

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von  
Epilepsiemodellen:  
Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten**

von

Christina Elisabeth Möller

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

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von  
Epilepsiemodellen:  
Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten**

von

Christina Elisabeth Möller

aus Wiesbaden-Dotzheim

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
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: Prof. Dr. Gerhard Wess  
Priv.-Doz. Dr. Birgit Viertlböck  
Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard  
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Tag der Promotion: 27.07.2018

*Meinen Eltern und meinen Großeltern*

# 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 Bedeutung .....	3
1.2.	Klassifizierung .....	4
1.3.	Relevanz von Tiermodellen in der Epilepsieforschung.....	5
1.3.1.	Amygdala-Kindling-Modell .....	7
1.3.2.	Status-Epilepticus-Modelle .....	9
<b>2.</b>	<b>Belastungseinschätzung in Tierversuchen .....</b>	<b>10</b>
2.1.	Ethik von Tierversuchen .....	10
2.2.	Belastung und Stress.....	13
<b>3.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>16</b>
3.1.	Heimkäfigverhalten.....	17
3.2.	Soziale Interaktion .....	18
3.3.	Grabverhalten.....	19
3.4.	Open-Field.....	20
3.5.	Black-and-White-Box.....	21
3.6.	Elevated-Plus-Maze.....	22
3.7.	Saccharin-Präferenz-Test.....	23
3.8.	Grimace-Scale und Irwin-Score .....	25
<b>4.</b>	<b>Biochemische Parameter .....</b>	<b>26</b>
4.1.	Corticosteron .....	26
4.2.	Oxytocin .....	31
4.3.	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF) .....	32
4.4.	Creatinkinase (CK) .....	34
4.5.	Sexualzyklus.....	34
<b>5.</b>	<b>(Patho-) physiologische Parameter.....</b>	<b>36</b>
5.1.	Zirkadiane Aktivität .....	37
5.2.	Herzfrequenz und Herzratenvariabilität.....	38
<b>III.</b>	<b>ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>43</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>45</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>45</b>

---

<b>2.</b>	<b>Elektrodenimplantation.....</b>	<b>48</b>
<b>3.</b>	<b>Amygdala-Kindling-Modell .....</b>	<b>50</b>
<b>4.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>53</b>
4.1.	Heimkufigverhalten .....	53
4.2.	Social-Interaction-Test.....	55
4.3.	Burrowing-Test .....	55
4.4.	Open-Field.....	56
4.5.	Black-and-White-Box.....	56
4.6.	Elevated-Plus-Maze.....	56
4.7.	Saccharin-Prferenz-Test.....	57
<b>5.</b>	<b>Biochemische Analysen .....</b>	<b>59</b>
5.1.	Analyse von Haarproben .....	59
5.2.	Analyse von Kotproben.....	59
5.3.	Analyse von Serumproben.....	60
5.4.	Bestimmung des Sexualzyklus .....	65
<b>6.</b>	<b>Telemetriemessungen.....</b>	<b>66</b>
6.1.	Transmitterimplantation .....	66
6.2.	Datenaufzeichnung.....	67
6.3.	Datenauswertung .....	69
<b>7.</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>72</b>
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>73</b>
<b>1.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>73</b>
1.1.	Heimkufig- und Grabverhalten .....	73
1.2.	Soziale Interaktion .....	78
1.3.	Lokomotion und angstassoziiertes Verhalten.....	79
1.4.	Prferenzverhalten .....	85
1.5.	Allgemeinbefinden und Korpergewicht.....	85
<b>2.</b>	<b>Biochemische Analysen .....</b>	<b>87</b>
2.1.	Corticosteron .....	87
2.2.	Oxytocin .....	89
2.3.	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF) .....	90
2.4.	Creatinkinase (CK) .....	91
2.5.	Zyklusstand .....	91
<b>3.</b>	<b>Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse .....</b>	<b>93</b>
3.1.	Korrelationsmatrix.....	93

---

3.2.	Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	97
<b>4.</b>	<b>Telemetrische Messungen.....</b>	<b>99</b>
4.1.	Zirkadiane Aktivität .....	99
4.2.	Herzfrequenz (HR).....	104
4.3.	Herzratenvariabilität (HRV) .....	113
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>118</b>
1.	Belastungseinschätzung der Elektrodenimplantation.....	119
2.	Belastungseinschätzung der wiederholten Anfälle .....	124
3.	Schlussfolgerung .....	135
4.	Limitationen und Ausblick.....	136
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>138</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>140</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>140</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>176</b>
1.	Geräte.....	176
2.	Software .....	178
3.	Lösungen, Medikamente und Substanzen.....	178
4.	Modifizierter Irwin Score .....	181
5.	R-Skripte .....	184
5.1.	Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse .....	184
5.2.	Aktivitäts- und Echokardiogrammanalyse .....	186
<b>X.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>191</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	M	Molare Masse
ADD	Nachentladungsdauer ( <i>Afterdischarge duration</i> )	MEZ	Mitteleuropäische Zeit
ADH	Antidiuretisches Hormon	MESZ	Mitteleuropäische Sommerzeit
ADT	Nachentladungsschwelle ( <i>Afterdischarge threshold</i> )	mg	Milligramm
ANOVA	Varianzanalyse	ml	Milliliter
ANS	Autonomes Nervensystem	ms	Millisekunde
ap	Anterio-posterior	n	Stichprobenumfang
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
BLA	Basolaterale Amygdala	nm	Nanometer
bpm	Schläge pro Minute ( <i>beats per minute</i> )	OF	Open-Field
BWB	Black-and-White-Box	OP	Operation
CK	Creatinkinase	p	Signifikanzniveau
CRH	Corticotropin-Releasing- Hormon	PCA	Hauptkomponentenanalyse ( <i>principal component analysis</i> )
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
EEG	Elektroenzephalogramm	r	Korrelationskoeffizient
EKG	Elektrokardiogramm	RR-I	Schlag-zu-Schlag-Intervall
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	RL	Richtlinie
EPM	Elevated-Plus-Maze	rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
FCM	Fäkale Corticosteron- Metaboliten	s.c.	Subkutan
GG	Grundgesetz	SD	Anfallsdauer ( <i>seizure duration</i> )
HC	Hippocampus	SE	Status epilepticus
HPA-Achse	Hypothalamus- Hypophysen-Nebennieren- Achse	SEM	Standardfehler
HR	Herzfrequenz	SS	Anfallsschwere ( <i>seizure severity</i> )
HRV	Herzratenvariabilität	SUDEP	Plötzlicher, unerwarteter Tod bei Epilepsiepatienten ( <i>sudden unexpected death in epilepsy</i> )
i.p.	Intraperitoneal	TierSchG	Tierschutzgesetz
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie	TierSchVers	Tierschutz- Versuchtsierverordnung
IVETF	<i>International Veterinary Epilepsy Task Force</i>	VEV	Versuchtsierverordnung
kS/s	Abtastrate ( <i>kilo samples per second</i> )	ZNS	Zentrales Nervensystem
LC-MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>	3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
		°C	Grad Celsius

