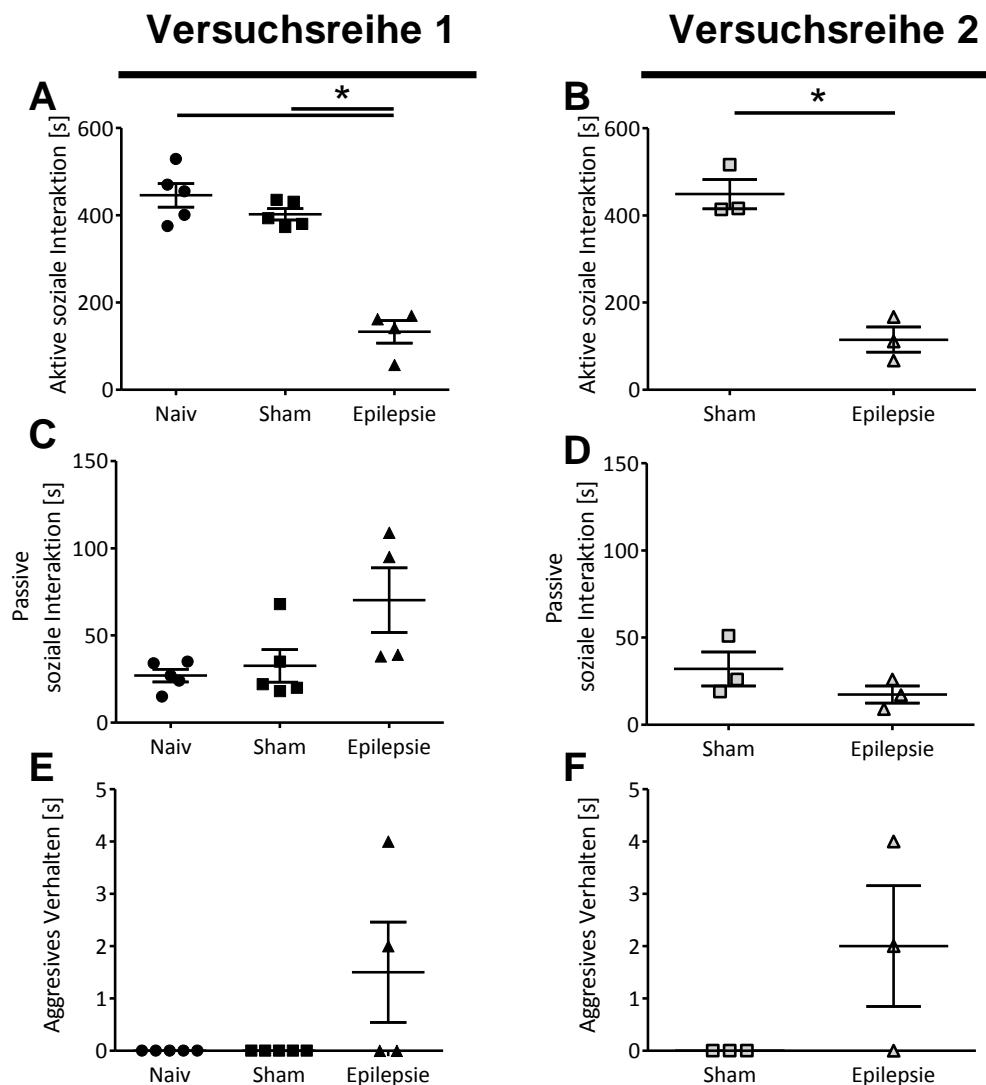
**Abbildung 17:** Grabverhalten gemessen anhand der Latenzzeit bis zu der ersten Grabbewegung. Die Grafiken zeigen das Grabverhalten der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 10$ , Sham  $n = 11$ , Post-SE  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 10$ ) in der (A) Post-OP-, (C) in der Post-Insult- ( $F(2,30) = 11,19$ ;  $p = 0,0002$ ), (E) der Latenzphase ( $F(2,30) = 162,1$ ;  $p < 0,0001$ ) und (G) der chronischen Phase ( $F(2,28) = 37,44$ ;  $p < 0,0001$ ). Das Grabverhalten der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Post-SE und Epilepsie  $n = 6$ ) ist in den Grafiken entsprechend der Zeitpunkte der (B) Post-OP- ( $p = 0,1343$ ), (D) Post-Insult-phase ( $p = 0,0038$ ), (F) Latenzphase ( $p = 0,0026$ ) und (H) chronischen Phase ( $p = 0,0036$ ) dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).



### 2.3. Sozialer Interaktionstest

Der soziale Interaktionstest wurde einmalig in beiden Versuchsreihen während der chronischen Phase durchgeführt (Abb. 18). Das EEG der Tiere der ersten Versuchsreihe wurden zuvor in der EEG-Anfallsüberwachung über ein Kabel abgeleitet. Das EEG der Tiere der zweiten Versuchsreihe wurde telemetrisch im Heimkäfig erfasst.

Zwei Tiere aus der gleichen Versuchsgruppe bildeten ein Interaktionspaar, für das ein gemeinsamer Wert pro Interaktionsqualität erhoben werden konnte. Zwei Interaktionspaare der Epilepsiegruppe der ersten Versuchsreihe und eines der zweiten Versuchsreihe wurden exkludiert, da bei je einem Tier kein generalisierter Anfall nachgewiesen werden konnte. Bei den Tieren mit Epilepsie konnte ein signifikant reduziertes aktives Sozialverhalten festgestellt werden. Zudem zeigten nur Tiere der Epilepsiegruppen phasenweise ein aggressives Verhalten gegenüber ihren Interaktionspartnern. Bei dem passiven Verhalten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen erfasst werden.



**Abbildung 18:** Zeit der sozialen Interaktion beider Versuchsreihen während der chronischen Phase (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ). Die Grafiken zeigen die Zeit in Sekunden pro Qualität der sozialen Interaktion der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 5$ , Sham  $n = 5$ , Epilepsie  $n = 4$ ) (A), dort die aktive soziale Interaktion ( $F(2,11) = 52,32$ ;  $p < 0,0001$ ), (C) passive Interaktion und (E) das aggressive Verhalten ( $F(2,11) = 3,214$ ;  $p = 0,0796$ ), und der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 3$ , Epilepsie  $n = 3$ ), (B) die aktive soziale Interaktion ( $p = 0,0017$ ), (D) passive Interaktion und (F) das aggressive Verhalten ( $p = 0,0796$ ).

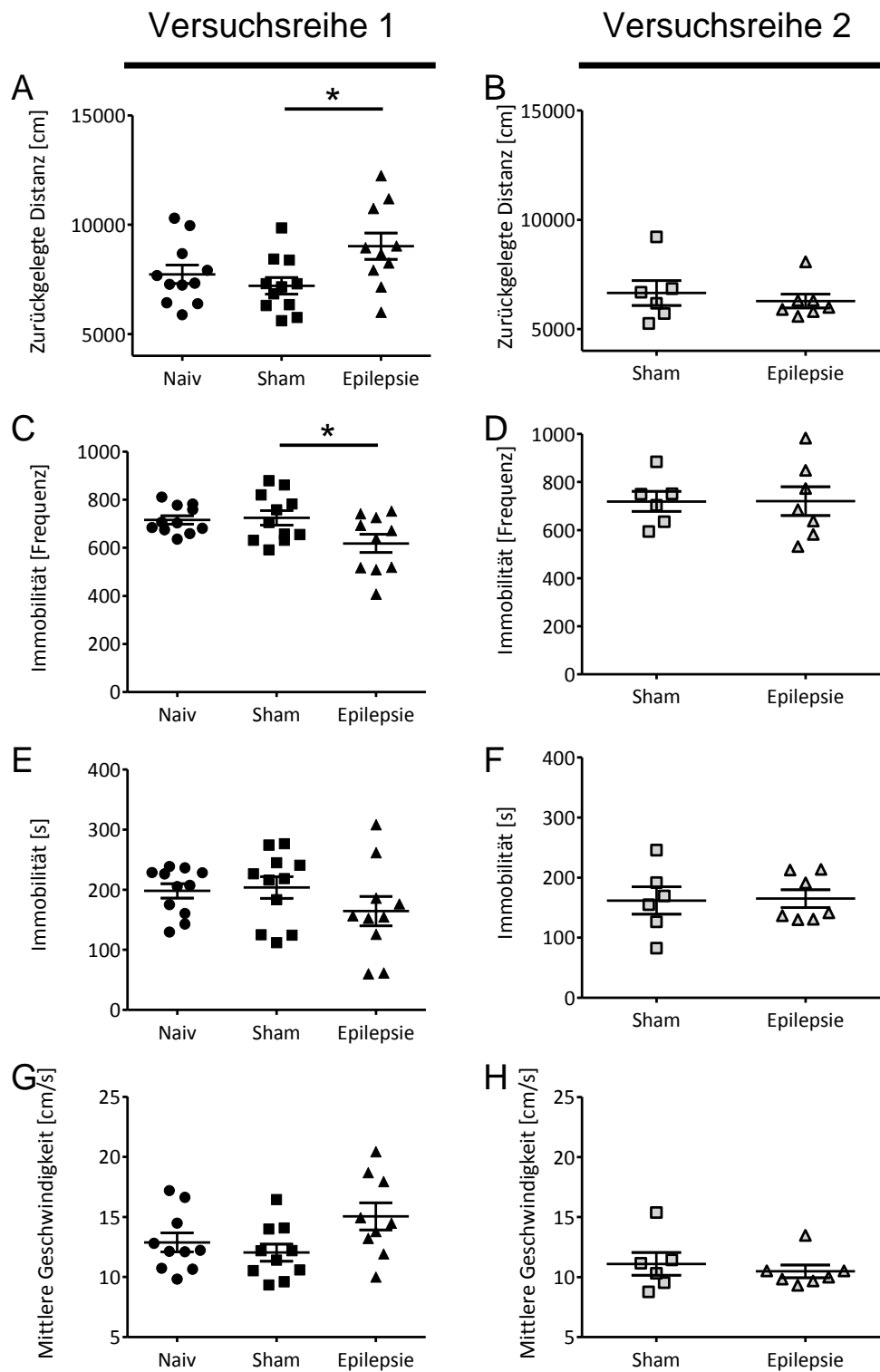
## 2.4. Open-Field-Test

Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde mit dem Open-Field-Test einmalig während der chronischen Phase nach der unterschiedlich detektierten EEG-Anfallsüberwachung erfasst. Das EEG der Tiere der ersten Versuchsreihe wurden mit Hilfe eines Kabels erfasst, das EEG der Tiere der zweiten Versuchsreihe konnte hingegen telemetrisch, ohne einen fixierenden Charakter, aufgezeichnet werden. Die Ergebnisse beider Versuchsreihen unterscheiden sich in diesem Test (Abb. 19 und 20).

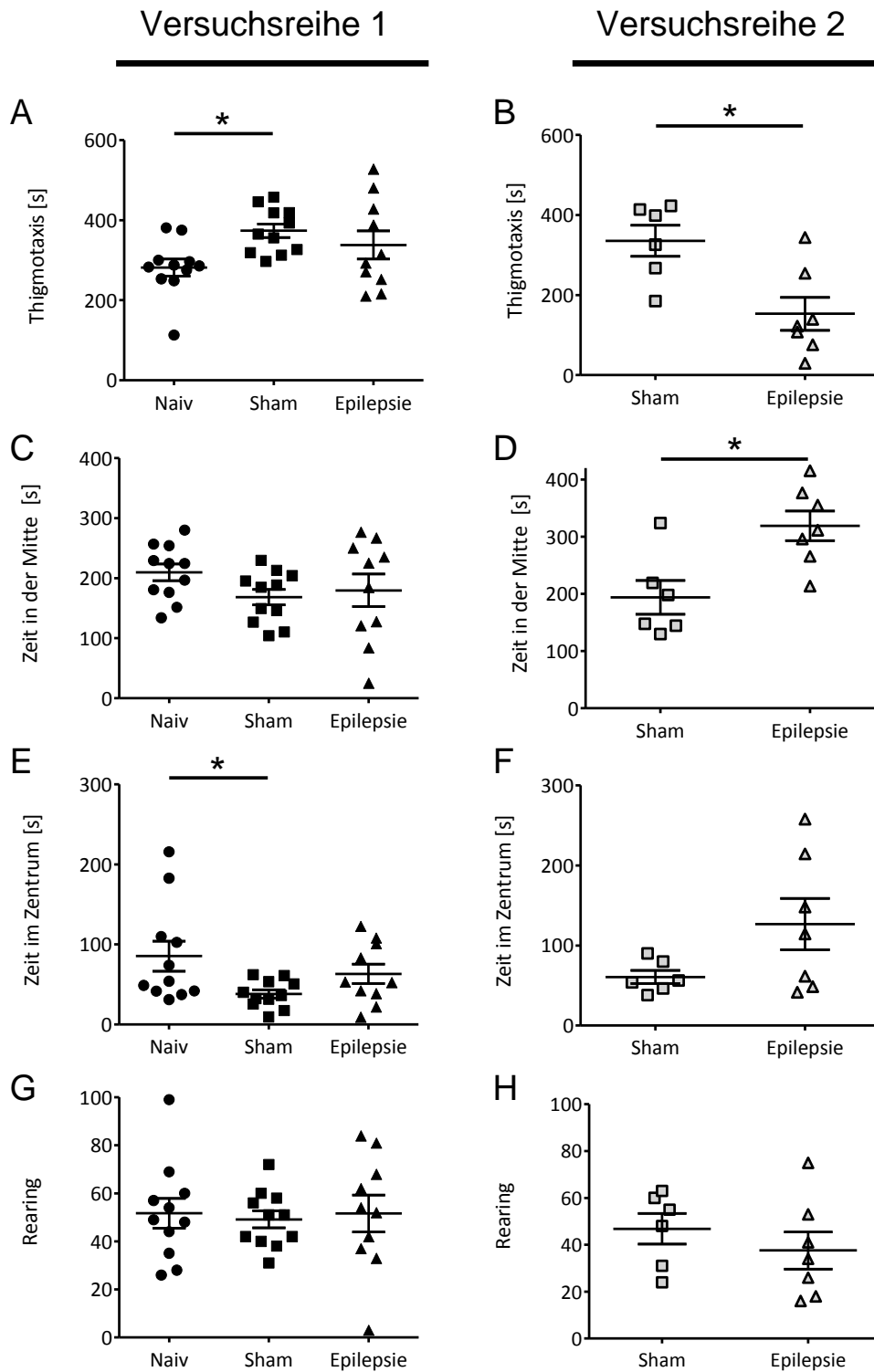
In der ersten Versuchsreihe legten die Tiere mit Epilepsie signifikant mehr Strecke zurück und zeigten gleichzeitig signifikant weniger immobile Frequenzen gegenüber der Sham-Kontrollgruppe. Die Dauer der Immobilität ist zwischen den Versuchsgruppen nicht verändert. Die naive Kontrollgruppe zeigte bei den genannten Parametern keine Veränderungen im Vergleich zu beiden Gruppen. Allerdings verbrachten die naiven Tiere weniger Zeit im Wandbereich und mehr Zeit in der Mitte des Open Fields im Vergleich zu den Tieren der Sham-Gruppe. In den anderen Parametern konnte kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe festgestellt werden.

In der zweiten Versuchsreihe zeigten die Tiere mit Epilepsie eine reduzierte Aufenthaltsdauer im Randbereich und einen gesteigerten Aufenthalt in der mittleren Zone. Die Aufenthaltsdauer der epileptischen Tiere im Zentrum zeigte eine große Streuung der Tiere. Die Analyse der übrigen Parameter ergab keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

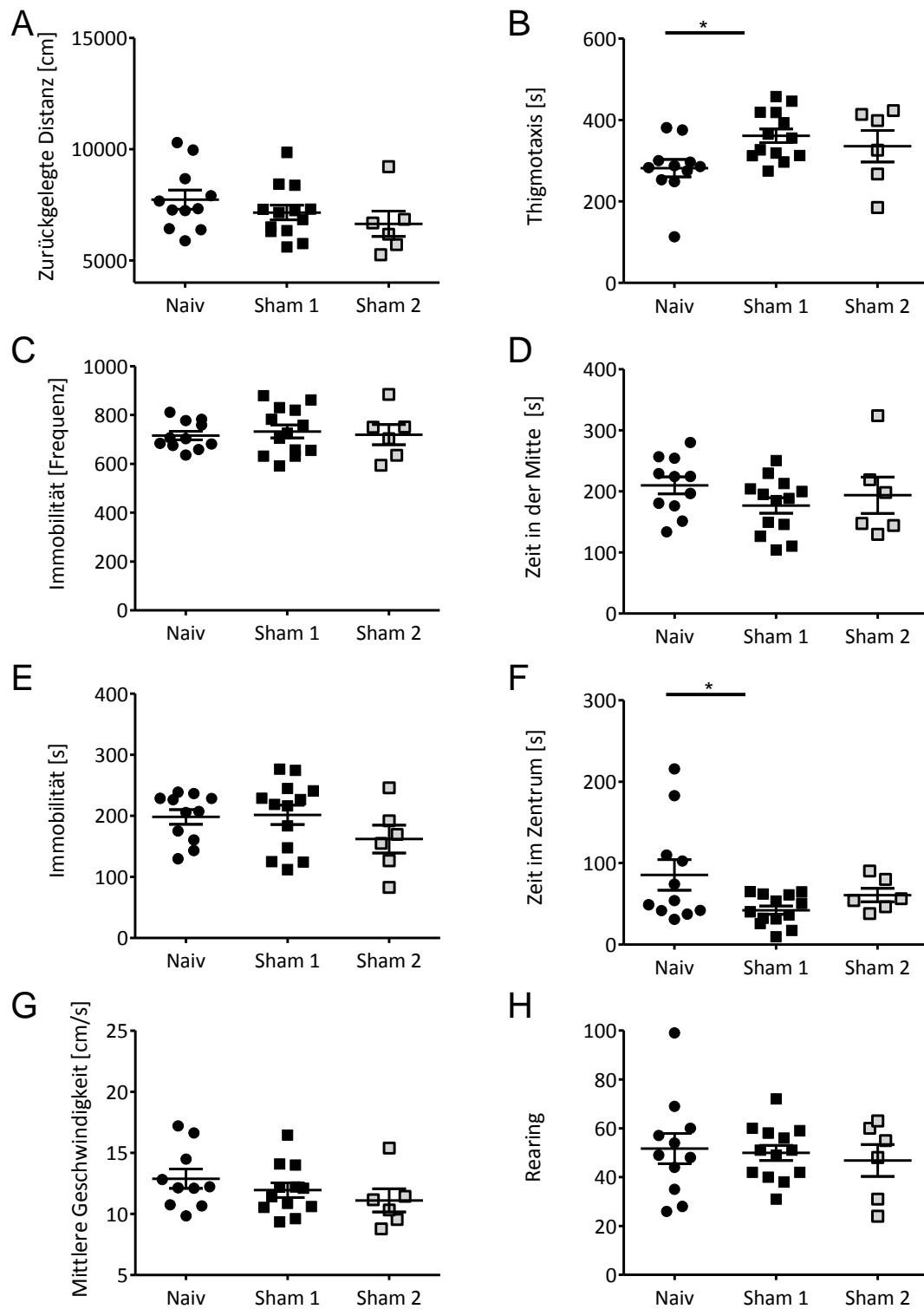
Die vergleichende Analyse der Sham-Kontrollgruppen beider Versuchsreihen (Abb. 21) ergab keine Veränderung in der Lokomotion dieser Tiere.



**Abbildung 19:** Lokomotorisches Verhalten beider Versuchsreihen gemessen in dem Open Field während der chronischen Phase. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) in Bezug auf die (A) zurückgelegte Distanz ( $F(2,29)=3,791$ ,  $p= 0,0345$ ), (C) die Immobilitätsfrequenz ( $F(2,29)=3,968$ ;  $p= 0,0300$ ), (E) Immobilitätsdauer und (G) die mittlere Geschwindigkeit sowie der zweiten Versuchsphase (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) in Bezug auf (B) zurückgelegte, (D) die Immobilitätsfrequenz, (F) Immobilitätsdauer und (H) die mittlere Geschwindigkeit dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 20:** Lokomotorisches Verhalten in beiden Versuchsreihen erfasst im Open Field während der chronischen Phase. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) in Bezug auf die (A) Thigmotaxis ( $F(2,29)=3,524$ ,  $p = 0,1955$ ), (C) Aufenthaltsdauer im mittleren Bereich, (E) Aufenthaltsdauer im Zentrum ( $F(2,29)= 3,240$ ;  $p= 0,0537$ ) und (G) Rearing sowie der zweiten Versuchsphase (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) in Bezug auf (B) Thigmotaxis ( $t(1,11)= 3,189$ ;  $p= 0,0086$ ), (D) Aufenthaltsdauer im mittleren Bereich ( $t(1,11)= 3,193$ ;  $p=0,0086$ ), (F) Aufenthaltsdauer im Zentrum und (H) Rearing dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).



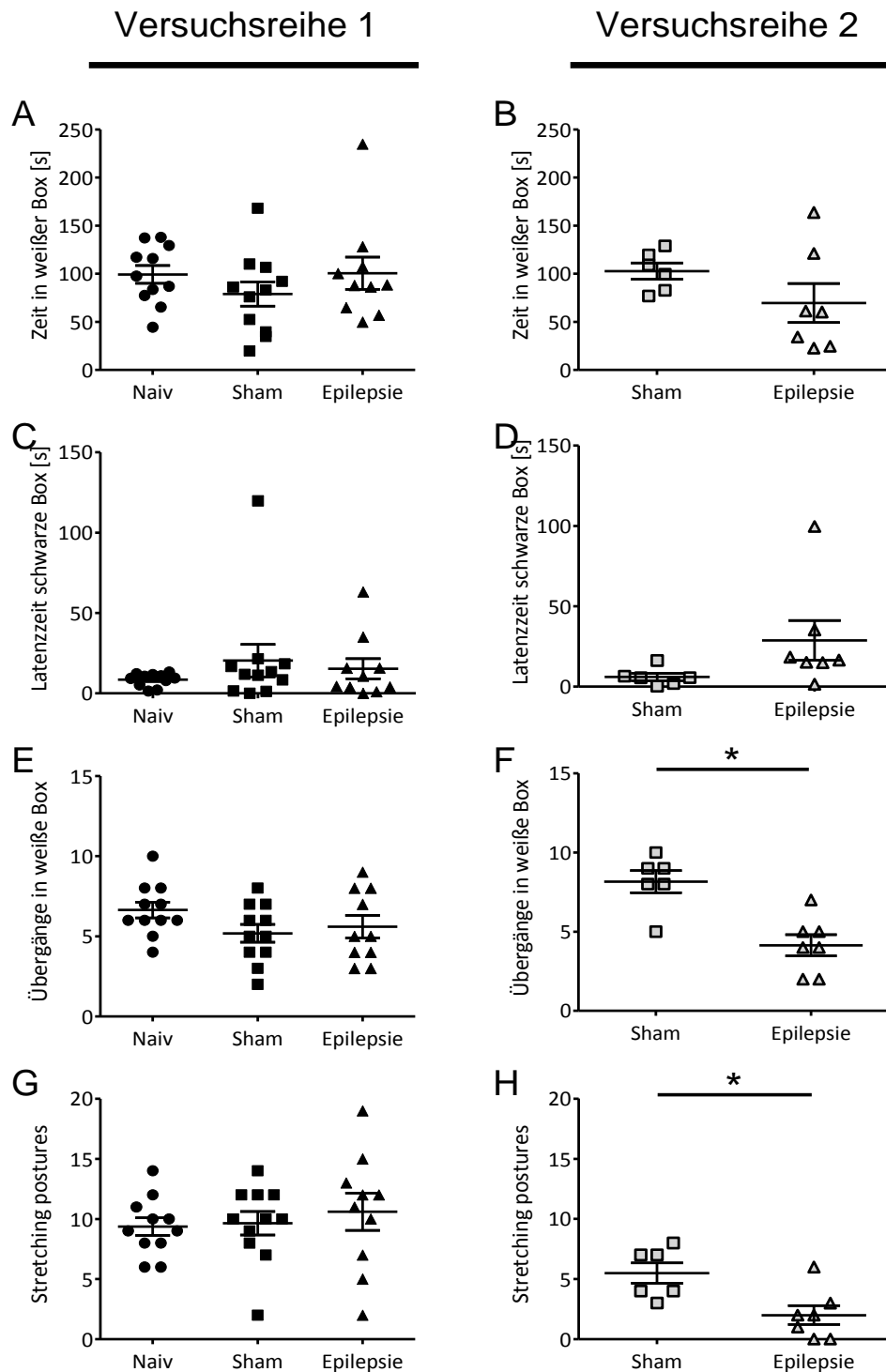
**Abbildung 21:** Vergleichende Analyse der Lokomotion der Sham-Gruppen beider Versuchsreihen (Naiv n = 11, Sham 1 n = 11, Sham 2 n = 6) in der chronischen Phase anhand des Open Fields. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte in Bezug auf die (A) zurückgelegte Distanz, (B) Thigmotaxis (C) die Immobilitätsfrequenz, (D) Aufenthaltsdauer im mittleren Bereich, (E) Immobilitätsdauer, (F) Aufenthaltsdauer im Zentrum (G), der mittleren Geschwindigkeit und (H) Rearing dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* = p < 0,05).

## **2.5. Angstassoziiertes Verhalten**

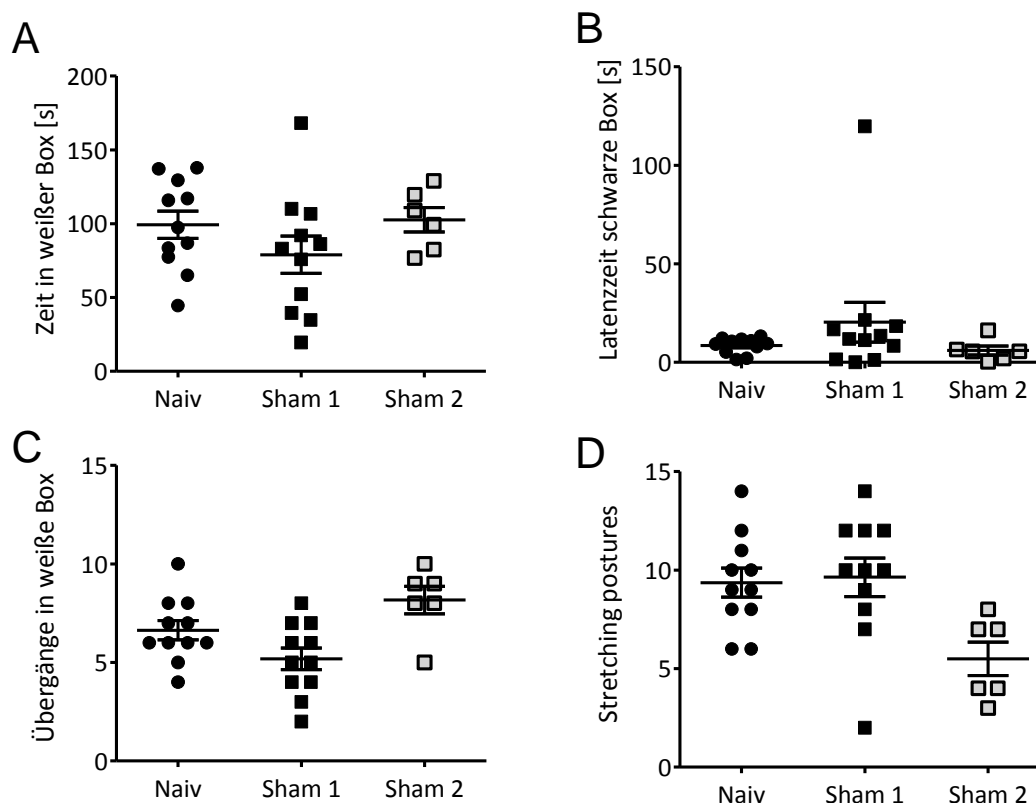
Das angstassoziierte Verhalten wurde mit Hilfe der Black-and-white-Box (Abb. 22–24) und des Elevated-Plus-Maze einmalig während der chronischen Phase nach der EEG-Anfallsüberwachung für beide Versuchsreihen ermittelt. Die Tiere der Sham und Epileptischen Gruppe wurden zuvor in der EEG-Anfallsüberwachung mit einem Kabel abgeleitet. Die Tiere der zweiten Versuchsgruppe konnten telemetrisch im Heimkäfig überwacht werden.

### **2.5.1. Black-and-white-Box**

Bei der Black-and-white-Box konnten bei den Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede in den Parametern festgestellt werden. In der zweiten Versuchsreihe wechselten die epileptischen Tiere signifikant weniger zwischen den Kompartimenten und vollzogen weniger Stretching-Positionen bei dem Übertritt in das weiße Kompartiment. In einer vergleichenden Analyse der Sham-Kontrollgruppen beider Versuchsreihen konnte keine Veränderung zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 24).



**Abbildung 22:** Angstassoziiertes Verhalten beider Versuchsreihen in der chronischen Phase ermittelt über die Black-and-white-Box. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der Tiere der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) in Bezug auf die (A) Zeit in der weißen Box, (C) die Latenzzeit bis zu dem ersten Übertritt in die schwarze Box, (E) die Anzahl der Übergänge in die weiße Box und (G) die Anzahl der Stretching-Positionen aus der schwarzen Box heraus sowie die Messwerte der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) in Bezug auf (B) Zeit in der weißen Box, (D) die Latenzzeit bis zu dem ersten Übertritt in die schwarze Box, (F) die Anzahl der Übergänge in die weiße Box ( $p = 0,0017$ ) und (H) die Anzahl der Stretching-Positionen aus der schwarzen Box heraus dargestellt ( $p = 0,0115$ ) (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).



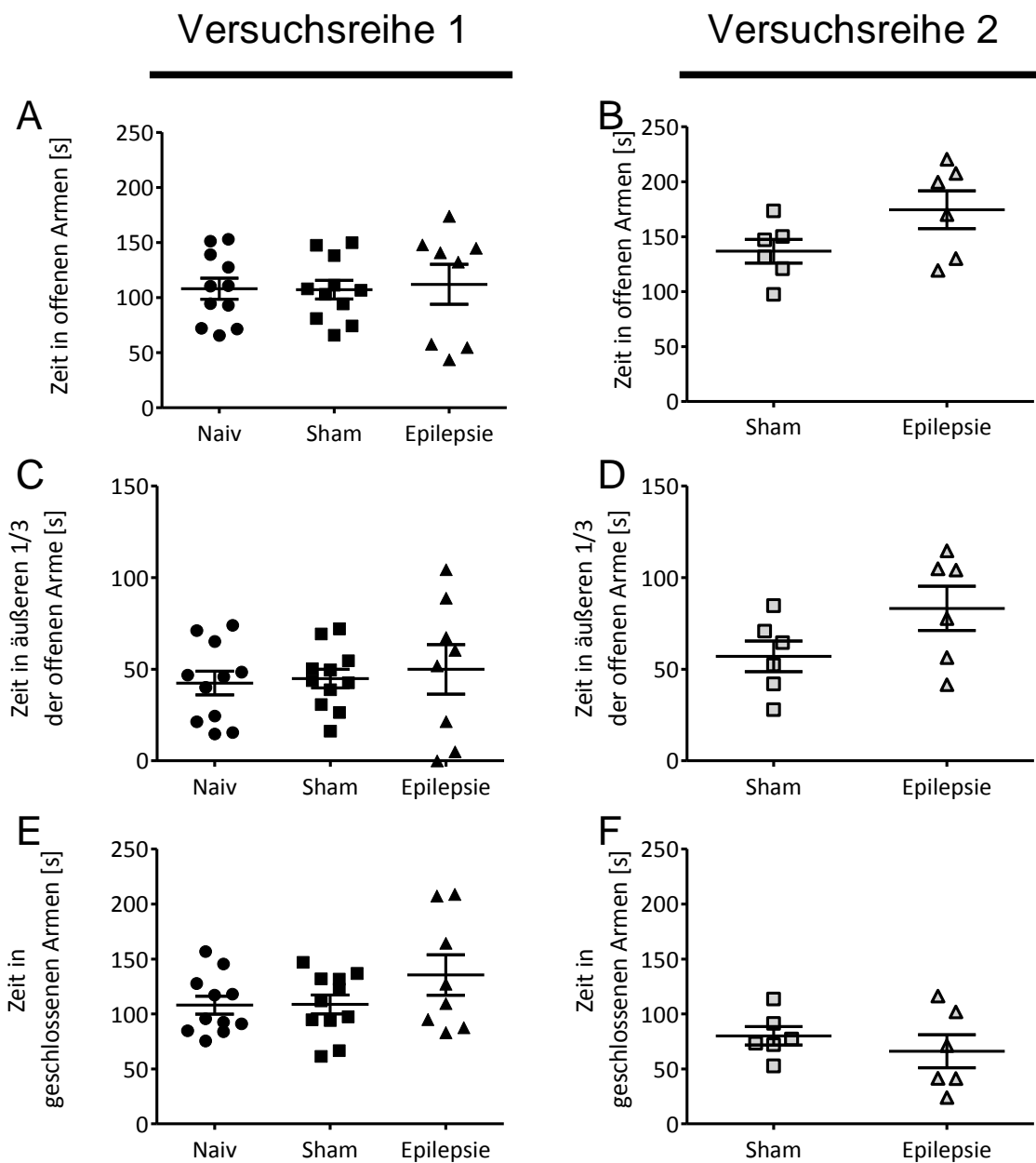
**Abbildung 23:** Vergleichende Analyse des angstassoziierten Verhaltens der Sham-Gruppen bei der Black-and-white-Box. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte in Bezug auf die (A) Zeit in der weißen Box, (B) die Latenzzeit bis zu dem ersten Übertritt in die schwarze Box, (C) die Anzahl der Übergänge in die weiße Box und (D) die Anzahl der Stretching-Positionen aus der schwarzen Box heraus dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM).

### 2.5.2. Elevated-Plus-Maze

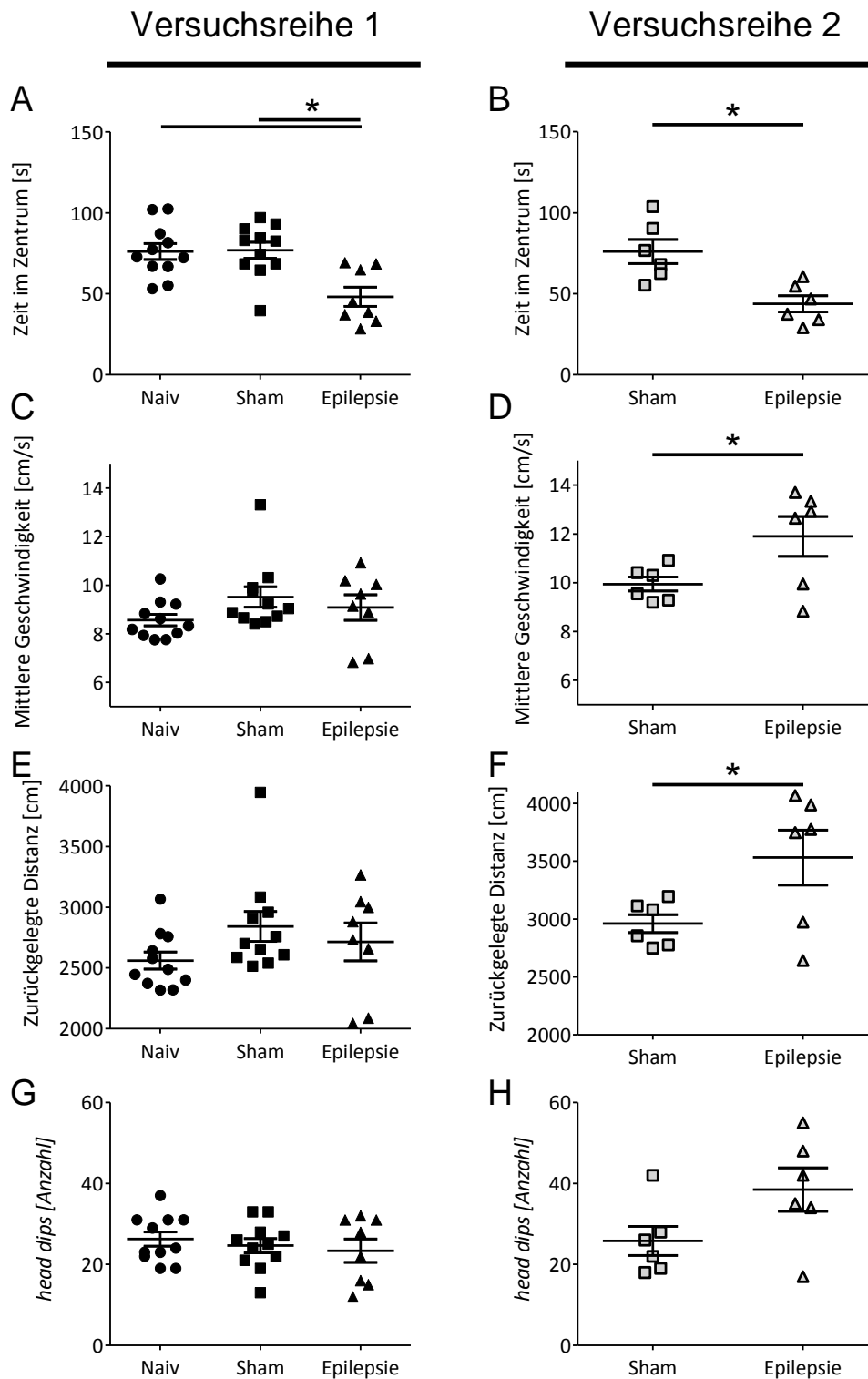
Bei der Analyse der im Elevated-Plus-Maze ermittelten Daten musste in beiden Versuchsreihen jeweils ein Tier aus der epileptischen Gruppe exkludiert werden, da diese Tiere mehr als drei Mal von der Apparatur heruntergesprungen waren. In beiden Versuchsreihen verbrachten die epileptischen Tiere signifikant weniger Zeit in dem Zentrum der Apparatur als die Tiere der entsprechenden Kontrollgruppen. Beide Epilepsiegruppen wiesen eine hohe Streuung bei der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen und offenen Armen des Elevated-Plus-Maze auf.