## I. EINLEITUNG

Die ethische Rechtfertigung von Tierversuchen nimmt in der heutigen Gesellschaft einen hohen Stellenwert ein. So schreibt die europäische Richtlinie 2010/63/EU und die Tierschutz-Versuchstierverordnung die Einstufung der Belastung jedes Tierversuchs vor. Hierfür ist eine Einschätzung der auf die Versuchstiere einwirkenden modellspezifischen Schmerzen, Leiden und Schäden erforderlich, deren Reduktion im Sinne des 3R-Konzepts von RUSSELL u. BURCH (1959) anzustreben ist. Wissenschaftler sowie Regierungsinstanzen unterliegen der ethischen, moralischen und gesetzlichen Verpflichtung, das Leid der Versuchstiere auf das unerlässliche Maß zu beschränken und die Legitimation eines Versuchs im Rahmen einer Abwägung der Belastung der Tiere gegenüber dem Nutzen für die Forschung zu prüfen (BLAKEMORE et al. 2012; FERDOWSIAN u. GLUCK 2015).

Anfälle treten bei Labortieren sowohl im Rahmen von Epilepsiemodellen als auch in anderen Modellen neurologischer Erkrankungen, genetisch modifizierten Mäusen und präklinischen Studien der Arzneimittelsicherheit auf (WOLFENSOHN et al. 2013; LIDSTER et al. 2016). Epilepsiemodelle sowie Anfälle an sich besitzen das Potenzial, Schmerzen, Leiden und andauernde Schäden bei den Tieren hervorzurufen (LIDSTER et al. 2016). Es ist daher erforderlich, den Einfluss wiederholter Anfälle auf das Wohlbefinden von Labortieren zu untersuchen und geeignete Beurteilungsschemata für eine evidenzbasierte, modellspezifische Belastungseinschätzung zu entwickeln. In den vorliegenden Untersuchungen wird der Einfluss eines der am häufigsten verwendeten Epilepsiemodelle, des Amygdala-Kindling-Modells, auf das Wohlbefinden von Ratten evaluiert. Die Versuchsprozeduren, die wiederkehrenden Anfälle, die Entstehung epileptogener Netzwerkstrukturen sowie der damit verbundene Stress können sich auf die physiologischen Körperfunktionen und das Verhalten der Tiere auswirken (LIDSTER et al. 2016). Eine Analyse der modellspezifischen Veränderungen der Körperfunktionen muss mit Hilfe von evidenzbasierten Parametern erfolgen (BAUMANS 2005). Bereits nachgewiesene epilepsie- und stressassoziierte Komorbiditäten aus der Veterinär- und Humanmedizin stellen dabei die Grundlage für die Auswahl geeigneter Parameter für die Belastungseinstufung in Epilepsiemodellen dar, die nachfolgend in die Routineüberwachung übertragen werden sollen. Die vorliegende Arbeit ist Teil einer nationalen DFG-Forschergruppe (FOR 2591, [www.severity-assessment.de](http://www.severity-assessment.de)), deren Ziel eine Implementierung modellspezifischer Methoden zur Belastungseinschätzung in unterschiedlichen Bereichen der wissenschaftlichen Forschung ist. Im Rahmen dieses Projekts sollen möglichst nicht-invasive Parameter zur Belastungseinschätzung validiert, verbessert und auf Korrelation untersucht werden. Auf der Grundlage valider und

---

standardisierter Methoden kann die Belastung der Labortiere in unterschiedlichen Modellen verglichen, Refinement-Maßnahmen implementiert und eine wissenschaftliche Grundlage für die Durchsetzung rechtlicher Maßnahmen, wie zum Beispiel die Legitimation oder Prohibition eines Modells geschaffen werden. Dadurch wird eine Basis für die ethische vertretbare Durchführung der In-vivo-Forschung bereitgestellt. Zudem kann die Qualität der erhobenen Daten durch eine reduzierte Belastung der Versuchstiere verbessert werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Epilepsien

#### 1.1. Definition und Bedeutung

Epilepsien stellen eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen in der Veterinär- und Humanmedizin dar (PITKÄNEN u. LUKASIUK 2009; HUANG et al. 2015), der unter anderem strukturelle, infektiöse, genetische, immun- oder stoffwechselbedingte Ätiologien zugrunde liegen können (SCHEFFER et al. 2017). Ein epileptischer Anfall entsteht durch synchrone Entladungen von Neuronen im Gehirn, die je nach Anfallsform zu unterschiedlichen unkontrollierbaren Verhaltensweisen oder Bewusstseinsstörungen führen können (FISHER et al. 2005). Die Epilepsieerkrankung wird von der Internationalen Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE) definiert als eine „Erkrankung des Gehirns, charakterisiert durch die andauernde Prädisposition, nicht provozierte Anfälle zu entwickeln, sowie den neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Konsequenzen, die sich daraus ergeben“ (FISHER et al. 2005). Diese Definition wurde 2014 erweitert, um Anfälle klinisch besser differenzieren zu können (FISHER et al. 2014). Demnach liegt eine Epilepsieerkrankung vor, wenn

- 1.) zwei nicht provozierte Anfälle auftreten, die mehr als 24 Stunden auseinanderliegen oder
- 2.) ein nicht provoziertes Anfall auftritt, der mit der Wahrscheinlichkeit einhergeht, weitere Anfälle zu entwickeln oder
- 3.) die Diagnose eines epileptischen Syndroms gestellt wird.

Eine Epilepsieerkrankung gilt als überstanden (*resolved*), wenn die Patienten über mindestens zehn Jahre anfallsfrei blieben und seit mindestens fünf Jahren keine Antiepileptika einnehmen (FISHER et al. 2014).

Weltweit sind derzeit circa 65 Millionen Menschen von Epilepsien betroffenen (THURMAN et al. 2011; MOSHÉ et al. 2015). In hochentwickelten Ländern ist eine Prävalenz von fünf bis acht Erkrankten pro 1000 Einwohnern zu verzeichnen (THURMAN et al. 2011; MOSHÉ et al. 2015). In niedrig entwickelten Ländern sind es zehn bis 15 Betroffene pro 1000 Einwohner (NGUGI et al. 2010). Epilepsien stellen aufgrund des hohen Unfallrisikos bei unvorhersehbaren Anfällen und den psychiatrischen Komorbiditäten eine Belastung für die Betroffenen dar (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008). Weiterhin ist die hohe Prävalenz

der Erkrankung auch mit hohen Kosten für das jeweilige nationale Gesundheitssystem verknüpft (BEHR et al. 2016).

In der Veterinärmedizin gilt ein Patient gemäß der *International Veterinary Epilepsy Task Force* (IVETF) als an Epilepsie erkrankt, wenn zwei nicht provozierte Anfälle auftreten, die mehr als 24 Stunden auseinanderliegen und abgesehen von einer genetischen Prädisposition kein erkennbarer Grund für das Auftreten der Anfälle vorliegt (HULSMAYER et al. 2015). In der Veterinärmedizin sind vor allem Hunde von Epilepsien betroffen (URIARTE u. MAESTRO SAIZ 2016). Die Prävalenz einer Epilepsieerkrankung liegt bei Hunden zwischen 0,5 und 0,75 % (KEARSLEY-FLEET et al. 2013; HESKE et al. 2014), aber auch bei Katzen sind epileptische Anfälle die häufigste Form einer neurologischen Erkrankung (SMITH BAILEY u. DEWEY 2009). Bei bestimmten Hunderassen ist eine Heritabilität bekannt, wobei bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ob ausschließlich dieser Effekt für die Entstehung verantwortlich ist oder es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt (BERENDT et al. 2015).

## 1.2. Klassifizierung

Da sich das Verständnis der Pathophysiologie der Epilepsien fortwährend weiterentwickelt, sind seit der ersten Klassifizierung von Epilepsien durch die ILAE (1985) entsprechende Anpassungen notwendig geworden. Zuletzt wurde die Einteilung der ILAE 2017 überarbeitet, um Epilepsien auf klinisch relevanter Basis unter der Einbeziehung von zusätzlichen Daten, wie zum Beispiel Elektroenzephalogramm (EEG)-Messungen, zu klassifizieren. Die Klassifikation der Epilepsien findet dabei auf mehreren Ebenen statt (SCHEFFER et al. 2017). Zunächst wird der Anfallstyp in einen fokalen, generalisierten oder unbekanntem Anfallsbeginn eingeteilt (SCHEFFER et al. 2017). Im zweiten Schritt wird der Epilepsietyp bestimmt, was voraussetzt, dass bei dem Patienten eine Epilepsie nach oben beschriebenen Bedingungen vorliegt (SCHEFFER et al. 2017). Hierbei wird zwischen vier Epilepsietypen unterschieden: fokal, generalisiert, kombiniert generalisiert und fokal, unbekannt. Für diese Einteilung sind meist weitere Untersuchungen wie EEG-Messungen oder der Einsatz bildgebender Verfahren notwendig (SCHEFFER et al. 2017). Auf Grundlage der erhobenen Daten sowie weiterer Informationen, wie zum Beispiel das Alter bei Beginn der Anfälle, wird im dritten Schritt die Diagnose des Epilepsie-Syndroms gestellt (SCHEFFER et al. 2017). Gemäß der ILAE wird momentan zwischen 31 unterschiedlichen Epilepsie-Syndromen unterschieden (SCHEFFER et al. 2017). Es kann allerdings vorkommen, dass keine Zuteilung zu einem bekannten Syndrom möglich ist.

Die Einteilung der Epilepsien in fokal und generalisiert beruht auf der Lokalisation des für den Anfall ursächlichen Netzwerks im Gehirn. Dieses Netzwerk kann sich auf ein

bestimmtes Areal in einer Hemisphäre beschränken und fokale Anfälle verschiedener Ausprägung hervorrufen, wie zum Beispiel motorische fokale Anfälle, die sich durch unkontrollierte Bewegungen einer Gliedmaße manifestieren können (BERG et al. 2010). Dehnt sich das epileptische Netzwerk über beide Hemisphären aus, kommt es zu generalisierten Anfällen, die den gesamten Körper betreffen. Häufig entwickeln sich aus primär fokalen Anfällen durch eine Ausweitung des epileptischen neuronalen Netzwerks sekundär generalisierte Anfälle (BERG et al. 2010). Diese Einteilung wird sowohl in der Veterinär- (BERENDT et al. 2015) als auch in der Humanmedizin (BERG et al. 2010) vorgenommen. Die IVETF teilt fokale Anfälle in motorische und autonome Anfälle, sowie in Anfälle mit Verhaltensänderungen ein (BERENDT et al. 2015). Generalisierte Anfälle manifestieren sich bei Hund und Katze in der Regel als tonische, klonische, tonisch-klonische oder myoklonische bilaterale motorische Aktivität (BERENDT et al. 2015). Neben der Klassifikation des Anfallstyps in fokal und generalisiert wird in der Veterinärmedizin eine Einteilung nach der Krankheitsätiologie vorgenommen (BERENDT et al. 2015). Demnach kann zwischen idiopathischer und struktureller Ätiologie unterschieden werden (BERENDT et al. 2015). Die idiopathischen Epilepsien werden weiterhin in genetische Epilepsien, vermutete genetische Epilepsien und Epilepsien unbekannter Genese eingeteilt (BERENDT et al. 2015). Strukturelle Ursachen umfassen unter anderem Inflammation, Trauma und Neoplasien (BERENDT et al. 2015).

### 1.3. Relevanz von Tiermodellen in der Epilepsieforschung

Bei den in der Epilepsieforschung verwendeten Tiermodellen wird zwischen akuten und chronischen Tiermodellen unterschieden. In den akuten Modellen wird entweder elektrisch (Maximal-Elektroschock-Test) oder chemisch (Pentylentetrazol) ein epileptischer Anfall induziert (LÖSCHER u. SCHMIDT 1994; LÖSCHER 2002a). In den chronischen Modellen wird die Entstehung eines epileptogenen neuronalen Netzwerks entweder elektrisch, chemisch oder genetisch bedingt, was in den meisten Modellen zu spontanen epileptischen Anfällen führt (LÖSCHER 2002a). Im Vergleich zu den Modellen, welche in der Erforschung anderer neurologischer Erkrankungen zum Einsatz kommen, besitzen Epilepsiemodelle eine hohe Validität (PERUCCA et al. 2007; LÖSCHER et al. 2013). Aus bisherigen Studien ist bekannt, dass die chronischen Epilepsiemodelle im Vergleich zu den akuten Modellen eine höhere prädiktive Validität aufweisen (LÖSCHER 2002a). Der Einsatz akuter Modelle in der Arzneimittelentwicklung hat in der Vergangenheit häufig zu falsch positiven Ergebnissen geführt (LÖSCHER 2002a). Es existieren drei Kriterien, mit deren Hilfe die Validität eines Tiermodells bezüglich der Übertragbarkeit auf Humanpatienten beurteilt werden kann. Dabei wird die Ähnlichkeit von Tiermodell und Humanpatienten hinsichtlich der Verhaltensweisen (*face validity*), der Krankheitsätiologie und -pathologie (*construct*

*validity*) und dem Ansprechen auf eine Behandlung (*predictive validity*) bewertet (CAMPOS et al. 2013; VERVLIET u. RAES 2013; GRONE u. BARABAN 2015).