Die Tiere der Epilepsiegruppe der zweiten Versuchsreihe zeigten zudem eine signifikant höhere Durchschnittsgeschwindigkeit und legten mehr Strecke zurück als die Tiere der Sham-Kontrollgruppe. Des Weiteren ist ein Trend ( $p < 0,1$ ) einer gesteigerten Anzahl von *head dips* in der Epilepsiegruppe der zweiten Versuchsphase zu verzeichnen.





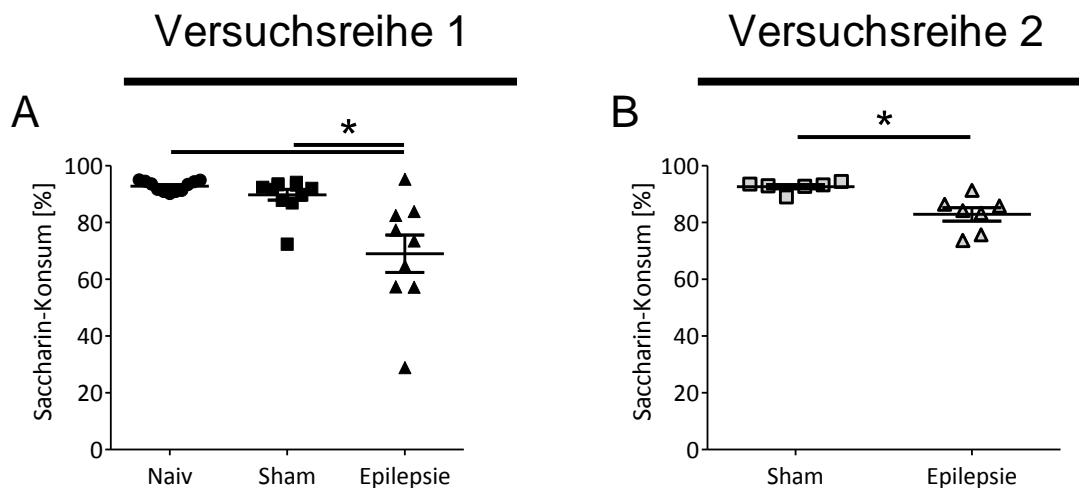
**Abbildung 24:** Angstassoziiertes Verhalten beider Versuchsreihen in dem Elevated-Plus-Maze während der chronischen Phase. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der Tiere der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 8$ ) bezüglich der Aufenthaltsdauer (A) in den offenen Armen, (C) im äußeren Drittel der offenen Arme und (E) in den geschlossenen Armen der Apparatur sowie die Aufenthaltsdauer der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 6$ ) (B) in den offenen Armen, (D) im äußeren Drittel der offenen Arme und (F) in den geschlossenen Armen der Apparatur dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM).



**Abbildung 25:** Angstassoziiertes Verhalten beider Versuchsreihen in dem Elevated-Plus-Maze während der chronischen Phase. In den Grafiken sind die individuellen Messwerte der Tiere der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 8$ ) bezüglich (A,  $F(2,27) = 8.706$ ,  $p = 0,0012$ ) der Aufenthaltsdauer im Zentrum, (C) der mittleren Geschwindigkeit, (E) der zurückgelegten Distanz [cm] und (G) der Anzahl an *head dips*, bei der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 6$ ) (B,  $p = 0,0049$ ) sind die Aufenthaltsdauer im Zentrum [s], (D,  $p = 0,0479$ ) die mittlere Geschwindigkeit [cm/s], (F,  $p = 0,0462$ ) die zurückgelegte Distanz [cm] und (H) die Anzahl an *head dips* dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).

## 2.6. Saccharin-Präferenz-Test

Das depressionsähnliche Verhalten der Tiere wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Saccharin-Präferenz-Test einmalig während der chronischen Phase überprüft. Beide Epilepsiegruppen konsumierten signifikant weniger Saccharin gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen.

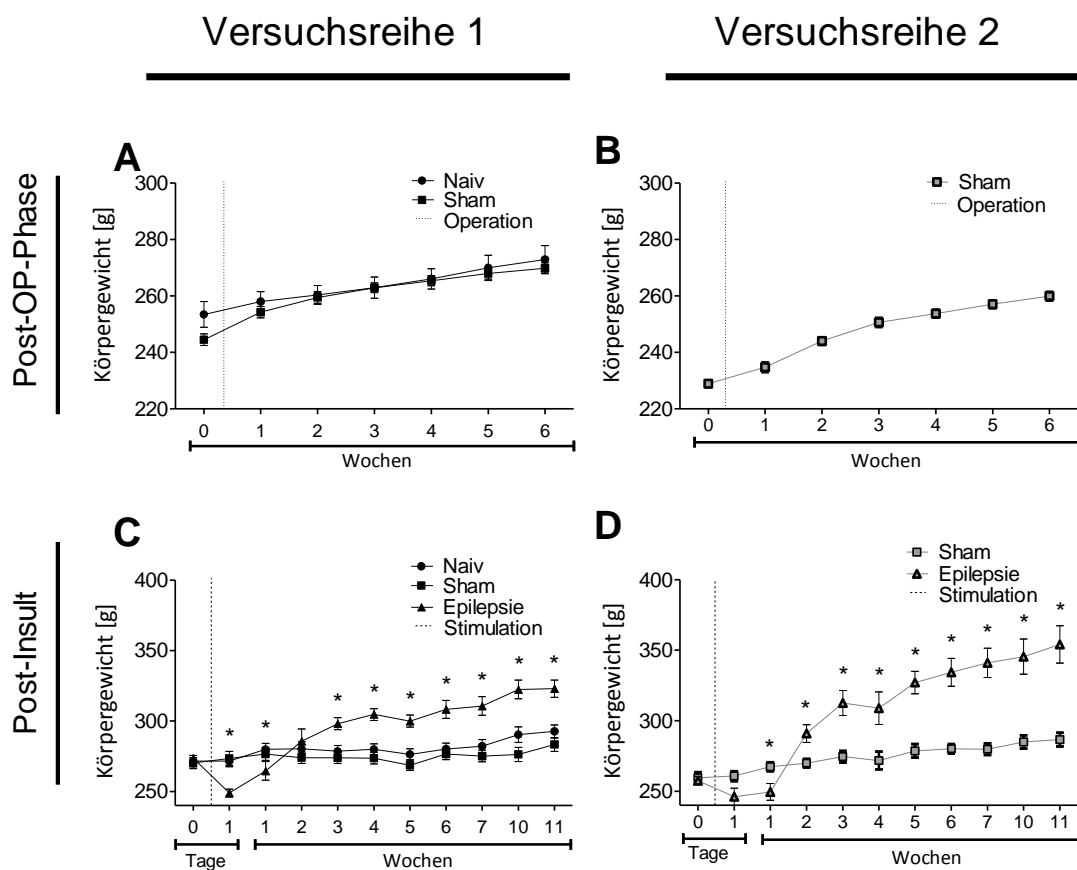


**Abbildung 26:** Saccharin-Konsum beider Versuchsreihen in der chronischen Phase, über den Saccharin-Präferenz-Test ermittelt. Individueller prozentualer Anteil an konsumiertem mit Saccharin gesüßtem Trinkwasser gemessen an der gesamten Flüssigkeitsaufnahme an Tag 2 und 4. (A) zeigt den prozentualen Saccharin-Konsum der ersten Versuchsreihe ( $F(2,28)=12.86$ ,  $p=0,0001$ ) und (B) den der zweiten Versuchsreihe ( $p=0,0036$ ) (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ). Anzahl an Tieren in der ersten Versuchsreihe sind Naiv  $n=11$ , Sham  $n=11$ , Epilepsie  $n=12$  und der zweiten Versuchsreihe sind: Sham  $n=6$ , Epilepsie  $n=7$ .

## 2.7. Allgemeinbefinden und Körpergewicht

Das Allgemeinbefinden wurde zusätzlich zu der täglichen Inaugenscheinnahme der Tiere im Rahmen des durch die Regierung von Oberbayern genehmigten Evaluationsbogens auch über das Körpergewicht, den Irwin-Score und den Grimace-Scale mindestens wöchentlich bewertet.

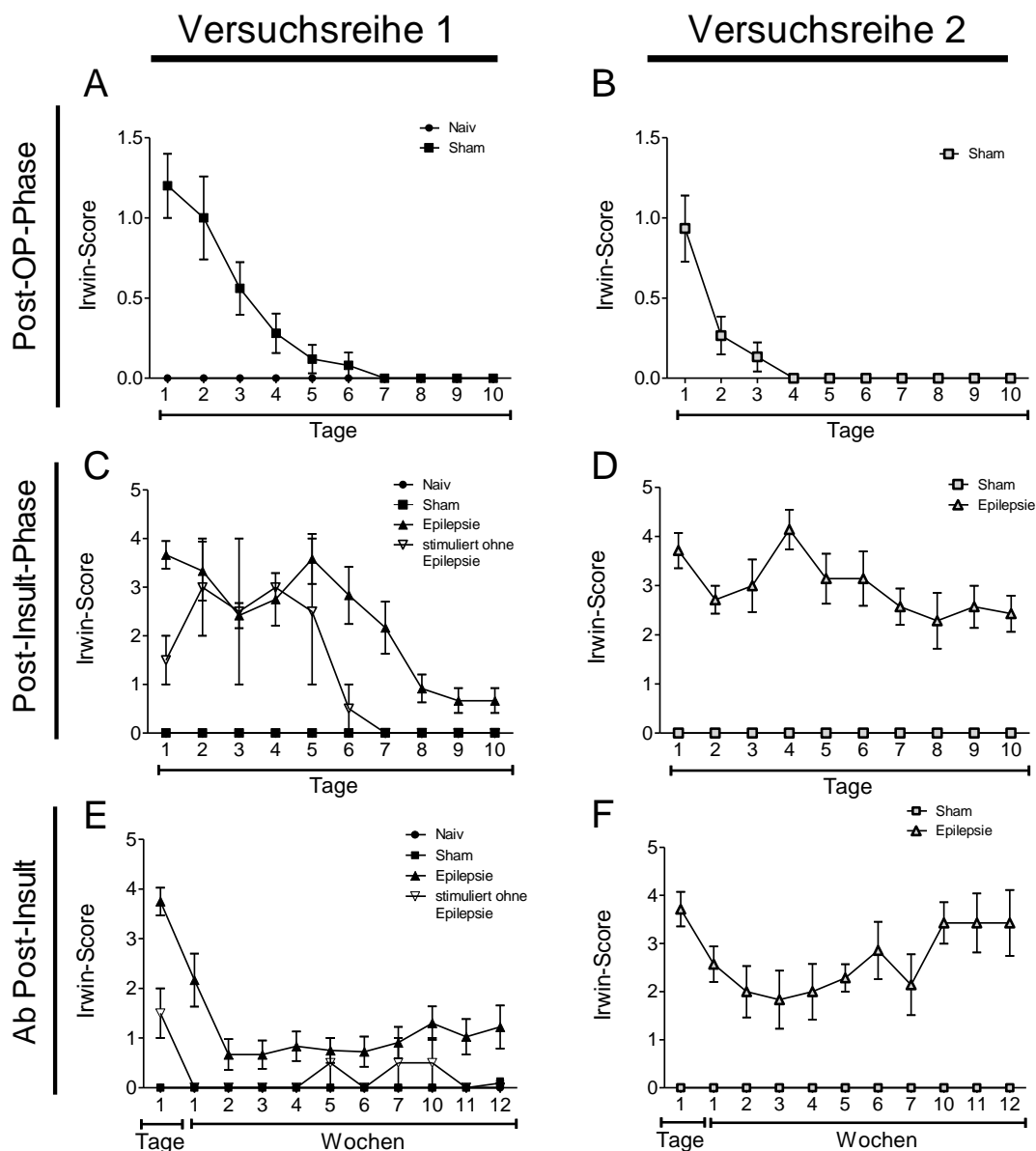
Das Körpergewicht der Tiere beider Versuchsreihen wurde während des gesamten Versuches mindestens einmal in der Woche erfasst (Abb. 27). In beiden Versuchsreihen konnte nach der Implantation bei den Tieren in der wöchentlichen Gewichtskontrolle keine Veränderung im Körpergewicht gemessen werden. Nach dem induzierten elektrischen Insult verloren die stimulierten Tiere beider Versuchsreihen in der Post-Insult-Phase signifikant an Gewicht. Schließlich nahmen die stimulierten Tiere beider Versuchsreihen wieder an Gewicht zu und erreichten ab der dritten Woche post-SE bis zum Ende des Versuches ein signifikant erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen.



**Abbildung 27:** Gewichtsverlauf der Tiere beider Versuchsreihen. Nach der Operation ist sowohl in (A) der ersten Versuchsreihe mit der Elektrodenimplantation (Naive  $n = 11$ , Sham  $n = 22$ ), als auch in (B) der zweiten Versuchsreihe mit Elektroden- und Transmitterimplantation (Sham  $n = 17$ ) keine Veränderung in dem Körpergewicht zu erkennen. Im Anschluss an den elektrischen SE zeigt (C) den Gewichtsverlauf der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und (D) der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ). Es lässt sich in beiden Versuchsreihen erst ein signifikant reduziertes Körpergewicht in der ersten Wochen nach dem SE (C:  $P < 0.05$ , D:  $P = 0.0293$ ), dann ein erhöhtes Körpergewicht der stimulierten Tiere (C:  $P < 0.0001$ , D:  $P < 0.05$ ) bis zum Ende des Projektes erfassen. Dargestellt ist jeweils der Gruppenmittelwert (Mittelwert  $\pm$  SEM, \* =  $p < 0,05$ ).

Der Irwin-Score wurde wöchentlich während des gesamten Versuches sowie im Zeitraum nach der Implantation und nach dem elektrisch induzierten SE täglich beurteilt. In der ersten Versuchsreihe erreichte der Irwin-Score einen Maximalwert von 1,2 an dem ersten Tag nach der Elektrodenimplantation. Dieser sank in den Folgetagen stetig und erreichte am achten Tag postoperativ den Kontrollwert der naiven Tiere. In der zweiten Versuchsreihe blieb der Irwin-Score postoperativ unter 1 und erreichte bereits am 4. Tag postoperativ wieder den Basalwert. In der gesamten folgenden Regenerationszeit bis zu dem Zeitpunkt des elektrischen Insults ließen sich keine veränderten Werte bei den Tieren beider Versuchsreihen ermitteln (nicht dargestellt). Infolge des elektrischen Insults zeigten die stimulierten Tiere beider Versuchsreihen am ersten Tag post-SE einen durchschnittlichen Wert zwischen 3,5 und 4. Dieser Wert verringerte sich in den ersten Tagen nach dem SE in beiden Versuchsreihen. Schließlich erreichte der Irwin-Score einen wie-

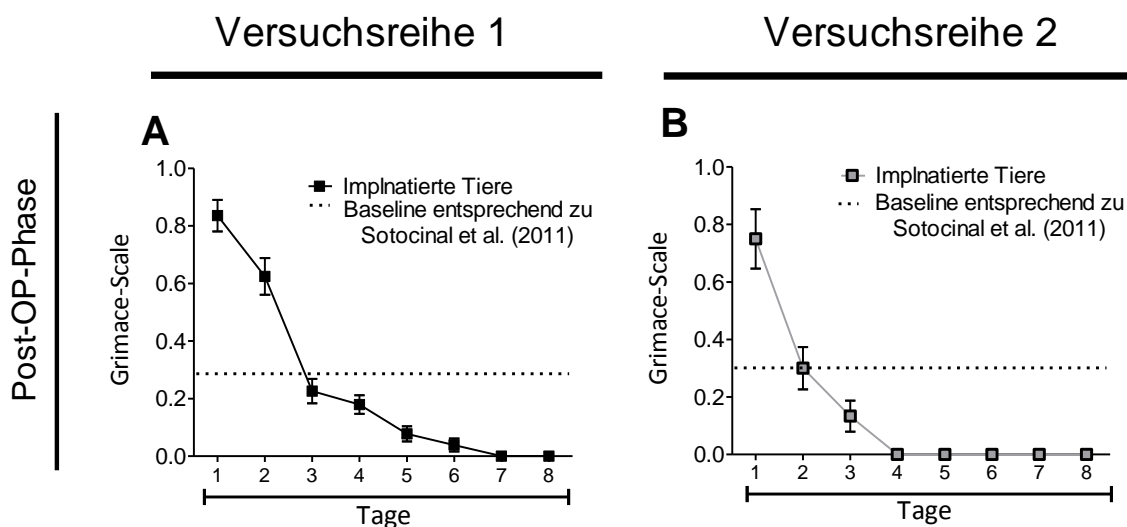
derholten Spitzenwert an dem fünften Tag post-SE in der ersten Versuchsreihe und dem vierten Tag post-SE in der zweiten Versuchsreihe. Anschließend reduzierte sich dieser Wert konstant, bis sich der Irwin-Score über die Latenzphase hinweg zwischen 0,6 und 1,0 bei der ersten Versuchsreihe und zwischen 1,8 und 2,9 bei der zweiten Versuchsreihe einpendelte. Während der chronischen Phase stieg der Irwin-Score in beiden Versuchsreihen leicht an und befand sich in der ersten Versuchsreihe zwischen 1,0 und 1,4 und in der zweiten Versuchsreihe zwischen 3,4 und 3,8. In der chronischen Phase erreichten die Tiere jedoch nicht die Spitzenwerte der Post-Insult-Phase.



**Abbildung 28:** Irwin-Score beider Versuchsreihen im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der ersten Versuchsreihe sind (A) täglich in der Post-OP-Phase nach der reinen Elektrodenimplantation, (C) täglich in der Post-Insult-Phase sowie (E) wöchentlich ab dem elektrischen Insult bis zum Ende des Versuches dargestellt. In den anderen Grafiken ist der Irwin-Score als Mittelwert ( $\pm$  SEM) der zweiten Versuchsreihe (B) täglich in der Post-OP-Phase nach der Elektroden- und Transmitterimplantation, (D) täglich in der Post-Insult-Phase sowie (F) wöchentlich ab dem elektrischen Insult bis zum Ende des Versuches präsentiert.

Der Grimace-Scale wurde im Rahmen der vorliegenden Studie in beiden Versuchsreihen zu den gleichen Zeitpunkten wie der Irwin-Score erfasst (Abb. 29). Am ersten Tag nach dem operativen Eingriff erreichte der Grimace-Scale einen Maximalwert von 0,8 in der ersten Versuchsreihe und 0,75 in der zweiten Versuchsreihe. In den Tagen nach der Implantation sank der Grimace-Scale konstant ab. In der ersten Versuchsreihe erreichte der Grimace-Scale der operierten Tiere den Wert der naiven Kontrolltiere. In der zweiten Versuchsreihe erreichten die implantierten Tiere bereits an dem vierten Tag den Basalwert. Während der fortlaufenden Regenerationszeit konnte keine weitere Veränderung des Grimace-Scales observiert werden (nicht dargestellt).

Insgesamt sind die Veränderungen des Allgemeinbefindens und der neurologischen Defizite ermittelt über das Körpergewicht, den Irwin-Score und den Grimace-Scale besonders in der Post-Insult-Phase ausgeprägt. In der Latenzphase sind die Unterschiede zu den Kontrollgruppen geringer, jedoch erreichten die stimulierten Tiere nicht mehr die Werte der entsprechenden Kontrollgruppen. In der chronischen Phase ist eine leicht erhöhte Differenz dieser Parameter zwischen den Gruppen zu verzeichnen.



**Abbildung 29:** Grimace-Scale beider Versuchsreihen in der Post-OP-Phase. In der Grafik ist der Grimace-Scale als Mittelwert ( $\pm$  SEM) (A) ersten Versuchsreihe ( $n = 22$ ) nach der Elektrodenimplantation und (B) der zweiten Versuchsreihe ( $n = 17$ ) nach der Elektroden- und Transmitterimplantation dargestellt.

### 3. Biochemische Analysen

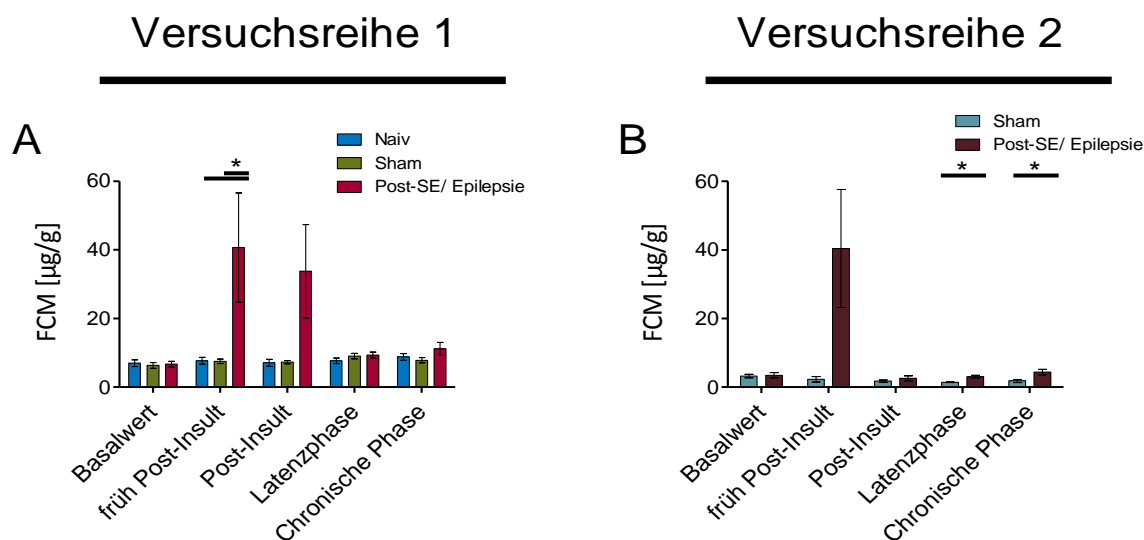
Die biochemischen Parameter konnten mit Ausnahme der Kotproben nur in der chronischen Phase erhoben werden.

### 3.1. Corticosteron

Die Corticosteron-Konzentration wurde in beiden Versuchsreihen sowohl über Serum-, als auch Haarproben ermittelt. Die Konzentration der Corticosteron-Metaboliten konnte zudem im Kot während des Verlaufes der Studie zu fünf Zeitpunkten erhoben werden, ohne zusätzlichen Stress zu induzieren.

#### 3.1.1. Fäkale Corticosteronmetaboliten (FCM)

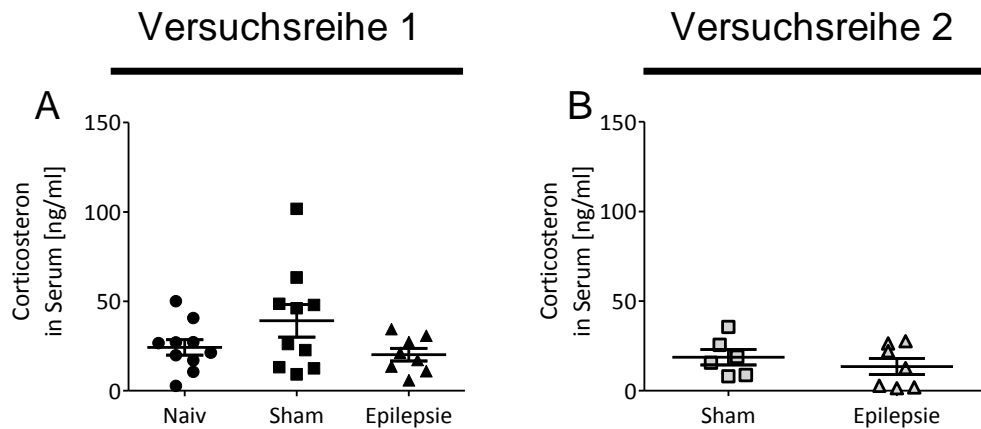
Die Ergebnisse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten-Konzentration (FCM) sind in Abbildung 30 zusammengefasst. In beiden Versuchsreihen ist ein deutlicher Anstieg der FCM-Konzentration in der frühen Post-Insult-Phase (zwei Tage nach dem SE) zu verzeichnen. Zusätzlich lässt sich auch in der ersten Versuchsreihe in der Post-Insult-Phase (sieben Tage post SE) ein höherer FCM-Wert ablesen. Die FCM-Werte innerhalb der Versuchsgruppen weisen eine hohe Varianz auf. Dies führt dazu, dass teilweise die Varianz der Ergebnisse signifikant ist, jedoch nicht die Gruppenunterschiede. Dennoch ließ sich in der ersten Versuchsreihe in der frühen Post-Insult-Phase und bei der zweiten Versuchsreihe in der Latenz- und chronischen Phase ein signifikant erhöhter FCM-Wert der stimulierten Tiere erfassen.



**Abbildung 30:** Balkendiagramm der FCM beider Versuchsreihen zu fünf Zeitpunkten. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ ) der Versuchsgruppen in (A) der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Post-SE und Epilepsie  $n = 12$ ) und (B) der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Post-SE und Epilepsie  $n = 7$ ). Der Basalwert wurde am Morgen vor der Elektrodenimplantation gewonnen. Das Einsammeln der Kotproben für die frühe Post-Insult-Phase erfolgte zwei Tage nach dem elektrisch induzierten Insult. Die Zeitpunkte der Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase beschreiben analog zu der gesamten Studie die Zeitpunkte eine, vier und elf Wochen nach dem elektrischen Insult. In der ersten Versuchsreihe haben sich die Versuchsgruppen signifikant in der frühe Post-Insult-Phase ( $F(2,30) = 4.975$ ,  $p = 0,0136$ ) unterschieden und in der zweiten Versuchsreihe während der Latenzphase ( $p = 0.0036$ ) und der chronischen Phase ( $p = 0.0188$ ).

### 3.1.2. Corticosteron in Serumproben

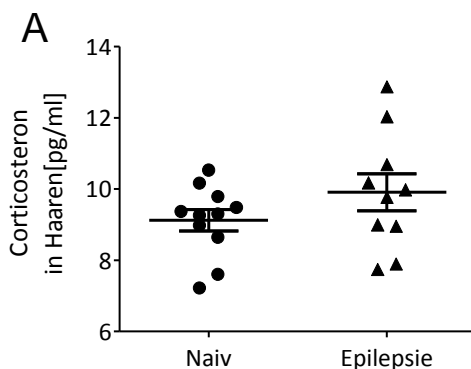
Die Serum-Konzentration von Corticosteron, die in der chronischen Phase in beiden Teilversuchen erhoben wurde, unterscheidet sich nicht zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 31). Die Sham-Kontrollgruppen hatten in beiden Versuchsreihen einen leicht erhöhten, jedoch nicht signifikant erhöhten Corticosteron-Wert gegenüber den Epilepsiegruppen.



**Abbildung 31:** Corticosteron-Konzentration der Serumproben aus der chronischen Phase. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Versuchsgruppen der (A) ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und (B) der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ).

### 3.1.3. Corticosteron in Haarproben

Die Corticosteron-Konzentration der Haarproben wurde analysiert, um eine Langzeiterfassung der modellspezifischen Belastung ermitteln zu können. Dabei wurden Haarproben der naiven und der epileptischen Tiere der ersten Versuchsreihe in der chronischen Phase entnommen und vergleichend analysiert. Zuletzt erfolgte die Rasur der entsprechenden Hautstelle der Tiere unmittelbar vor der Elektrodenimplantation. Somit war gewährleistet, dass durch die Messung der Haarproben ausschließlich der Zeitraum der versuchsbedingten Prozeduren erfasst wurde. Bei der Untersuchung konnte kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 32).

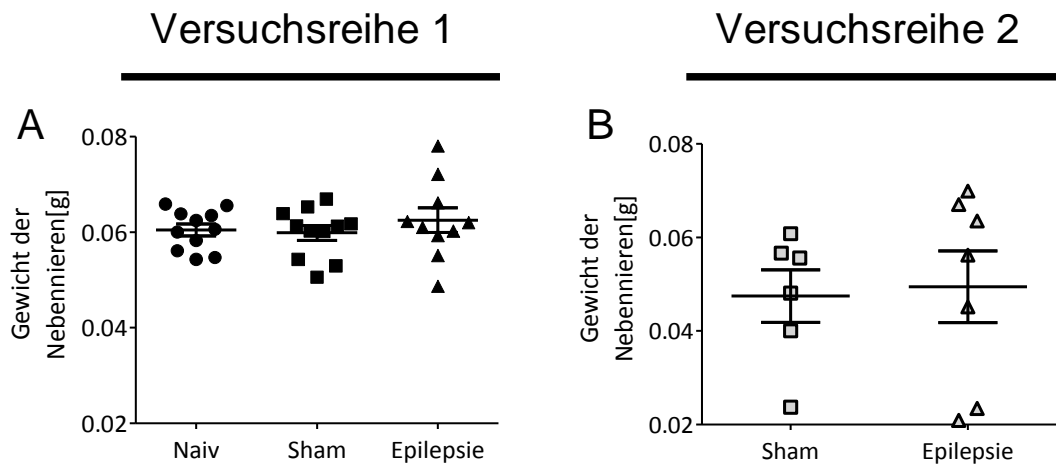


**Abbildung 32:** Konzentration von Corticosteron in Haarproben der ersten Versuchsreihe. Die Grafik bildet die absolute Corticosteron-Konzentration der Haarprobe der einzelnen Tiere (Naiv  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und den Gruppenmittelwert  $\pm$  SEM ab.



### 3.2. Nebennieren

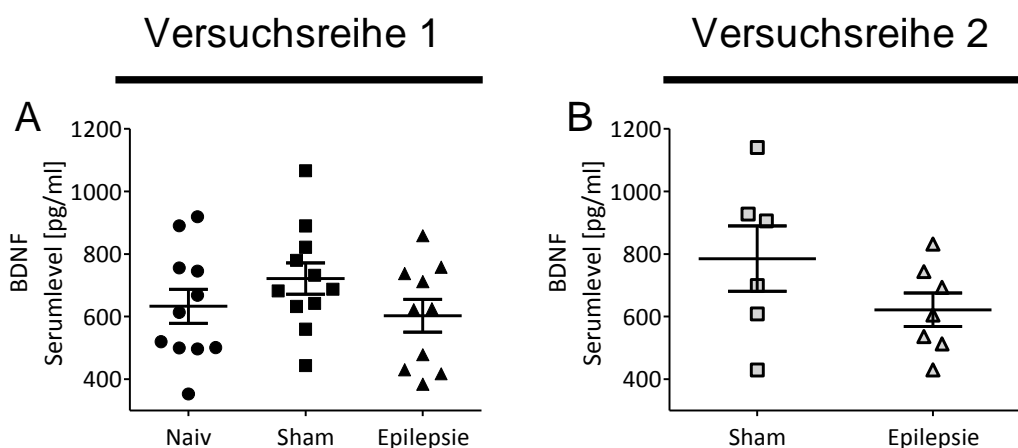
Das Gewicht der Nebennieren wurde bei beiden Versuchsreihen am Tag der Perfusion ermittelt. In beiden Versuchsreihen ließ sich kein Unterschied zwischen entsprechenden Versuchsgruppen feststellen (Abb. 33).



**Abbildung 33:** Gewicht der Nebennieren. Das Gewicht der Nebennieren ist als Summe aus der rechten und der linken Nebenniere für jedes Tier als Einzelwert dargestellt (Mittelwerte  $\pm$  SEM). (A) bildet die Werte der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und (B) die der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) ab.

### 3.3. Brain-derived-neurotrophic-Factor (BDNF)

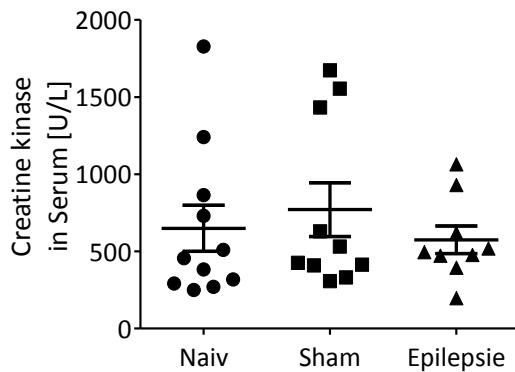
Die Konzentration von BDNF im Serum wurde in beiden Versuchsreihen in der chronischen Phase analysiert. In beiden Versuchsreihen konnte keine signifikante Abweichung zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der Varianz oder des Mittelwertes erfasst werden.



**Abbildung 34:** Serumkonzentration von BDNF. Dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere sowie die Mittelwerte  $\pm$  SEM beider Versuchsreihen in der chronischen Phase. (A) bildet die Werte der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und (B) die Werte der zweiten Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) ab.

### 3.4. Creatinkinase (CK)

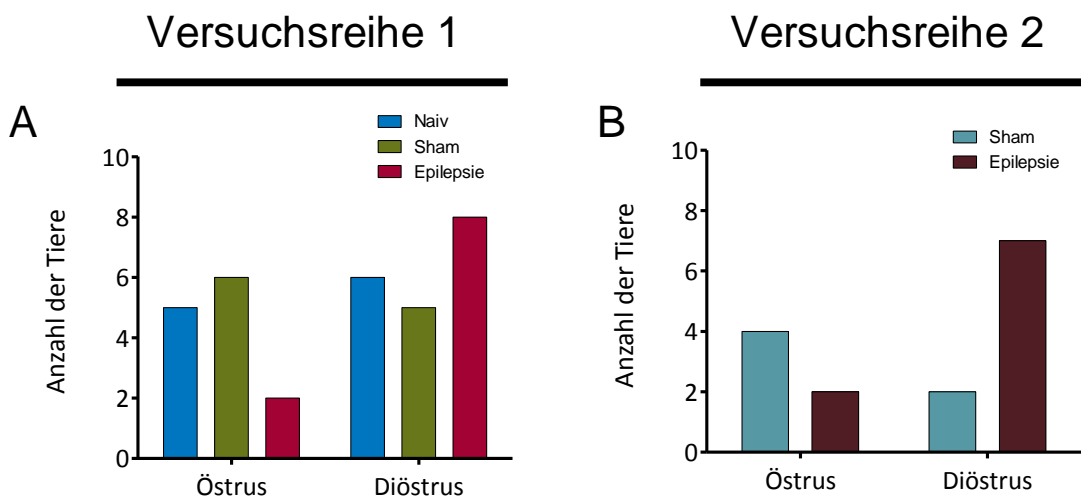
Der Serumgehalt der Creatinkinase wurde in der ersten Versuchsreihe für die chronische Phase ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen identifiziert werden.



**Abbildung 35:** CK-Konzentration in Serumproben. Die Grafik bildet die CK-Konzentration der Serumproben der einzelnen Tiere (Mittelwert  $\pm$  SEM) der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) ab.

### 3.5. Zyklusstand

Der Zyklusstand aller Tiere wurde anhand der am Tag der Perfusion gewonnenen Vaginalzytologie ermittelt. Weniger Tiere der stimulierten Gruppen beider Versuchsreihen befanden sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus, verglichen mit den Kontrollgruppen.



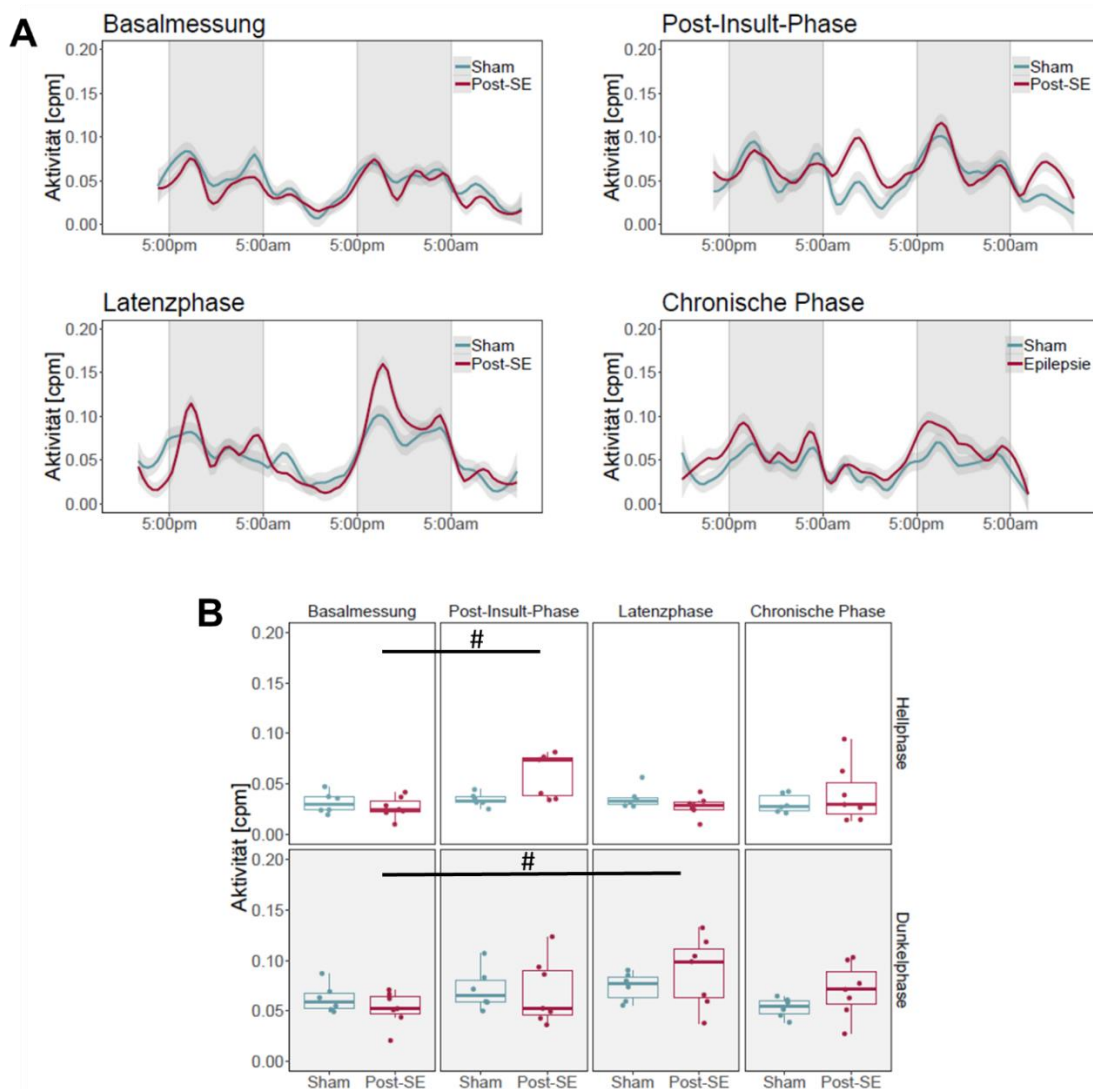
**Abbildung 36:** Zyklusstand der Tiere. In den Balkendiagrammen ist die Anzahl an Tieren der Versuchsgruppen abgebildet, die anhand der Vaginalzytologie dem Östrus oder dem Diöstrus zugeordnet werden konnten. (A) stellt die Versuchsgruppen der ersten Versuchsreihe (Naiv  $n = 11$ , Sham  $n = 11$ , Epilepsie  $n = 10$ ) und (B) die zweite Versuchsreihe (Sham  $n = 6$ , Epilepsie  $n = 7$ ) dar.

## 4. Telemetrie Messungen

Die telemetrischen Aufzeichnungen der transmitterimplantierten Tiere der zweiten Versuchsreihe fanden zu vier Zeitpunkten für mindestens 48 Stunden statt. Die Basalmessungen wurden an den zwei Tagen vor dem elektrischen Insult erfasst. Die Aufzeichnungen während der Post-Insult-Phase fanden an Tag sechs und sieben nach dem Insult statt. Die Latenzphase beschreibt den Zustand der Tiere vier Wochen nach dem SE und die chronische Phase wurde in der achten Woche nach dem SE aufgezeichnet. Im Zuge jeder telemetrischen Aufzeichnung wurden das EEG, das EKG und die Aktivität der Tiere in ihrem Heimkäfig gemessen. Anschließend erfolgte die vergleichende Analyse der Hell- und Dunkelphase, der Versuchsgruppen und der Aufzeichnungsphasen miteinander. Sowohl die signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen innerhalb einer Aufzeichnungsphase als auch signifikante Abweichungen innerhalb einer Versuchsgruppe zwischen den Aufzeichnungsphasen sollen nachfolgend beschrieben werden. Bei der Analyse des EKG und den daraus resultierenden HRV-Parametern mussten drei Tiere aufgrund von undeutlichen EKG-Signalen ab der Basalmessung ausgeschlossen werden.

### 4.1. Circadiane Aktivität

Bei der Betrachtung der circadianen Aktivität von Ratten ist zu beachten, dass es sich um nachtaktive Tiere handelt, die ihre Aktivitätsphase physiologisch während der Dunkelphase ausleben. Die Aktivität der Tiere der zweiten Versuchsreihe im Heimkäfig ist in Abb. 37 dargestellt. Dabei entsprechen die erhöhte Aktivität während der Dunkel- und die erniedrigte Aktivität in der Hellphase dem physiologischen Verhalten von Ratten. Bei Betrachten des Kurvenverlaufs lassen sich in der Dunkelphase zwei Aktivitätshöhepunkte identifizieren, der erste am Anfang und der zweite gegen Ende der Dunkelphase. Während der Hellphase sinkt die Aktivität stetig und erreicht den Tiefpunkt in der zweiten Hälfte der Hellphase. In der Basalmessung verlaufen die Aktivitätsphasen beider bis dahin noch identischer Versuchsgruppen analog zueinander. Weiterhin konnte das beschriebene Verhalten bei der Sham-Gruppe zu allen Aufnahmezeitpunkten erfasst werden. Nach dem elektrischen Insult zeigten die stimulierten Tiere eine signifikant erhöhte Aktivität in der Hellphase im Vergleich zu der Basalmessung ( $p= 0,0093$ ). In der Latenzphase ließ sich eine gesteigerte Aktivität der epileptischen Tiere in der Dunkelphase im Vergleich zu der Basalmessung erfassen ( $p= 0,0057$ ). Während der chronischen Phase hingegen konnten keine Abweichungen der Aktivität der Versuchsgruppen ermittelt werden.

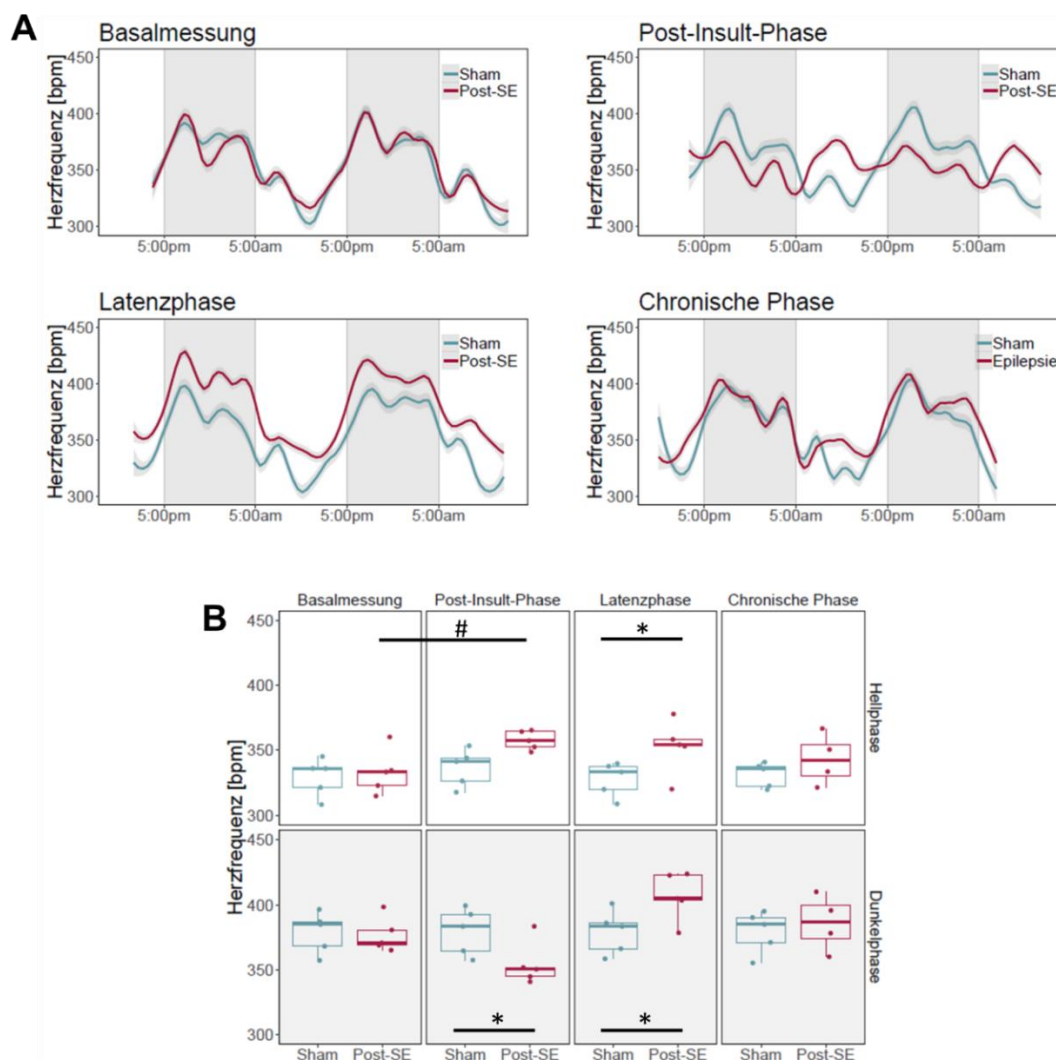


**Abbildung 37:** Circadiane Aktivität im Heimkäfig. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf der Aktivität beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farbigen abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den grau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) der Aktivität entsprechend der Aufnahmeperiode. Signifikante Unterschiede zu den Basalwerten einer Versuchsgruppe sind durch eine Raute gekennzeichnet.

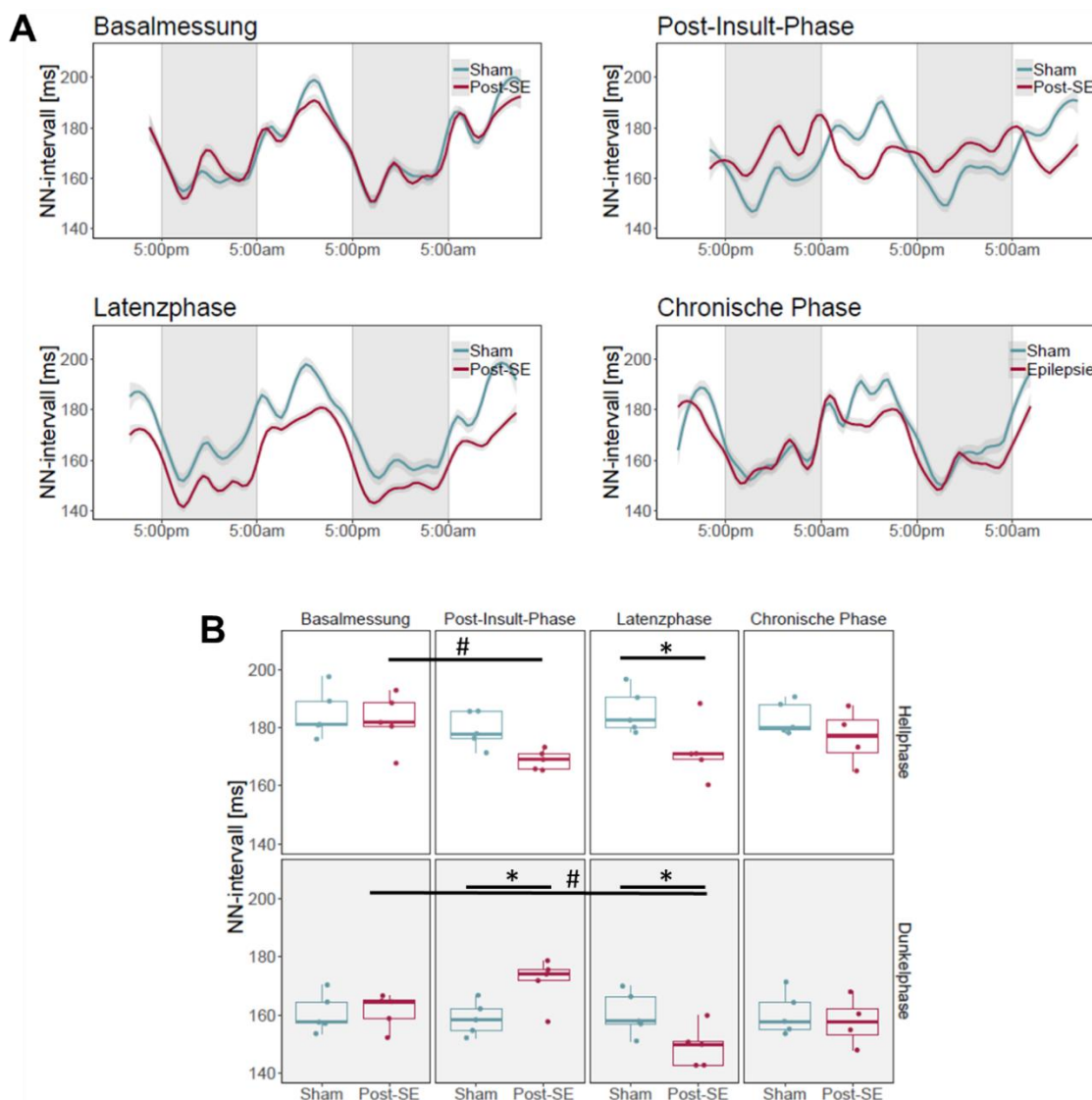
#### 4.2. Herzfrequenz (HR)

Die circadiane Veränderung der Herzfrequenz (HR) und des NN-Intervalls (NN-I) der Tiere der zweiten Versuchsreihe ist in Abbildung 38 und 39 demonstriert. Der generelle Kurvenverlauf der HR zeigt erhöhte Werte in der Dunkelphase und niedrigere Werte während der Hellphase. Ein maximale HR ist überwiegend in der ersten Hälfte der Dunkelphase zu erkennen. In der Basalmessung verhalten sich die Werte beider noch identischer Versuchsgruppen analog zueinander. Nach dem elektrischen Insult sind in der Hellphase der Post-Insult-Phase eine signifikant erhöhte Herzfrequenz ( $p=0,0341$ ) und ein erniedrigtes NNI ( $p=0,0148$ ) der stimulierten Tiere gegenüber ihrer Basalmessung zu

erkennen. In der Dunkelphase der Post-Insult-Phase ergab die Analyse eine Verminderung der HR ( $p=0,0309$ ) und einen Anstieg des NNI ( $p=0,0195$ ) der stimulierten Tiere im Vergleich zu der Sham-Gruppe. Weiterhin ist die HR der stimulierten Tiere in der Latenzphase sowohl in der Hell- ( $p=0,0330$ ) als auch in der Dunkelphase ( $p=0,0200$ ) gegenüber der Sham-Gruppe signifikant erhöht. Diese Abweichungen lassen sich anhand des signifikant erniedrigten NNI in der gleichen Phase bestätigen (Hellphase:  $p=0,0129$ , Dunkelphase:  $p=0,0377$ ). Zusätzlich konnte ein signifikant erniedrigter NNI-Wert der stimulierten Tiere in der Dunkelphase der Latenzphase gegenüber ihrer Basalwerte erfasst werden ( $p=0,0255$ ). In der chronischen Phase konnten keine Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen detektiert werden.



**Abbildung 38:** Herzfrequenz (HR) im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf der HR beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farblich abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den grau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers =  $1,5 \times \text{IQR}$ ) der HR entsprechend der Aufnahmephase. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen innerhalb einer Phase sind durch einen Stern, Unterschiede zu den Basalwerten der gleichen Versuchsreihe sind durch eine Raute gekennzeichnet.



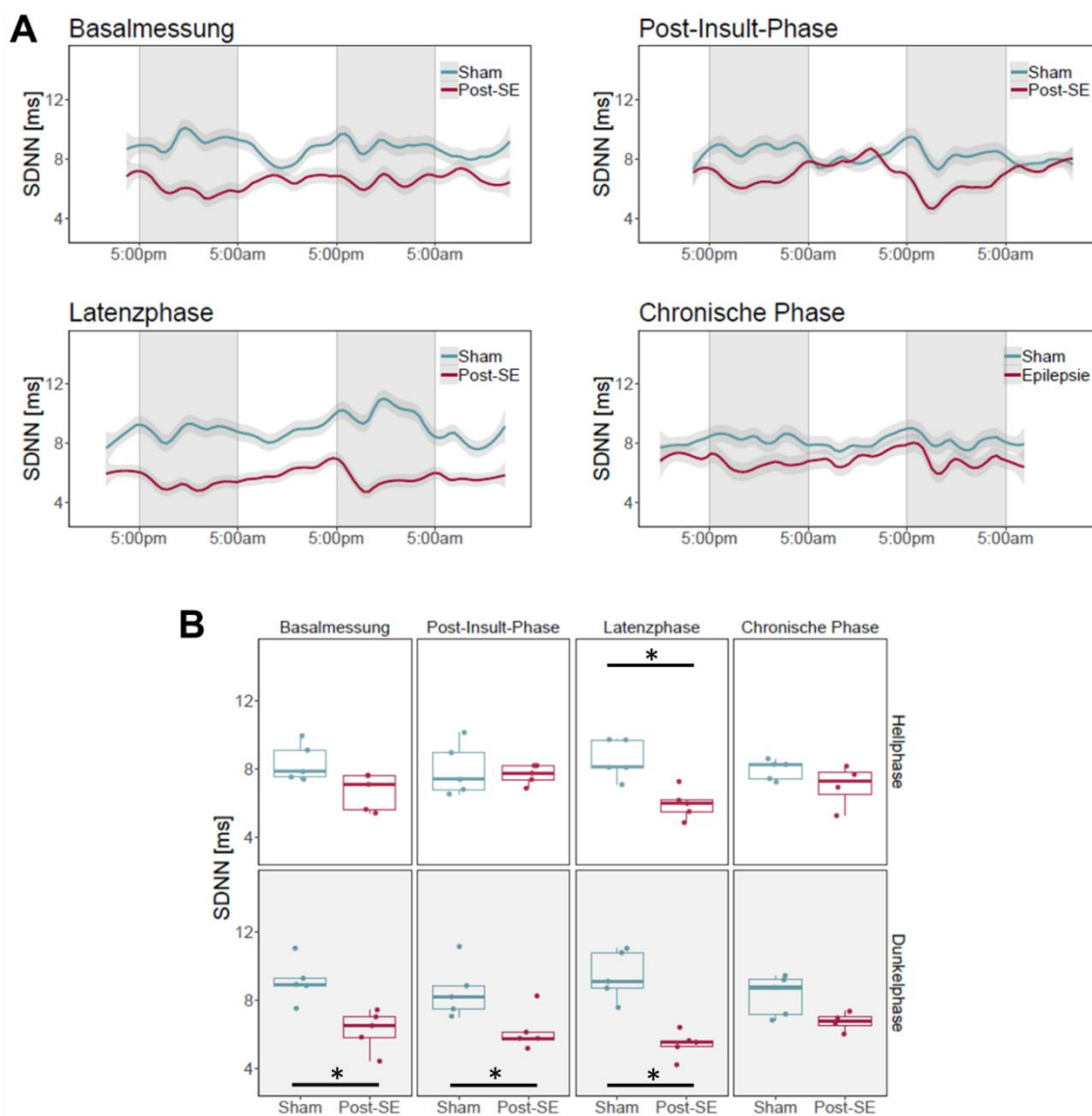
**Abbildung 39:** NN-Intervall (NNI) im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf des NNI beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farblich abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den hellgrau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) des NNI entsprechend der Aufnahmephase. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern, Unterschiede zu den Basalwerten sind durch eine Raute gekennzeichnet.

#### 4.3. Zeitabhängige Herzratenvariabilität (HRV)

Um die zeitabhängige HRV zu analysieren, wurden die Parameter SDNN, RMSSD,  $NN_x$  und  $pNN_x$  in allen vier Zeitpunkten analysiert.

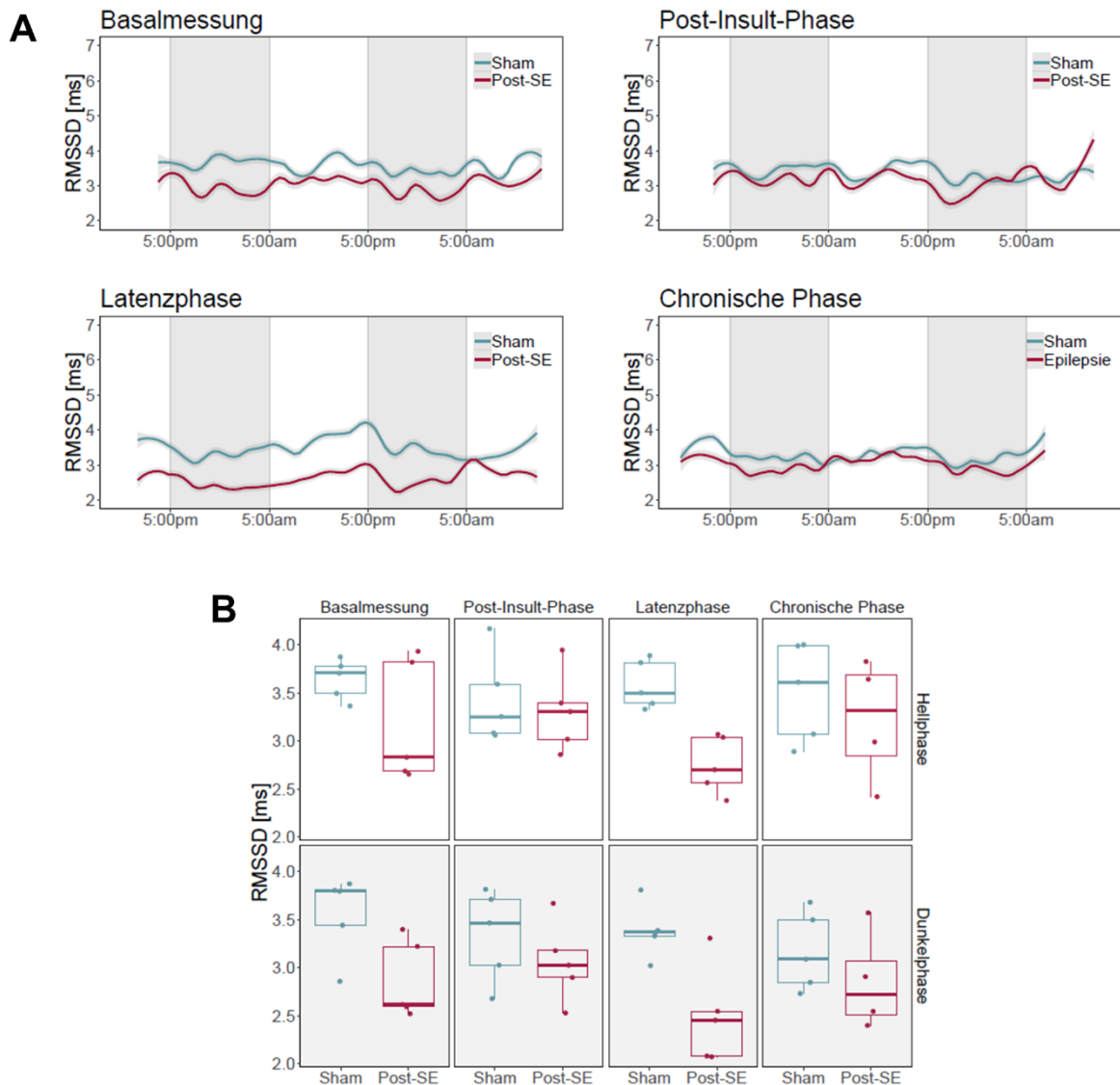
Die SDNN-Werte verhalten sich innerhalb der Versuchsgruppen zu allen Zeitpunkten unverändert (Abb. 40). Signifikante Unterschiede wurden zwischen den noch identischen Versuchsgruppen in der Dunkelphase während der Basalmessung erfasst. Die künftig stimulierten Tiere wiesen zu dem Zeitpunkt der Basalmessung einen niedrigeren SDNN-

Wert gegenüber den Sham-Tieren auf ( $p= 0,0019$ ). Weithin konnte diese Abweichung zwischen den beiden Versuchsgruppen auch in der Post-Insult-Phase ( $p= 0,0107$ ) und der Latenzphase ( $p= 0,0001$ ) detektiert werden. Zusätzlich ist eine signifikant niedrigere SDNN während der Hellphase in der Latenzphase ( $p= 0,0052$ ) der stimulierten Tiere verglichen mit der Sham-Gruppe festzustellen.



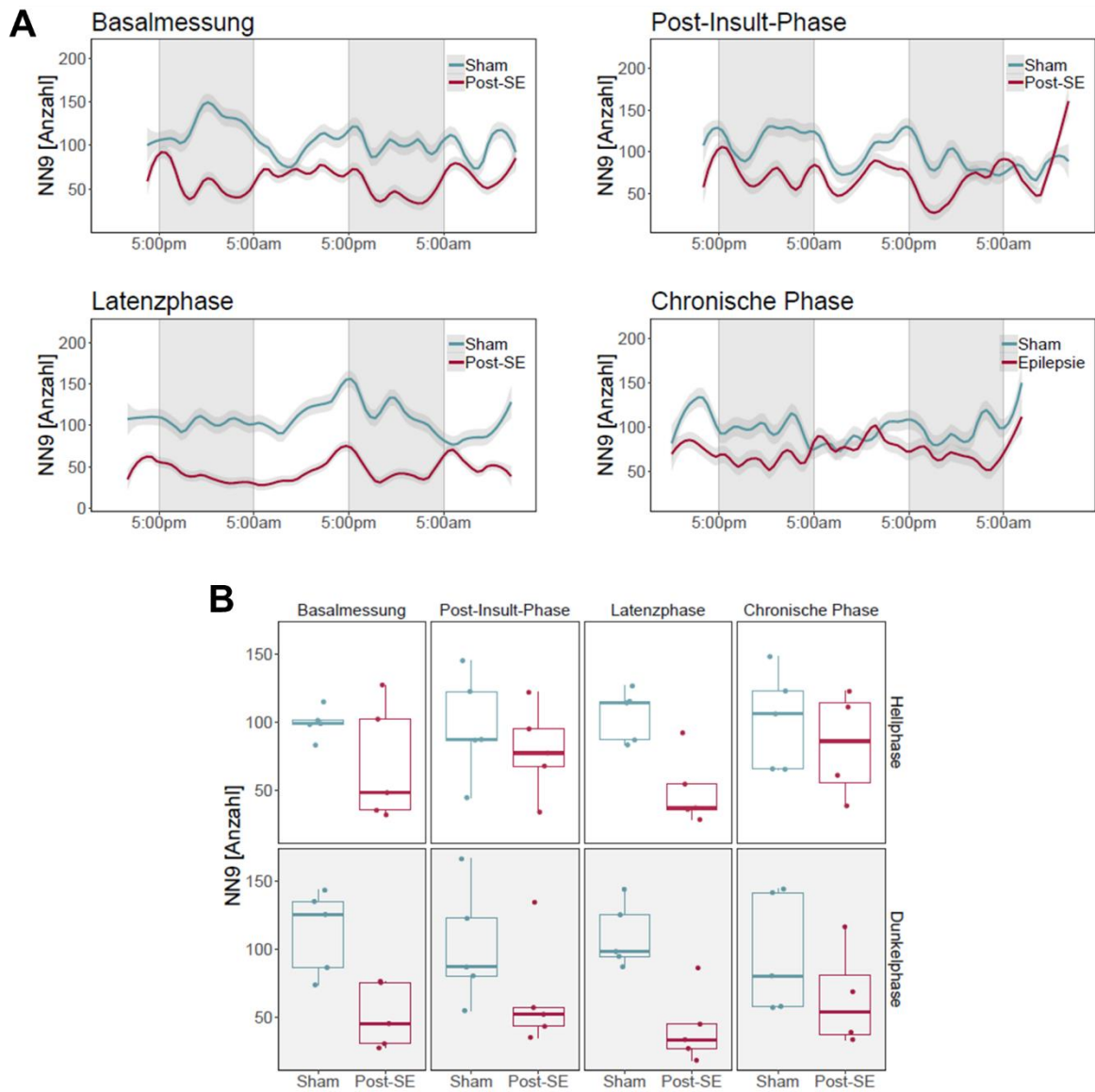
**Abbildung 40:** Standardabweichung der NN-Intervalle (SDNN) im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf der SDNN beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farbigen abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den hellgrau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) der SDNN entsprechend der Aufnahmephase. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Für die Analyse der kurzfristigen Anpassung der HRV wurden die Parameter  $NN_9$ ,  $pNN_9$  und RMSSD herangezogen (Abb. 41 – 43). Bei diesen Parametern sind sowohl zwischen den Versuchsgruppen innerhalb einer Aufnahmephase als auch innerhalb einer Versuchsgruppe im Vergleich zu den Basalmessungen keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

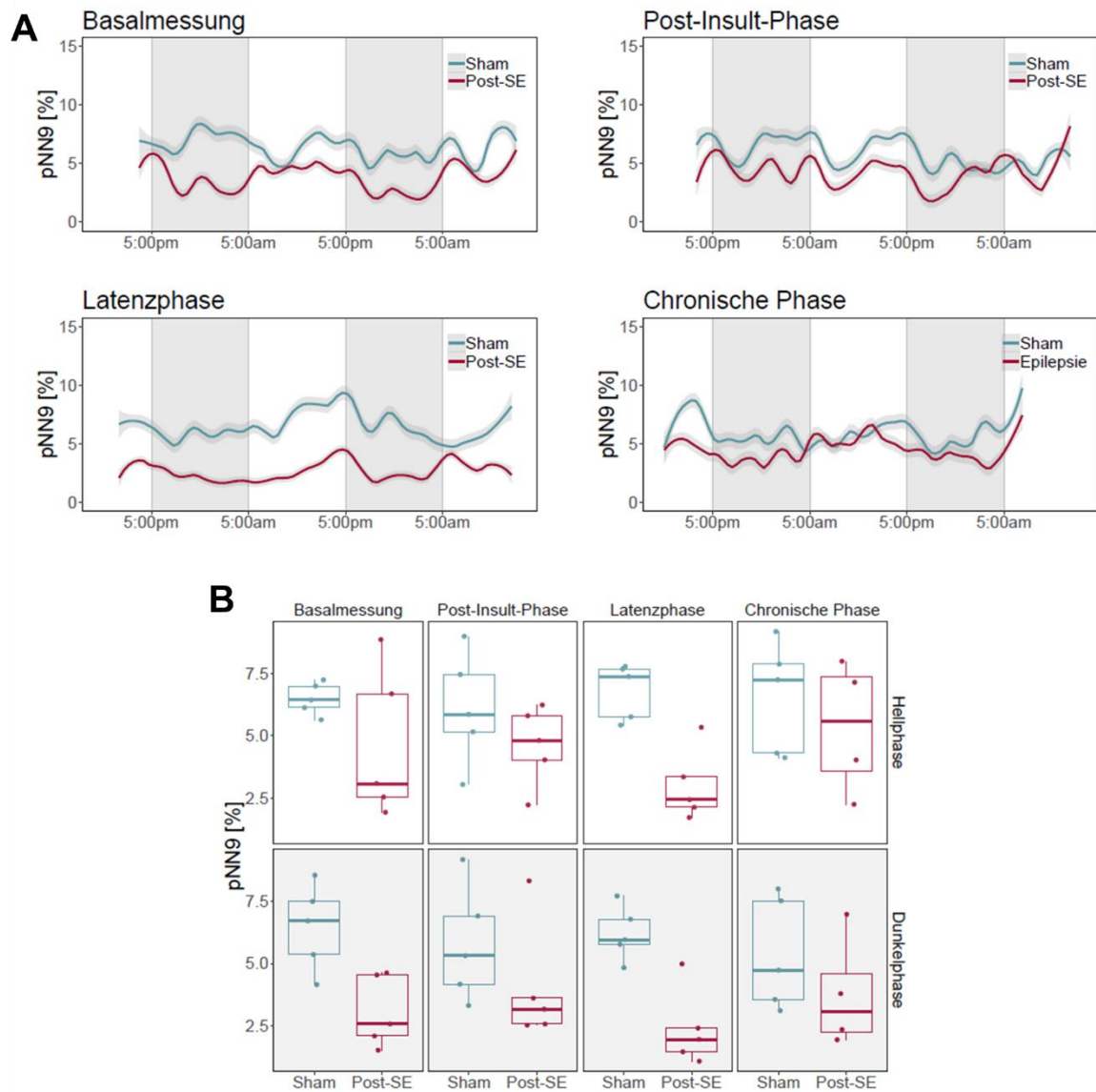


**Abbildung 41:** Die Quadratwurzel der Änderung der RR-Intervalle (RMSSD) im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf der RMSSD beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farblich abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den hellgrau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) der RMSSD entsprechend der Aufnahmephase.





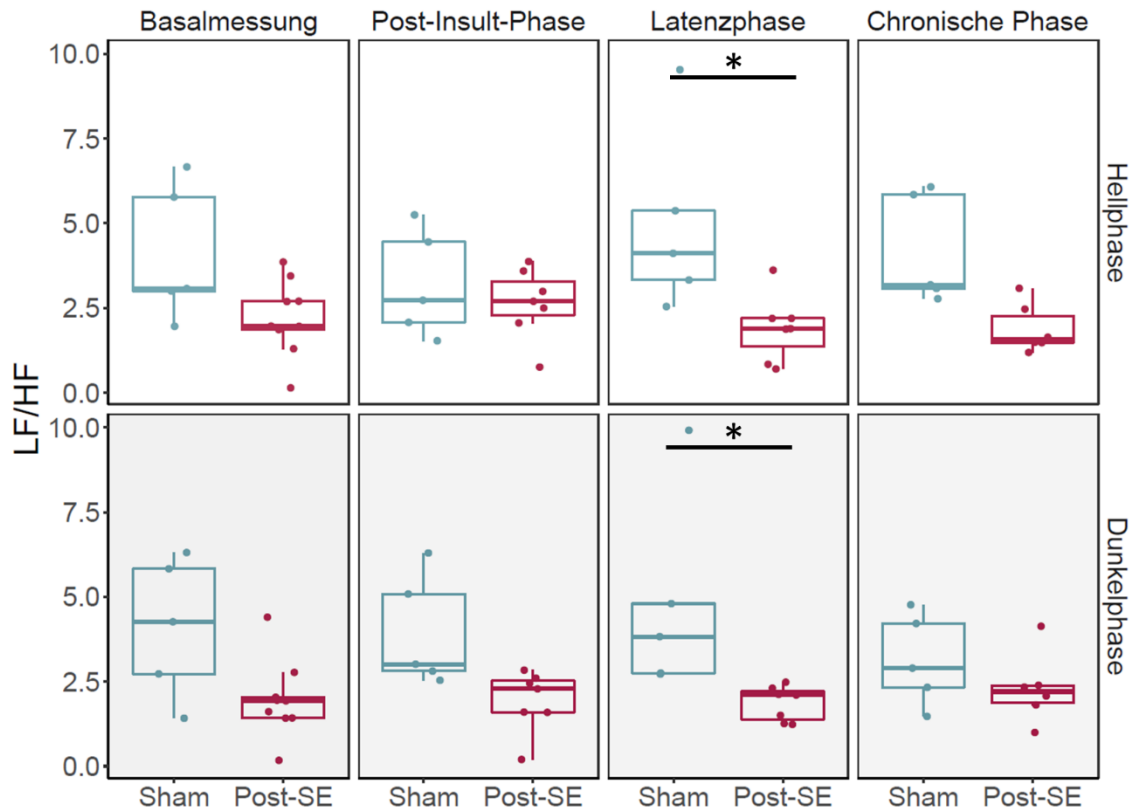
**Abbildung 42:**  $NN_9$  im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf der SDNN beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farbiger abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den hellgrau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) der  $NN_x$  entsprechend der Aufnahmeperiode.



**Abbildung 43:** Der Prozentsatz aller durch  $NN_9$  beschriebenen Intervalle ( $pNN_9$ ) im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. (A) Der zeitbasierte Kurvenverlauf des  $pNN_9$  beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angedeutet. Die Darstellung des Kurvenverlaufes basiert auf den farblich abgebildeten Mittelwerten als Loss-Regression und den hellgrau unterlegten Flächen, die das 95%-Konfidenzintervall demonstrieren. (B) beschreibt den Median (Whiskers = 1,5 x IQR) der  $pNN_9$  entsprechend der Aufnahmeperiode.

#### 4.4. Frequenzbasierte Herzratenvariabilität

Für den Vergleich der kurzfristigen Veränderung der HRV wurde die frequenzbasierte HRV-Analyse herangezogen. Die erfassten Werte der frequenzbasierten HRV verhielten sich zu allen Zeitpunkten unverändert im Vergleich zu den Basalmessungen. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen konnten in der Hell- ( $p=0,0193$ ) und Dunkelphase ( $p=0,0193$ ) der Latenzphase festgestellt werden. Die stimulierten Tiere hatten ein geringeres Verhältnis zwischen LF und HF.



**Abbildung 44:** Frequenzbasierte Herzratenvariabilität als Verhältnis von LF zu HF im Verlauf des elektrischen Post-SE-Modells. Dargestellt sind die Mediane (Whiskers = 1,5 x IQR) beider Versuchsgruppen zu den vier Messzeitpunkten. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet.

## 5. Korrelationsmatrix- und Hauptkomponentenanalyse

### 5.1. Korrelationsmatrixanalyse

Anhand einer Korrelationsmatrixanalyse und der errechneten Korrelationskoeffizienten können Korrelationen zwischen Parametern beschrieben werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für jede Versuchsreihe eine Korrelationsmatrixanalyse nach Spearman angefertigt und in den Abbildungen 46 (erste Versuchsreihe) und 47 (zweite Versuchsreihe) mit Hilfe von *heat maps* dargestellt. Die Werte der Koeffizienten liegen zwischen plus eins und minus eins. Die exakten Werte der Analysen sind im Anhang 5. Korrelationsmatrixanalysen in Tabelle 5.2 (erste Versuchsreihe) und Tabelle 5.3 (zweite Versuchsreihe) angegeben. Ein positiver Wert beschreibt eine positive Korrelation zwischen den Werten zweier Parametern. Ein negativer Wert hingegen impliziert ein konträres Verhalten, also eine negative Korrelation von Daten der ermittelten Parameter zueinander. Je weiter entfernt der Korrelationskoeffizient von null ist, desto ausgeprägter ist die Korrelation. In beiden Korrelationsmatrixanalysen sollen nur die signifikanten Korrelationen ( $p < 0,05$ ) genannt werden, die zusätzlich eine Korrelation von niedriger als -0,5 und höher als 0,5 aufweisen. Eine Erklärung der Abkürzungen ist im Anhang, Tabelle 5.1 zu finden.