Die aktuell verfügbaren Antiepileptika wurden durch den Einsatz von verschiedenen Tiermodellen entwickelt und tragen maßgeblich zum Therapiefortschritt bei der Behandlung von Epilepsien bei (BIALER u. WHITE 2010; LÖSCHER u. SCHMIDT 2011; LÖSCHER 2017). Seit der Entdeckung des ersten Antiepileptikums Kaliumbromid 1857 hat die kontinuierliche Verwendung von Tiermodellen bereits zur Entwicklung von drei Generationen von Antiepileptika beigetragen (LÖSCHER u. SCHMIDT 2011; LÖSCHER 2017). Allerdings dürfen Tiermodelle immer nur als eine Annäherung an die beim Menschen vorliegenden, sehr heterogenen krankheitsbedingten Veränderungen verstanden werden (CAMPOS et al. 2013). Daher existiert kein Epilepsiemodell, das die Krankheit in vollem Ausmaß widerspiegelt (GRONE u. BARABAN 2015). Trotz der bestehenden Therapieoptionen kann sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin bei ungefähr 30 % der Epilepsiepatienten keine Anfallsfreiheit erreicht werden (POTSCHKA u. BRODIE 2012; PACKER et al. 2014). Weiterhin besteht derzeit noch keine therapeutische Möglichkeit in den Prozess der Epileptogenese, das heißt in die Ausweitung des epileptogenen neuronalen Netzwerks nach einem initialen Insult, einzugreifen (GALANOPOULOU et al. 2012; PITKÄNEN et al. 2015). Die Entwicklung neuer Antiepileptika ist nicht nur durch das Screening biochemischer Datenbanken und die Verwendung von In-vitro-Modellen zu erreichen (ROGAWSKI 2006). Voraussetzung für die Entwicklung eines neuen antikonvulsiven Medikaments ist die Kenntnis über das Zusammenspiel von biomolekularen, kinetischen und energetischen Faktoren der Anfallsentstehung (ROGAWSKI 2006). Dieses Wissen ist zum momentanen Zeitpunkt noch begrenzt, weshalb es notwendig ist, neue Zielstrukturen und Biomarker der Epileptogenese mit Hilfe von Tiermodellen zu identifizieren (ROGAWSKI 2006; KOBOW et al. 2012). Auf diese Weise können physiologische Vorgänge im Gehirn unter der Berücksichtigung verschiedener relevanter Faktoren der Epileptogenese wiedergegeben werden. Nachfolgend ist es möglich, diese Zielstrukturen in in-vitro Modellen weitergehend zu evaluieren (ROGAWSKI 2006). Die mit Hilfe von Tiermodellen neu identifizierten Strukturen geben Hinweise auf mögliche Zielstrukturen für die Modulation der Epileptogenese (PITKÄNEN et al. 2015; KECK et al. 2017).

Das Leben der Betroffenen wird durch eine Epilepsieerkrankung nachhaltig verändert und beeinflusst in hohem Maße deren Lebensqualität, vor allem bei Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie (BOYLAN et al. 2004). Häufig sind das hohe Unfallrisiko, welches sich aus den unvorhersehbaren Anfällen ergibt und die psychiatrischen Komorbiditäten für die herabgesetzte Lebensqualität verantwortlich (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008; BEGHI 2009; BEHR et al. 2016; KANNER 2017). Das Wissen über einen

jederzeit möglichen plötzlichen, unerwarteten Tod (*sudden unexpected death in epilepsy*, SUDEP), der die häufigste Todesursache von Epilepsiepatienten darstellt, trägt zusätzlich zu einer reduzierten Lebensqualität bei und stellt eine Ursache der Sorgen und Depressionen der Betroffenen und Angehörigen dar (MAGUIRE et al. 2016). Auch in der Veterinärmedizin ist bekannt, dass Epilepsien die Lebensqualität von Hunden negativ beeinflussen können (PACKER u. VOLK 2015). Hierbei stellen insbesondere die Nebenwirkungen der Antiepileptika Gründe für eine herabgesetzte Lebensqualität dar (ZIMMERMANN et al. 2009). Die Belastung von Versuchstieren in der Epilepsieforschung ergibt sich sowohl durch das Auftreten der Anfälle als auch durch modellspezifische Methoden zu Anfallsinduktion und -monitoring, Haltungsbedingungen (Einzelhaltung der Tiere) sowie psychiatrische Komorbiditäten (LIDSTER et al. 2016). Aufgrund des anhaltenden Bedarfs der Tiermodelle in der Epilepsieforschung ist es unabdingbar, deren Verwendung kritisch zu diskutieren (LIDSTER et al. 2016). In diesem Zusammenhang ist die Entwicklung von Orientierungshilfen für eine Belastungseinstufung, die eine ethisch vertretbare Verhältnismäßigkeit zwischen dem Leiden der Tiere und dem Nutzen für den wissenschaftlichen Fortschritt ermöglichen, essentiell (BOUT et al. 2014; LIDSTER et al. 2016). Bei der Auswahl eines Tiermodells sollte nicht nur die wissenschaftliche Fragestellung, sondern auch das Tierwohl in Betracht gezogen werden (GRONE u. BARABAN 2015).

### 1.3.1. Amygdala-Kindling-Modell

Das Amygdala-Kindling-Modell ist eines der am häufigsten genutzten Tiermodelle der Temporallappenepilepsie (KANDRATAVICIUS et al. 2014). Diese Form der Epilepsie zeichnet sich häufig durch ein Übergreifen der Anfälle auf benachbarte Gehirnregionen sowie neuronalen Zellverlust im limbischen System aus (KANDRATAVICIUS et al. 2014). In Analogie zur Temporallappenepilepsie beziehungsweise limbischen Epilepsie des Menschen befindet sich die Lokalisation der initialen Anfallsaktivität im Amygdala-Kindling-Modell im limbischen System. Dies geschieht mit Hilfe unilateraler in die basolaterale Amygdala implantierte Elektroden, über die durch wiederholte elektrische Impulse Anfälle ausgelöst werden (SATO et al. 1990; BERTRAM 2007). Anders als bei den Status-Epilepticus-Modellen zeigen die Tiere ohne diese tägliche Stimulation in der Regel keine spontanen Anfälle. Allerdings induzieren die wiederholten Anfälle eine progressive Übererregbarkeit des Gehirns gegenüber elektrischen Stimuli (SATO et al. 1990; LÖSCHER 2017). Das Kindling-Protokoll kann je nach wissenschaftlicher Fragestellung durch eine Veränderung der Stimulationsparameter Intensität, Frequenz und Inter-Stimulus-Intervall angepasst werden (MORALES et al. 2014). Je nach Auswahl der Parameter wird das Modell als „*slow*“ (GODDARD 1967; RACINE 1972) oder „*rapid*“ (GILBERT u. CAIN 1981; MORALES et al. 2014) Kindling bezeichnet.