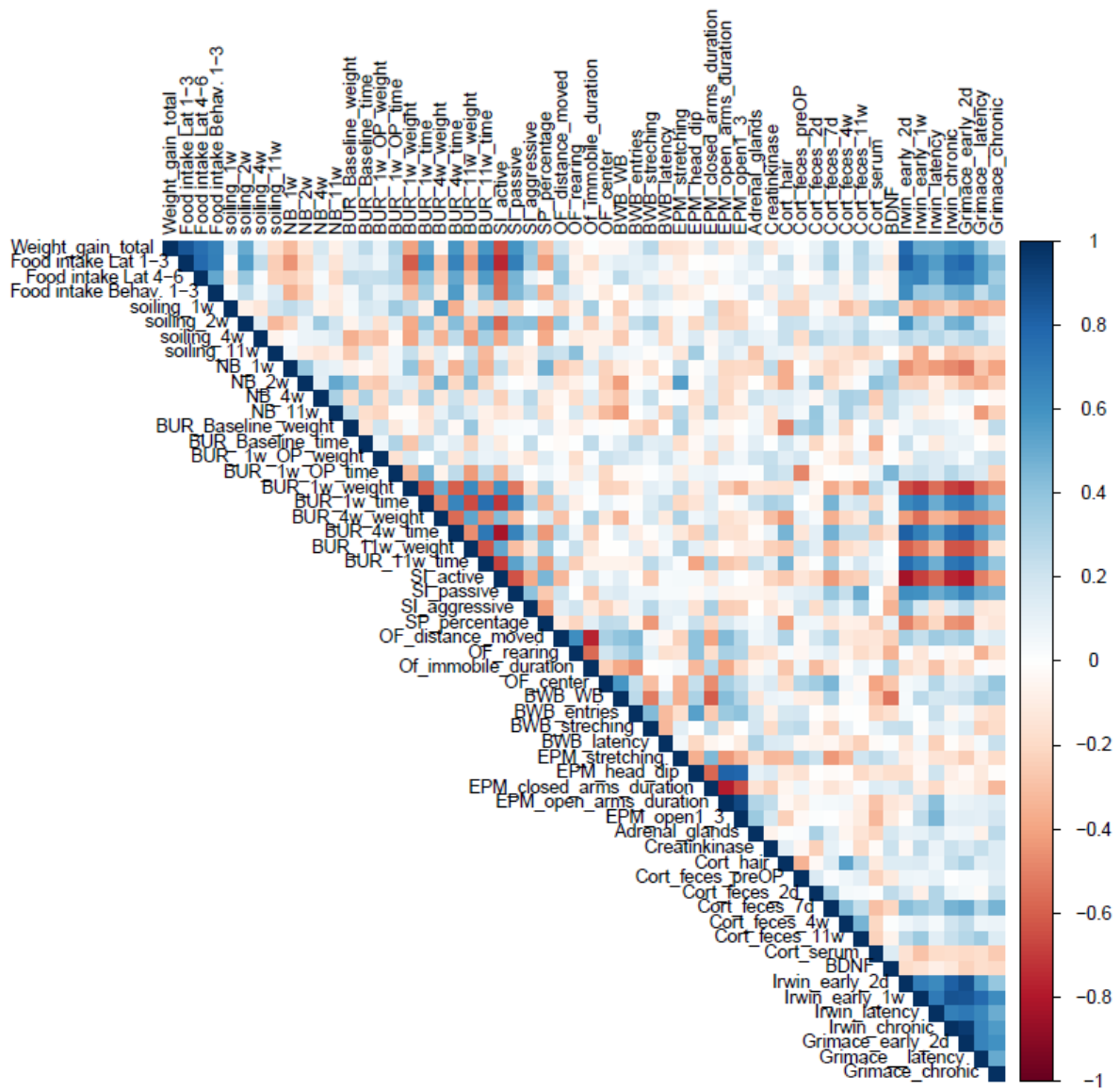
In der Kreuzkorrelationsanalyse der ersten Versuchsphase wurden alle erfassten Verhaltens- und biochemischen Daten in Bezug zueinander untersucht. In der zweiten Versuchsphase konnten zusätzlich zu den Verhaltens- und biochemischen Daten auch die Korrelationen der telemetrisch ermittelten Parameter untersucht werden. Die Daten der folgenden Parameter korrelieren sowohl in der ersten Versuchsreihe (hier VR1 abgekürzt) als auch in der zweiten Versuchsreihe (hier VR2 abgekürzt): Die totale Gewichtszunahme korreliert mit dem Futterverbrauch zu verschiedenen Zeitpunkten (VR1: +0,54 bis +0,76; VR2: +0,68 bis +0,85). Die Gewichtszunahme und der Futterverbrauch korrelieren beide weiterhin mit der Latenzzeit zum Graben in der Latenzphase (VR1: +0,6; VR2: +0,63), Zeit in aktiver sozialer Interaktion (VR1: -0,62, VR2: -0,78), dem Grimace-Scale in der Post-Insult-Phase (VR1: +0,61, VR2: +0,63) sowie Irwin-Score in der Post-Insult-Phase (VR1: +0,77, VR2: +0,66) und chronischen Phase (VR1: +0,57, VR2: +0,76). Die Latenzzeit des Grabverhaltens aller Zeitpunkte post-SE korreliert mit der Zeit in aktiver sozialer Interaktion (VR1: -0,69 bis -0,83, VR2: -0,79 bis -0,83). Außerdem korrelieren ab dem SE das Grabverhalten (Latenzzeit) überwiegend mit den Zeitpunkten der Irwin-Scores (VR1: +0,54 bis +0,82; VR2: +0,53 bis +0,86) und dem Grimace-Scale der Post-Insult- und Latenzphase (VR1: +0,52 bis +0,8; VR2: +0,67 bis +0,72 nur Post-Insult-Phase). Weiterhin korreliert auch die Zeit in sozialer Interaktion mit den Zeitpunkten der Irwin-Scores (VR1: -0,58 bis -0,84; VR2: -0,78 bis -0,87) und dem Grimace-Scale der

Post-Insult- und Latenzphase (VR1: -0,51 bis -0,79; VR2: -0,52 bis -0,8).

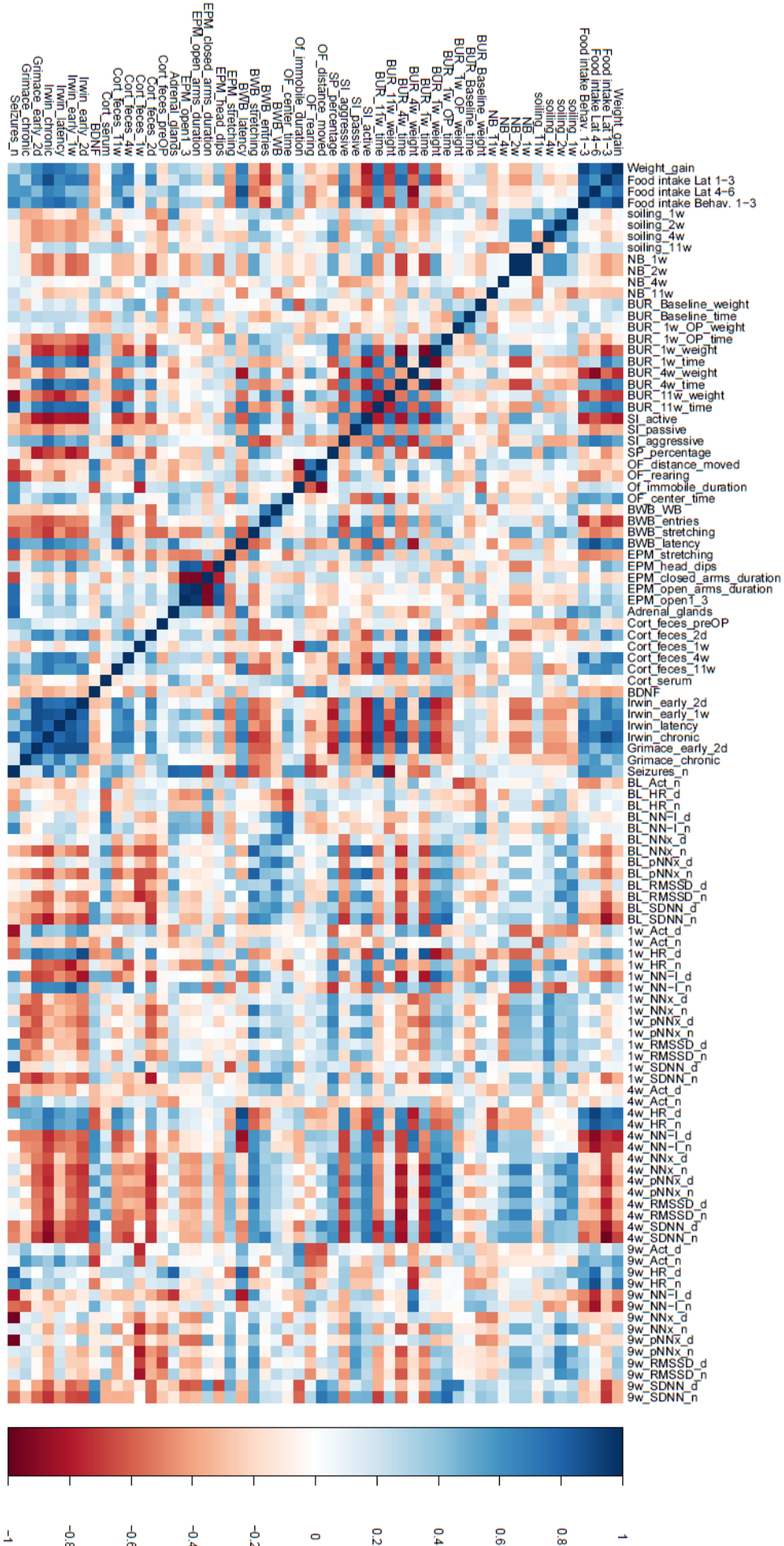
Folgende Korrelationen konnten nur in einer der beiden Versuchsreihen detektiert werden: Die Zeit in passiver Interaktion korreliert in der ersten Versuchsreihe mit der prozentualen Gewichtszunahme ab dem elektrischen Insult (+0,53) sowie mit der Latenzzeit zum Graben nach dem SE (+0,53 bis +0,63). Zu den oben genannten Korrelationen konnten in der zweiten Versuchsreihe zusätzliche Korrelationen zwischen den Parametern der Verhaltensuntersuchungen erfasst werden. Im Speziellen ist die Korrelation des Saccharin-Konsums mit einer Vielzahl an Parametern wie den Burrowing-Ergebnissen der Post-Insult-Phase (-0,62 und +0,64), dem Irwin-Score (-0,58 bis -0,82) und dem Grimace-Scale in der Post-Insult-Phase (-0,78) zu nennen. Zudem korreliert in der zweiten Versuchsreihe die Zeit in aggressiven Interaktionen mit dem Grabverhalten ab der Latenzphase (Latenzzeit: +0,63 bis +0,67; Kies: -0,67 bis -0,75). Des Weiteren korrelieren in der zweiten Versuchsreihe auch die signifikanten Parameter der Black-and-white-Box mit dem Irwin-Score (-0,5 bis -0,72), Grimace-Scale (-0,51 bis -0,61) und Gewichtszunahme (+0,66 bis +0,78). Bei den Tieren der ersten Versuchsreihe konnte bei den genannten Korrelationen nur eine Tendenz bestimmt werden.

Zusätzlich konnte in der zweiten Versuchsreihe bei den Ergebnissen des Burrowing-Tests in der Post-Insult- und der Latenzphase eine Korrelation mit den entsprechenden Parametern der HR (Kies: -0,84 und -0,79) und NNI (Kies: +0,78, +0,75) erfasst werden. Dabei korreliert sowohl in der Post-Insult-Phase als auch in der Latenzphase das Gewicht des entfernten Kieses negativ und die Latenzzeit positiv mit der HR. Des Weiteren konnten bei der Basalmessung der HRV-Parameter von  $NN_9$ ,  $pNN_9$ , RMSSD und SDNN Korrelationen mit Parametern ab dem elektrischen Insult erfasst werden. Dabei handelt es sich im Speziellen um die Korrelation des Verschmutzungsgrades (+0,53 bis +0,67) und der FCM-Konzentration in der Post-Insult-Phase (-0,64 bis -0,74) sowie einzelner Burrowing-Parameter verschiedener Phasen. Zusätzlich korrelieren die genannten HRV-Parameter in ihrer Dunkelphase auch mit einzelnen Parametern der sozialen Interaktion (Zeit in aktiver Interaktion: +0,66 bis +0,8) und der Black-and-white-Box der chronischen Phase (Stretching: +0,67 bis +0,81).

Auch Korrelationen zwischen der Anfallsaktivität und Daten der Post-Insult-Phase und der chronischen Phase konnte in beiden Versuchsreihen ermittelt werden. In der Post-Insult-Phase ist vor allem der Burrowing-Test (-0,52 bis -0,56), der Irwin-Score (+0,52 bis +0,64) und die Futteraufnahme (+0,56 bis +0,78) zu nennen. In der chronischen Phase konnte der Irwin-Score (+0,55 bis +0,78), aber auch vereinzelt Parameter des Elevated-Plus-Maze und des Open Field identifiziert werden. Der Saccharin-Konsum korrelierte bei keiner Versuchsreihe mit der Anfallsaktivität.



**Abbildung 45:** Korrelationsmatrixanalyse der ersten Versuchsreihe nach Spearman. Darstellung der Korrelationskoeffizienten zwischen Verhaltens- und biochemischen Parametern anhand einer *heat map*.



**Abbildung 46:** Korrelationsmatrixanalyse der zweiten Versuchsreihe nach Spearman. Darstellung der Korrelationskoeffizienten zwischen Verhaltens-, biochemischen und telemetrischen Parametern anhand einer *heat map*.

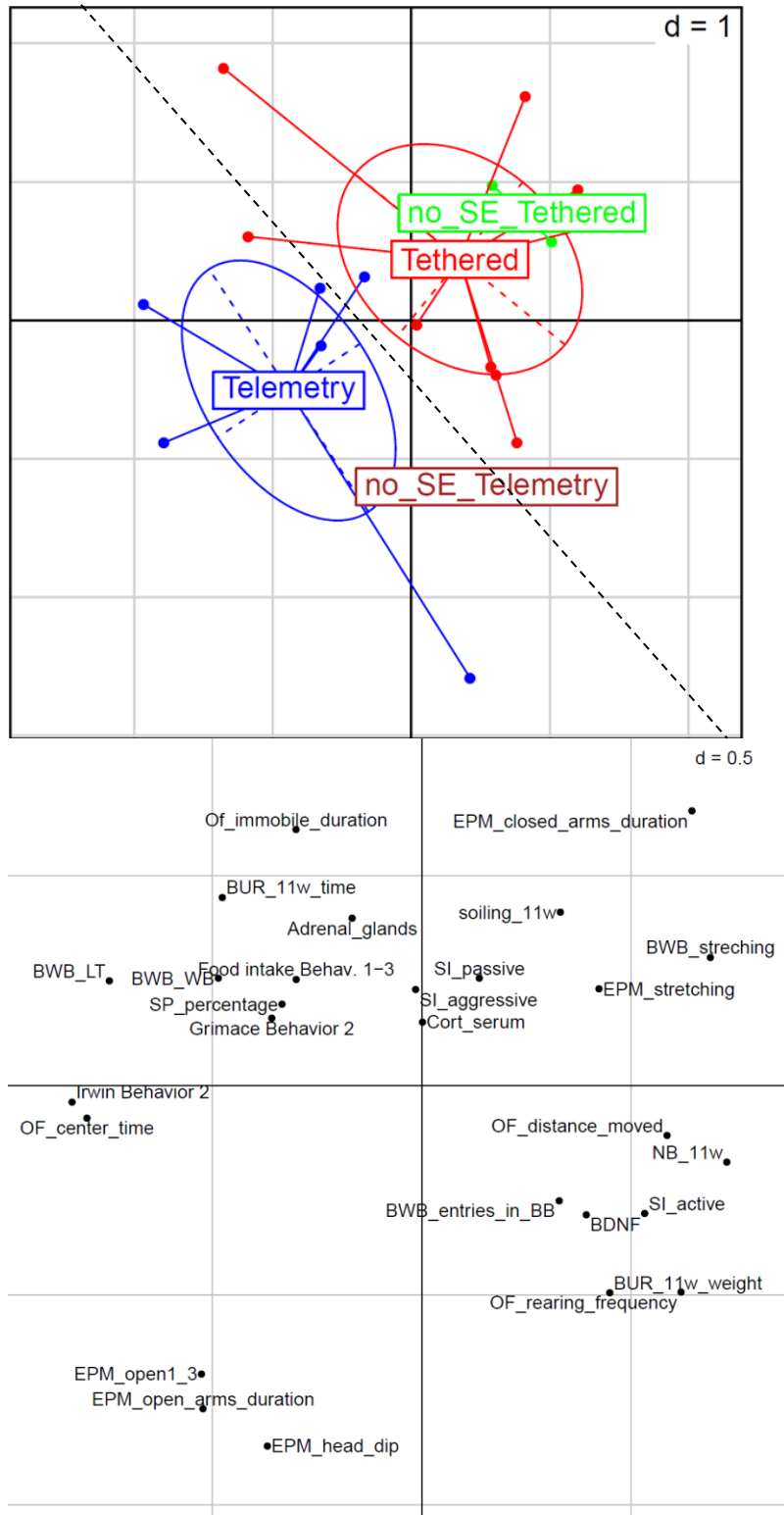
## 5.2. Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Eine PCA wird verwendet, um eine vergleichende Analyse von großen Datensätzen zu gewährleisten. Dabei werden die Datensätze auf wenige Variablen reduziert, die gleichzeitig eine möglichst große Varianz aller betrachteten Variablen darstellen sollen. Für die Erstellung der PCA in dieser Studie wurden die Datensätze beider epileptischer Gruppen der zwei Versuchsreihen ausschließlich nach dem zweiwöchigen EEG-Monitoring in der chronischen Phase verwendet (Abb. 48). Somit soll ein Vergleich der Belastung durch die telemetrische und die kabelbasierte EEG-Anfallsüberwachung anhand der Verhaltens- und biochemischen Parameter gewährleistet werden. Die verwendeten Parameter wurden in den neuen, dimensionslosen Hauptkomponenten (*principal components*, PC) eins und zwei zusammengefasst. In Kombination repräsentieren die PC1 und PC2 in dieser Analyse 41,44 % der Varianzen aller betrachteten Variablen (PC1: 24,80 %, PC2: 16,63 %). Die beiden epileptischen Gruppen teilen sich diagonal an der PC1 ( $F(3; 17)=3,91$ ;  $p=0,027$ ) und PC2 ( $F(3; 17)=3,366$ ;  $p=0,043$ ) auf und unterscheiden sich in der Darstellung signifikant voneinander. Die zehn Variablen, die den größten Einfluss auf die PC1 und PC2 haben, sind in Abbildung 49 aufgelistet. Auf die PC1 haben überwiegend verhaltensassoziierte Variablen Einfluss und keine biochemischen Parameter.

Da sich die zu untersuchenden Gruppen diagonal an der gestrichelten Linie über die PC1 und PC2 aufspalten, sollen die Parameter beider PC in Kombination beschrieben werden: Parameter, die einen maßgeblichen Einfluss auf beide PC haben, sind Parameter des Elevated-Plus-Maze, des Open Fields, der Black-and-white-Box und des Burrowing-Tests. Im Folgenden werden nur Parameter beschrieben, deren Einfluss auf die entsprechende PC größer 0,5 ist. Das Elevated-Plus-Maze stellt die meisten Parameter, die in der PC1 und PC2 dargestellt sind. Dabei sind die ersten vier einflussreichsten Variablen der PC2 zu nennen, die von dem Elevated-Plus-Maze gestellt werden: *head dips* (PC2: 0,859), Zeitdauer in den offenen Armen (PC2: 0,771; PC1: 0,522), Zeitdauer in den äußeren Dritteln der offenen Arme (PC2: 0,688; PC1: 0,526) und Zeit in den geschlossenen Armen (PC2: 0,655; PC1: 0,645). Bis auf die *head dips* sind die gleichen Parameter auch in der PC1 auffindbar. Das Open Field ist mit den Parametern Zeitdauer im Zentrum (PC1: 0,800), Rearing-Frequenz (PC1: 0,619), zurückgelegte Distanz (PC1: 0,585) und Zeitdauer in Immobilität (PC2: 0,610) ebenfalls auf der PC1 und PC2 vorzufinden. Die Black-and-white-Box wird mit der Latenzzeit für den ersten Übertritt in die schwarze Box (PC1: 0,746) und Stretching (PC1: 0,689) auf der PC1 abgebildet. Weiter repräsentierte Parameter sind der Irwin-Score (PC1: 0,835), das Nestbauverhalten (PC1: 0,728) und die Zeit



in aktiver sozialer Interaktion (PC1: 0,532).



**Abbildung 47:** Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Datensätze der epileptischen Tiere beider Versuchsreihen ausschließlich in der chronischen Phase. (A) Aufspaltung der epileptischen Gruppen anhand PC1 und PC2. Beide Gruppen sind signifikant zueinander. Jeder Punkt reflektiert den individuellen Datensatz eines Tieres. (B) Gewichtung der erfassten Parameter innerhalb der PC1 und PC2. Parameter, die am äußeren Rand der jeweiligen PC liegen, haben den größten Einfluss auf die entsprechende PC.

<b>Top 10 Parameter der PC 1</b>		
Parameter	PC 1 ↓	PC 2
Irwin Behavior	<b>0.8358554</b>	0.03931673
OF_center_time	<b>0.8000005</b>	0.07682096
BWB_LT	<b>0.7464104</b>	0.24946328
NB_11w	<b>0.7281720</b>	0.18256250
BWB_streching	<b>0.6892370</b>	0.30646649
EPM_closed_arms_duration	<b>0.6450863</b>	0.65501745
OF_rearing_frequency	<b>0.6191751</b>	0.49256212
OF_distance_moved	<b>0.5857125</b>	0.11924203
SI_active	<b>0.5322236</b>	0.30539345
EPM_open1_3	<b>0.5263760</b>	0.68806244
EPM_open_arms_duration	<b>0.5227335</b>	0.77139947
BWB_WB	<b>0.4862518</b>	0.25618847
BUR_11w_time	<b>0.4766258</b>	0.44959336
BUR_11w_weight	<b>0.4490956</b>	0.49446692
EPM_stretching	<b>0.4231935</b>	0.23068032
<b>Top 10 Parameter der PC 2</b>		
Parameter	PC 1	PC 2 ↓
EPM_head_dip	0.3692961	<b>0.8592327</b>
EPM_open_arms_duration	0.5227335	<b>0.7713995</b>
EPM_open1_3	0.5263760	<b>0.6880624</b>
EPM_closed_arms_duration	0.6450863	<b>0.6550174</b>
Of_immobile_duration	0.3005793	<b>0.6104832</b>
BUR_11w_weight	0.4490956	<b>0.4944669</b>
OF_rearing_frequency	0.6191751	<b>0.4925621</b>
BUR_11w_time	0.4766258	<b>0.4495934</b>
soiling_11w	0.3306151	<b>0.4134658</b>
Adrenal_glands	0.1662866	<b>0.3998193</b>
BDNF	0.3927536	<b>0.3077007</b>
BWB_streching	0.6892370	<b>0.3064665</b>
SI_active	0.5322236	<b>0.3053934</b>
BWB_entries_in_BB	0.3279928	<b>0.2743327</b>
BWB_WB	0.4862518	<b>0.2561885</b>

**Abbildung 48:** Top 10-Parameter der PC1 und PC2. Dargestellt ist die faktorielle Auflistung der einzelnen Parameter mit absteigendem Einfluss auf die PC1 und PC2



## VI. DISKUSSION

Zum aktuellen Zeitpunkt sind die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Epileptogenese, der pharmakoresistenten Epilepsie und der Komorbiditäten nicht vollständig verstanden. Damit der medizinische Fortschritt mittels der Entwicklung neuer Therapieansätze gewährleistet werden kann, sind Tierversuche in der Epilepsieforschung derzeit noch unabdingbar. Die Vertretbarkeit jedes einzelnen Tierversuchs wird im Rahmen des Tierversuchsantrages unter ethischen und wissenschaftlichen Aspekten geprüft. Dabei muss jede Manipulation an einem Versuchstier als eine potenzielle Belastung für das Tier betrachtet werden. Geplante Eingriffe sind zur Erteilung einer Durchführungsgenehmigung gemäß der EU-Richtlinie 2010/63 Anhang VIII in einen der Belastungsgrade „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“, „mittel“ oder „schwer“ einzustufen. In Anhang VIII lassen sich bereits allgemein gehaltene Vorschläge für die Belastungseinstufungen einzelner Eingriffe an Tieren finden. Neben dieser Empfehlung wird durch die EU-Richtlinie und deren deutsche Umsetzung in die Tierschutz-Versuchstierverordnung eine aktuelle, evidenzbasierte Belastungseinstufung von Tiermodellen gefordert. Im Rahmen der Forschergruppe (DFG - FOR 2591) sollen evidenzbasiert Vorschläge für die Belastungseinstufung verschiedener Tiermodelle entwickelt werden.

In der tierexperimentellen Forschung können epileptische Anfälle auch bei Tiermodellen anderer Krankheiten, in Zuchtlinien oder bei der toxikologischen Testung neuer Substanzen auftreten. Epileptische Anfälle können im Allgemeinen eine Belastung bei Mensch und Tier darstellen. Nagetiere verbergen potenziell ihre Schmerzen, Leiden und Schäden gegenüber ihrem Umfeld, wodurch eine objektive Belastungseinstufung erschwert werden kann. Daher ist eine umfassende Untersuchung von Verhaltens-, biochemischen und physiologischen Parametern notwendig, damit eine objektive Beurteilung der Belastung der Tiere möglich wird. Solch eine Beurteilung kann Wissenschaftlern und Behörden als Grundlage dafür dienen, bereits durch die Auswahl eines Tiermodells die Belastung der Versuchstiere zu minimieren. Damit zusätzlich die Bedingungen der Tiere innerhalb der verwendeten Tiermodelle weiterhin verbessert werden, sind fortlaufend *Refinement*-Maßnahmen zu entwickeln.

Im Hinblick auf das elektrische Post-Status-Epilepticus-Modell bei Ratten stellt die notwendige Implantation einer Tiefenstimulationselektrode, als versuchsbedingte Prozedur, einen Eingriff am Tier und damit eine Belastung dar. Als weitere Belastungen der Tiere in diesem Tiermodell sind der Eingriff des elektrischen Insultes und die daraus resultierenden Folgen zu betrachten. Der elektrische Insult und der folgende verlängerte SE dienen dabei als Induktion des chronisch verlaufenden Tiermodells. In dieser Arbeit soll im Einklang mit der aktuellen Gesetzeslage eine evidenzbasierte Belastungseinstufung des

elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells nach BRANDT et al. (2003) bei Ratten empfohlen werden. Die erfassten Parameter wurden vergleichend zwischen den Versuchsgruppen analysiert. Komplexe Zusammenhänge zwischen den Daten der einzelnen Parameter konnten durch Kreuzkorrelationsanalysen und eine Hauptkomponentenanalyse ermittelt werden. Zusätzlich wurde der Einsatz von Telemetrie-Transmittern während der EEG-Erfassung in der chronischen Phase als mögliche *Refinement*-Maßnahme geprüft.

## 1. Belastungseinstufung des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells

Ziel dieser Arbeit ist eine Empfehlung für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung des elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modells bei Ratten. Hierzu wurden Verhaltensuntersuchungen, biochemische und physiologische Parameter systematisch in zwei Versuchsreihen erfasst. In der ersten Versuchsreihe wurden elektrodenimplantierte Tiere, die mit einem elektrischen Insult stimuliert wurden, mit elektrodenimplantierten, jedoch nicht stimulierten Tieren (Sham) und naiven Tieren verglichen. In der zweiten Versuchsreihe wurden allen Tieren eine Elektrode sowie ein subkutaner Telemetrie-Transmitter implantiert, sodass zusätzlich die physiologischen Parameter erfasst werden konnten. Weiterführend erhielt eine Subgruppe der zweiten Versuchsreihe den elektrischen Insult und wurde mit nicht stimulierten Tieren (Sham) verglichen. Damit eine umfassende Belastungseinstufung vorgeschlagen werden kann, müssen Belastungsparameter identifiziert werden. Dafür werden erst die Einzelparameter evaluiert. Dabei ist sowohl die Belastung der Elektrodenimplantation als auch die Belastung innerhalb der experimentell bedingten Versuchsreihen ab dem elektrisch induzierten Status epilepticus zu untersuchen. Schließlich wird eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um die epileptischen Tiere beider Versuchsreihen, mit und ohne Telemetrie-Transmitter, übergreifend miteinander vergleichen zu können.

### 1.1. Kurz- und langfristige Belastung durch die Elektrodenimplantation

In dem elektrischen Post-SE-Modell nach BRANDT et al. (2003) stellt die Implantation einer Tiefenstimulationselektrode in die rechte BLA für die Ausführung des Modells einen unumgänglichen Eingriff dar. Daher ist die Berücksichtigung der kurz- und langfristigen Belastung der Elektrodenimplantation für eine Belastungseinstufung des gesamten Modells unabdingbar. Die Grundlage der Überprüfung der Belastung stellt die vergleichende Analyse der elektrodenimplantierten Tiere gegenüber den naiven Kontrolltieren der ersten Versuchsreihe dar. MÖLLER et al. (2018) aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten bereits

ausführlich die Belastung durch die Elektrodenimplantation in die rechte BLA und stufen diese als ‚gering‘ ein. Da es sich um das identische prä- bis postoperative Management handelt, werden im Folgenden nur abweichende Ergebnisse diskutiert.

Im Gegensatz zu MÖLLER et al. (2018) wurden in dieser Studie postoperative leicht erhöhte Werte im Irwin-Score und im Grimace-Scale erfasst. Es wäre möglich, dass die beiden erhöhten Parameter ein Anzeichen für postoperative Schmerzen oder Stress sind. Das Analgesiemanagement könnte daraufhin weitergehend überprüft werden. Dabei ist im Sinne des Tierwohls zwischen den Nebenwirkungen sowie dem Stress bei anwendbaren Analgetika gegenüber den möglichen transient geringgradigen Schmerzen und abzuwägen.

Als Langzeiteffekt der Elektrodenimplantation konnten im Gegensatz zu MÖLLER et al. (2018) im Rahmen dieser Arbeit keine Veränderungen des Sozialverhaltens festgestellt werden. MÖLLER et al. (2018) beobachteten eine gesteigerte Neugierde der elektrodenimplantierten Tiere an dem Implantat ihres Sozialpartners, die in einer gesteigerten aktiven sozialen Interaktionszeit resultierte. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Dies könnte an dem fortgeschrittenen Alter der Tiere sowie dem größeren zeitlichen Abstand zu der Elektrodenimplantation in dem vorliegenden Modell liegen. In dem zuvor in unserem Institut untersuchten Amygdala-Kindling-Modell wurden die Untersuchungen in einem Alter der Tiere von fünf Monaten und zwei Monate nach der Elektrodenimplantation durchgeführt (MÖLLER et al. 2018). Aufgrund des zeitintensiveren elektrischen Post-SE-Modells konnten die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erst fünf Monate nach der Elektrodenimplantation vorgenommen werden. Die Tiere hatten zu diesem Zeitpunkt ein Alter von acht Monaten erreicht. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung zu, dass die gesteigerte Neugierde gegenüber dem Implantat mit fortschreitender Zeit abnimmt und somit lediglich einen transienten Effekt darstellen könnte.

Im Rahmen der angstassoziierten Verhaltensuntersuchungen konnten von MÖLLER et al. (2018) und in der vorliegenden Studie ähnliche Ergebnisse detektiert werden. Die Tiere der vorliegenden Arbeit zeigten ein verstärktes angstassoziiertes Verhalten im Open-Field-Test. Die elektrodenimplantierten Tiere hielten sich im Vergleich zu den naiven Tieren reduziert im Zentrum und vermehrt im Wandbereich des Open Fields auf. Durch die gleichmäßige, geringe Ausleuchtung des Open Fields sollte primär die Erfassung der Lokomotion und nicht das Erfassen des angstassoziierten Verhaltens gewährleistet werden. Da die Orientierung von Nagetieren mehr über die sensiblen Vibrissen als durch die visuelle Wahrnehmung erfolgt, kann die erhöhte Thigmotaxis dennoch als Hinweis für ein vermehrt angstassoziiertes Verhalten der elektrodenimplantierten Tiere herangezogen werden. Weil diese Verhaltensänderung der elektrodenimplantierten Tiere weder in der

Black-and-white-Box noch im Elevated-Plus-Maze bestätigt werden konnte, ist die erhöhte Thigmotaxis im Open-Field-Test nur als ein Hinweis auf ein mögliches geringgradig angstassoziiertes Verhalten der elektrodenimplantierten Tiere in dieser Studie zu verstehen. Auch MÖLLER et al. stellten bei den elektrodenimplantierten Tieren ein geringgradig verstärktes angstassoziiertes Verhalten fest. Verhaltensänderungen konnten nur in der geringeren Aufenthaltsdauer der elektrodenimplantierten Tiere im äußeren Drittel der offenen Arme des Elevated-Plus-Maze detektiert werden. Durch die Elektrodenimplantation in die BLA ist in beiden Studien eine Läsion in dieser Hirnregion entstanden. Die BLA steuert die instinktive Angst- und Furchtreaktion (SAH 2017). Es ist möglich, dass die implantationsbedingten Läsionen zu einem dauerhaften geringgradig verstärkten angstassoziierten Verhalten führen. Für die Durchführung des elektrischen Post-SE-Modells wurde in verschiedenen Studien die Tiefenstimulationselektrode auch in andere Bereiche des limbischen Systems, wie den Hippocampus oder die linke BLA, implantiert (J. A. GORTER et al. 2016). Tiere, die über den Hippocampus stimuliert worden waren, zeigten ein ausgeprägtes aggressives Verhalten. Bei einer Stimulation der linken BLA entwickelten bisher weniger Tiere während der Stimulation einen SSSE. Um den möglichen Einfluss der Implantationen von Tiefenstimulationselektroden in verschiedene Gehirnregionen näher zu beleuchten, wären weiterführende Untersuchungen notwendig.

Abschließend kann, parallel zu MÖLLER et al. (2018) aus unserer Arbeitsgruppe, die kurz- und langfristige Belastungseinstufung der Elektrodenimplantation in die rechte BLA als geringgradig empfohlen werden. Dabei handelt es sich um eine Empfehlung, die eine Basis für die erforderliche laborspezifische Beurteilung liefert.

### **1.2. Belastungseinstufung ab dem Status epilepticus**

Die Belastungseinstufung der drei experimentell bedingten Versuchsphasen ab dem elektrisch induzierten Status epilepticus basiert auf dem Vergleich zwischen den elektrisch stimulierten Tieren beider Versuchsreihen und den zugehörigen Kontrollgruppen. Die Verhaltensänderungen und biochemischen Parameter wurden in beiden Versuchsreihen erfasst und untersucht. Damit die Auswirkungen des elektrischen SE-Modells umfassend untersuchen zu können, wurden auch die physiologischen Parameter ermittelt. Für diesen Zweck wurde den Tieren in einer weiteren Teilstudie, der zweiten Versuchsreihe, neben den Elektroden auch subkutan Telemetrie-Transmitter implantiert. Änderungen der physiologischen Parameter können demnach ausschließlich über die transmitterimplantierten epileptischen Tiere der zweiten Versuchsreihe beurteilt werden. Aufgrund des Einsatzes von Telemetrie-Transmittern in der zweiten Versuchsreihe können bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Versuchsreihe mögliche Nebeneffekte der Transmitterimplantation nicht ausgeschlossen werden.

## Verhaltensänderungen

Verhaltensänderungen geben Hinweise auf ein modifiziertes neuronales Netzwerk (CAMPOS et al. 2013). Bei dem elektrischen Post-SE-Modell handelt es sich um ein chronisches Modell der TLE, in dessen Rahmen die Tiere spontane Anfälle in der chronischen Phase ausbilden (BRANDT et al. 2003). Diese entstehen aufgrund eines veränderten neuronalen Netzwerks, das wiederum zu Verhaltensänderungen führen kann. Bei Patienten mit TLE sind die häufigsten Komorbiditäten psychiatrische Begleitscheinungen, Angstzustände und Depressionen (SEO et al. 2013). Es bestehen ausgeprägte Parallelen zwischen den Komorbiditäten von Patienten mit TLE und den beschriebenen Verhaltensänderungen bei Tiermodellen der TLE (MAZARATI et al. 2008; SEO et al. 2013). Im Folgenden sollen die Verhaltensänderungen in dem elektrischen Post-SE-Modell dargelegt werden.

### *Allgemeinbefinden*

Der verlängerte SE führt zu einer Temporallappenschädigung auf zellulärer und molekularer Ebene (KECK et al. 2018). Vor allem die Amygdala sowie der Hippocampus können durch Zelluntergang und eine veränderte synaptische Plastizität geschädigt werden (WALKER et al. 2016). Diese Vorgänge können weiterführend zu Verhaltensänderungen führen (BARNES u. PINEL 2001). In der Post-Insult-Phase, die direkt im Anschluss an den verlängerten SE einsetzt, spielen wahrscheinlich sowohl die körperliche Erholung als auch die neuropathologischen Prozesse eine maßgebliche Rolle für das Wohlbefinden der Tiere. Durch eine konsequente Erhebung des Irwin-Scores und des Gewichts können Rückschlüsse auf das körperliche Allgemeinbefinden und die Erholung nach dem SE gezogen werden.

Das Körpergewicht der stimulierten Tiere in den ersten beiden Tagen nach dem SE war signifikant vermindert. Aufgrund der Diazepam-Applikation, die einen kontrollierten Abbruch des SE zum Ziel hatte, waren die Tiere für weitere Stunden nach dem SE in einem sedativen Stadium. Während dieser Phase nahmen die Tiere keine Nahrung auf. Eine Abnahme des Körpergewichtes in den Folgetagen nach dem SE war daher zu erwarten. Ab dem dritten Tag nach dem SE konnte wieder eine Zunahme des Gewichtes der stimulierten Tiere erfasst werden.

Mit Hilfe des Irwin-Scores werden neben Veränderungen des Allgemeinbefindens auch Handling-assoziierte Verhaltensänderungen quantifiziert (GROTICKE et al. 2007). Im direkten Anschluss an den SE war der Irwin-Score der stimulierten Tiere im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen erhöht. In der Latenzphase war der erfasste Irwin-Score bei den stimulierten Tieren geringer als in der Post-Insult-Phase, erreichte jedoch nicht mehr den Wert der Kontrollgruppen. WALKER et al. (2016) stellten in dem vorlie-



genden Modell eine ausgeprägte Neurodegeneration und Neuroinflammation im Hippocampus in den Folgetagen nach dem SE fest. Auch im Rahmen der Epileptogenese ist stets von überrepräsentierten inflammationsassoziierten Prozessen bei den stimulierten Tieren auszugehen (WALKER et al. 2016). Es wäre möglich, dass die erfassten Handling-assoziierten Verhaltensänderungen des Irwin-Scores auf solche neuropathologischen Prozesse der stimulierten Tiere zurückzuführen sind.