Zum ersten Mal wurde das Amygdala-Kindling-Modell von GODDARD et al. (1969) beschrieben, nachdem zuvor bereits die Stimulation des limbischen Systems sowie subkortikaler Kerne bei Ratten und Katzen zum Auslösen epileptischer Anfälle genutzt wurde (DELGADO u. SEVILLANO 1961; GODDARD 1967). Die auftretenden Anfälle wurden von RACINE (1972) in verschiedene Stadien eingeteilt: 1.) Immobilität und schwacher Fazialklonus, 2.) Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen), 3.) Unilateraler Vorderextremitätenklonus, 4.) Bilateraler Vorderextremitätenklonus mit Aufrichten und 5.) Aufrichten und Verlust der Stellreflexe (Hintenüberfallen). Das Amygdala-Kindling-Modell zeichnet sich zu Beginn durch fokale Anfälle (Stadium 1 bis 3) aus, die im weiteren Verlauf in generalisierte Anfälle (Stadium 4 und 5) übergehen (GODDARD 1983). Diese Progression der Anfallsstadien im Verlauf des Kindling-Prozesses deutet darauf hin, dass durch die täglichen Stimulationen eine Netzwerkentstehung ausgehend von dem initialen Insult in der basolateralen Amygdala ausgelöst wird (BERTRAM 2007). Dabei ist es wahrscheinlich, dass jeder Anfall die Entstehung eines darauffolgenden, komplexeren Anfalls begünstigt, indem weitere Gehirnregionen in das neuronale Netzwerk mit einbezogen werden (BERTRAM 2007). Weiterhin weist das Amygdala-Kindling-Modell eine hohe Reproduzierbarkeit molekularer Veränderungen von epileptogenen Schaltkreisen auf (KANDRATAVICIUS et al. 2014). Demzufolge eignet sich dieses Tiermodell dazu, die in den Prozess der Epileptogenese involvierten Schaltkreise näher zu untersuchen und Gehirnregionen zu lokalisieren, in denen Anfälle vermehrt entstehen können (KANDRATAVICIUS et al. 2014). Ferner besitzt das Amygdala-Kindling-Modell eine hohe Prädiktivität in Bezug auf die Verhaltensweisen (*face validity*) sowie die Arzneimittelwirksamkeit (*predictive validity*) beim Humanpatienten (LÖSCHER 2002b, 2017). Allerdings müssen auch die Limitationen des Modells in Betracht gezogen werden. Denn im Gegensatz zu den spontan auftretenden epileptischen Anfällen bei Humanpatienten ist im Amygdala-Kindling-Modell eine Stimulation für das Auslösen eines Anfalls notwendig (LÖSCHER u. BRANDT 2010). Demzufolge kann das Amygdala-Kindling-Modell nur bedingt als Modell der humanen Epileptogenese angesehen werden (LÖSCHER 2017). Des Weiteren spiegelt das Amygdala-Kindling-Modell nicht die unterschiedlichen Ätiologien wie Traumata oder Inflammationen und nicht alle neuropathologischen Merkmale einer humanen Temporallappenepilepsie wieder (*construct validity*) (TUUNANEN u. PITKÄNEN 2000; LÖSCHER 2002a). Das Amygdala-Kindling-Modell wird insbesondere verwendet, um gezielt Angriffsstrukturen für neue Antiepileptika zu identifizieren, und kann weniger in großen präklinischen *Screenings* eingesetzt werden, da die erforderliche Durchsatzrate aufgrund des hohen zeitlichen Zeitaufwands dieses Modells nicht umzusetzen ist (LÖSCHER u. SCHMIDT 2011). Die Belastung der Versuchstiere ergibt sich beim Amygdala-Kindling-Modell aus der notwendigen Elektrodenimplantation, die mit dem Kindling verknüpften experimentellen Prozeduren

(*Handling*, Transport, Kabelableitung) und die Induktion der Anfälle selbst (LIDSTER et al. 2016).

### 1.3.2. Status-Epilepticus-Modelle

Weitere häufig in der Epilepsieforschung eingesetzte Tiermodelle stellen die Status-Epilepticus-Modelle dar. Hierbei wird entweder durch die Applikation einer chemischen Substanz (Pilocarpin oder Kainat) oder durch die elektrische Überstimulation einer definierten Gehirnregion ein Status epilepticus induziert (LÖSCHER 2002a). Durch diesen epileptogenen Insult treten nach einer Latenzperiode wiederkehrende spontane Anfälle sowie sichtbare Verhaltensänderungen auf (LÖSCHER 2002a; GRONE u. BARABAN 2015). Versuchstiere, die ein Status-Epilepticus-Modell durchlaufen haben, weisen ähnliche neuropathologische Merkmale wie Menschen mit Temporallappenepilepsie auf (*construct validity*) (LÖSCHER 2002a; BERTRAM 2007). Die Status-Epilepticus-Modelle weisen allerdings im Vergleich zum Amygdala-Kindling-Modell eine deutlich höhere Variabilität und Mortalität auf. Dies kommt durch die unterschiedliche Dauer und Schwere des Status epilepticus sowie der darauffolgenden spontanen epileptischen Anfälle zustande (LIDSTER et al. 2016). Die erhöhte Mortalität von bis zu 60 % der Tiere ist bedingt durch perakute Todesfälle während des Status epilepticus sowie das hochgradig gestörte Allgemeinbefinden der Tiere nach dem Status epilepticus (LIDSTER et al. 2016). Durch eine verbesserte medizinische Versorgung der Tiere nach dem Status epilepticus, die Anpassung der verwendeten Dosierungen und durch orale oder subkutane Flüssigkeits- und Futterzufuhr kann die Mortalität zwar vermindert werden, bleibt aber trotzdem deutlich höher als im Kindling-Modell (CURIA et al. 2008).