In der chronischen Phase stieg der ermittelte Irwin-Score wieder an. Das Krankheitsbild manifestierte sich im Rahmen der Epileptogenese bis zum Ausbilden des ersten spontanen Anfalls. Das neuronale Netzwerk liegt zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung in der Regel mit degenerativen Veränderungen vor (WALKER et al. 2016). Bei Epilepsie handelt es sich in der Regel um eine progressive Erkrankung mit stetigen Veränderungen in dem neuronalen Netzwerk, die auch über den Zeitpunkt des ersten spontanen Anfalls hinausgehen (LOSCHER 2002). Demzufolge wäre es möglich, dass auch in der chronischen Phase die über den erhöhten Irwin-Score erfassten Handling-assoziierten Verhaltensänderungen auf neuropathologische Prozesse zurückzuführen sind.

An dieser Stelle soll eine mögliche zukünftige modellspezifische Optimierung diskutiert werden, die auf einer frühzeitigen Selektion derjenigen stimulierten Tiere basiert, die nachweislich keine generalisierten Anfälle entwickeln. Die Überprüfung der Anfallsaktivität während der chronischen Phase könnte dadurch vereinfacht werden. Bei dem erfassten Irwin-Score dieser Studie zeichnet sich bereits in der Post-Insult-Phase ein zügigeres Absinken des Scores bei denjenigen stimulierten Tieren ab, bei denen in der chronischen Phase nachweislich keine generalisierten Anfälle detektiert wurden. Zusätzlich liegt eine positive Korrelation zwischen dem Irwin-Score in der Post-Insult-Phase und der Anfallsaktivität in der chronischen Phase vor. Demnach könnten möglicherweise bereits anhand des Irwin-Scores nach dem SE Tiere frühzeitig identifiziert werden, die mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit keine generalisierten Anfälle in der chronischen Phase entwickeln werden. Kriterien für eine frühzeitige Selektion der stimulierten Tiere bedürfen weiterer Untersuchungen. Hierbei sollte auch, wie BRANDT et al. (2003) bereits bemerkten, der während des SE ausgebildete SSSE-Typ berücksichtigt werden. Zusätzlich könnte durch ein frühzeitiges Ausscheiden dieser Tiere aus dem Versuch deren Belastung frühzeitig reduziert werden. Bei den stimulierten Tieren ohne nachweisbaren generalisierte Anfälle wurde in dieser Studie auch ein erhöhter Irwin-Score im Vergleich zu den Kontrollgruppen in der chronischen Phase erfasst. Auch BRANDT (2002) et al. stellten bei solchen Tieren bereits pathologische Veränderungen im neuronalen Netzwerk fest. Aufgrund solcher Ergebnisse muss ohne weiterführende Untersuchungen vorerst auch bei diesen Tieren von einer Belastung während der Latenzphase und der chronischen Phase ausgegangen werden. Könnten diese Tiere nun vorzeitig aus einem Versuch genommen werden, würde

diese Maßnahme eine Verbesserung im Sinne des Tierwohls darstellen (*Refinement*).

### *Wohlfühlverhalten*

Damit das Wohlfühlverhalten von Labornagern näherungsweise beurteilt werden kann, werden das Wühlverhalten und das Nestbauverhalten als Parameter herangezogen (JIRKOF 2014). Ein reduziertes Nestbauverhalten kann dabei als Anzeichen für einen möglichen Distress gewertet werden (JIRKOF et al. 2013). Ein vermindertes Wühlverhalten kann als ein vermindertes Wohlfühlverhalten oder als Schmerzen interpretiert werden (JIRKOF 2014). In der vorliegenden Arbeit zeigten die stimulierten Tiere in beiden Versuchsreihen ausschließlich in der Post-Insult-Phase eine geringere Nestkomplexität gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen. Das Wühlverhalten der stimulierten Tiere war in allen Phasen nach dem SE reduziert. Das reduzierte Wühlverhalten in der Post-Insult-Phase könnte ein reduziertes Allgemeinbefinden oder Wohlfühlverhalten nach dem verlängerten SE reflektieren. In der chronischen Phase zeigten schließlich nur noch vereinzelte Tiere mit Epilepsie Interesse an den mit Kies befüllten Röhren. Diese Ergebnisse geben einen Hinweis auf ein vermindertes Wohlfühlverhalten der stimulierten Tiere in allen drei Phasen nach dem Insult.

Im Unterschied zu dem Wühlverhalten der stimulierten Tiere, das in allen drei Phasen nach dem SE reduziert war, konnte hingegen bei dem Nestbauverhalten nur eine Veränderung während der Post-Insult-Phase detektiert werden. Somit wäre es möglich, dass der Burrowing-Test gegenüber dem Nestbauverhalten als ein sensitiverer Parameter für das Wohlfühlverhalten herangezogen werden könnte.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis deutete sich bei MÖLLER et al. (2018) aus unserer Arbeitsgruppe in dem Amygdala-Kindling-Modell das Nestbauverhalten als ein sensitiverer Parameter an. Zudem korrelierte das Nestbauverhalten in dem Amygdala-Kindling-Modell auch mit vielen Verhaltensänderungen. Daraus ergab sich bei MÖLLER et al. (2018) die Annahme, dass das Nestbauverhalten auch in anderen Epilepsiemodellen als ein Kandidat für einen robusten Parameter zum Zweck einer Belastungseinschätzung herangezogen werden könnte. Diese Annahme kann aufgrund der Ergebnisse dieser Studie vorläufig nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem eine negative Korrelation zwischen der Anfallsaktivität und der Nestkomplexität in der chronischen Phase festgestellt werden. Es könnte demnach einen Zusammenhang zwischen einer geringeren Nestkomplexität und einer zunehmenden Anfallsaktivität geben. In der vorliegenden Arbeit wurde das Nestbauverhalten nur zu einem Zeitpunkt pro Tag evaluiert und stellt damit lediglich eine Momentaufnahme dar. Unklar bleibt deshalb, ob es einen echten Zusammenhang zwischen der niedrigen Nestkomplexität und den Anfällen der epileptischen Tiere gibt.

Intensivere Untersuchungen wären notwendig, um weiterführende Aussagen über das Nestbauverhalten von Tieren in diesem Epilepsiemodell treffen zu können.

#### *Depressions- und angstähnliches Verhalten*

Depressions- und angstähnliche Verhaltensänderungen werden beim Menschen als psychiatrische Komorbiditäten beschrieben (MAZARATI et al. 2008). Auch bei Tieren in Post-SE-Modellen wurden ähnliche Verhaltensänderungen beobachtet (MAZARATI et al. 2008). SEO et al. (2013) diskutierten, dass es durch die Änderungen von Neurotransmittern, deren Rezeptoren sowie eine Neurodegeneration zu einer Imbalance der neuronalen Aktivität kommen kann, was zu einem veränderten Verhalten führen könnte.

Der soziale Interaktionstest kann als ein sensibler Parameter zum Erfassen des Interesses an einem Partnertier herangezogen werden (TOTH u. NEUMANN 2013). Eine Veränderung im Interesse kann unter anderem bei anhedonie-, angst- und autismusähnlichem Verhalten auftreten (FILE et al. 2004; J. L. SILVERMAN et al. 2010). Eine Beeinträchtigung der Interaktion stellt dabei nur einen Teilaspekt dieser genannten Störungen dar. Demnach ist die isolierte Betrachtung dieses Tests nicht für die Diagnostik der genannten Störungen ausreichend und kann nur als ein Hinweis auf diese verstanden werden. Dennoch ist eine Einschränkung der sozialen Interaktion bei Ratten, als im Sozialverband lebenden Tieren, als belastend zu bewerten (BEERY u. KAUFER 2015). Auch bei dem Menschen hat die Qualität der sozialen Interaktion maßgeblichen Einfluss auf die Lebensqualität (SZEMERE u. JOKEIT 2015).

In der vorliegenden Studie präsentierten die epileptischen Tiere beider Versuchsreihen gegenüber den Kontrollgruppen ein reduziertes aktives Verhalten. Aggressives Verhalten gegenüber dem Sozialpartner konnte ausschließlich bei epileptischen Tieren beobachtet werden. Dieses Verhalten lässt sich als eine reduzierte Interaktion der epileptischen Tiere identifizieren und ist als eine möglicherweise belastende Verhaltensänderung zu werten. Die Untersuchung der sozialen Interaktion ist bei Epilepsiemodellen als einem neurologischen Krankheitsbild besonders interessant. Eine Voraussetzung für das Eingehen einer sozialen Interaktion ist die Fähigkeit, soziale Aufmerksamkeit zu realisieren und zu verarbeiten (SEO et al. 2013). Aufmerksames Verhalten wird durch die Aktivität des Neokortex beeinflusst, die bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen beeinträchtigt sein kann. Dies kann auch bei einer Epilepsieerkrankung der Fall sein. SZEMERE u. JOKEIT (2015) diskutierten bereits, dass ein signifikanter Anteil der Epilepsiepatienten Schwierigkeiten hat, soziale Interaktionen einzugehen. Das veränderte neuronale Netzwerk könnte zu einer Fehl- oder Überinterpretation von verschiedenen Situationen und sogar zu vermehrt aggressivem Verhalten führen.

Weiterführend sollen das angstassoziierte und das anhedonische Verhalten sowie die

lokomotorische Aktivität in der vorliegenden Studie bewertet werden. Damit die Ergebnisse dieser Verhaltensuntersuchungen nicht falsch positiv interpretiert werden, soll zuvor die lokomotorische Aktivität im Rahmen des Open-Field-Tests evaluiert werden. Die erfassten Verhaltensänderungen der epileptischen Gruppen beider Versuchsreihen sollen nacheinander beurteilt werden. Die diskutierten Untersuchungen fanden in beiden Versuchsreihen im Anschluss an die zweiwöchige EEG-Anfallsüberwachung statt, die in beiden Versuchsreihen unterschiedlich durchgeführt werden konnte. Die EEG-Anfallsüberwachung der ersten Versuchsreihe wurde mit der herkömmlichen Kabelableitung in Glasaquarien durchgeführt. Die Anfallsaktivität der Tiere der zweiten Versuchsreihe konnte aufgrund der implantierten Telemetrie-Transmitter, die für die Erfassung der physiologischen Daten genutzt wurden, frei beweglich im Heimkäfig detektiert werden.

Die epileptischen Tiere der ersten Versuchsreihe hatten mehr Distanz im Open Field zurückgelegt, mit weniger immobilen Frequenzen im Vergleich zu den Tieren der entsprechenden Sham-Kontrollgruppe. Gleichzeitig verbrachten die epileptischen Tiere auch weniger Zeit im Zentrum des Elevated-Plus-Maze. Das Zentrum des Elevated-Plus-Maze stellt den Übertritt zwischen dem explorativen und dem geschützten Bereich dar. Eine verringerte Aufenthaltsdauer in diesem Kompartiment kann damit nicht eindeutig einem der beiden Bereiche zugewiesen werden und kann entsprechend den Ergebnissen des Open-Field-Tests als eine erhöhte Lokomotion der epileptischen Tiere der ersten Versuchsreihe bewertet werden.

In der Black-and-white-Box konnte keine Veränderung im angstassoziierten Verhalten der epileptischen Tiere festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse konnten Anzeichen einer Hyperlokomotion bei den epileptischen Tieren der ersten Versuchsreihe festgestellt werden.

Das Verhalten der epileptischen Tiere der zweiten Versuchsreihe wurde ebenfalls im Anschluss an die zweiwöchige EEG-Anfallsüberwachung durchgeführt. Diese konnte mittels der implantierten Telemetrie-Transmitter ohne den fixierenden Charakter eines Kabels, frei beweglich im Heimkäfig stattfinden. Im Open-Field-Test konnte keine Veränderung bezüglich der Lokomotion beobachtet werden. Jedoch zeigten die epileptischen Tiere dieser Versuchsreihe ebenfalls eine erniedrigte Aufenthaltsdauer im Zentrum des Elevated-Plus-Maze. Dies könnte als ein Hinweis für eine geringgradige Hyperlokomotion verstanden werden. Die Verminderten Stretching-Positionen im Rahmen der Black-and-white-Box und der reduzierte Wechsel zwischen der weißen und schwarzen Box sollten daher nach CAMPOS et al. (2013) vorsichtig betrachtet werden. Die Wissenschaftler diskutierten, dass eine erhöhte lokomotorische Aktivität fälschlicherweise als eine reduzierte Risikoabschätzung interpretiert werden könnte. Jedoch konnte weder über den Open-

Field-Test, noch über das Heimkäfigverhalten eine eindeutige Hyperlokomotion der epileptischen Tiere dieser Versuchsreihe evaluiert werden. Zudem zeigten die epileptischen Tiere durch die reduzierte Aufenthaltsdauer in dem Wandbereich und die erhöhte Aufenthaltsdauer in dem mittleren Bereich des Open Fields eine geringe Orientierung mit den Vibrissen. Auch dieses Verhalten könnte als eine mögliche reduzierte Risikoabschätzung verstanden werden. Die Ergebnisse geben demnach Hinweise auf eine reduzierte Risikoabschätzung und möglicherweise Anzeichen einer geringgradigen Hyperlokomotion der epileptischen Tiere der zweiten Versuchsreihe.

MAHAR et al. (2014) erläuterten, dass neurodegenerative Prozesse zu chronischem Stress führen können, der langfristig depressionsähnliche und somit anhedonische Verhaltensweisen hervorrufen kann (HOOPER et al. 2018). Ein reduzierter Konsum von Saccharin kann als ein anhedonie-assoziiertes Verhalten interpretiert werden (KLEIN et al. 2015). Der in dieser Studie erfasste reduzierte Konsum von Saccharin der epileptischen Tiere beider Versuchsreihen kann dementsprechend als ein anhedonie-assoziiertes Verhalten gedeutet werden. Dabei handelt es sich um eine Annahme des Gefühlszustandes, der immer nur näherungsweise interpretiert werden kann. Weiterführend wäre eine Durchführung des Saccharin-Präferenz-Tests in den anderen experimentell bedingten Versuchsphasen interessant gewesen. Dadurch hätte eine differenzierte Aussage über ein möglicherweise verändertes Verhalten in der Post-Insult-Phase und der Latenzphase getroffen werden können.

Zusammenfassend können folgende Annahmen in Bezug auf die Verhaltensänderungen der stimulierten Tiere festgehalten werden: In der Post-Insult-Phase gibt es Anzeichen auf eine transiente körperliche Belastung der Tiere. In allen drei Phasen nach der Stimulation deutete sich ein reduziertes Wohlfühlverhalten der Tiere an. Zusätzlich können die Verhaltensänderungen in der chronischen Phase Hinweise auf eine geringgradige Hyperlokomotion, ein anhedonie-assoziiertes Verhalten sowie eine reduzierte soziale Interaktion bei den Tieren mit Epilepsie geben. Schließlich ergaben die Verhaltensuntersuchungen der transmitterabgeleiteten epileptischen Tiere der zweiten Versuchsreihe zusätzlich Anzeichen für eine reduzierte Risikoabschätzung.

### **Biochemische Parameter**

Pathologische Anpassungsreaktionen auf psychischen und physischen Stress beeinflussen die Homöostase des Organismus und können zu einer Veränderung von biochemischen und physiologischen Parametern führen (SELYE 1936a). Zur Erfassung möglicher pathologischer Vorgänge wurden im Verlauf der Studie bekannte Stressmarker untersucht. Eine invasive Probennahme wurde dabei während des Versuches vermieden, damit die Induktion von iatrogenem Stress ausblieb (THANOS et al. 2009). Daher muss-

ten die Analysen von biochemischen Parametern in der Post-Insult-Phase sowie der Latenzphase auf die Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten reduziert werden. Parameter, die über das Serum oder invasive Eingriffe erfasst werden, konnten folglich nur einmalig während der chronischen Phase evaluiert werden.

### *BDNF*

Laut DEVIN K. BINDER u. SCHARFMAN (2009) schützt der Wachstumsfaktor BDNF bei Mensch und Tier unter anderem die existierenden Nervenzellen und beeinflusst positiv die Neurogenese. Eine erhöhte Konzentration von BDNF fördert die Bildung von neuen neuronalen Bahnen und damit die synaptische Plastizität (MAHAR et al. 2014). Mit einer verminderten Konzentration des Wachstumsfaktors in Sprague-Dawley-Ratten gelang es C. BECKER et al. (2015), die Tiere zu differenzieren, die eine hohe Anfälligkeit für depressionsähnliches Verhalten aufwiesen. Des Weiteren kann Stress zu einer reduzierten Serumkonzentration von BDNF führen, weshalb BDNF auch als Stressmarker diskutiert wird (VASCONCELOS et al. 2015). In dieser Arbeit konnte bei den epileptischen Tieren beider Versuchsreihen keine Veränderung der BDNF-Konzentration ermittelt werden. Damit kann in dieser Arbeit anhand von BDNF kein chronisch erhöhtes Stressniveau der Tiere detektiert werden. In weiteren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten DI LIBERTO et al. (2018) hingegen einen signifikant erniedrigten BDNF-Serumwert bei epileptischen Tieren im Lithium-Pilocarpin-Modell feststellen. Dementsprechend wäre es interessant zu untersuchen, ob sich BDNF als möglicher Parameter für die Belastungseinschätzung von Epilepsiemodellen eignet. Dies sollte bei zukünftigen Analysen weiter untersucht werden.

### *Sexualzyklus*

Chronischer Stress und eine damit einhergehende langfristige Aktivierung der HPA-Achse können bei Ratten eine Infertilität zur Folge haben (KIRBY et al. 2009). Die Auswertung des Zyklusstandes für jedes Tier in der chronischen Phase basiert auf einer Vaginalzytologie, wie sie von GOLDMAN et al. (2007) bereits beschrieben wurde. Die invasive Probennahme wurde bei beiden Versuchsreihen auf den letzten Zeitpunkt beschränkt und stellt damit eine Momentaufnahme dar. Es konnten mehr epileptische Tiere dem Diöstrus zugeordnet werden. Es ist zu beachten, dass bei der Auswertung der Vaginalzytologie nicht zwischen allen vier Zyklusphasen unterschieden werden konnte. Aufgrund des von GOLDMAN et al. (2007) beschriebenen fließenden Übergangs zwischen den Zyklusständen konnten die Tiere nur sicher dem Östrus oder dem Diöstrus zugeordnet werden. Da dieses Ergebnis eine Momentaufnahme darstellt, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei den Tieren mit Epilepsie um einen veränderten oder einen inaktiven Sexu-

alzyklus handelt. Für eine genauere Beurteilung wäre eine regelmäßige Überprüfung des Sexualzyklus notwendig gewesen. Diese Probennahme konnte allerdings nicht mit der Zielrichtung dieser Arbeit in Einklang gebracht werden. Perspektivisch wäre es von Interesse, eine regelmäßige Erfassung des Zyklusstandes zu ermöglichen, zum Beispiel mit Hilfe eines von S. D. RAMOS et al. (2001) empfohlenen Ohm-Meters.

### *Corticosteron*

KIRBY et al. (2009) diskutierten weiterhin einen engen Zusammenhang zwischen dem Zyklusstand von Ratten und der Konzentration von Corticosteron. Mit Hilfe der Konzentration von Corticosteron kann die Aktivierung der HPA-Achse und somit das Stressniveau nachvollzogen werden (SCORRANO et al. 2015). Dabei kann die Konzentration von Corticosteron und dessen Metaboliten über Exkrete, Blutplasma oder Haare ermittelt werden. Die Ergebnisse reflektieren jedoch unterschiedlich sensitiv einen akuten bis chronischen Stress (MOSTL u. PALME 2002). Mittels einer hohen Serumkonzentration kann eine akute Stressreaktion erfasst werden (SCORRANO et al. 2015). Anhand der Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten (FCM) lässt sich der akute bis mittelfristige Corticosteron-Spiegel erheben (THANOS et al. 2009). Haarproben hingegen reflektieren die langfristige Konzentration von Corticosteron und können daher für die Ermittlung von chronischem Stress herangezogen werden (KIRSCHBAUM et al. 2009).

Eine veränderte Corticosteron-Konzentration konnte weder über die Serum- noch die Haaranalysen bei den Tieren mit Epilepsie detektiert werden. In den Kotproben wiederum ließ sich in der Post-Insult-Phase eine Erhöhung der FCM feststellen. Bei den stimulierten Tieren der ersten Versuchsreihe konnte sogar noch eine Woche nach dem SE ein signifikant erhöhter FCM-Wert erfasst werden. O'TOOLE et al. (2014) diskutierten diesbezüglich bereits, dass epileptische Anfälle auch eine direkte Aktivierung der HPA-Achse bedingen können. Somit können die erhöhten FCM-Werte nicht eindeutig als Stress-assoziierte Veränderung interpretiert werden.

Die transmitterimplantierten epileptischen Tiere der zweiten Versuchsreihe zeigten zwei Tage nach dem SE aufgrund der hohen Streuung innerhalb der Gruppe lediglich einen Trend ( $p < 0,1$ ) erhöhter FCM-Werte. Diese Streuung könnte auf eine zu geringe Gruppengröße für die FCM-Analyse in der zweiten Versuchsreihe zurückzuführen sein. Aufgrund der kostenintensiven Telemetrie-Transmitter war die Gruppengröße limitiert. Dennoch konnte eine signifikant erhöhte Konzentration in der Latenzphase sowie der chronischen Phase gemessen werden. Diese Erhöhung der FCM kann auch hier nicht zwangsläufig auf eine erhöhte Stressbelastung zurückgeführt werden, sondern könnte auch in dieser Phase eine Konsequenz der Anfallsaktivität der Tiere mit Epilepsie sein (O'TOOLE et al. 2014). Jedoch korrelieren die Ergebnisse der Corticosteron-Werte in der

vorliegenden Arbeit nicht mit der Anfallsaktivität, im Gegensatz zu HOOPER et al. (2018) im Pilocarpin-Modell bei Mäusen die eine Korrelation feststellen konnten.

In der vorliegenden Arbeit konnten allerdings Korrelationen der FCM-Werte mit den Daten anderer Parameter festgestellt werden: Die FCM-Analysen der frühen Post-Insult-, der Latenz- und der chronischen Phase korrelieren in allen Phasen mit dem Wühlverhalten und dem Irwin-Score. Weiterhin korrelieren die FCM-Analysen mit der veränderten HR in der Latenzphase und mit der sozialen Interaktion während der chronischen Phase. Diese Korrelationen bestehen zwischen Parametern, die genutzt werden können, um Stress bei Nagetieren zu detektieren. Diese Ergebnisse könnten daher als Anzeichen gewertet werden, dass die erhöhten FCM-Werte in der vorliegenden Studie nicht ausschließlich auf die Anfälle zurückzuführen sein könnten, sondern auch die kontinuierliche Belastung des Modells reflektieren könnten.

Zusammenfassend können die erhöhten FCM-Werte in der vorliegenden Studie nicht zweifelsfrei als Anzeichen eines erhöhten Stresses der epileptischen Tiere interpretiert werden. Da in der vorliegenden Studie ausschließlich Veränderungen der Corticosteron-Konzentration in den Analysen der FCM vorzufinden waren, scheint diese Analysemethode die Corticosteron-Änderungen sensitiver zu reflektieren als die Analysen der Haar- und Serumproben.

### **Physiologische Parameter**

Ein weiterer Aspekt, der betrachtet werden soll, betrifft die modellspezifischen Auswirkungen auf das autonome Nervensystem. Im Speziellen wird eine Beeinträchtigung des circadianen Rhythmus anhand der Aktivität und der Herzratenvariabilität in den verschiedenen Phasen des Modells untersucht. Die Basis für die Analyse bieten die telemetrisch erfassten Daten der Tiere der zweiten Versuchsreihe. VADNIE u. MCCLUNG (2017) zeigten, dass sich der circadiane Rhythmus sowohl bei tages- als auch bei nachtaktiven Tieren physiologisch an die Hell- und Dunkelphase anpassen kann. Durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel eine verlängerte Lichtexposition sowie durch eine dauerhafte Stressbelastung oder Depressionen kann der circadiane Rhythmus verschoben werden oder sogar abflachen (VADNIE u. MCCLUNG 2017). Bei den Tieren der zweiten Versuchsreihe wurden mittels telemetrischer Aufzeichnungen das EKG und die Aktivität der Tiere erfasst. Mit Hilfe des EKG konnten die physiologischen Parameter der HR und HRV analysiert werden. Veränderte Parameter der HRV werden als Marker für Stress diskutiert (PARK et al. 2017). BAYSAL-KIRAC et al. (2017) erfassten bereits erniedrigte HRV-Parameter bei Patienten mit Epilepsie.



### *Post-Insult-Phase*

In der Post-Insult-Phase zeigten die stimulierten Tiere in der Hellphase ein gestörtes Ruheverhalten. UNTERBERGER et al. (2015) berichteten analog dazu, dass es bei Patienten mit Epilepsie zu einer akuten Störung des Schlafzyklus infolge eines epileptischen Anfalls kommen kann. Die genauen Einflüsse des gestörten Schlafzyklus beim Menschen sind dabei noch nicht eindeutig untersucht. Eine chronische Beeinträchtigung des Schlafzyklus aufgrund einer Epilepsieerkrankung konnten UNTERBERGER et al. (2015) jedoch nicht feststellen.

In der vorliegenden Studie ist neben dem Anstieg der Aktivität und HR in der Hellphase auch in der Dunkelphase eine verminderte HR zu erkennen. Dadurch ergibt sich im Tagesverlauf eine Reduktion der Amplitude dieser Parameter. Der circadiane Rhythmus der stimulierten Tiere kann somit als reduziert beschrieben werden. Diesbezüglich zeigten CESAROVIC et al. (2011), dass sich bei Mäusen, die chronischem Stress ausgesetzt sind, die HR und Aktivität jeweils zwischen der Hell- und Dunkelphase angleichen können. Der reduzierte circadiane Rhythmus und die gestörte Ruhephase der stimulierten Tiere könnten folglich als ein Hinweis auf einen anhaltenden Stress verstanden werden, der durch den verlängerten SE ausgelöst wurde oder eine direkte Folge der Epilepsie darstellt. Es konnte keine Änderung in der frequenzbasierten HRV-Analyse festgestellt und dadurch keine Verschiebung der sympathisch-vagalen Balance nachgewiesen werden.

### *Latenzphase*

In der Latenzphase konnte bei den stimulierten Tieren sowohl in der Hell- als auch in der Dunkelphase eine erhöhte HR ermittelt werden. Die erfassten Veränderungen der HR bestätigen die Analysen von BREWSTER et al. (2016). Die Wissenschaftler konnten zwei Wochen nach einem verlängerten SE bei Sprague-Dawley-Ratten eine erhöhte HR messen (BREWSTER et al. 2016). Sie erklärten sich dieses Ergebnis mit molekularen Veränderungen des Myokards und einer Aktivierung des ANS als Folge des SE. Dadurch könnte es langfristig zu einer modifizierten kardialen Erregbarkeit mit verstärkter Aktivierung des Sympathikus kommen (BREWSTER et al. 2016). Zudem ist in dieser Studie die frequenzbasierte HRV bei den stimulierten Tieren in der Hell- und Dunkelphase im Vergleich zu den Sham-Tieren zugunsten des hohen Frequenzbereiches (HF) verschoben. Der HF wird überwiegend von der Aktivität des Parasympathikus beeinflusst (GEISLER et al. 2013). Werden die hier vorliegenden Ergebnisse der HR und frequenzbasierten HRV im Kontext gesehen, so gibt es Anzeichen für eine veränderte Aktivierung des ANS und eine gesteigerte kardiale Erregbarkeit.

Zusätzlich konnte eine erhöhte Aktivität in der Dunkelphase bei den Tieren mit Epilepsie im Vergleich zu der Sham-Gruppe in der Latenzphase nachgewiesen werden.

SULEYMANOVA et al. (2016) stellten eine Korrelation zwischen einer Hyperlokomotion epileptischer Tiere in dem Pilocarpin-Modell mit einer Neurodegeneration der Amygdala fest. Auch in dem elektrischen Post-SE-Modell sind neurodegenerative Vorgänge in der Amygdala während der Latenzphase bekannt (WALKER et al. 2016). Die erfasste Hyperlokomotion könnte möglicherweise ebenfalls auf den neurodegenerativen Prozessen und der Manifestation der Epilepsieerkrankung basieren. Dies würde auch die Hyperlokomotion in der chronischen Phase während der Verhaltensuntersuchungen erklären, da es sich bei solchen neurodegenerativen Prozessen um dauerhafte Veränderungen handelt.

Eine Veränderung des circadianen Rhythmus der stimulierten Tiere gegenüber den Kontrolltieren kann nicht detektiert werden. Folglich handelt es sich bei dem reduzierten circadianen Rhythmus in der Post-Insult-Phase nur um eine transiente Veränderung.

### *Chronische Phase*

In der chronischen Phase waren keine Veränderungen in der HR, der HRV oder der Aktivität bei den Tieren mit Epilepsie zu erfassen. Daher kann eine langfristige Änderung aller physiologischen Parameter ausgeschlossen werden. Die Änderungen der physiologischen Parameter während der vorangegangenen Phasen stellen demnach transiente Effekte dar.

Zusammenfassend gibt es in der Post-Insult-Phase Hinweise auf eine gestörte Ruhephase und einen reduzierten circadianen Rhythmus der stimulierten Tiere. Mittelfristige Veränderungen der HRV während der Latenzphase deuten auf eine veränderte Aktivierung des ANS hin. Abschließend sind in der chronischen Phase keine Veränderungen der physiologischen Parameter mehr vorzufinden. Folglich können die Veränderungen der physiologischen Parameter nach dem SE nur als transiente Effekte beschrieben werden.

### **Auswertung der Korrelationsmatrixanalysen**

Weiterführend sollen im Rahmen dieser Arbeit geeignete Parameter für die Routineüberwachung im Rahmen des elektrischen Post-SE-Modells bei Ratten empfohlen werden. Hierfür werden die gesamten Datensätze der einzelnen Versuchsreihen mit Hilfe jeweils einer Korrelationsmatrixanalyse in Bezug zueinander betrachtet. Auch die Daten der stimulierten Tiere, bei denen kein epileptischer Anfall in der chronischen Phase nachgewiesen werden konnte, wurden in die Analyse integriert. Dadurch konnten Parameter detektiert werden, deren Ergebnisse mit der Anfallsaktivität korreliert.

In beiden Versuchsreihen korrelieren die Ergebnisse des Burrowing-Tests und des Saccharin-Präferenz-Tests mit einer Vielzahl von veränderten Daten wie dem Nestbauverhalten, der sozialen Interaktion, dem Irwin-Score, dem Grimace-Scale sowie

der HR und HRV. Daher könnten beide Tests als kostengünstige und einfach durchführbare Methoden herangezogen werden, die eine Vielzahl an veränderten Parametern widerspiegeln. Im Gegensatz zu dem Wühlverhalten korreliert der Saccharin-Konsum bei keiner Versuchsreihe mit der Anfallsaktivität. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass über den Saccharin-Konsum eine generelle Belastung der Tiere in dem Modell erfasst werden kann und nicht ausschließlich anfallsassoziierte Veränderungen darstellt. MÖLLER et al. (2018) aus unserer Arbeitsgruppe stellten in dem Amygdala-Kindling-Modell eine hohe Anzahl an Korrelationen bei den Ergebnissen des Elevated-Plus-Maze und des Heimkäfigverhaltens fest. Die Daten dieser Tests zeigen in der vorliegenden Studie nur wenige Korrelationen mit anderen Ergebnissen.

Abschließend können sowohl der Burrowing-Test als auch der Saccharin-Präferenz-Test als Kandidaten für Parameter in der Routineüberwachung vorgeschlagen werden. Dabei handelt es sich bei beiden Tests um kostengünstige und einfach durchführbare Untersuchungen, die mit einer Vielzahl an Daten korrelieren.

## 2. Einsatz von Telemetrie-Transmittern und deren Einflüsse

Radiotelemetrie-Transmitter finden in der Versuchstierkunde immer häufiger Anwendung (CESAROVIC et al. 2011). Die Verwendung wird speziell in Projekten mit langfristigen Aufzeichnungen als eine mögliche *Refinement*-Maßnahme diskutiert (LIDSTER et al. 2016). Durch die zusätzliche Implantation eines Telemetrie-Transmitters kann es zu Veränderungen in der Belastung der Tiere kommen. LEON et al. (2004) diskutierten die Implantation des Transmitters als einen invasiven und somit belastenden Eingriff für die Tiere und somit als Nachteil. Auch verwiesen die Wissenschaftler auf das ungünstige Verhältnis zwischen dem Gewicht und Volumen des Implantats und dem Körpergewicht kleiner Nagetiere. BAUMANS et al. (2001) untersuchten eine Änderung in der Fortbewegung aufgrund einer intraperitonealen Transmitter-Implantation bei Mäusen und konnten eine kurzfristig reduzierte Lokomotion feststellen, die nach zweiwöchiger Erholungsphase nicht mehr vorzufinden war.

Es soll nachfolgend eine Einschätzung einer möglichen modellspezifischen *Refinement*-Maßnahme durch die Verwendung von Telemetrie-Transmittern diskutiert werden. Dafür wurden beide Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit, einmal mit und einmal ohne Telemetrie-Transmitter, vergleichend analysiert. Zum einen werden die Auswirkungen der zusätzlichen Implantation eines Telemetrie-Transmitters anhand der nicht stimulierten Tiere dargelegt. Zum anderen wird der modellspezifische Effekt mittels der Tiere mit Epilepsie nach der EEG-Anfallsüberwachung diskutiert. Dabei soll speziell der Einfluss der telemetrischen gegenüber der kabelgebundenen EEG-Anfallsüberwachung in der chroni-

schen Phase untersucht werden. Es ist zu beachten, dass die nachfolgenden Untersuchungen der beiden Versuchsreihen nicht in einem Studienzeitraum stattfanden. Ein Gruppeneffekt, und die damit verbundene erschwerte Detektion von Unterschieden in der Belastung, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

#### *Folgen und Einflüsse der Implantation von Telemetrie-Transmittern*

Um eine mögliche zusätzliche Belastung durch die Implantation des Telemetrie-Transmitters zu erfassen, wurde das Wohlbefinden beider Sham-Gruppen in der postoperativen Phase vergleichend betrachtet. Bei den Tieren der ersten Versuchsreihe wurde ausschließlich eine Elektrode implantiert. Bei den Tieren der zweiten Versuchsreihe handelte es sich hingegen um elektroden- und transmitterimplantierte Tiere.

Im Rahmen der Schmerzerfassung wurden der Irwin-Score und der Grimace-Scale beurteilt. Durch die subkutane Manipulation während der Implantation des Telemetrie-Transmitters könnten im Vergleich zu der alleinigen Elektrodenimplantation zusätzliche Schmerzen und Schwellungen im Gewebe entstehen. Der Grimace-Scale dient der quantitativen Erfassung des beurteilten Schmerzgesichtes. Akute Schmerzen würden sich in einem erhöhten Summenscore des Grimace-Scales manifestieren (SOTOCINAL et al. 2011). Mit Hilfe des modifizierten Irwin-Scores werden Handling-assoziierte Verhaltensänderungen durch einen gesteigerten Summenscore festgehalten (GROTICKE et al. 2007). Gewebeläsionen und Schwellungen könnten bei Berührung zu Schmerzen führen. Es ist demnach denkbar, dass die Tiere bei akuten Schmerzen während des Handlings mit einem veränderten Verhalten reagieren. Weder über den Grimace-Scale noch über den Irwin-Score konnten Anzeichen von zusätzlichen Schmerzen oder Handling-assoziierte Verhaltensänderungen bei den elektroden- und transmitterimplantierten Tieren gegenüber den nur elektrodenimplantierten Tieren erfasst werden.

Zur Beurteilung des Wohlbefindens der Tiere nach der Implantation wurden das Nestbauverhalten und das Wühlverhalten ermittelt. Beide Verhaltensweisen werden als Indikatoren des Wohlbefindens verstanden, da Labornager mit Schmerzen oder Stress ein reduziertes Nestbau- und Wühlverhalten zeigen können (JIRKOF 2014). In der vorliegenden Studie konnte in beiden Sham-Gruppen kein Unterschied der Nestkomplexität und des Wühlverhaltens zwischen der postoperativen Phase und den Basalmessungen dieser Tiere festgestellt werden. Zusammenfassend gibt es keinen Hinweis auf ein erhöhtes Schmerzempfinden oder ein reduziertes Wohlbefinden bei den elektroden- und transmitterimplantierten Tieren gegenüber den rein elektrodenimplantierten Tieren.

Allerdings ist zu beachten, dass infolge der Elektroden- und Transmitterimplantation 10,5 % der operierten Tiere aufgrund von Wundkomplikationen oder lokomotorischen Einschränkungen eingeschläfert werden mussten. Die Rate ist im Vergleich zu den reinen

Elektrodenimplantationen (3,1 %) mehr als dreimal so hoch. Mit der vergrößerten Wundfläche könnte die Wahrscheinlichkeit von Wundkomplikationen im Vergleich zu der reinen Elektrodenimplantation ansteigen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob auch in anderen Tiermodellen aufgrund einer zusätzlichen Transmitterimplantation mit einem erhöhten Ausfall von Tieren zu rechnen ist. Die Tiere mit Wundkomplikationen zeigten zuvor keine Veränderung in den soeben diskutierten Tests. Aus diesem Grund konnte bei diesen Tieren nicht von einem reduzierten Allgemeinbefinden oder erhöhten Schmerzen ausgegangen werden. Dennoch sollte bei der Planung von Versuchen diese erhöhte Verlustrate bei der Anzahl der Tiere einkalkuliert werden. Diese entspricht nicht dem geforderten 3R-Prinzip (*Reduction*). Gegensätzlich zu diesen Ergebnissen wird in der Literatur der Einsatz von Telemetrie-Transmittern nicht nur als *Refinement*-Maßnahme, sondern auch als eine *Reduction* diskutiert. CESAROVIC et al. (2011) diskutierten eine mögliche Reduktion der Tierzahl im Versuch aufgrund einer geringeren Streuung innerhalb der Versuchsgruppen, die durch die Verbesserung des Tierwohls (*Refinement*) erreicht werden könnte. Folglich würde man weniger Tiere im Versuch benötigen, damit Effekte nachgewiesen werden können. Schließlich wäre es interessant zu prüfen, ob in Anbetracht der operationsbedingt benötigten erhöhten Tierzahl dennoch eine Reduktion der Tiere durch eine geringere Streuung erreicht werden könnte.

Abschließend kann festgehalten werden, dass vorerst keine über die Elektrodenimplantation hinausgehende Belastung der Tiere durch eine zusätzliche subkutane Implantation eines Telemetrie-Transmitters feststellbar war. Die von LEON et al. (2004) diskutierte zusätzliche Belastung durch die Implantation eines Telemetrie-Transmitters kann anhand der vorliegenden Daten nicht bestätigt werden. Es ist zu bedenken, dass die Erfassung möglicher postoperativer Belastung hier begrenzt war. Das primäre Ziel der Studie, die kumulative Belastung des elektrischen Post-SE-Modells in seiner Gesamtheit zu evaluieren, durfte nicht beeinträchtigt werden. Eine invasive Probennahme war daher erst am Ende des Versuches möglich, um systematische Fehler durch iatrogen induzierten Stress zu vermeiden. Im Rahmen dieser Studie kann vorerst nicht von einer kurzfristigen, zusätzlichen Belastung aufgrund einer Transmitter-Implantation gegenüber einer Elektrodenimplantation ausgegangen werden.

#### *Hauptkomponentenanalyse*

Um eine mögliche *Refinement*-Maßnahme durch die Verwendung von Telemetrie-Transmittern in der EEG-Anfallsüberwachung im Rahmen des elektrischen SE-Modells zu untersuchen, wurden die Datensätze beider Gruppen mit epileptischen Tieren in einer PCA verglichen. Die Basis der PCA bildeten demnach die Datensätze der telemetrisch abgeleiteten epileptischen Tiere und der kabelabgeleiteten epileptischen Tiere, die nach

der zweiwöchigen EEG-Anfallsüberwachung ermittelt wurden. Die PCA zeigt eine Trennung der beiden epileptischen Gruppen entlang der PC1 und PC2. Die Variablen, die den größten Einfluss auf diese Trennung nehmen, sind die Daten des Elevated-Plus-Maze, des Open-Field-Tests und der Black-and-white-Box. Dieses Resultat reflektiert die Ergebnisse der Analysen der Einzelparameter. Die Gruppen unterschieden sich in Bezug auf die geringere Risikoabschätzung der telemetrisch abgeleiteten Tiere mit Epilepsie. Hinsichtlich weiteren Untersuchungen konnten nur geringe Unterschiede zwischen den Daten der Gruppen erfasst werden. Da beide Teilstudien nacheinander stattfinden mussten, kann in Bezug auf die geringere Risikoabschätzung ein Gruppeneffekt nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit über die Elektrodenimplantation hinaus keine zusätzliche Belastung der Tiere durch die Implantation eines Telemetrie-Transmitters ermittelt werden. Mit Blick auf die Untersuchung einer möglichen modellspezifischen *Refinement*-Maßnahme durch die Verwendung eines Telemetrie-Transmitters in der EEG-Anfallsüberwachung konnte eine Tendenz für eine geringere Risikoabschätzung der telemetrisch abgeleiteten epileptischen Tiere gegenüber den kabelabgeleiteten epileptischen Tieren festgestellt werden.

### 3. Schlussfolgerung

#### *Belastungseinstufung des elektrischen Post-SE-Modells*

In chronischen Epilepsiemodellen, bei denen die Tiere spontane Anfälle entwickeln, durchlaufen die Tiere verschiedene Phasen mit unterschiedlichen experimentellen Einflüssen. Die Implantation einer Tiefenstimulationselektrode, die sowohl als Stimulations- wie auch als Ableitungselektrode dient, ist als versuchsbedingte Prozedur eine Grundvoraussetzung dieses Modells. Demnach muss bei einer Gesamtbelastungsbeurteilung auch die Elektrodenimplantation berücksichtigt werden. In der vorliegenden Studie wird, analog zu einer früheren Studie aus unserer Arbeitsgruppe (MÖLLER et al. 2018), die Einstufung der kurz- und langfristigen Belastung durch die Elektrodenimplantation in die rechte BLA als ‚gering‘ empfohlen.

Damit eine umfassende Belastungseinschätzung empfohlen werden kann, soll die Belastung der Tiere in jeder Phase des Post-Status-Epilepticus-Modells separat betrachtet werden.

Ab dem SE zeigen die stimulierten Tiere im gesamten Verlauf der Studie ein reduziertes Wohlfühlverhalten. In der Post-Insult-Phase wurden eine transiente schwere körperliche Beeinträchtigung, ein reduziertes Wohlfühlverhalten, eine erhöhte Konzentration der fä-

kalen Corticosteron-Metaboliten und ein reduzierter circadianer Rhythmus der stimulierten Tiere erfasst. Darüber hinaus stellten in der vorliegenden Arbeit der Tag des elektrischen Insults und der Folgetag den einzigen Zeitraum dar, in dem Tiere akut verstarben. Nach der Richtlinie 2010/63/EU (EUROPÄISCHES-PARLAMENT 2010) werden „*Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine schwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere verursachen, [...] als ‚schwer‘*“ eingestuft. Anhand dieser Ergebnisse wird empfohlen, die Belastung der stimulierten Tiere in der Post-Insult-Phase als transient ‚schwere‘ Belastung einzustufen.

In der Latenzphase konnten ein reduziertes Wohlfühlverhalten, eine Hyperlokomotion sowie eine veränderte Aktivierung des ANS erfasst werden. In der Latenz- und der chronischen Phase blieb das Körpergewicht der epileptischen Tiere stabil. Schließlich wurden in der chronischen Phase eine Hyperlokomotion, ein anhedonie-assoziiertes Verhalten, ein reduziertes Wohlbefinden sowie eine reduzierte soziale Interaktion bei den Tieren mit Epilepsie erfasst. Diese Verhaltensänderungen könnten auf neuropathologische Prozesse zurückzuführen sein und daher vorerst als eine dauerhafte Manifestation verstanden werden. Änderungen der HR und HRV konnten zu diesem Zeitpunkt nicht mehr ermittelt werden. Gemäß der EU-Richtlinie 2010/63 werden Verfahren als eine ‚mittlere‘ Belastung eingestuft, wenn sie „*kurzzeitig mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste oder lang anhaltende geringe Schmerzen verursachen sowie Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine mittelschwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere verursachen*“ (EUROPÄISCHES-PARLAMENT 2010). Die erfassten Veränderungen der Latenz- und chronischen Phase können als *anhaltende geringe bis mittelschwere* Veränderungen verstanden werden. Aus diesem Grund wird für die Belastung der Tiere während dieser Phasen ein Belastungsgrad von ‚mittel‘ vorgeschlagen.

In der Gesamtheit wird basierend auf den langfristigen geringen bis mittelgradigen Veränderungen sowie der transient schweren Belastung eine Belastungseinstufung von ‚schwer‘ empfohlen. Dabei handelt es sich um eine Empfehlung, die eine Basis für eine grundsätzlich erforderliche laborspezifische Beurteilung liefert.

Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl die Saccharin-Präferenz als auch das Wühlverhalten Kandidaten für robuste Parameter darstellen, die in der Routineüberwachung eingesetzt werden könnten. Die Ergebnisse dieser Tests korrelieren mit einer Vielzahl an veränderten Daten. Im Speziellen sind hier die Veränderungen der Herzrate und der Herzratenvariabilität zu nennen, die mit Hilfe kostenintensiver Telemetrie-Transmitter in frei beweglichen Ratten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Studie aufgezeichnet wurden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei dem Saccharin-Präferenz-Test und dem Burrowing-Test um kostengünstige und einfach durchführbare Untersu-

chungen, die in der tierexperimentellen Forschung eine realisierbare Umsetzung darstellen könnten. Zudem erwies sich das Wühlverhalten, ermittelt mit dem Burrowing-Test, gegenüber dem Nestbauverhalten in der vorliegenden Arbeit als ein sensitiverer Parameter zum Erfassen des Wohlfühlverhaltens.

Für eine künftige Priorisierung von Tiermodellen in der Epilepsieforschung sollen die ermittelten Datensätze verschiedener Epilepsiemodelle verglichen werden, um einen modellübergreifenden Vergleich der Belastung der Tiere zu ermöglichen. Anschließend kann eine transparente Empfehlung für eine Priorisierung der Tiermodelle, in Bezug auf deren Belastungsgrad, für Wissenschaftler und Behörden abgegeben werden. Dadurch soll die Belastung von Tieren in der Epilepsieforschung nachhaltig minimiert werden.

#### *Verwendung von Telemetrie-Transmittern*

Abschließend konnte aufgrund der zusätzlichen Implantation der Telemetrie-Transmitter keine zusätzliche Belastung ermittelt werden. Die telemetrisch abgeleiteten Tiere mit Epilepsie zeigten eine geringgradig reduzierte Risikoabschätzung. Ob sich diese Verhaltensänderung auf das Verfahren der EEG-Ableitung zurückführen lässt oder ob es sich um einen Effekt basierend auf unterschiedlichen Untersuchungszeiträumen handelt, kann abschließend nicht beurteilt werden.

## **4. Limitationen und Ausblick**

### *Limitationen*

Bezüglich der in der vorliegenden Untersuchung erhobenen Ergebnisse sind verschiedene Limitationen zu berücksichtigen. Im elektrischen Post-SE-Modell nehmen das Alter, der Rattenstamm und das Geschlecht Einfluss auf das Modell. Da in der vorliegenden Arbeit weibliche Tiere verwendet wurden, ist eine höhere Varianz der Ergebnisse aufgrund des Sexualzyklus mit den hormonellen Schwankungen zu beachten. Wegen der Elektrodenimplantation war eine Einzelhaltung der Tiere obligatorisch. Die dadurch bedingte zusätzliche Belastung der Tiere wurde in der vorliegenden Studie nicht separat analysiert. Außerdem ist die exakte Lokalisation der Elektrode im Gehirn zu berücksichtigen, da allein die Implantation in die BLA der rechten Hemisphäre zu Verhaltensänderungen führen kann. Abweichungen von dem Stimulationsprotokoll, wie hinsichtlich der Dauer und Intensität der Stimulation sowie des zeitlichen Abstands zu der Implantation der Elektrode, können das Ergebnis des Modells beeinflussen. Aufgrund all dieser Faktoren können die vorliegenden Ergebnisse und die Belastungsempfehlung als Basis für eine grundsätzlich erforderliche Belastungseinschätzung herangezogen werden. Eine laborspezifische Abwägung ist für jede Versuchsdurchführung essentiell. Die emp-



fohlenen Kandidaten für Parameter der Belastungseinschätzung in der Routineüberwachung können nicht die tägliche Inaugenscheinnahme und Evaluation des Allgemeinbefindens der Tiere ersetzen.

Weiterhin ist zu beachten, dass einzelne Parameter an Limitationen gebunden sind. Das Nestbauverhalten, der Verschmutzungsgrad, der Grimace-Scale und der Irwin-Score unterliegen einer subjektiven Evaluation anhand etablierter Bewertungsschemata. Aufgrund dessen ist die Präzision der genannten Tests limitiert. Biochemische Parameter unterliegen individuellen tageszeitlichen und zyklusbedingten Schwankungen der Tiere. Eine langfristige Darstellung des Sexualzyklus und der Bezug der Konzentrationen von Hormonen zueinander könnten neue Erkenntnisse liefern. In der vorliegenden Arbeit wurden die biochemischen Parameter und der Zyklusstand abgesehen von den fäkalen Corticosteron-Metaboliten nur einmalig in der chronischen Phase erhoben. Eine Aussage bezüglich dieser Parameter zu anderen Zeitpunkten ist daher hier nicht möglich.

#### *Ausblicke*

Über die vorliegenden Ergebnisse hinaus wäre es interessant, weiterführende Untersuchungen vorzunehmen. Durch eine mögliche frühzeitige Selektion der stimulierten Tiere, die mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine Epilepsieerkrankung entwickeln werden, könnten sowohl eine Verbesserung des Tierwohls (*Refinement*) als auch eine Vereinfachung der Anfallsüberwachung erreicht werden.

Ein weiterer Aspekt für eine Anwendung der Ergebnisse aus dieser Studie sind die Informationen hinsichtlich der erfassten Verhaltensänderungen. Die Untersuchung und Behandlung von Komorbiditäten bei Patienten mit Epilepsie rücken immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Zum einen mindern Komorbiditäten die Lebensqualität, zum anderen korreliert das Auftreten von Komorbiditäten mit der Prädisposition einer pharmakoresistenten TLE. Zur Auswahl eines geeigneten Tiermodells für Fragestellungen bezüglich der Komorbiditäten bei Epilepsie könnten die hier erfassten Verhaltensänderungen der Tiere als Hinweis auf Komorbiditäten verstanden und somit als Basis für den Auswahlprozess genutzt werden.

Die in dieser Arbeit angewandten Methoden unterliegen Standardprotokollen, sodass eine arbeitsgruppen- und laborübergreifende Replizierbarkeit gewährleistet werden kann. Im Rahmen der Forschergruppe (DFG - FOR 2591) werden diese Methoden nicht nur bei anderen häufig genutzten Epilepsiemodellen, sondern auch bei Tiermodellen anderer Bereiche angewendet. Dadurch soll eine Standardisierung in der Belastungseinstufung von Tiermodellen gewährleistet werden. Durch die Anwendungen von Hauptkomponentenanalysen (PCA) mit modellübergreifenden Datensätzen können mehrere Tiermodelle miteinander verglichen werden. Folglich können die Tiermodelle hinsichtlich der Belastung

---

der Tiere verglichen werden. In dieser Konsequenz wird bereits eine modellübergreifende Belastungseinstufung von Tiermodellen in der Epilepsieforschung bei Ratten erstellt. Analog dazu werden derzeit Datensätze von Epilepsiemodellen bei Mäusen erarbeitet, damit ebenfalls Belastungseinstufungen dieser empfohlen werden können. Anschließend wird eine Empfehlung für eine Priorisierung der Tiermodelle für Wissenschaftler und Behörden erarbeitet, mit dem Zweck, die Belastung von Tieren in der Epilepsieforschung nachhaltig zu minimieren.



## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsie stellt eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen in der Human- und Veterinärmedizin dar. Dreißig Prozent der mit Antiepileptika behandelten Humanpatienten und viele Hunde mit Epilepsie zeigen keine ausreichende Pharmakoresponse. Um die pathophysiologischen Mechanismen der Epilepsieerkrankung weiter zu untersuchen sowie aufbauend auf den gewonnenen Kenntnissen neue Medikamente entwickeln zu können, ist es leider zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht möglich, auf die Verwendung von tierexperimentellen Epilepsiemodellen zu verzichten. Die dafür an den Tieren vorgenommenen Eingriffe gehen in der Regel mit einer Belastung der Tiere einher. Diese Belastung ist sowohl aus ethischen, als auch aus rechtlichen Gründen minimal zu halten. Dies setzt jedoch eine objektive und umfassende Beurteilung der Schmerzen, Leiden und Schäden der verwendeten Tiere voraus. Aus diesem Grund werden in der EU Richtlinie 2010/63 Belastungseinstufungen von Tiermodellen, basierend auf aktuellen, evidenzbasierten Daten, in den Abstufungen ‚gering‘, ‚mittel‘ oder ‚schwer‘ gefordert. Zusätzlich wird die Umsetzung des 3R-Prinzips (*Refinement, Reduction, Replacement*) verlangt. Die nationale Forschergruppe ‚Severity assessment in animal based research‘ (DFG - FOR 2591) erarbeitet Empfehlungen für die Belastungseinstufungen von ausgewählten Tiermodellen. Diese basieren auf der Identifizierung und Validierung von Belastungsparametern um eine objektive und umfassende Erhebung der Schmerzen, Leiden und Schäden von Versuchstieren zu erwirken. Unsere Arbeitsgruppe arbeitet als Mitglied dieser Forschergruppe im Speziellen an Belastungseinstufungen von Epilepsiemodellen in Mäusen und Ratten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Belastung von weiblichen Sprague-Dawley Ratten im elektrischen Post-SE-Modell untersucht. Dafür wurde das Verhalten der Tiere sowie biochemische und physiologische Parameter erfasst. Die Verhaltensuntersuchungen umfassten das Wohlfühlverhalten (Nestbau- und Wühlverhalten), das angst- und anhedonie-assoziierte Verhalten (Elevated-Plus-Maze, Black-and-white-Box und Saccharin-Präferenz), die lokomotorische Aktivität (Open Field) sowie die soziale Interaktion. Für die Untersuchung der biochemischen Parameter wurden Analysen der Konzentration von BDNF, Creatinkinase sowie Corticosteron und seinen Metaboliten herangezogen. In einer Teilstudie konnten weiterhin mittels einer subkutanen Implantation von Telemetrie-Transmittern die physiologischen Parameter der Aktivität, der Herzrate und der Herzratenvariabilität überprüft werden. Mit Hilfe dieser Teilstudie konnte zudem eine mögliche *Refinement*-Maßnahme bezüglich der telemetrischen EEG-Ableitung, bei frei beweglichen Tieren im Heimkäfig, gegenüber der herkömmlichen, kabelabhängigen EEG-Ableitung überprüft werden. Anhand dieser umfangreichen Analysen konnten einzelne Parameter identifiziert werden, die mit einer Vielzahl an veränderten Daten korrelierten.

Während der Post-Insult-Phase konnten Veränderungen bei den stimulierten Tieren im Verhalten, der biochemischen und physiologischen Parameter identifiziert werden. Diese Ergebnisse geben Hinweise auf eine transient ‚schwer‘ belastende Phase. Mittelfristig führen die pathologischen Veränderungen während der Latenzphase zu einer veränderten Aktivierung des Autonomen Nervensystems. In der chronischen Phase konnten bei den Tieren mit Epilepsie eine geringgradige Hyperlokomotion, ein anhedonie-assoziiertes Verhalten sowie eine verminderte Interaktionsfähigkeit erfasst werden. Bezüglich der biochemischen Parameter konnten erhöhte Werte der fäkalen Corticosteron-Metaboliten detektiert werden. In der Latenz- und chronischen Phase geben die Ergebnisse Hinweise auf eine ‚geringe‘ bis ‚mittlere‘ Belastung der stimulierten Tiere. In der Gesamtheit wird für das vorliegende Epilepsiemodell ein Belastungsgrad von ‚schwer‘ empfohlen. Für weiterführende Studien ist zu beachten, dass es sich hierbei lediglich um eine Empfehlung handelt, die eine Basis für eine grundsätzlich erforderliche laborspezifische Beurteilung liefert.

Die Ergebnisse deuten außerdem darauf hin, dass die Saccharin-Präferenz und das Wühlverhalten Kandidaten für robuste Parameter darstellen, die möglicherweise in der Routineüberwachung eingesetzt werden könnten. Beide Tests sind kostengünstige und einfach durchführbare Untersuchungen, welche mit den Veränderungen der Herzrate und der Herzratenvariabilität korrelierten. Zudem erwies sich das Wühlverhalten modellspezifisch als ein sensitiverer Parameter zum Erfassen des Wohlfühlverhaltens gegenüber dem Nestbauverhalten.

Künftig soll, basierend auf den modellübergreifenden Ergebnissen der von unserer Arbeitsgruppe geprüften Epilepsiemodelle, eine transparente Empfehlung für die Priorisierung von Epilepsiemodellen für Behörden und Wissenschaftler erarbeitet werden.

## VIII. SUMMARY

Epilepsy is one of the most common neurological disorders in cats, dogs and humans. Epileptic seizures and its associated psychiatric comorbidities can considerably affect the quality of life of patients. Pharmacological treatment and seizure control in epilepsy patients is equally challenging in both, veterinary and human medicine. In many cases seizure control is not sufficient where around 30% of patients with epilepsy do not respond to medical treatment. To improve drug efficiency, hence, there is still a need to understand the pathophysiological mechanisms of epilepsy and discover new components for pharmacological treatment. Our current knowledge about epilepsy is primarily based on the use of animal models for epilepsy. Research about epilepsy still requires the use of animal models, which is usually paired with a certain burden for the animals. The level of burden needs to be considered in terms of animal welfare and ethical approval. Therefore, the estimated gain of knowledge needs to be balanced with the expected burden. As a requirement for an objective evaluation of burden, the EU-declaration 2010/63 demands an evidence-based severity assessment for animal models with a classification of the burden as 'mild', 'moderate' or 'severe'. The national research unit 'Severity assessment in animal based research' (DFG - FOR 2591) develops recommendations for severity assessment in selected animal models. In our working group we work specifically with epilepsy models in mice and rats.

This study presents an evidence-based recommendation for a severity classification of the electrical post-status-epilepticus model in Sprague-Dawley rats. Therefore, we investigated alterations in behavioral, biochemical, and physiological parameters in epileptic rats. Behavioral investigations encompass burrowing behavior, social interaction, home cage behavior and anxiety-associated behaviour. Biochemical analysis focussed on BDNF-, corticosterone- and creatinkinase-concentrations. Finally, during a separate subproject we were able to analyse physiological parameters based on telemetric recordings (activity, ECG and EEG) in freely moving rats, in their home cage, at several time points of the study. ECG Analysis allowed us to obtain additional information concerning the heart rate and heart rate variability. Furthermore, we were able to compare the conventional tethered recording for the EEG-monitoring to telemetric recording in freely moving rats as a refinement-procedure.

Our results show that most alterations in animals with a history of SE were found during the post-insult phase. This suggests a classification of the severity of this early and transient experimental phase as 'severe'. In addition, during the latency phase we observed hyper locomotion and a modified activation of the autonomous nervous system due to

changes in heart rate and the heart rate variability. In the chronic phase, epileptic animals exhibited behavioral alterations like hyper locomotion, reduced social interaction and anhedonia-associated behaviour. Moreover, a higher concentration of fecal corticosterone metabolites was identified. These results indicate longer phases of a “mild” severity, which translates to a “moderate” classification. Considering all experimental phases, we recommend a classification of the electrical post-SE model as an animal model with a ‘severe’ severity classification.

Furthermore, we obtained evidence to propose the saccharin-preference test and the burrowing test as candidates for low cost and simple parameters to evaluate severity during routine monitoring, considering that they show strong correlations with a wide range of more costly and labour intensive severity parameters.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

ADAMEC, R., J. BLUNDELL u. P. BURTON (2004):

Anxiolytic effects of kindling role of anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right basolateral amygdala.

Brain research 1024, 44-58

AKSELROD, S., D. GORDON, F. A. UBEL, D. C. SHANNON, A. C. BERGER u. R. J. COHEN (1981):

Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control.

Science (New York, N.Y.) 213, 220-222

AL-QUDAH, M. A. u. A. AL-DWAIRI (2016):

Mechanisms and regulation of neurotrophin synthesis and secretion.

Neurosciences (Riyadh) 21, 306-313

ARMARIO, A., N. DAVIU, C. MUNOZ-ABELLAN, C. RABASA, S. FUENTES, X. BELDA, H. GAGLIANO u. R. NADAL (2012):

What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors?

Cellular and molecular neurobiology 32, 749-758

ARRAS, M., A. RETTICH, P. CINELLI, H. P. KASERMANN u. K. BURKI (2007):

Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability.

BMC Vet Research 3, 16

BARDE, Y. A., D. EDGAR u. H. THOENEN (1982):

Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain.

The EMBO journal 1, 549-553

BARKER-HALISKI, M. L., D. FRIEDMAN, J. A. FRENCH u. H. S. WHITE (2015):

Disease modification in epilepsy: from animal models to clinical applications.

Drugs 75, 749-767

BARNES, S. J. u. J. P. PINEL (2001):

Conditioned effects of kindling.



Neuroscience and Biobehavioural Reviews 25, 745-751

BAUMANS, V. (2005):

Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals.

Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties 24, 503-513

BAUMANS, V., J. A. BOUWKNECHT, H. BOERE, K. KRAMER, H. A. VAN LITH, H. A. VAN DE WEERD u. H. VAN HERCK (2001):

Intra-abdominal transmitter implantation in mice: Effects on behaviour and body weight.

Animal Welfare 10, 291-302

BAUMANS, V., P. F. BRAIN, H. BRUGERE, P. CLAUSING, T. JENESKOG u. G. PERRETTA (1994):

Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992.

Laboratory Animals 28, 97-112

BAYSAL-KIRAC, L., N. G. SERBEST, E. SAHIN, H. O. DEDE, C. GURSES, A. GOKYIGIT, N. BEBEK, A. K. BILGE u. B. BAYKAN (2017):

Analysis of heart rate variability and risk factors for SUDEP in patients with drug-resistant epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 71, 60-64

BEALER, S. L., C. S. METCALF u. J. G. LITTLE (2011):

Methods for ECG evaluation of indicators of cardiac risk, and susceptibility to aconitine-induced arrhythmias in rats following status epilepticus.

Journal of visualized experiments : JoVE

BECKER, A. J. (2018):

Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis.

Neuropathology and Applied Neurobiology 44, 112-129

BECKER, C., E. BOUVIER, A. GHESTEM, S. SIYOUCEF, D. CLAVERIE, F. CAMUS, F. BARTOLOMEI, J. J. BENOLIEL u. C. BERNARD (2015):

Predicting and treating stress-induced vulnerability to epilepsy and depression.

Annals of neurology 78, 128-136

BEERY, A. K. u. D. KAUFER (2015):

Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents.

Neurobiology of stress 1, 116-127

BEHR, C., M. A. GOLTZENE, G. KOSMALKI, E. HIRSCH u. P. RYVLIN (2016):

Epidemiology of epilepsy.

Revue neurologique 172, 27-36

BELDA, X., S. FUENTES, N. DAVIU, R. NADAL u. A. ARMARIO (2015):

Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond.

Stress (Amsterdam, Netherlands) 18, 269-279

BERENDT, M., R. G. FARQUHAR, P. J. MANDIGERS, A. PAKOZDY, S. F. BHATTI, L. DE RISIO, A. FISCHER, S. LONG, K. MATIASEK, K. MUNANA, E. E. PATTERSON, J. PENDERIS, S. PLATT, M. PODELL, H. POTSCHKA, M. B. PUMAROLA, C. RUSBRIDGE, V. M. STEIN, A. TIPOLD u. H. A. VOLK (2015):

International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals.

BMC Veterinary Research 11, 182

BERGMEYER, H., H. BREUER, H. BÜTTNER, A. DELBRÜCK, D. LAUE u. W. PILZ (1977):

Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. Standard-Methode zur Bestimmung der Aktivität der Creatin-Kinase.

J Clin Chem Clin Biochem 15, 249-254

BINDER, D. K. (2004):

The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system.

In: Recent advances in epilepsy research

Springer, S. 34-56

BINDER, D. K. u. H. E. SCHARFMAN (2009):

Mini Review.

Growth Factors 22, 123-131

BLANCHARD, R. J. u. D. C. BLANCHARD (1989):

Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion.

Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 13 Suppl, S3-14

BORCHERS, D. u. J. LUY (2009):

Der ethisch vertretbare Tierversuch: Kriterien und Grenzen.

Mentis 10

BOURIN, M. u. M. HASCOET (2003):

The mouse light/dark box test.

European journal of pharmacology 463, 55-65

BRANDT, C. (2002):

Die Rolle der Neurodegeneration bei der Pathogenese  
der Temporallappenepilepsie im Hinblick  
auf die Entwicklung neuer Antiepileptika.

BRANDT, C., M. BANKSTAHL, K. TOLLNER, R. KLEE u. W. LOSCHER (2016):

The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Marked intrastrain differences in female Sprague-Dawley rats and the effect of estrous cycle.

Epilepsy & Behaviour 61, 141-152

BRANDT, C., A. M. GASTENS, M. SUN, M. HAUSKNECHT u. W. LOSCHER (2006):

Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats.

Neuropharmacology 51, 789-804

BRANDT, C., M. GLIEN, H. POTSCHKA, H. VOLK u. W. LOSCHER (2003):

Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats.

Epilepsy Res 55, 83-103

BREWSTER, A. L., K. MARZEC, A. HAIRSTON, M. HO, A. E. ANDERSON u. Y. C. LAI (2016):

Early cardiac electrographic and molecular remodeling in a model of status epilepticus and acquired epilepsy.

Epilepsia 57, 1907-1915

BRIGO, F., S. C. IGWE, R. ERRO, L. G. BONGIOVANNI, A. MARANGI, R. NARDONE, M. TINAZZI u. E. TRINKA (2015):

Postictal serum creatine kinase for the differential diagnosis of epileptic seizures and psychogenic non-epileptic seizures: a systematic review.

Journal of neurology 262, 251-257

BRUHN, H. D., R. JUNKER, H. SCHÄFER u. S. SCHREIBER (2011):

Labormedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte, Pathophysiologie und Klinik.

Schattauer Verlag 3. Auflage, 89-90

BUCKLEY, A. W. u. G. L. HOLMES (2016):

Epilepsy and Autism.

Cold Spring Harbor perspectives in medicine 6, a022749

CAMPOS, A. C., M. V. FOGACA, D. C. AGUIAR u. F. S. GUIMARAES (2013):

Animal models of anxiety disorders and stress.

Revista Brasileira de Psiquiatria 35 Suppl 2, S101-111

CANNON, W. B. (1914):

The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions.

American Journal of Physiology 33, 356-372

CANNON, W. B. (1929):

Organization for physiological homeostasis.

Physiological reviews 9, 399-431

CAVIGELLI, S. A., S. L. MONFORT, T. K. WHITNEY, Y. S. MECHREF, M. NOVOTNY u. M. K. MCCLINTOCK (2005):

Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms.

J Endocrinol 184, 153-163

CESAROVIC, N., P. JIRKOF, A. RETTICH u. M. ARRAS (2011):

Implantation of radiotelemetry transmitters yielding data on ECG, heart rate, core body temperature and activity in free-moving laboratory mice.

Journal of visualized experiments : JoVE e3260

CHAMPEROUX, P., P. FESLER, S. JUDE, S. RICHARD, J. Y. LE GUENNEC u. J. THIREAU (2018):

High-frequency autonomic modulation: a new model for analysis of autonomic cardiac control.

British Journal of Pharmacology 175, 3131-3143

CHEN, S. D., Y. L. WANG, S. F. LIANG u. F. Z. SHAW (2016):

Rapid Amygdala Kindling Causes Motor Seizure and Comorbidity of Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Rats.

Frontiers in Behavioral Neuroscience 10, 129

CRAWLEY, J. u. F. K. GOODWIN (1980):

Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines.

Pharmacology Biochemistry & Behavior 13, 167-170

CULHANE, A. C., J. THIOULOUSE, G. PERRIERE u. D. G. HIGGINS (2005):

MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data.

Bioinformatics 21, 2789-2790

CUNNINGHAM, C., R. DEACON, H. WELLS, D. BOCHE, S. WATERS, C. P. DINIZ, H. SCOTT, J. N. RAWLINS u. V. H. PERRY (2003):

Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease.

European Journal of Neuroscience 17, 2147-2155

CZAPLIK, M., N. HOCHHAUSEN, H. DOHMEIER, C. B. PEREIRA u. R. ROSSAINT (2017):

Development of a "Thermal-Associated Pain Index" score using infrared-thermography for objective pain assessment.

In: 2017 39th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 3831-3834

DALLA COSTA, E., M. MINERO, D. LEBELT, D. STUCKE, E. CANALI u. M. C. J. P. O. LEACH (2014):

Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration.

PLoS ONE 9, e92281

DARWIN, C. (1872):

The expression of emotion in animals and man.

London: Methuen.(1877), A biographical sketch of an infant. Mind 2, 285-294

DAVENPORT, M. D., S. TIEFENBACHER, C. K. LUTZ, M. A. NOVAK u. J. S. MEYER (2006):

Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques.

General and comparative endocrinology 147, 255-261

DAVIES, K. J. (2016):

Adaptive homeostasis.

Molecular Aspects of Medicine 49, 1-7

DE OLIVEIRA, C. V., V. N. ZORZI, M. R. FIGHERA, L. F. F. ROYES, A. F. FURIAN u. M. S. J. P. R. OLIVEIRA (2018):

Subtle improvement of seizure susceptibility by atorvastatin treatment during epileptogenesis.

Pharmacological Reports 70, 364-371

DEACON, R. M. (2006a):

Assessing nest building in mice.

NATURE PROTOCOLS 1, 1117-1119

DEACON, R. M. (2006b):

Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction.

NATURE PROTOCOLS 1, 118-121

DEACON, R. M. (2009):

Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents.

Behavioural brain research 200, 128-133

DEACON, R. M., L. L. CHOLERTON, K. TALBOT, R. G. NAIR-ROBERTS, D. J. SANDERSON, C. ROMBERG, E. KOROS, K. D. BORNEMANN u. J. N. RAWLINS (2008):

Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice.

Behavioural brain research 189, 126-138

DEACON, R. M., C. PENNY u. J. N. RAWLINS (2003):

Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice.

Behavioural brain research 139, 139-155

DEACON, R. M., J. M. RALEY, V. H. PERRY u. J. N. RAWLINS (2001):

Burrowing into prion disease.

Neuroreport 12, 2053-2057

DENENBERG, V. H., R. E. TAYLOR u. M. X. ZARROW (1969):

Maternal behavior in the rat: an investigation and quantification of nest building.

Behaviour 34, 1-16

DEUTSCH-FELDMAN, M., R. PICETTI, K. SEIP-CAMMACK, Y. ZHOU u. M. J. KREEK (2015):

Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotropin and corticosterone concentrations in Sprague-Dawley compared with Lewis rats.

Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 54, 35-39

DEVINSKY, O., B. G. VICKREY, J. CRAMER, K. PERRINE, B. HERMANN, K. MEADOR u. R. D. HAYS (1995):

Development of the quality of life in epilepsy inventory.

Epilepsia 36, 1089-1104

DI GIMINIANI, P., V. L. BRIERLEY, A. SCOLLO, F. GOTTARDO, E. M. MALCOLM, S. A. EDWARDS u. M. C. LEACH (2016):

The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale.

Frontiers in Veterinary Science 3, 100

DI LIBERTO, V., R. M. VAN DIJK, M. BRENDEL, A. M. WALDRON, C. MOLLER, I. KOSKA, I. SEIFFERT, F. GUALTIERI, F. J. GILDEHAUS, B. VON UNGERN-STERNBERG, M. LINDNER, S. ZIEGLER, R. PALME, R. HELLWEG, P. GASS, P. BARTENSTEIN u. H. POTSCHKA (2018):

Imaging correlates of behavioral impairments: An experimental PET study in the rat pilocarpine epilepsy model.

Neurobiology of Disease 118, 9-21

DIENI, S., T. MATSUMOTO, M. DEKKERS, S. RAUSKOLB, M. S. IONESCU, R. DEOGRACIAS, E. D. GUNDELFINGER, M. KOJIMA, S. NESTEL, M. FROTSCHER u. Y. A. BARDE (2012):

BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons.

The Journal of cell biology 196, 775-788

DÖRNER, K. (2009):

Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen [Taschenlehrbuch].

7. vollständig überarbeitete Auflage, 477-479

DUDEK, B. C., N. ADAMS, R. BOICE u. M. E. ABBOTT (1983):

Genetic influences on digging behaviors in mice (*Mus musculus*) in laboratory and seminatural settings.

Journal of Comparative Psycholom 97, 249-259

ELGER, C. E., S. A. JOHNSTON u. C. HOPPE (2017):

Diagnosing and treating depression in epilepsy.

Seizure 44, 184-193

ENGLAND, M. J., C. T. LIVERMAN, A. M. SCHULTZ u. L. M. STRAWBRIDGE (2012):

Epilepsy across the spectrum: promoting health and understanding. A summary of the Institute of Medicine report.

Epilepsy & behavior : E&B 25, 266-276

ERHARDT, W., P. KÖLLE, J. HENKE, J. HABERSTROH, C. BAUMGARTNER u. S. TACKE (2012):

Anästhesie und Analgesie beim Klein-und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen.

Schattauer Verlag,

ERICKSON, R. L., C. A. BROWNE u. I. LUCKI (2017):

Hair corticosterone measurement in mouse models of type 1 and type 2 diabetes mellitus.

Physiology & Behavior 178, 166-171

EUROPÄISCHES-PARLAMENT (2010):

RICHTLINIE 2010/63/EU, 22. September 2010

zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.

Amtsblatt der Europäischen Union

EUROPEAN-UNION (2010):

Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

33–79

FILE, S. E., A. S. LIPPA, B. BEER u. M. T. LIPPA (2004):

Animal tests of anxiety.

Current Protocols in Neuroscience Chapter 8, Unit 8 3

FILE, S. E. u. P. SETH (2003):

A review of 25 years of the social interaction test.

European journal of pharmacology 463, 35-53

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU, A. BOGACZ, J. H. CROSS, C. E. ELGER, J. ENGEL, JR., L. FORSGREN, J. A. FRENCH, M. GLYNN, D. C. HESDORFFER, B. I. LEE, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, I. E. SCHEFFER, T. TOMSON, M. WATANABE u. S. WIEBE (2014):

ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.

Epilepsia 55, 475-482

FISHER, R. S., W. VAN EMDE BOAS, W. BLUME, C. ELGER, P. GENTON, P. LEE u. J. ENGEL, JR. (2005):

Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).

Epilepsia 46, 470-472

FONCK, C., A. EASTER, M. R. PIETRAS u. R. A. BIALECKI (2015):

CNS Adverse Effects: From Functional Observation Battery/Irwin Tests to Electrophysiology.

Handbook of experimental pharmacology 229, 83-113

FORSCHUNG, F. T. I. D. (2010):

Belastungskataloge

zur Bewertung von Tierversuchen

Hintergrundpapier

des Forum Tierversuche in der Forschung.



FRANK, M. G., L. R. WATKINS u. S. F. MAIER (2013):

Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger.

Brain, behavior, and immunity 33, 1-6

GAO, W., T. STALDER, P. FOLEY, M. RAUH, H. DENG u. C. KIRSCHBAUM (2013):

Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay.

Journal of Chromatography B 928, 1-8

GASKILL, B. N., A. Z. KARAS, J. P. GARNER u. K. R. PRITCHETT-CORNING (2013):

Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice.

Journal of visualized experiments : JoVE 51012

GAUTHIER, C. u. G. GRIFFIN (2005):

Using animals in research, testing and teaching.