## 2. Belastungseinschätzung in Tierversuchen

### 2.1. Ethik von Tierversuchen

Die Notwendigkeit von Versuchstieren in der biomedizinischen Forschung wird seit deren erster Verwendung kritisch diskutiert. Die Frage, ob ein Tier dem Menschen moralisch gleich oder zumindest ähnlich gestellt sein kann, ist Thema zahlreicher wissenschaftlicher Abhandlungen (FESTING u. WILKINSON 2007; FOEX 2007; FERDOWSIAN u. GLUCK 2015). Im deutschen Tierschutzgesetz ist in § 1 festgehalten: „Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“ (§ 1, TierSchG, 2006<sup>1</sup>). Die Definition des vernünftigen Grundes wird hierbei offengelassen. Den Tieren wird jedoch eine Leidensfähigkeit zugestanden, aufgrund derer sie moralischer Rücksichtnahme bedürfen. Die Möglichkeit, den Tieren mit einem vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zuzufügen, impliziert allerdings eine moralische Sonderstellung des Menschen gegenüber den Tieren, in deren Ausmaß der Mensch die Entscheidungsgewalt über ihr Wohlergehen besitzt. Diese Entscheidungsgewalt muss eingesetzt werden, um die Tierversuche, die zum momentanen Zeitpunkt für den wissenschaftlichen Fortschritt notwendig sind, auf ein vernünftiges Maß zu reduzieren (*reduce*), durch andere Methoden zu ersetzen (*replace*) und die Leiden der Versuchstiere zu minimieren (*refine*) (RUSSELL u. BURCH 1959). Die Umsetzung dieses sogenannten 3R-Prinzips ist auch sinngemäß im deutschen Tierschutzgesetz verankert (§ 7 Abs. 1 Nr. 1, TierSchG, 2006<sup>2</sup>). Darin heißt es, dass die Schmerzen, Leiden und Schäden der verwendeten Tiere auf das unerlässliche Maß zu beschränken sind. Da die Auswirkungen eines Versuches nicht bei jeder Tierspezies gleich sind, wird hier nochmals auf die artspezifische Fähigkeit der verwendeten Tiere, unter den Versuchseinwirkungen zu leiden, besonders betont. Demnach ist es auch erforderlich, artspezifische Verhaltensweisen als Grundlage für die Belastungseinschätzung zu analysieren. Dem Grundsatz der Verhältnismäßigkeit folgend müssen Tierversuche, einen von „der Allgemeinheit legitimierten Zweck verfolgen und überdies geeignet, erforderlich und verhältnismäßig“ sein (BORCHERS u. LUY 2009). Eine Anleitung für die aktive Umsetzung des 3R-Prinzips liefert das National Research Council im „Guide for the care and use of laboratory animals“ (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2010). Dies soll für Wissenschaftler und Behörden eine Hilfestellung bei der Durchführung und Beurteilung der

---

<sup>1</sup> § 1, Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 141 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist.

<sup>2</sup> § 7 Abs. 1 Nr. 1, Tierschutzgesetz, 2006 (Fn. 1)

Versuche nach wissenschaftlichen und ethischen Prinzipien darstellen.

Seit 2002 ist der Schutz der Tiere auch im deutschen Grundgesetz niedergeschrieben (Art. 20a, GG, 1949<sup>3</sup>). Demzufolge ist es notwendig geworden, Tierversuchsanträge einer grundlegenden Prüfung zu unterziehen, da der Tierschutz der Forschungsfreiheit nun rangmäßig gleichgestellt ist (BORCHERS u. LUY 2009). Es ist die Pflicht jedes Wissenschaftlers sicherzustellen, dass der Nutzen seines Versuchs die den Tieren zugefügten Schmerzen, Leiden und Schäden übersteigt (BAUMANS et al. 1994). In diesem Zusammenhang ist die Relevanz des jeweiligen Versuches hinsichtlich der Weiterentwicklung des medizinischen Wissens für Mensch und Tier zu erörtern (BAUMANS et al. 1994). Diese Voraussetzung für einen Tierversuch wurde im Rahmen der europäischen Richtlinie 2010/63/EU festgehalten: „Die voraussichtliche Schädigung des Tieres sollte gegen den erwarteten Nutzen des Projekts abgewogen werden“ (Art. 39, RL 2010/63/EU<sup>4</sup>). Diese utilitaristische Sichtweise stellt einen Grundsatz für die Durchführung ethisch vertretbarer Tierversuche in der heutigen Gesellschaft dar (BOUT et al. 2014).

Bevor ein Tierversuch durchgeführt werden kann, muss zudem im Sinne des *Refinements* dargelegt werden, in welchem Maße Leiden für das Tier zu erwarten sind. Hierfür ist eine eingehende Evaluation der durch den Tierversuch verursachten Belastung bei der jeweiligen Tierspezies notwendig. Die Richtlinie 2010/63/EU fordert eine Belastungseinstufung der Tierversuche in vier verschiedene Schweregrade. Diese umfassen „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“ (Schweregrad 1), „mittel“ (Schweregrad 2) oder „schwer“ (Schweregrad 3) (Art. 15, Nr. 1, RL 2010/63/EU<sup>5</sup>). Versuche, die mit einer als „schwer“ eingestuften Belastung für die Tiere verbunden sind, dürfen nicht durchgeführt werden, wenn die damit verbundenen starken Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste „lang anhalten und nicht gelindert werden können“ (Art. 15, Nr. 2, RL 2010/63/EU<sup>6</sup>). Auch bezüglich der guten wissenschaftlichen Praxis ist es sinnvoll, die auf die Versuchstiere einwirkende Belastung genau zu kennen und auf das Minimum zu reduzieren, da Schmerzen und Stress die Versuchsergebnisse beeinflussen (Abbildung 1). Durch eine Reduktion der Belastung kann die Varianz der Versuchsergebnisse und somit die benötigte Tieranzahl vermindert werden.

---

<sup>3</sup> Art. 20a, Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 13. Juli 2017 (BGBl. I S.2347) geändert worden ist

<sup>4</sup> Art. 39, Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, ABl. L 276 vom 20.10.2010, S.1-47

<sup>5</sup> Art. 15 Nr. 1, RL 2010/63/EU (Fn. 4)

<sup>6</sup> Art. 15 Nr. 2, RL 2010/63/EU (Fn. 4)

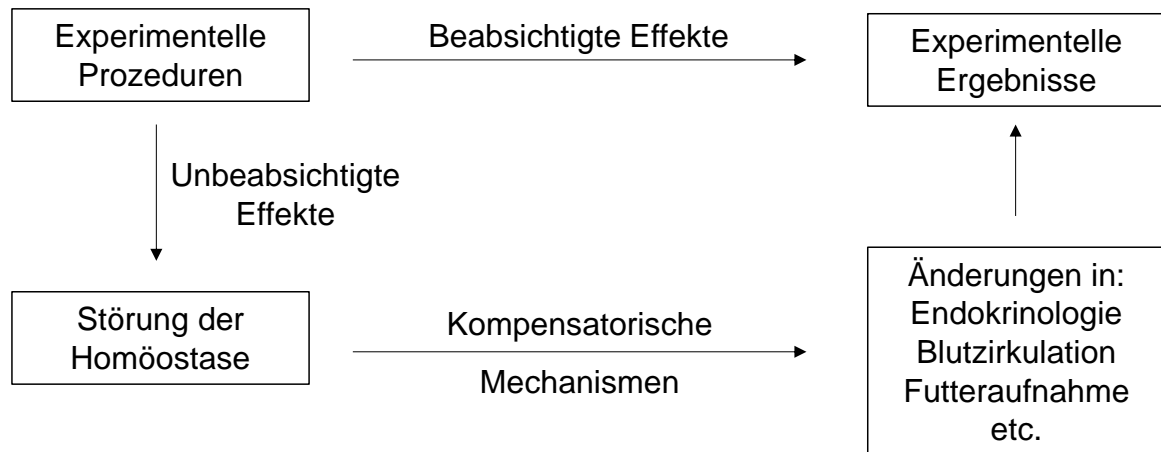


Abbildung 1

Beabsichtigte und unbeabsichtigte Effekte experimenteller Prozeduren. Aus dem Englischen übersetzt und modifiziert nach HERCK (1994). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Als Hilfestellung für die Einordnung des jeweiligen Modells in einen Schweregrad wurde von der Europäischen Kommission das „Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung)“<sup>7</sup> veröffentlicht. Darin sind Indikationen zur Festlegung des Schweregrads sowie Vorschläge für projektspezifische Score-Sheets festgehalten. Score-Sheets werden zu einer täglichen Einschätzung des Wohlbefindens der Tiere im Projektverlauf verwendet und müssen dem Tierversuchsantrag beiliegen.

Laut der Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersVEV), welche die Richtlinie 2010/63/EU in deutsches Recht umsetzt, muss in jedem Antrag auf Durchführung eines Tierversuchs „wissenschaftlich begründet dargelegt werden, in welchen Schweregrad der Versuch eingestuft wird“ (§ 31 Abs. 1 Nr. 2b, TierSchVersVEV<sup>8</sup>). Diese Einstufung des Schweregrads sollte in jedem Fall evidenzbasiert erfolgen und auf aktuellen, modellspezifischen Daten beruhen (LIDSTER et al. 2016). Um *Refinement*-Maßnahmen erfolgreich durchführen zu können, müssen mögliche Schmerzen oder Leiden der Versuchstiere so schnell wie möglich erkannt (HAWKINS et al. 2011) und durch eine Weiterentwicklung oder Vermeidung der damit verbundenen Versuchsprozedur reduziert werden (BLAKEMORE et al. 2012). Die Schwierigkeit besteht darin, dass viele Versuchstiere, allen voran Nager, versuchen, ihre Schmerzen und Leiden so lange wie

<sup>7</sup> Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung), Zuständige nationale Behörden für die Durchführung der Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, Brüssel, 11./12. Juli 2012

<sup>8</sup> § 31 Abs. 1 Nr. 2b, Verordnung zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (TierSchVersVEV k.a.Abk.), V. v. 01.08.2013 BGBl. I S. 3125 (Nr. 47); Geltung ab 13.08.2013

möglich zu verbergen. Es ist demzufolge möglich, dass bisher bestehende Belastungseinstufungen, die sich auf die subjektiven Beobachtungen einzelner Personen stützen, nicht dem tatsächlichen Befinden der Tiere entsprechen. Daher ist es von ausgesprochener Dringlichkeit, Behörden, Kommissionen sowie antragsstellenden Forschergruppen möglichst genaue und evidenzbasierte Beurteilungsschemata an die Hand zu geben. Nur auf diese Weise ist es möglich, der moralischen Sonderstellung des Menschen gerecht zu werden und im Sinne des *Refinements* zu handeln (§ 8 Abs. 3 Nr. 1a, TierSchG, 2006<sup>9</sup>).

## 2.2. Belastung und Stress

Um die Belastung eines Versuchstieres durch spezifische Versuchsprozeduren nachweisen zu können, muss die beurteilende Person in der Lage sein, verschiedene Gemütszustände des Tieres erkennen und bewerten zu können (BAUMANS et al. 1994). Da die Einschätzung des Gemütszustandes eines Tieres immer nur eine Annäherung an den tatsächlichen Zustand darstellt, ist es von Bedeutung, verschiedene Methoden zur Belastungseinschätzung anzuwenden (BAUMANS 2005). Dabei ist es wichtig, die physiologischen Hintergründe der Reaktion des Organismus auf Stress zu kennen und bewerten zu können.

Der Körper reagiert auf Stresssituationen mit einer Anpassung physiologischer Körperfunktionen, um das Gleichgewicht des Organismus, auch als Homöostase bezeichnet, aufrecht zu erhalten (CANNON 1932). Im Speziellen werden physiologische und psychologische Veränderungen des Organismus, die dazu dienen sich an Stresssituationen anzupassen und die Stabilität des Körpers aufrecht zu erhalten, als Allostase bezeichnet (FISHER u. REASON 1988; MCEWEN 1998). Der Körper stellt sich durch eine Anpassungsreaktion auf Umweltreize ein, um der Situation gerecht zu werden und das eigene Überleben sicherzustellen. Dabei sind zwei Systeme für die Reaktion des Organismus auf Stress verantwortlich: 1.) das autonome Nervensystem und 2.) die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Die Reaktionen dieser beiden Systeme manifestieren sich durch Verhaltensänderungen-, sowie Veränderungen des Hormonhaushalts und der Herzfrequenz (TAYLOR 2006). Die Veränderungen von Verhaltensweisen, endokrinen und autonomen Parametern wurden von HERCK (1994) beschrieben. Eine Übersicht hierzu ist in Tabelle 1 dargestellt.

---

<sup>9</sup> § 8 Abs. 3 Nr. 1a, Tierschutzgesetz, 2006 (Fn. 1)

Tabelle 1: Stressantworten bei Ratten.

Verhaltensänderungen		Endokrine Stressantwort		Autonome Stressantwort	
Lokomotorische Aktivität		Hypophyse		Sympathikus	↑
Sozialverhalten	↑/↓	ACTH	↑	Blutdruck	↑
Rückzug	↑	FSH	↑	Temperatur	↑
Immobilität	↑	LH	↑	Herzfrequenz	↑
Fellpflege	↑	Nebenniere		Noradrenalin	↑
Verstecken/ Vergraben	↑	Corticosteroide	↑	Glucose	↑
Berührungsreaktion	↑	Adrenalin	↑	Parasympathikus	↓
Nahrungsaufnahme	↓	Pankreas		Magenentleerung	↓
Exploration	↓	Glucagon	↑	Magenulzera	↑
Sexualverhalten	↓	Insulin	↓/↑	Defäkation	↑

Tabelle aus dem Englischen übersetzt und modifiziert nach HERCK (1994). Mit freundlicher Genehmigung von Elsevier. ↑ = Anstieg, ↓ = Abfall.