Rev Sci Tech Oie 24, 735-745

GEISLER, F. C., T. KUBIAK, K. SIEWERT u. H. WEBER (2013):

Cardiac vagal tone is associated with social engagement and self-regulation.

Biological psychology 93, 279-286

GHEYARA, A. L., R. PONNUSAMY, B. DJUKIC, R. J. CRAFT, K. HO, W. GUO, M. M. FINUCANE, P. E. SANCHEZ u. L. MUCKE (2014):

Tau reduction prevents disease in a mouse model of Dravet syndrome.

Annals of neurology 76, 443-456

GIRAL, M., D. C. GARCIA-OLMO u. K. KRAMER (2011):

Effects of wire-bottom caging on heart rate, activity and body temperature in telemetry-implanted rats.

Laboratory animals 45, 247-253

GODDARD, G. V. (1967):

Development of Epileptic Seizures through Brain Stimulation at Low Intensity.

Nature 214, 1020-&

GOLDMAN, J. M., A. S. MURR u. R. L. COOPER (2007):

The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies.

Birth Defects Research 80, 84-97

GORTER, J., E. VAN VLIET, E. ARONICA u. F. L. DA SILVA (2001):

Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons.

European Journal of Neuroscience 13, 657-669

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET u. F. H. LOPES DA SILVA (2016):

Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models?

Journal of neuroscience methods 260, 96-108

GREEN, M. R. u. C. M. MCCORMICK (2016):

Sex and stress steroids in adolescence: Gonadal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat.

General and comparative endocrinology 234, 110-116

GREENBERG, M. E., B. XU, B. LU u. B. L. HEMPSTEAD (2009):

New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function.

Journal of Neuroscience 29, 12764-12767

GROTICKE, I., K. HOFFMANN u. W. LOSCHER (2007):

Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice.

Experimental Neurology 207, 329-349

HÄGER, C., S. BIERNOT, M. BUETTNER, S. GLAGE, L. KEUBLER, N. HELD, E. BLEICH, K. OTTO, C. MÜLLER u. S. J. P. O. DECKER (2017):

The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep.

PloS one 12, e0175839

HAGER, C., L. M. KEUBLER, S. BIERNOT, J. DIETRICH, S. BUCHHEISTER, M. BUETTNER u. A. BLEICH (2015):

Time to Integrate to Nest Test Evaluation in a Mouse DSS-Colitis Model.

PLoS One 10, e0143824

HALL, C. S. (1934):

Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality.

Journal of Comparative Psychology 18, 385-403

HANDLEY, S. L. u. S. MITHANI (1984):

Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour.

Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology 327, 1-5

HELPER, V., C. DERANSART, C. MARESCAUX u. A. DEPAULIS (1996):

Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences.

Neuroscience 73, 971-978

HELLWEG, R., C. A. VON ARNIM, M. BUCHNER, R. HUBER u. M. W. RIEPE (2003):

Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation.

Experimental Neurology 183, 346-354

HESKE, L., A. NODTVEDT, K. H. JADERLUND, M. BERENDT u. A. EGENVALL (2014):

A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: incidence, mortality and survival after diagnosis.

The Veterinary Journal 202, 471-476

HITIRIS, N., R. MOHANRAJ, J. NORRIE, G. J. SILLS u. M. J. BRODIE (2007):

Predictors of pharmaco-resistant epilepsy.

Epilepsy research 75, 192-196

HOCHHAUSEN, N., C. B. PEREIRA, S. LEONHARDT, R. ROSSAINT u. M. CZAPLIK (2018):

Estimating Respiratory Rate in Post-Anesthesia Care Unit Patients Using Infrared Thermography: An Observational Study.

Sensors 18, 1618

HOFSTRA, W. A. u. A. W. DE WEERD (2008):

How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature.

Epilepsy & behavior : E&B 13, 438-444

HOHLBAUM, K., B. BERT, S. DIETZE, R. PALME, H. FINK u. C. THONE-REINEKE (2017):

Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress.

PLoS One 12, e0179588

HÖLTER, S. M., J. EINICKE, B. SPERLING, A. ZIMPRICH, L. GARRETT, H. FUCHS, V. GAILUS-DURNER, M. H. D. ANGELIS u. W. WURST (2015):

Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice.

Current Protocols in Mouse Biology 5, 291-309

HOOPER, A., R. PARACHA u. J. MAGUIRE (2018):

Seizure-induced activation of the HPA axis increases seizure frequency and comorbid depression-like behaviors.

Epilepsy & behavior : E&B 78, 124-133

HULSMEYER, V. I., A. FISCHER, P. J. MANDIGERS, L. DERISIO, M. BERENDT, C. RUSBRIDGE, S. F. BHATTI, A. PAKOZDY, E. E. PATTERSON, S. PLATT, R. M. PACKER u. H. A. VOLK (2015):

International Veterinary Epilepsy Task Force's current understanding of idiopathic epilepsy of genetic or suspected genetic origin in purebred dogs.

BMC veterinary research 11, 175

INOSTROZA, M., E. CID, L. MENENDEZ DE LA PRIDA u. C. SANDI (2012):

Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats.

PLoS One 7, e38959

IRWIN, S. (1968):

Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse.

Psychopharmacologia 13, 222-257

IUGHETTI, L., L. LUCACCIONI, F. FUGETTO, B. PREDIERI, A. BERARDI u. F. FERRARI (2018):

Brain-derived neurotrophic factor and epilepsy: a systematic review.

Neuropeptides 72, 23-29

JANAK, P. H. u. K. M. TYE (2015):

From circuits to behaviour in the amygdala.

Nature 517, 284-292

JIRKOF, P. (2014):

Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice.

Journal of neuroscience methods 234, 139-146

JIRKOF, P., N. CESAROVIC, A. RETTICH, F. NICHOLLS, B. SEIFERT u. M. ARRAS (2010):

Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice.

Frontiers in BEHAVIORAL NEUROSCIENCE 4, 165

JIRKOF, P., T. FLEISCHMANN, N. CESAROVIC, A. RETTICH, J. VOGEL u. M. ARRAS (2013):

Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring.

Laboratory Animals 47, 153-161

JOSEPHSON, C. B. u. N. JETTE (2017):

Psychiatric comorbidities in epilepsy.

International Review of Psychiatry 29, 409-424

KALYNCHUK, L. E., J. P. PINEL u. D. TREIT (1998):

Long-term kindling and interictal emotionality in rats: effect of stimulation site.

Brain research 779, 149-157

KANNER, A. M. (2017):

Psychiatric comorbidities in new onset epilepsy: Should they be always investigated?

Seizure 49, 79-82

KATZ, R. J., K. A. ROTH u. B. J. CARROLL (1981):

Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression.

Neuroscience & Biobehavioral Reviews 5, 247-251

KECK, M., R. M. VAN DIJK, C. A. DEEG, K. KISTLER, A. WALKER, E. L. VON RUDEN, V. RUSSMANN, S. M. HAUCK u. H. POTSCSKA (2018):

Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: Focus on cell stress, extracellular matrix and angiogenesis.

Neurobiology of Disease 112, 119-135

KEENEY, A. J., S. HOGG u. C. A. MARSDEN (2001):

Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice.

Physiology & Behavior 74, 177-184

KILKENNY, C., W. J. BROWNE, I. C. CUTHILL, M. EMERSON u. D. G. ALTMAN (2010):

Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research.

PLoS biology 8, e1000412

KIRBY, E. D., A. C. GERAGHTY, T. UBUKA, G. E. BENTLEY u. D. KAUFER (2009):

Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats.

Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 11324-11329

KIRSCHBAUM, C., A. TIETZE, N. SKOLUDA u. L. DETTENBORN (2009):

Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy.

Psychoneuroendocrinology 34, 32-37

KLEIN, S., J. P. BANKSTAHL, W. LOSCHER u. M. BANKSTAHL (2015):

Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy.

Experimental Neurology 263, 263-271

KLÜVER, H. u. P. C. BUCY (1997):

Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys (Reprinted from Archives of Neurology and Psychiatry, vol 42, pg 979, 1939).

Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 9, 606-620

KORESH, O., Z. KAPLAN, J. ZOHAR, M. A. MATAR, A. B. GEVA u. H. COHEN (2016):

Distinctive cardiac autonomic dysfunction following stress exposure in both sexes in an animal model of PTSD.

Behavioural brain research 308, 128-142

KORTE, S. M., G. A. BOUWS u. B. BOHUS (1993):

Central actions of corticotropin-releasing hormone (CRH) on behavioral, neuroendocrine, and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement.

Hormones and behavior 27, 167-183

KUNDAKOVIC, M., K. GUDSNUK, J. B. HERBSTMAN, D. TANG, F. P. PERERA u. F. A. CHAMPAGNE (2015):

DNA methylation of BDNF as a biomarker of early-life adversity.

Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 6807-6813

LAI, W. S. u. R. E. JOHNSTON (2002):

Individual recognition after fighting by golden hamsters: a new method.

Physiology & Behavior 76, 225-239

LAMBERTS, R. J., R. D. THIJS, A. LAFFAN, Y. LANGAN u. J. W. SANDER (2012):

Sudden unexpected death in epilepsy: people with nocturnal seizures may be at highest risk.

Epilepsia 53, 253-257

LEON, L. R., L. D. WALKER, D. A. DUBOSE u. L. A. STEPHENSON (2004):

Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms.

American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 286, R967-974

LEPSCHY, M., C. TOUMA, R. HRUBY u. R. PALME (2007):

Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats.

Laboratory Animals 41, 372-387

LEPSCHY, M., C. TOUMA u. R. PALME (2010):

Faecal glucocorticoid metabolites: how to express yourself - comparison of absolute amounts versus concentrations in samples from a study in laboratory rats.

Laboratory Animals 44, 192-198

LEUNG, V., E. ZHANG u. D. S. PANG (2016):

Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats.

Scientific Reports 6, 31667

LIDSTER, K., J. G. JEFFERYS, I. BLUMCKE, V. CRUNELLI, P. FLECKNELL, B. G. FRENGUELLI, W. P. GRAY, R. KAMINSKI, A. PITKANEN, I. RAGAN, M. SHAH, M. SIMONATO, A. TREVELYAN, H. VOLK, M. WALKER, N. YATES u. M. J. PRESCOTT (2016):

Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures.

Journal of neuroscience methods 260, 2-25

LOSCHER, W. (2002):

Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Research 50, 105-123

LOSCHER, W. (2011):

Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs.

Seizure 20, 359-368

LOSCHER, W. (2017):

Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs.

Neurochemical research 42, 1873-1888

LÖSCHER, W., A. RICHTER u. H. POTSCHKA (2014):

Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.

Enke,

LUNDT, A., C. WORMUTH, M. E. SIWEK, R. MULLER, D. EHNINGER, C. HENSELER, K. BROICH, A. PAPAZOGLU u. M. WEIERGRABER (2016):

EEG Radiotelemetry in Small Laboratory Rodents: A Powerful State-of-the Art Approach in

Neuropsychiatric, Neurodegenerative, and Epilepsy Research.

Neural plasticity 2016, 8213878

LUPIEN, S. J., B. S. MCEWEN, M. R. GUNNAR u. C. HEIM (2009):

Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition.

Nature reviews neuroscience 10, 434-445

MADSEN, H. B. u. S. H. AHMED (2015):

Drug versus sweet reward: greater attraction to and preference for sweet versus drug cues.

Addiction Biology 20, 433-444

MAHAR, I., F. R. BAMBICO, N. MECHAWAR u. J. N. NOBREGA (2014):

Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects.

Neuroscience and biobehavioral reviews 38, 173-192

MATSUOKA, Y., D. NISHI, Y. TANIMA, M. ITAKURA, M. KOJIMA, K. HAMAZAKI, H. NOGUCHI u. T. HAMAZAKI (2015):

Serum pro-BDNF/BDNF as a treatment biomarker for response to docosahexaenoic acid in traumatized people vulnerable to developing psychological distress: a randomized controlled trial.

Translational psychiatry 5, e596

MAZARATI, P. SIDDARTH, BALDWIN, D. SHIN, R. CAPLAN u. R. SANKAR (2008):

Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine.

Brain 131, 2071-2083

MAZARATI, A., D. SHIN, S. AUVIN, R. CAPLAN u. R. SANKAR (2007):

Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior.

Epilepsy & behavior : E&B 10, 377-383

MAZARATI, A. M., D. SHIN, Y. S. KWON, A. BRAGIN, E. PINEDA, D. TIO, A. N. TAYLOR u. R. SANKAR (2009):

Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of disease 34, 457-461

MCEWEN, B. S. (1998):

Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load.

Annals of the New York Academy of Sciences 840, 33-44



MCINTYRE, D. C., D. NATHANSON u. N. EDSON (1982):

A new model of partial status epilepticus based on kindling.

Brain research 250, 53-63

MCKEE, H. R. u. M. D. PRIVITERA (2017):

Stress as a seizure precipitant: Identification, associated factors, and treatment options.

Seizure 44, 21-26

MEHRABI, S., N. SANADGOL, M. BARATI, A. SHAHBAZI, G. VAHABZADEH, M. BARZROUDI, M. SEIFI, M. GHOLIPOURMALEKABADI u. F. GOLAB (2018):

Evaluation of metformin effects in the chronic phase of spontaneous seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

Metabolic brain disease 33, 107-114

MEIER, T. u. M. J. P.-P. P. M. P. NOLL-HUSSONG (2014):

Die Rolle der Stressachsen in der Entstehung und Proliferation einer Krebserkrankung.

PPmP-Psychotherapie· Psychosomatik· Medizinische Psychologie 64, 341-344

MEYER, J. S. u. M. A. J. P. NOVAK (2017):

Application of hair cortisol methodology to animal models: Assessment of long-term HPA activity and chronic stress.

Psychoneuroendocrinology 83, 2-3

MINHAS, S., C. LIU, J. GALDAMEZ, V. M. SO u. R. D. ROMEO (2016):

Stress-induced oxytocin release and oxytocin cell number and size in prepubertal and adult male and female rats.

General and comparative endocrinology 234, 103-109

MÖLLER, R. M. VAN DIJK, F. WOLF, M. KECK, K. SCHÖNHOF, V. BIERLING u. H. POTSCSKA (2019):

Impact of repeated kindled seizures on heart rate rhythms, heart rate variability, and locomotor activity in rats.

Epilepsy Behavior 92, 36-44

MÖLLER, F. WOLF, R. M. VAN DIJK, V. DI LIBERTO, V. RUSSMANN, M. KECK, R. PALME, R. HELLWEG, P. GASS, C. OTZDORFF u. H. POTSCSKA (2018):

Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling.

Epilepsia 59, 765-777

MOSTL, E. u. R. PALME (2002):

Hormones as indicators of stress.

Domestic animal endocrinology 23, 67-74

NADLER, J. J., S. S. MOY, G. DOLD, D. TRANG, N. SIMMONS, A. PEREZ, N. B. YOUNG, R. P. BARBARO, J. PIVEN, T. R. MAGNUSON u. J. N. CRAWLEY (2004):

Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice.

Genes, Brain and Behavior 3, 303-314

NANINCK, E. F., L. HOEIJMAKERS, N. KAKAVA-GEORGIADOU, A. MEESTERS, S. E. LAZIC, P. J. LUCASSEN u. A. KOROSI (2015):

Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice.

Hippocampus 25, 309-328

NASS, R. D., R. SASSEN, C. E. ELGER u. R. SURGES (2017):

The role of postictal laboratory blood analyses in the diagnosis and prognosis of seizures.

Seizure 47, 51-65

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, N. (2008):

Recognition and alleviation of distress in laboratory animals.

2, 181

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, N. (2010):

Guide for the care and use of laboratory animals.

National Academies Press 8. edition, 220

NEUFELD, M. Y., T. A. TREVES, V. CHISTIK u. A. D. KORCZYN (1997):

Sequential serum creatine kinase determination differentiates vaso-vagal syncope from generalized tonic-clonic seizures.

Acta neurologica scandinavica 95, 137-139

NISSINEN, J., T. HALONEN, E. KOIVISTO u. A. PITKANEN (2000):

A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat.

Epilepsy Research 38, 177-205

NOVAK, J. L., P. R. MILLER, D. MARKOVIC, S. K. MEYMANDI u. C. M. DEGIORGIO (2015):

Risk Assessment for Sudden Death in Epilepsy: The SUDEP-7 Inventory.

Frontiers in Neurology 6, 252

NOVAKOVA, B., P. R. HARRIS u. M. REUBER (2017):

Diurnal patterns and relationships between physiological and self-reported stress in patients with epilepsy and psychogenic non-epileptic seizures.

Epilepsy & behavior : E&B 70, 204-211

O'TOOLE, K. K., A. HOOPER, S. WAKEFIELD u. J. MAGUIRE (2014):

Seizure-induced disinhibition of the HPA axis increases seizure susceptibility.

Epilepsy Research 108, 29-43

OLIVER, V., D. DE RANTERE, R. RITCHIE, J. CHISHOLM, K. G. HECKER u. D. S. PANG (2014):

Psychometric assessment of the Rat Grimace Scale and development of an analgesic intervention score.

PLoS One 9, e97882

ONGERTH, T., V. RUSSMANN, S. FISCHBORN, K. BOES, C. SIEGL u. H. POTSCSKA (2014):

Targeting of microglial KCa3.1 channels by TRAM-34 exacerbates hippocampal neurodegeneration and does not affect ictogenesis and epileptogenesis in chronic temporal lobe epilepsy models.

Epilepsy & behavior : E&B 740, 72-80

PACKER, R. M., N. K. SHIHAB, B. B. TORRES u. H. A. VOLK (2014):

Clinical risk factors associated with anti-epileptic drug responsiveness in canine epilepsy.

PLoS One 9, e106026

PACKER, R. M. u. H. A. VOLK (2015):

Epilepsy beyond seizures: a review of the impact of epilepsy and its comorbidities on health-related quality of life in dogs.

Veterinary Record 177, 306-315

PARK, S. E., D. PARK, K. I. SONG, J. K. SEONG, S. CHUNG u. I. YOUN (2017):

Differential heart rate variability and physiological responses associated with accumulated short- and long-term stress in rodents.

Physiology & Behavior 171, 21-31

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005):

The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition.

Elsevier, Sydney

PELLOW, S. u. S. E. FILE (1986):

Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat.

Pharmacology Biothermstry & Behavior 24, 525-529

PETROVSKI, S., C. E. SZOEKE, N. C. JONES, M. R. SALZBERG, L. J. SHEFFIELD, R. M. HUGGINS u. T. J. O'BRIEN (2010):

Neuropsychiatric symptomatology predicts seizure recurrence in newly treated patients.

Neurology 75, 1015-1021

PITKÄNEN, A., P. BUCKMASTER, A. S. GALANOPOULOU u. S. L. MOSHÉ (2017):

Models of seizures and epilepsy.

Academic Press,

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2009):

Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 14 Suppl 1, 16-25

PITKANEN, A. u. K. LUKASIUK (2011):

Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets.

Lancet Neurology 10, 173-186

PITKANEN, A., K. LUKASIUK, F. E. DUDEK u. K. J. STALEY (2015):

Epileptogenesis.

Cold Spring Harbor perspectives in medicine 5, a022822

PITKANEN, A., J. TUUNANEN, R. KALVIAINEN, K. PARTANEN u. T. SALMENPERA (1998):

Amygdala damage in experimental and human temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Research 32, 233-253

POTSCHKA, H. (2012):

Animal models of drug-resistant epilepsy.

Epileptic Disord 14, 226-234

POTSCHKA, H. u. M. J. BRODIE (2012):

Pharmacoresistance.

Handbook of clinical neurology 108, 741-757

PRUT, L. u. C. BELZUNG (2003):

The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review.

European journal of pharmacology 463, 3-33

QUIGG, M., M. STRAUME, T. SMITH, M. MENAKER u. E. H. BERTRAM (2001):

Seizures induce phase shifts of rat circadian rhythms.

Brain research 913, 165-169

RACINE, R. J. (1972):

Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure.

Electroencephalography and clinical neurophysiology 32. Jg., Nr. 3, S. 281-294.,

RAMOS, A., E. PEREIRA, G. C. MARTINS, T. D. WEHRMEISTER u. G. S. IZIDIO (2008):

Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial.

Behavioural brain research 193, 277-288

RAMOS, S. D., J. M. LEE u. J. D. PEULER (2001):

An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle.

Journal of applied physiology 91, 667-670

RAS., M. VAN DE VEN, E. G. PATTERSON-KANE u. K. NELSON (2002):

Rats' preferences for corn versus wood-based bedding and nesting materials.

Laboratory Animals 36, 420-425

RAWENWAAIJ-ARTS, C.M.A., L. A. A. KALLEE u. J. C. M. HOPMAN (1993):

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability. Standards of measurement, physiologic interpretation, and clinical use.

Intern. Med 118, 436-447

REYNAERT, R., S. MARCUS, M. DE PAEPE u. G. PEETERS (1976):

Influences of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acid levels in cattle.

Hormone and Metabolic Research 8, 109-114

ROCHE (2008):

Creatin Kinase Liquid Reagent.

COBAS INTEGRA 400/800 Product Information, Mannheim: Roche Diagnostics

RODGERS, R. J. u. A. DALVI (1997):

Anxiety, defence and the elevated plus-maze.

Neuroscience and biobehavioral reviews 21, 801-810

ROUX, S., E. SABLE u. R. D. PORSOLT (2005):

Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function.

Current protocols in pharmacology Chapter 10, Unit 10 10

ROWAN, W. H., 3RD, M. J. CAMPEN, L. B. WICHERS u. W. P. WATKINSON (2007):

Heart rate variability in rodents: uses and caveats in toxicological studies.

Cardiovascular toxicology 7, 28-51

RUSSELL, W. M. S. u. R. L. BURCH (1959):

The Principles of Humane Experimental Technique.

Methuen, London

RUTTEN, K., K. SCHIENE, A. ROBENS, A. LEIPELT, T. PASQUALON, S. J. READ u. T. CHRISTOPH (2014):

Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation.

European Journal of Pain 18, 204-212

SAH (2017):

Fear, Anxiety, and the Amygdala.

Neuron 96, 1-2

SANCHEZ (1997):

Acute stress enhances anxiolytic-like drug responses of mice tested in a black and white test box.

European Neuropsychopharmacology 7, 283-288

SARTORIUS, A., R. HELLWEG, J. LITZKE, M. VOGT, C. DORMANN, B. VOLLMAYR, H. DANKER-HOPFE u. P. GASS (2009):

Correlations and discrepancies between serum and brain tissue levels of neurotrophins after electroconvulsive treatment in rats.

Pharmacopsychiatry 42, 270-276

SCHEFFER, I. E., S. BERKOVIC, G. CAPOVILLA, M. B. CONNOLLY, J. FRENCH, L. GUILHOTO, E. HIRSCH, S. JAIN, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. R. NORDLI, E. PERUCCA, T. TOMSON, S. WIEBE, Y. H. ZHANG u. S. M. ZUBERI (2017):

ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.

Epilepsia 58, 512-521

SCHMIDT (2011):

Concepts of animal welfare in relation to positions in animal ethics.

Acta biotheoretica 59, 153-171

SCORRANO, F., J. CARRASCO, J. PASTOR-CIURANA, X. BELDA, A. RAMI-BASTANTE, M. L. BACCI u. A. ARMARIO (2015):

Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker.

The FASEB Journal 29, 859-867

SELYE (1936a):

A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents.

Nature 138, 32-32

SELYE (1936b):

A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936.

The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences 10, 230-231

SELYE u. FORTIER (1950):

Adaptive reaction to stress.

Psychosomatic medicine 12, 149-157

SEO, J., S. JUNG, S. Y. LEE, H. YANG, B. S. KIM, J. CHOI, M. BANG, H. S. SHIN u. D. JEON (2013):

Early deficits in social behavior and cortical rhythms in pilocarpine-induced mouse model of temporal lobe epilepsy.

Experimental Neurology 241, 38-44

SHARMA, S., S. CARLSON, S. PUTTACHARY, S. SARKAR, L. SHOWMAN, M. PUTRA, A. G. KANTHASAMY u. T. THIPPESWAMY (2018):

Role of the Fyn-PKCdelta signaling in SE-induced neuroinflammation and epileptogenesis in experimental models of temporal lobe epilepsy.

Neurobiology of Disease 110, 102-121

SHIHAB, N., J. BOWEN u. H. A. VOLK (2011):

Behavioral changes in dogs associated with the development of idiopathic epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 21, 160-167

SILBERNAGL, S. u. A. DESPOPOULOS (2012):

Taschenatlas Physiologie.

Thieme, Ludwigsburg

SILVERMAN, A. P. (1966):

The social behaviour of laboratory rats and the action of chlorpromazine and other drugs.

Behaviour 27, 1-38

SILVERMAN, J. L., M. YANG, C. LORD u. J. N. CRAWLEY (2010):

Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism.

Nature Reviews Neuroscience 11, 490-502

SIMANI, L., M. ELMI u. M. ASADOLLAHI (2018):

Serum GFAP level: A novel adjunctive diagnostic test in differentiate epileptic seizures from psychogenic attacks.

Seizure: European Journal of Epilepsy 61, 41-44

SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009):

The seizuring cat. Diagnostic work-up and therapy.

Journal of feline medicine and surgery 11, 385-394

SMITH, G. S., G. L. WALTER u. R. M. WALKER (2013):

Clinical Pathology in Non-Clinical Toxicology Testing.

In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology

Academic Press, Boston, S. 565-594

SMITH, M. A., S. MAKINO, R. KVETNANSKY u. R. M. POST (1995):

Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus.

The Journal of Neuroscience 15, 1768-1777

SOLLARS, P. J. u. G. E. PICKARD (2015):

The Neurobiology of Circadian Rhythms.

Psychiatric Clinics 38, 645-665

SOTOCINAL, S. G., R. E. SORGE, A. ZALOUM, A. H. TUTTLE, L. J. MARTIN, J. S. WIESKOPF, J. C. MAPPLEBECK, P. WEI, S. ZHAN, S. ZHANG, J. J. MCDOUGALL, O. D. KING u. J. S. MOGIL (2011):

The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions.

Molecular pain 7, 55

STALDER, T. u. C. KIRSCHBAUM (2012):



Analysis of cortisol in hair--state of the art and future directions.

Brain, behavior, and immunity 26, 1019-1029

STEIN, P. K., P. P. DOMITROVICH, E. J. LUNDEQUAM, S. P. DUNTLEY, K. E. FREEDLAND u. R. M. CARNEY (2006):

Circadian and ultradian rhythms in heart rate variability.

Biomedizinische Technik 51, 155-158

STEPHAN, F. K. u. I. ZUCKER (1972):

Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions.

Proceedings of the National Academy of Sciences 69, 1583-1586

STRZYZ, P. (2017):

Circadian rhythms: Replication keeps the clock ticking.

Nature Reviews Molecular Cell Biology 18, 468-469

SULEYMANOVA, E. M., M. V. GULYAEV u. K. R. ABBASOVA (2016):

Structural alterations in the rat brain and behavioral impairment after status epilepticus: An MRI study.

Neuroscience 315, 79-90

SYKES, A. V., F. D. BAPTISTA, R. A. GONÇALVES u. J. P. ANDRADE (2012):

Directive 2010/63/EU on animal welfare: a review on the existing scientific knowledge and implications in cephalopod aquaculture research.

Reviews in Aquaculture 4, 142-162

SZEMERE, E. u. H. JOKEIT (2015):

Quality of life is social--towards an improvement of social abilities in patients with epilepsy.

Seizure 26, 12-21

TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY, N. (1996):

{Rawenwaaij-Arts, 1993 #1291}.

Circulation 93, 1043-1065

TAYLOR, S. E. (2016):

Tend and Befriend.

Current Directions in Psychological Science 15, 273-277

TEELING, J. L., L. M. FELTON, R. M. DEACON, C. CUNNINGHAM, J. N. RAWLINS u. V. H. PERRY (2007):

Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines.  
Brain, behavior, and immunity 21, 836-850

THANOS, P. K., S. A. CAVIGELLI, M. MICHAELIDES, D. M. OLVET, U. PATEL, M. N. DIEP u. N. D. VOLKOW (2009):

A non-invasive method for detecting the metabolic stress response in rodents: characterization and disruption of the circadian corticosterone rhythm.

Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca 58, 219-228

THIREAU, J., B. L. ZHANG, D. POISSON u. D. BABUTY (2008):

Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide.  
Experimental physiology 93, 83-94

TIERSCHUTZ-VERSUCHSTIER-VERORDNUNG (2013):

Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren.

TierSchVersV

TIERSCHUTZGESETZ (2006):

Ausfertigungsdatum: 24.07.1972,

TOTH, I. u. I. D. NEUMANN (2013):

Animal models of social avoidance and social fear.  
Cell and tissue research 354, 107-118

TOUMA, C., N. SACHSER, E. MOSTL u. R. PALME (2003):

Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice.

General and comparative endocrinology 130, 267-278

TRIPATHI, S. J., S. CHAKRABORTY, B. N. SRIKUMAR, T. R. RAJU u. B. S. SHANKARANARAYANA RAO (2019):

Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala.

Journal of chemical neuroanatomy 95, 134-145

UNTERBERGER, I., D. GABELIA, M. PRIESCHL, K. CHEA, M. HOFER, B. HOGL, G. LUEF u. B. FRAUSCHER (2015):

Sleep disorders and circadian rhythm in epilepsy revisited: a prospective controlled study.

Sleep Medicine 16, 237-242

VADNIE, C. A. u. C. A. MCCLUNG (2017):

Circadian Rhythm Disturbances in Mood Disorders: Insights into the Role of the Suprachiasmatic Nucleus.

Neural plasticity 2017,

VAN DEN BUUSE, M., S. A. VAN ACKER, M. FLUTTERT u. E. R. DE KLOET (2001):

Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats.

Psychophysiology 38, 490-499

VAN DIJK, R. M., V. DI LIBERTO, M. BRENDEL, A. M. WALDRON, C. MÖLLER, F. J. GILDEHAUS, B. VON UNGERN-STERNBERG, M. LINDNER, S. ZIEGLER, R. HELLWEG, P. GASS, P. BARTENSTEIN u. H. POTSCHKA (2018):

Imaging biomarkers of behavioral impairments: A pilot micro-positron emission tomographic study in a rat electrical post-status epilepticus model.

Epilepsia

VAN LOO, P. L. u. V. BAUMANS (2004):

The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats.

Laboratory Animals 38, 17-24

VASCONCELOS, M., D. J. STEIN u. R. M. DE ALMEIDA (2015):

Social defeat protocol and relevant biomarkers, implications for stress response physiology, drug abuse, mood disorders and individual stress vulnerability: a systematic review of the last decade.

Trends in psychiatry and psychotherapy 37, 51-66

VITALO, A., J. FRICCHIONE, M. CASALI, Y. BERDICHEVSKY, E. A. HOGE, S. L. RAUCH, F. BERTHIAUME, M. L. YARMUSH, H. BENSON, G. L. FRICCHIONE u. J. B. LEVINE (2009):

Nest making and oxytocin comparably promote wound healing in isolation reared rats.

PLoS One 4, e5523

WAHNSCHAFFE, U. u. W. LOSCHER (1992):

Lack of changes in seizure susceptibility during the estrous cycle in kindled rats.

Epilepsy Research 13, 199-204

WALKER, A., V. RUSSMANN, C. A. DEEG, C. VON TOERNE, K. J. H. KLEINWORT, C. SZOBER, M. L. RETTENBECK, E. L. VON RUDEN, J. GOC, T. ONGERTH, K. BOES, J. D. SALVAMOSER, A. VEZZANI, S. M. HAUCK u. H. POTSCHKA (2016):

Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: Focus on inflammation.

Brain, behavior, and immunity 53, 138-158

WEI, T. (2013):

corrplot: Visualization of a correlation matrix. R package version 0.73.

WICKHAM, H. (2010):

ggplot2: elegant graphics for data analysis.

Journal of Statistical Software 35, 65-88

WILSON, S. J. u. S. BAXENDALE (2014):

The new approach to classification: rethinking cognition and behavior in epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 41, 307-310

WOLF, D. C., L. S. BUENO-JUNIOR, C. LOPES-AGUIAR, R. A. DO VAL DA SILVA, L. KANDRATAVICIUS u. J. P. LEITE (2016):

The frequency of spontaneous seizures in rats correlates with alterations in sensorimotor gating, spatial working memory, and parvalbumin expression throughout limbic regions.

Neuroscience 312, 86-98

WYLLIE, E., H. LUEDERS, C. PIPPENGER u. F. VANLENTE (1985):

Postictal serum creatine kinase in the diagnosis of seizure disorders.

Archives of neurology 42, 123-126

XU, K., Z. LIU, L. WANG, G. WU u. T. LIU (2018):

Influence of hippocampal low-frequency stimulation on GABAA R alpha1, ICER and BDNF expression level in brain tissues of amygdala-kindled drug-resistant temporal lobe epileptic rats.

Brain research 1698, 195-203

ZEHENDNER, C. M., H. J. LUHMANN u. J. W. YANG (2013):

A simple and novel method to monitor breathing and heart rate in awake and urethane-anesthetized newborn rodents.