Als Stressoren werden Stimuli bezeichnet, die in der Lage sind, die Homöostase des Körpers zu beeinflussen. Es existieren systemische (physische) Stimuli, wie zum Beispiel Hypoglykämie, und emotionale (psychische) Stimuli, wie beispielsweise eine neue Umgebung (ARMARIO et al. 2012). Die auf ein Tier einwirkende Belastung hängt vor allem von der Kontrollierbarkeit und Vorhersehbarkeit des Stressors ab (QUIRCE et al. 1981; ARMARIO et al. 2012). Akute Stressreaktionen sind genetisch festgelegt und notwendig, um den persönlichen Erfolg und das Überleben der Art zu sichern. Dauert dieser Zustand allerdings länger an, kann dies zu chronischem Stress führen. Im Rahmen der Stresstheorie von SELYE (1975) wird zwischen positivem Eustress („εὖ“ griechisch für „gut“) und negativem Distress („δύς“ griechisch für schlecht) unterschieden. Im Falle von Distress wird ein Großteil der dem Tier zur Verfügung stehenden Ressourcen darauf verwendet, die Situation zu bewältigen (UFAW 1989). Demnach ist Distress eine über dem physiologischen Stresslevel liegende Belastung für das Tier (BAUMANS et al. 1994). Diese dauerhafte Belastung beeinträchtigt das Wohlbefinden des Tieres und ist im Sinne des 3R-Konzepts und der guten wissenschaftlichen Praxis zu vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit werden die verschiedenen Methoden zur Erkennung von Belastung bei der Ratte umfassend untersucht und miteinander verglichen, um eine optimale Belastungseinschätzung der Tiere im Amygdala-Kindling-Modell zu ermöglichen. Eine vergleichende Darstellung der dabei verwendeten Methoden zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2: Vergleichende Darstellung der verwendeten Methoden zur Erkennung von Schmerzen und Stress.

	Telemetrie	Stresshormone	Verhalten
Geschwindigkeit	-	++	++
Objektivität	++++	++++	+
Zuverlässigkeit	++++	++++	?
Quantifizierbarkeit	ja	ja	ja?
Invasivität	ja	ja/ nein	nein
Tiermanipulation	nein	ja/ nein	nein
Probleme	teuer (Transmitter)	teuer (Kits)	Interpretation/ Robustheit

Tabelle aus dem Englischen übersetzt und modifiziert nach KRETLOW et al. (2010)

Nachfolgend werden die verwendeten Verhaltensuntersuchungen sowie die analysierten biochemischen Parameter (Stresshormone) und physiologischen Parameter (Telemetrie) eingehend erläutert.



### 3. Verhaltensuntersuchungen

Bereits DARWIN (1872) beschrieb in seinem Werk „Der Ausdruck der Gemütsbewegungen bei dem Mensch und den Tieren“ parallele Verhaltensweisen von Mensch und Tier. Dabei wurden die Begriffe Schmerzen und Leiden zunächst für die Beschreibung menschlicher Gemütszustände verwendet (BAUMANS et al. 1994). Anhand menschlicher Verhaltensweisen bei Schmerzen oder unter Belastung können analoge Verhaltensmuster bei Tieren Rückschlüsse auf Beeinträchtigungen ihres Wohlbefindens liefern. Die zugrunde liegenden Mechanismen von Verhaltensänderungen bei Menschen in Stresssituationen (TAYLOR 2006; BEERY u. KAUFER 2015) wurden bereits mit Hilfe von Studien an Labornagern untersucht (BEERY u. KAUFER 2015). Verhaltensänderungen erlauben Rückschlüsse auf krankheitsassoziierte Veränderungen der physiologischen Gehirnfunktion (CAMPOS et al. 2013). So sind auch bei Epilepsiepatienten neuropsychiatrische Komorbiditäten beschrieben worden (TELLEZ-ZENTENO et al. 2007; POHLMANN-EDEN et al. 2015), wobei häufig Angststörungen, Suizidgedanken und Depressionen auftreten (TELLEZ-ZENTENO et al. 2007; KANNER 2011). Es wird vermutet, dass eine wechselseitige Beziehung zwischen Epilepsien und psychiatrischen Komorbiditäten vorliegt, die durch Veränderungen von gemeinsamen Netzwerkstrukturen zustande kommt (POHLMANN-EDEN et al. 2015). Dies konnte kürzlich auch im Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten bestätigt werden (MEDEL-MATUS et al. 2017). Studien deuten darauf hin, dass Nager in Epilepsiemodellen und humane Epilepsiepatienten ähnliche krankheitsassoziierte Verhaltensveränderungen aufweisen. Dazu zählt unter anderem ein verändertes angstassoziiertes Verhalten (THOMAS u. GUNTON 2011; ONGERTH et al. 2014; ESMAEILPOUR et al. 2017; MEDEL-MATUS et al. 2017). Diese Komorbiditäten sollten weniger als Sekundäreffekt der Anfälle sondern vielmehr als Manifestation des veränderten epileptiformen Netzwerks selbst verstanden werden (WILSON u. BAXENDALE 2014; POHLMANN-EDEN et al. 2015). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Verhaltensuntersuchungen verwendet, um die Effekte des Amygdala-Kindling-Modells auf das Verhalten der Labortiere systematisch zu erfassen und dadurch einen Rückschluss auf deren Belastung zu ermöglichen. Die Einschätzung der Belastung mit Hilfe von Verhaltensuntersuchungen sollte auf eine für die Tiere positive Art erfolgen, zum Beispiel in Form von Präferenztests oder Beobachtungen der Tiere im Heimkäfig (BAUMANS 2005). Die Bewertung von Verhaltensparametern erfolgt in der Regel subjektiv und kann somit nicht als einziger Parameter für eine Belastungseinschätzung herangezogen werden. Daher müssen weitere objektivere Parameter, wie zum Beispiel die Analyse von Stresshormonen und die Auswertung der Herzaktivität, herangezogen werden. Erst durch die gesamte Betrachtung aller Parameter können geeignete Methoden für eine Belastungseinschätzung identifiziert werden.

### 3.1. Heimkäfingverhalten

Das Nestbauverhalten dient Nagern dazu, eine konstante Körperwärme ihrer Jungtiere zu gewährleisten. Ohne den Nestbau stirbt ein Großteil der Jungtiere von Ratten, Mäusen und Kaninchen (DENENBERG et al. 1969). Bei Ratten zeigen sowohl Muttertiere, als auch nicht tragende Weibchen und Männchen dieses Verhalten (DENENBERG et al