PLoS One 8, e62628



## X. ANHANG

### 1. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism <sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems <sup>TM</sup> by life technologies, Darmstadt
Accupulser A310C, Stimulus Isolator A365, Battery Charger	Light meter, MS 1300, Voltcraft <sup>®</sup>
Allegra <sup>TM</sup> 6KR Zentrifuge	Beckman Coulter <sup>TM</sup> , Krefeld
Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Beobachtungskäfige (Glasaquarien)	Domes Aquaristik, München, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Cisco Small Business Switch	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Cobas Integra <sup>®</sup> 400 plus System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur <sup>TM</sup> mit Apple-Computer	Becton Dickinson, Heidelberg
EEG-Ableitung (Powerlab 4/30 und 8/30, Animal BioAmp)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EEG-Ableitungs- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München, Deutschland
EEG-Auswertungssoftware Chart 5	ADInstruments, Spechbach, Deutschland
Ein-Kanal-Verstärker 8/30, Animal BioAmp	ADInstruments LTD., Hastings, UK
Feinwaage bis 0,005 g	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Freezmobile 12SL Sentry	VirTis, SP Scientific, Warminster, PA, USA
Gekühlte Mikro-Ultrazentrifuge „SORVALL <sup>®</sup> RC-M150GX“	Sorvall Products L.P., Newton, Conneticut, USA
GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700 (Thermocycler)	Applied Biosystems <sup>TM</sup> by life technologies, Darmstadt
Glaspotter	neoLab <sup>®</sup> , Heidelberg

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Kinematica Homogeniser Polytron® PT10-35	Kinematica, Littau, Schweiz
Kleinschüttler „IKA-VIBRAX-VRX“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Labsystems Fluoroskan II	GMI Inc., MN, USA
Luxmeter	Conrad Electronic SE, Hirschau
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	Heidolph, Schwabach
Matrix 2.0	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Microplate reader	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikro 200 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikro-Ultrazentrifuge M150 GX	Sorvall Products L.P., Newton, CT, USA
Multifuge 3R	Heraeus® by Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Perfusionspumpe	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stimulatoreinheit	World Percision Instruments, Berlin
Switchbox (HSE Type 215E12)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Tierkäfige und Wasserflaschen	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen,
Tischzentrifuge „Rotina 35R“	Fa. Hettlich, Tuttlingen
Transmitter HD-X-02	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Universalschrank UN	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 2. Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
EEG Software (Chart 7 für Windows)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EthoVision, Version 8.5	Noldus, Wageningen, Niederlande
Gen 5 Imager Software	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Graph Pad Prism Version 5.04	GraphPad, San Diego, CA, USA
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Electrocardiogram Analysis Software Module v5.30 NeuroScore™ © Version 3.0 Ponemah® 5.20 und 6.41,	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA

## 3. Lösungen, Medikamente und Substanzen

### Lösungen

#### *Chloralhydrat*

- 720 mg Chloralhydrat
- in 20 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung lösen

#### *0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung, pH 7,6)*

- 45,43 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei)
- 12,48 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O
- In Aqua dest. Lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

#### *0,01 M phosphatgepufferte 0,9 prozentige Kochsalzlösung (pH 7,6)*

- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl zugeben
- Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen



*Paraformaldehyd (8 prozentig)*

- Aqua dest. auf 60 – 70 °C erhitzen (800 ml)
- 80 g Paraformaldehyd hinzugeben
- Tropfenweise 6 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird
- Lösung abkühlen lassen
- mit Aqua. dest. auf 1000 ml auffüllen
- filtrieren

*Paraformaldehyd (4 prozentig)*

- 8-prozentiges Paraformaldehyd (200 ml)
- mit 0,2 M Phosphatpuffer (200 ml) verdünnen

*Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)*

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

*Saccharin-Lösung (0,1 prozentig)*

- 0,1 g Saccharin ≥ 98%
- 100 ml Wasser

*Saccharin-Lösung (0,2 prozentig)*

- 0,2 g Saccharin ≥ 98%
- 100 ml Wasser

*Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (30 prozentig)*

- 6 g Haushaltszucker
- ad 20 ml 0,1 mol Phosphatpuffer

**Medikamente**

<b>Medikament</b>	<b>Hersteller</b>
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1 : 200 000)	JENAPHARM®, Mibe GmbH, Jena
Bupivacain 0,5 %	JENAPHARM®, Mibe GmbH, Jena
Isofluran CP®	cp-pharma, Burgdorf
Marbofloxacin (Marbocyl®)	Vétoquinol, Ravensburg
Meloxicam (Metacam®)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Metamizol (Vetalgin®)	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos

**Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Actril®, cold sterilant	Medivators Inc. Minneapolis, USA
Antiprotease	Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922	Demeditec, Kiel, Deutschland,
Diff-Quick® Schnellfärbeset	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopentan (2-Methylbutan,) in	Honeywell, Offenbach
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharin ≥ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Stickstoff (flüssig)	Linde AG Gases Division, Pullach
Trifluoroacetic acid, 99 %	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt
Zahnzement (Paladur <sup>®</sup> )	Heraeus Kulzer, Hanau

#### 4. Modifizierter Irwin Score

Nummer	Parameter	Score und Beschreibung
1	Körperlage	-2 flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus
		-1 teilweise erhaltener Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen
		0 normale Haltung
		+1 starre oder verkrampfte Haltung (e.g., Opisthotonus)
		+2 Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden
2	Ptosis	0 Augenlider geöffnet
		+1 Augenlider partiell geöffnet
		+2 Augenlider geschlossen
3	Lokomotorische Aktivität	-2 keine Aktivität
		-1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten
		0 normale Aktivität
		+1 erhöhte Aktivität z.T. nicht fließender Bewegungsablauf
		+2 ruheloser Bewegungstyp
4	Berührungsreaktion	-2 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion
		-1 nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion
		0 normale Reaktion auf leichte Berührung
		+1 ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
		+2 Flucht über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisierung auf leichte Berührung
5	Reizbarkeit (Beißverhalten während des <i>Handlings</i> )	0 keine, +1 leichte, +2 deutlich
6	Neugier gegenüber einem präsentierten Objekt (z.B. Stift)	-2 keine Reaktion
		-1 verminderte Neugier
		0 normal, Interesse an präsentiertem Objekt
		+1 ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug
7	Freezing (= Erstarren/ Verharren im Bewegungsablauf)	0 kein Freezing
		+1 leichtes Freezing sichtbar
		+2 deutliches, abruptes Freezing
8	Vokalisation	0 keine Vokalisation
		+1 zeitweise spontan auftretendes leises Piepsen

		+2 häufiger spontan auftretendes stärkeres Piepsen
9	Harnabsatz (während des <i>Handlings</i> )	0 kein Harnabsatz
		+1 vorhanden
10	Kotabsatz (während des <i>Handlings</i> )	0 kein Kotabsatz
		+1 vorhanden
11	Lidreflex	0 normal
		+2 beeinträchtigt
12	Cornealreflex	0 normal
		+2 beeinträchtigt
13	Schreckhaftigkeit	-2 keine Reaktion
		-1 Verzögerte oder weniger Reaktion
		0 normal
		+1 Flucht
		+2 starke Reaktion, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren, Drücken auf dem Boden oder vorübergehendes Einfrieren
14	Beckenhöhe	-1 abgeflacht
		0 normal
		+1 etwas erhöht
15	Schwanzhöhe	-1 nachschleifen des Schwanzes beim Gehen
		0 normale Schwanzposition
		+1 aufgestellter Schwanz (max. 90 ° Winkel) während Ruhe und Aktivitätsperiode, Schwanzschlagen
		+2 Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)
16	Beinrotation (nach außen)	0 nicht vorhanden
		+1 leicht
		+2 deutlich
17	Körpertonus (während des <i>Handling</i> )	-2 völlig schlaff
		-1 reduzierter Tonus
		0 normaler Muskeltonus
		+1 erhöhter Tonus
		+2 steif
18	Bauchdeckenspannung	-1 reduzierter Muskeltonus
		0 normal
		+1 erhöhte Muskelspannung
19	Stellreflex (wenn das Tier kontinuierlich liegt)	-2 nicht vorhanden
		-1 reduziert
		0 keine Änderung
20	Ataxie	0 keine Ataxie
		+1 Koordinationsprobleme beim Laufen
		+2 Verlust der Bewegungskoordination
21	Exophthalmus (Hervortreten des Bulbus aus der Augenhöhle)	0 kein Exophthalmus
		+1 leichter Exophthalmus
		+2 ausgeprägter Exophthalmus
22	Hypersalivation	0 keine Hypersalivation
		+1 vorhanden
23	Tränenfluss	0 kein Tränenfluss

		+2 vorhanden
24	Faeces	-1 kein oder kaum Kot im Käfig
		0 Kotbeschaffenheit und Menge normal
		+1 Kotmenge deutlich erhöht
		+2 fast flüssiger Kot, Durchfall
25	Piloerektion (Aufstellen der Wollhaare)	0 nicht vorhanden
		+2 vorhanden
26	Hautdurchblutung	-2 Schwanz und Pfoten bläulich verfärbt: Zyanose
		-1 fast weiße Ohrmuschel, Pfoten oder Schwänze mit kaum sichtbaren Gefäßen
		0 normale Hautdurchblutung
		+1 Pfoten dunkelrosa, Schwanz stark hellrosa
		+2 Pfoten, Ohrmuschel oder Schwanz rot
27	Atemfrequenz	-2 Schnappatmung, akute Atemnot
		-1 verminderte, unregelmäßige, angespannte Atmung
		0 normale Atmung
		+1 erhöhte Atemfrequenz
		+2 erhöhte Atemfrequenz, aber auch während der Ruheperioden
28	Zittern	0 kein Zittern
		+2 vorhanden
29	Zuckungen	0 keine Zuckungen
		+2 vorhanden
30	Krämpfe	0 keine Krämpfe
		+2 vorhanden
31	Implantatbereich	-2 hochgradige nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
		-1 leichte nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
		0 unauffällige Implantatfläche
		+1 kleine Entzündungen im Implantatbereich
		+2 hochgradige Entzündung im Implantatbereich
32	Stereotypien	0 keine Stereotypien
	(=repetitive Verhaltensmuster)	+2 vorhanden
33	Körpertemperatur	-1 Temperatur von 2 ° C oder mehr gegen die Kontrolle
		0 Temperatur normal
		+1 Temperatur um 2 ° C oder mehr erhöht

## 5. Korrelationsmatrixanalyse

**Tabelle 5.1:** Erläuterungen der Abkürzungen in beiden Korrelationsmatrixanalysen.

Abkürzung in der Korrelationsmatrixanalyse	Bedeutung
Weight_gain	Gewichtszunahme seit Ankunft [g]
Food intake Lat 1-3	Futtermittelverbrauch 1-3 Woche post SE [g]
Food intake Lat 4-6	Futtermittelverbrauch 4-6 Woche post SE [g]
Food intake Behav. 1-3	Futtermittelverbrauch während Verhaltensuntersuchungen [g]
soiling_1w	Verschmutzungsgrad 1 Woche post SE
soiling_2w	Verschmutzungsgrad 2 Wochen post SE
soiling_4w	Verschmutzungsgrad 4 Wochen post SE
soiling_11w	Verschmutzungsgrad 11 Wochen post SE
NB_1w	Nestbauverhalten 1 Woche post SE
NB_2w	Nestbauverhalten 2 Wochen post SE
NB_4w	Nestbauverhalten 4 Wochen post SE
NB_11w	Nestbauverhalten 11 Wochen post SE
BUR_Baseline_weight	Burrowing Baslawert Kies [g]
BUR_Baseline_time	Burrowing Baslawert Latenzzeit [s]
BUR_1w_OP_weight	Burrowing Post-OP-Phase Kies [g]
BUR_1w_OP_time	Burrowing Post-OP-Phase Latenzzeit [s]
BUR_1w_weight	Burrowing Post-Insult-Phase Kies [g]
BUR_1w_time	Burrowing Post-Insult-Phase Latenzzeit [s]
BUR_4w_weight	Burrowing Latenzphase Kies [g]
BUR_4w_time	Burrowing Latenzphase Latenzzeit [s]
BUR_11w_weight	Burrowing chronische Phase Kies [g]
BUR_11w_time	Burrowing chronische Phase Latenzzeit [s]
SI_active	Aktive soziale Interaktion [s]
SI_passive	Passive soziale Interaktion [s]
SI_aggressive	Aggressives Verhalten [s]
SP_percentage	Saccharin-Konsum [%]
OF_distance_moved	Open Field Zurückgelegte Distanz [cm]
OF_rearing	Open Field rearing
Of_immobile_duration	Open Field Immobilität [Frequenz]
OF_center_time	Open Field Zeit in der Mitte [s]
BWB_WB	Black-and-white-Box Zeit in weißer Box [s]
BWB_entries	Black-and-white-Box Übergänge in weiße Box
BWB_stretching	Black-and-white-Box stretching postures
BWB_latency	Black-and-white-Box Latenzzeit schwarze Box [s]
EPM_stretching	Elevated-Plus-Maze stretching postures
EPM_head_dips	Elevated-Plus-Maze head dips
EPM_closed_arms_duration	Elevated-Plus-Maze Zeit in geschlossenen Armen [s]
EPM_open_arms_duration	Elevated-Plus-Maze Zeit in offenen Armen [s]
EPM_open1_3	Elevated-Plus-Maze Zeit in äußeren 1/3 der offenen Arme [s]
Adrenal_glands	Nebennieren [g]
Cort_feces_preOP	FCM [ $\mu\text{g/g}$ ] prä OP

Cort_feces_2d	FCM [ $\mu\text{g/g}$ ] 2 Tage post SE
Cort_feces_1w	FCM [ $\mu\text{g/g}$ ] 1 Woche post SE
Cort_feces_4w	FCM [ $\mu\text{g/g}$ ] 4 Wochen post SE
Cort_feces_11w	FCM [ $\mu\text{g/g}$ ] 11 Wochen post SE
Cort_serum	Coricosteron in Serum [ng/ml]
BDNF	BDNF Serumlevel [pg/ml]
Irwin_early_2d	Irwin-Score 2 Tage post SE
Irwin_early_1w	Irwin-Score 1 Woche post SE
Irwin_latency	Irwin-Score 4 Woche post SE
Irwin_chronic	Irwin-Score 11 Woche post SE
Grimace_early_2d	Grimace-Scale 2 Tage post SE
Grimace_chronic	Grimace-Scale 11 Woche post SE
Seizures_n	Anfallsfrequenz [14. T]
BL_Act_d	Aktivität [cpm] Basalwert Hellphase
BL_Act_n	Aktivität [cpm] Basalwert Dunkelphase
BL_HR_d	HR [bpm] Basalwert Hellphase
BL_HR_n	HR [bpm] Basalwert Dunkelphase
BL_NN-I_d	NN Interval [ms] Basalwert Hellphase
BL_NN-I_n	NN Interval [ms] Basalwert Dunkelphase
BL_NNx_d	NN9 [count] Basalwert Hellphase
BL_NNx_n	NN9 [count] Basalwert Dunkelphase
BL_pNNx_d	pNN9 [%] Basalwert Hellphase
BL_pNNx_n	pNN9 [%] Basalwert Dunkelphase
BL_RMSSD_d	RMSSD [ms] Basalwert Hellphase
BL_RMSSD_n	RMSSD [ms] Basalwert Dunkelphase
BL_SDNN_d	SDNN [ms] Basalwert Hellphase
BL_SDNN_n	SDNN [ms] Basalwert Dunkelphase
1w_Act_d	Aktivität [cpm] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_Act_n	Aktivität [cpm] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_HR_d	HR [bpm] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_HR_n	HR [bpm] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_NN-I_d	NN Interval [ms] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_NN-I_n	NN Interval [ms] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_NNx_d	NN9 [count] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_NNx_n	NN9 [count] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_pNNx_d	pNN9 [%] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_pNNx_n	pNN9 [%] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_RMSSD_d	RMSSD [ms] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_RMSSD_n	RMSSD [ms] Post-Insult-Phase Dunkelphase
1w_SDNN_d	SDNN [ms] Post-Insult-Phase Hellphase
1w_SDNN_n	SDNN [ms] Post-Insult-Phase Dunkelphase
4w_Act_d	Aktivität [cpm] Latenzphase Hellphase
4w_Act_n	Aktivität [cpm] Latenzphase Dunkelphase
4w_HR_d	HR [bpm] Latenzphase Hellphase
4w_HR_n	HR [bpm] Latenzphase Dunkelphase
4w_NN-I_d	NN Interval [ms] Latenzphase Hellphase
4w_NN-I_n	NN Interval [ms] Latenzphase Dunkelphase
4w_NNx_d	NN9 [count] Latenzphase Hellphase



















	1w_NN-1_d	1w_NN-1_n	1w_NNx_d	1w_NNx_n	1w_pNNx_d	1w_pNNx_n	1w_RMSSD_d	1w_RMSSD_n	1w_SDNN_d	1w_SDNN_n	4w_Act_d	4w_Act_n	4w_HR_d	4w_HR_n
Weight_gain	-0,5	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	-0,4	-0,2	0,1	0,8	0,7
Food intake Lat 1-3	-0,6	0,4	-0,1	-0,2	-0,2	-0,3	0,0	-0,2	0,1	-0,6	-0,1	0,1	0,7	0,7
Food intake Lat 4-6	-0,5	0,0	0,4	-0,1	0,3	-0,1	0,3	0,0	0,4	-0,1	0,0	-0,3	0,9	0,9
Food intake Behav. 1-3	-0,3	0,3	0,2	0,0	0,1	0,0	0,3	0,1	0,2	-0,3	-0,2	0,1	0,7	0,6
soiling_1w	0,3	-0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,5	-0,1	-0,3	0,1	-0,1
soiling_2w	0,2	-0,7	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	-0,3	0,2	0,3	0,1	0,0	-0,1
soiling_4w	0,4	-0,5	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,7	0,4	0,5	0,4	0,0	-0,1	0,0
soiling_11w	-0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	-0,1	0,1	-0,3	-0,4	0,2	0,1
NB_1w	0,7	-0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	-0,1	0,4	0,3	0,0	-0,4	-0,4
NB_2w	0,7	-0,6	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	-0,1	0,4	0,3	0,0	-0,4	-0,4
NB_4w	0,3	0,0	-0,4	-0,6	-0,3	-0,5	-0,4	-0,5	0,1	-0,1	-0,2	0,4	-0,3	-0,4
NB_11w	0,4	-0,2	-0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	-0,4	-0,1	-0,7	-0,6
BUR_Baseline_weight	0,0	0,5	0,2	0,0	0,3	0,0	0,3	0,1	0,6	0,1	-0,2	0,1	-0,1	-0,1
BUR_Baseline_time	-0,5	0,4	-0,2	-0,4	-0,1	-0,4	-0,2	-0,4	0,1	-0,3	0,1	0,3	0,2	0,1
BUR_1w_OP_weight	-0,3	0,2	0,1	-0,1	0,2	-0,1	0,0	-0,2	0,3	0,2	0,2	0,0	0,4	0,4
BUR_1w_OP_time	0,6	-0,4	0,3	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,1	0,6	-0,2	-0,2	-0,5	-0,5
BUR_1w_weight	0,8	-0,6	0,4	0,3	0,5	0,3	0,4	0,2	0,2	0,5	0,0	-0,4	-0,5	-0,6
BUR_1w_time	-0,8	0,5	-0,5	-0,5	-0,6	-0,5	-0,5	-0,4	-0,2	-0,6	-0,1	0,3	0,4	0,5
BUR_4w_weight	0,2	0,3	-0,6	-0,2	-0,5	-0,2	-0,5	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	0,3	-0,8	-0,7
BUR_4w_time	-0,8	0,5	-0,2	-0,4	-0,3	-0,4	-0,2	-0,3	0,1	-0,5	-0,1	0,1	0,7	0,7
BUR_11w_weight	0,0	-0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2	-0,3	-0,2
BUR_11w_time	-0,6	0,5	-0,2	-0,2	-0,3	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	-0,3	-0,1	-0,2	0,6	0,6
SI_active	0,7	-0,6	0,3	0,6	0,3	0,6	0,2	0,4	-0,3	0,6	0,4	-0,3	-0,7	-0,7
SI_passive	0,2	-0,3	0,2	0,5	0,1	0,5	0,1	0,5	-0,4	0,2	0,2	0,0	-0,4	-0,4
SI_aggressive	-0,5	0,1	0,2	-0,1	0,1	-0,2	0,2	-0,2	0,2	-0,3	-0,1	-0,2	0,7	0,7
SP_percentage	0,5	-0,7	0,6	0,6	0,7	0,6	0,5	0,4	0,2	0,7	0,5	-0,3	-0,2	-0,2
OF_distance_moved	0,2	-0,3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1	-0,2	0,3	-0,4	-0,3
OF_rearing	0,0	-0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,1	0,0	-0,4	-0,2
Of_immobile_duration	-0,2	0,1	-0,2	0,1	-0,2	0,1	-0,2	0,0	-0,3	-0,1	0,3	-0,2	0,4	0,3
OF_center_time	0,2	0,5	0,1	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5	0,4	-0,2	-0,2	0,2	0,2
BWB_WB	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,0	0,3	0,4	0,6	0,5	-0,1	0,1	0,2
BWB_entries	0,5	-0,1	0,0	0,3	0,1	0,3	-0,1	0,2	0,2	0,6	0,4	-0,2	-0,5	-0,3
BWB_stretching	0,6	-0,4	0,2	0,7	0,3	0,7	0,2	0,6	-0,4	0,6	0,3	0,1	-0,6	-0,6
BWB_latency	-0,5	0,2	0,2	-0,3	0,0	-0,2	0,0	-0,2	0,2	-0,1	-0,1	-0,3	0,9	0,8
EPM_stretching	0,2	-0,5	-0,1	0,1	0,0	0,1	-0,2	-0,1	-0,6	-0,1	0,1	0,2	-0,4	-0,4
EPM_head_dips	-0,2	0,5	-0,2	-0,1	-0,2	0,0	-0,1	0,1	0,1	-0,3	0,0	0,2	0,1	0,2
EPM_closed_arms_duration	-0,1	-0,5	0,1	0,1	0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,3	0,2	0,2	0,1	-0,1	0,0
EPM_open_arms_duration	0,0	0,5	0,0	-0,2	0,0	-0,1	0,1	0,0	0,4	-0,2	-0,1	0,0	0,1	0,1
EPM_open1_3	0,0	0,5	-0,1	-0,2	-0,1	-0,1	0,1	0,0	0,4	-0,2	-0,1	0,0	0,2	0,1
Adrenal_glands	0,0	0,2	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	-0,1	-0,5	0,5	0,3
Cort_feces_preOP	-0,1	-0,1	-0,1	-0,5	-0,2	-0,4	-0,1	-0,4	0,3	0,0	-0,3	-0,4	0,1	0,1
Cort_feces_2d	-0,7	0,4	-0,4	-0,6	-0,6	-0,6	-0,3	-0,5	-0,2	-0,8	-0,3	0,2	0,5	0,5
Cort_feces_1w	0,0	0,0	0,2	-0,3	0,1	-0,3	0,3	-0,2	0,6	-0,2	-0,3	0,1	-0,1	0,0
Cort_feces_4w	-0,4	0,7	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	0,2	0,1	-0,3	-0,4	0,1	0,5	0,4
Cort_feces_11w	-0,6	0,2	0,1	-0,3	0,0	-0,4	-0,1	-0,4	0,2	-0,2	-0,1	-0,3	0,7	0,6
Cort_serum	0,5	0,2	-0,2	0,1	-0,1	0,2	0,0	0,2	-0,2	0,2	-0,1	-0,2	-0,1	-0,3
BDNF	0,5	-0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	-0,3	-0,3	-0,6	-0,6
Irwin_early_2d	-0,8	0,6	-0,5	-0,5	-0,6	-0,5	-0,6	-0,4	-0,2	-0,6	-0,1	0,3	0,6	0,7
Irwin_early_1w	-0,6	0,9	-0,4	-0,4	-0,5	-0,3	-0,3	-0,2	0,0	-0,5	-0,4	0,2	0,5	0,5
Irwin_latency	-0,5	0,6	-0,4	-0,3	-0,4	-0,3	-0,3	-0,1	-0,1	-0,4	-0,3	0,3	0,6	0,5
Irwin_chronic	-0,7	0,6	-0,2	-0,4	-0,3	-0,4	-0,1	-0,3	0,2	-0,6	-0,3	0,1	0,7	0,7
Grimace_early_2d	-0,7	0,7	-0,6	-0,6	-0,6	-0,6	-0,5	-0,4	-0,2	-0,7	-0,4	0,4	0,5	0,5
Grimace_chronic	-0,5	0,1	-0,4	-0,6	-0,4	-0,7	-0,4	-0,5	-0,2	-0,6	-0,3	0,4	0,5	0,5
Seizures_n	0,6	0,2	0,3	-0,1	0,3	0,0	0,6	0,2	0,8	0,0	-0,5	-0,6	0,5	0,0
BL_Act_n	0,1	0,0	-0,4	-0,1	-0,5	-0,1	-0,3	-0,1	-0,5	-0,3	-0,2	0,0	-0,2	-0,2
BL_HR_d	-0,5	-0,6	0,3	-0,1	0,1	-0,1	0,0	-0,1	-0,2	-0,3	0,1	0,2	0,3	0,4





	4wr_NN-1_d	4wr_NN-1_n	4wr_NNx_d	4wr_NNx_n	4wr_pNNx_d	4wr_pNNx_n	4wr_RMSSD_d	4wr_RMSSD_n	4wr_SDNN_d	4wr_SDNN_n	9wr_Act_d	9wr_Act_n	9wr_HR_d	9wr_HR_n
Weight_gain	-0,8	-0,7	-0,2	-0,3	-0,4	-0,2	-0,4	-0,3	-0,6	-0,7	0,3	0,6	0,5	0,7
Food intake Lat 1-3	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,8	-0,7	-0,8	-0,7	-0,9	-1,0	0,1	0,4	0,2	0,3
Food intake Lat 4-6	-0,9	-0,9	-0,2	-0,1	-0,3	-0,1	-0,4	-0,3	-0,5	-0,5	0,4	0,4	0,8	0,9
Food intake Behav. 1-3	-0,7	-0,6	-0,2	-0,2	-0,3	-0,2	-0,3	-0,3	-0,5	-0,6	0,3	0,5	0,5	0,6
soiling_1w	-0,1	0,1	0,7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,1	-0,2	0,5	0,1
soiling_2w	0,0	0,1	0,4	0,7	0,4	0,7	0,4	0,7	0,4	0,4	0,1	0,0	0,3	0,3
soiling_4w	0,1	0,0	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,3	0,5	0,5	-0,2	-0,1	0,2	0,4
soiling_11w	-0,3	-0,1	0,3	-0,1	0,2	-0,1	0,2	-0,1	-0,3	-0,3	0,0	-0,1	0,2	-0,2
NB_1w	0,4	0,4	0,4	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5	-0,2	-0,1	0,0	0,1
NB_2w	0,4	0,4	0,4	0,7	0,5	0,7	0,5	0,7	0,5	0,5	-0,2	-0,1	0,0	0,1
NB_4w	0,3	0,4	0,0	0,4	0,2	0,4	0,3	0,5	0,4	0,5	0,0	-0,1	0,2	-0,1
NB_11w	0,7	0,6	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1	0,4	0,4	-0,2	-0,2	0,3	-0,2
BUR_Baseline_weight	0,1	0,1	0,2	-0,3	0,1	-0,3	0,1	-0,4	0,1	-0,2	-0,3	-0,2	-0,3	-0,5
BUR_Baseline_time	-0,2	-0,1	0,0	-0,4	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	0,2	0,3	-0,4	-0,4
BUR_1w_OP_weight	-0,4	-0,4	0,3	-0,1	0,2	-0,1	0,2	-0,3	0,0	-0,2	0,3	0,2	0,0	0,0
BUR_1w_OP_time	0,5	0,5	0,8	0,6	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7	0,7	0,1	-0,2	0,0	0,0
BUR_1w_weight	0,6	0,6	0,5	0,8	0,7	0,8	0,6	0,8	0,8	0,9	0,1	-0,4	0,3	-0,1
BUR_1w_time	-0,5	-0,5	-0,6	-0,8	-0,7	-0,8	-0,7	-0,8	-0,7	-0,8	-0,1	0,3	-0,3	-0,1
BUR_4w_weight	0,8	0,7	0,0	-0,1	0,1	-0,1	0,2	0,1	0,3	0,3	-0,4	-0,4	-0,7	-0,8
BUR_4w_time	-0,7	-0,7	-0,6	-0,8	-0,7	-0,8	-0,7	-0,9	-0,8	-0,9	0,0	0,3	0,0	0,1
BUR_11w_weight	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,5	0,6	-0,3	-0,4	0,1	0,0
BUR_11w_time	-0,7	-0,6	-0,4	-0,5	-0,5	-0,5	-0,5	-0,5	-0,8	-0,7	0,1	0,3	0,2	0,1
SI_active	0,7	0,7	0,6	0,7	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	0,0	-0,3	-0,3	-0,3
SI_passive	0,3	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,3	0,0	-0,1	-0,4	-0,3
SI_aggressive	-0,7	-0,7	-0,6	-0,6	-0,7	-0,6	-0,7	-0,6	-0,8	-0,8	0,1	0,3	0,4	0,4
SP_percentage	0,3	0,2	0,5	0,6	0,5	0,6	0,4	0,5	0,6	0,6	0,3	0,0	0,0	0,2
OF_distance_moved	0,4	0,3	0,4	0,1	0,3	0,0	0,3	0,1	0,6	0,4	-0,7	-0,5	-0,3	-0,2
OF_rearing	0,4	0,2	0,1	-0,2	0,1	-0,3	0,0	-0,2	0,3	0,2	-0,6	-0,6	-0,4	-0,5
Of_immobile_duration	-0,4	-0,3	-0,3	0,0	-0,3	0,1	-0,3	0,0	-0,5	-0,3	0,7	0,6	0,3	0,4
OF_center_time	-0,2	-0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,2	0,2	0,3	0,1
BWB_WB	-0,1	-0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	0,1	0,0
BWB_entries	0,5	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	-0,1	-0,3	0,0	-0,2
BWB_stretching	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6	0,1	0,0	-0,5	-0,2
BWB_latency	-0,9	-0,8	-0,2	-0,2	-0,3	-0,1	-0,3	-0,2	-0,5	-0,5	0,5	0,4	0,8	0,6
EPM_stretching	0,4	0,4	0,3	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,0	-0,1	-0,5	-0,1
EPM_head_dips	-0,1	-0,2	-0,4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3	-0,4	-0,1	0,1	0,0	-0,2
EPM_closed_arms_duration	0,0	0,0	0,3	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,3	0,0	0,0	-0,2	0,2
EPM_open_arms_duration	-0,1	-0,1	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	-0,4	-0,3	-0,3	-0,4	-0,1	0,0	0,1	-0,2
EPM_open1_3	-0,1	-0,1	-0,4	-0,4	-0,5	-0,3	-0,4	-0,3	-0,3	-0,4	-0,1	0,0	0,2	-0,1
Adrenal_glands	-0,4	-0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,1	0,2	-0,2	0,0	0,3	0,1	0,8	0,2
Cort_feces_preOP	-0,1	-0,1	-0,3	-0,1	-0,3	-0,1	-0,3	0,0	-0,1	0,2	0,0	-0,3	0,5	0,2
Cort_feces_2d	-0,5	-0,5	-0,7	-0,8	-0,8	-0,7	-0,8	-0,6	-0,7	-0,7	0,0	0,2	0,2	0,1
Cort_feces_1w	0,1	0,0	-0,3	-0,5	-0,4	-0,5	-0,4	-0,4	0,0	-0,1	-0,8	-0,6	0,1	-0,3
Cort_feces_4w	-0,5	-0,4	-0,2	-0,5	-0,3	-0,5	-0,3	-0,6	-0,6	-0,7	0,1	0,4	0,3	0,3
Cort_feces_11w	-0,6	-0,6	-0,3	-0,5	-0,4	-0,4	-0,4	-0,5	-0,6	-0,6	0,1	0,1	0,3	0,0
Cort_serum	0,2	0,3	0,1	0,5	0,2	0,6	0,3	0,5	0,0	0,2	0,3	0,0	0,3	-0,1
BDNF	0,6	0,6	0,6	0,3	0,6	0,2	0,6	0,3	0,7	0,6	-0,5	-0,7	-0,2	-0,5
Irwin_early_2d	-0,6	-0,7	-0,6	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	-0,7	0,0	0,4	0,0	0,1
Irwin_early_1w	-0,5	-0,5	-0,5	-0,7	-0,6	-0,6	-0,5	-0,6	-0,7	-0,7	0,0	0,3	0,2	0,0
Irwin_latency	-0,6	-0,5	-0,2	-0,3	-0,3	-0,2	-0,2	-0,3	-0,5	-0,6	0,3	0,6	0,2	0,4
Irwin_chronic	-0,8	-0,7	-0,6	-0,7	-0,8	-0,7	-0,7	-0,7	-0,9	-0,9	0,1	0,4	0,3	0,3
Grimace_early_2d	-0,5	-0,5	-0,5	-0,6	-0,6	-0,5	-0,5	-0,5	-0,6	-0,7	0,1	0,4	0,0	0,2
Grimace_chronic	-0,5	-0,5	-0,3	-0,1	-0,3	0,0	-0,3	0,0	-0,3	-0,3	0,4	0,6	0,2	0,7
Seizures_n	-0,5	0,0	-0,1	0,2	-0,1	0,2	-0,1	0,1	-0,5	-0,5	0,2	0,0	0,8	0,6
BL_Act_n	0,2	0,2	-0,4	0,1	-0,2	0,1	-0,2	0,2	-0,2	0,0	-0,2	-0,3	0,2	0,0
BL_HR_d	-0,3	-0,4	-0,2	-0,1	-0,3	-0,2	-0,3	-0,1	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	0,2	0,5



	9w_NN-1_d	9w_NN-1_n	9w_NNx_d	9w_NNx_n	9w_pNNx_d	9w_pNNx_n	9w_RMSSD_d	9w_RMSSD_n	9w_SDNN_d	9w_SDNN_n
Weight_gain	-0,5	-0,7	-0,1	0,3	-0,2	0,3	0,4	0,3	-0,4	-0,4
Food intake Lat 1-3	-0,3	-0,3	-0,2	-0,3	-0,2	-0,3	-0,2	-0,3	-0,7	-0,7
Food intake Lat 4-6	-0,8	-0,9	-0,2	0,0	-0,3	0,0	0,1	0,1	-0,1	-0,2
Food intake Behav. 1-3	-0,5	-0,6	-0,2	0,3	-0,3	0,3	0,3	0,3	-0,3	-0,3
soiling_1w	-0,4	-0,1	0,1	0,5	0,0	0,5	0,4	0,5	0,3	0,4
soiling_2w	-0,2	-0,4	0,4	0,7	0,3	0,7	0,7	0,6	0,1	0,3
soiling_4w	-0,2	-0,5	-0,1	0,2	-0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,5
soiling_11w	-0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	-0,1	-0,1
NB_1w	0,2	-0,2	0,1	0,5	0,1	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3
NB_2w	0,2	-0,2	0,1	0,5	0,1	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3
NB_4w	-0,1	0,2	-0,2	0,2	-0,2	0,2	-0,2	0,2	0,1	0,1
NB_11w	0,3	0,2	-0,5	-0,3	-0,5	-0,3	-0,2	-0,3	0,3	0,3
BUR_Baseline_weight	0,3	0,5	-0,5	-0,2	-0,5	-0,2	-0,2	-0,2	0,3	0,4
BUR_Baseline_time	0,3	0,4	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	0,2	0,1
BUR_1w_OP_weight	0,0	0,0	0,0	-0,1	0,1	-0,1	-0,1	0,0	0,7	0,3
BUR_1w_OP_time	0,0	0,0	-0,2	0,4	-0,2	0,4	0,4	0,4	0,7	0,8
BUR_1w_weight	-0,1	0,1	-0,2	0,4	-0,3	0,4	0,2	0,4	0,3	0,6
BUR_1w_time	0,1	0,1	0,2	-0,5	0,3	-0,5	-0,4	-0,5	-0,3	-0,6
BUR_4w_weight	0,6	0,8	0,3	-0,1	0,2	-0,1	-0,2	-0,2	-0,1	0,1
BUR_4w_time	-0,1	-0,1	-0,1	-0,7	0,0	-0,7	-0,5	-0,6	-0,3	-0,6
BUR_11w_weight	-0,1	0,0	0,3	-0,1	0,2	-0,1	-0,1	-0,1	0,1	0,4
BUR_11w_time	-0,3	-0,1	0,2	-0,4	0,3	-0,4	-0,4	-0,4	-0,4	-0,7
SI_active	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,5
SI_passive	0,3	0,2	0,5	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,2	0,5
SI_aggressive	-0,4	-0,4	-0,3	-0,4	-0,2	-0,4	-0,3	-0,4	-0,3	-0,5
SP_percentage	0,1	-0,3	-0,1	0,3	-0,1	0,3	0,3	0,2	0,5	0,6
OF_distance_moved	0,3	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	-0,1	0,6	0,7
OF_rearing	0,3	0,5	0,2	-0,4	0,2	-0,4	-0,3	-0,5	0,1	0,3
Of_immobile_duration	-0,3	-0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0	0,2	-0,6	-0,6
OF_center_time	-0,2	0,0	-0,4	0,1	-0,5	0,1	-0,1	0,2	0,0	-0,1
BWB_WB	0,0	0,0	0,2	0,3	0,1	0,3	0,0	0,3	0,1	0,2
BWB_entries	0,1	0,2	0,0	-0,1	0,0	-0,1	-0,3	-0,1	0,2	0,2
BWB_stretching	0,6	0,2	0,3	0,6	0,4	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5
BWB_latency	-0,8	-0,5	0,0	0,0	-0,1	0,0	-0,1	0,1	-0,3	-0,4
EPM_stretching	0,5	0,1	0,4	0,4	0,5	0,4	0,6	0,4	0,5	0,3
EPM_head_dips	-0,1	0,2	0,0	0,0	-0,2	0,0	-0,1	-0,1	-0,7	-0,4
EPM_closed_arms_duration	0,1	-0,2	0,4	0,0	0,5	0,0	0,2	0,0	0,6	0,3
EPM_open_arms_duration	-0,1	0,2	-0,5	-0,2	-0,6	-0,2	-0,4	-0,3	-0,6	-0,3
EPM_open1_3	-0,2	0,1	-0,4	-0,2	-0,6	-0,2	-0,4	-0,2	-0,6	-0,4
Adrenal_glands	-0,7	-0,2	-0,1	0,3	-0,2	0,3	0,1	0,3	-0,3	-0,1
Cort_feces_preOP	-0,5	-0,1	-0,3	-0,6	-0,3	-0,6	-0,7	-0,5	-0,2	-0,3
Cort_feces_2d	-0,4	-0,1	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	-0,4	-0,3	-0,6	-0,6
Cort_feces_1w	-0,2	0,3	-0,5	-0,8	-0,5	-0,8	-0,7	-0,8	-0,1	0,0
Cort_feces_4w	-0,3	-0,2	-0,3	0,0	-0,4	0,0	0,1	0,1	-0,3	-0,4
Cort_feces_11w	-0,3	0,0	0,0	-0,5	0,1	-0,5	-0,4	-0,4	-0,2	-0,4
Cort_serum	-0,2	0,1	-0,1	0,4	-0,1	0,4	0,1	0,4	-0,4	-0,3
BDNF	0,2	0,5	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	0,0	-0,1	0,6	0,7
Irwin_early_2d	-0,1	-0,1	0,4	-0,3	0,4	-0,3	-0,3	-0,3	-0,5	-0,7
Irwin_early_1w	-0,2	0,1	0,0	-0,2	0,0	-0,2	-0,2	-0,2	-0,6	-0,7
Irwin_latency	-0,2	-0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	-0,3	-0,5
Irwin_chronic	-0,4	-0,2	-0,2	-0,4	-0,2	-0,4	-0,3	-0,3	-0,6	-0,7
Grimace_early_2d	-0,1	-0,1	0,2	-0,1	0,2	-0,1	0,0	0,0	-0,4	-0,6
Grimace_chronic	-0,2	-0,6	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,0	-0,3
Seizures_n	-0,8	-0,6	-1,0	0,2	-1,0	0,2	-0,2	0,2	-0,4	-0,6
BL_Act_n	-0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	-0,1	0,0	-0,7	-0,7
BL_HR_d	-0,2	-0,6	0,4	-0,1	0,4	-0,1	0,2	-0,1	0,0	0,0



## **XI. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich meinen größten Dank meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für das in mich gesetzte Vertrauen und das überaus spannende Thema dieser Dissertation aussprechen. Die sehr gute Betreuung und die offenen, wissenschaftlichen Diskussionen, die auch innerhalb der Arbeitsgruppe stets von ihr gefördert werden, haben maßgeblich zu meiner Entwicklung beigetragen.

Darüber hinaus bedanke ich mich vielmals bei der DFG-Forschergruppe (DFG - FOR 2591) für den regen wissenschaftlichen Austausch und die finanzielle Unterstützung. Bei unseren Kooperationspartnern Prof. Palme (Vetmed Uni Wien), Prof. Hellweg (Charité Berlin) und Prof. Kirschbaum (Dresden LabService) bedanke ich mich für die Probenanalysen.

Ein ganz großer Dank gilt Dr. Maarten Van Dijk für die fachliche und persönliche Betreuung während meiner Doktorarbeitszeit. Deine positive und konstruktive Art hat mir sehr oft weitergeholfen. Bei Dr. Valentina di Liberto, Dr. Eva-Lotta von Rüden, Dr. Josephine Salvamoser, Dr. Ann-Marie Waldron, Dr. Vera Bierling und Dr. Claudia Pace möchte ich mich für die organisatorische und fachliche Hilfestellung bedanken.

Den technischen Mitarbeitern Sarah Driebusch, Sieglinde Fischlein, Claudia Siegl, Grazyna Langer, Regina Rentsch, Sabine Sass, Isabella Waclawczyk und Andreas Kutschka danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, ohne diese die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen wäre. Danke Sarah für deine stets verlässliche Hilfsbereitschaft bei den Verhaltensuntersuchungen und der dabei entstandenen Freundschaft. Weiterhin möchte ich den Tierpflegern Sabine Vican, Katharina Gabriel und Uwe Birett meinen Dank für die Unterstützung bei der Pflege meiner Tiere aussprechen.

Bei meiner Mitdotorandin Ines Koska möchte ich mich von Herzen für die schöne gemeinsame Doktorandenzeit bedanken. Du hast alle Höhen und Tiefen des Projektes mit mir gemeinsam durchlebt. Dabei hätte ich mir keine bessere Laborpartnerin vorstellen können. Auch meinen Mitdotoranden Dr. Christina Möller, Dr. Fabio Wolf, Nina Miljanović, Martha Nowakowska, Lena Boldt und Verena Buchecker möchte ich für den tollen Zusammenhalt, die Hilfsbereitschaft und die stets gute Stimmung im Doktorandenzimmer danken. Für die Zuarbeit bei der Auswertung meiner Daten geht mein Dank an unsere Studentin Katharina Schönhoff.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und ganz speziell meinen Eltern danken, auf die ich mich jederzeit verlassen kann. Euer Rückhalt hat entscheidend zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen.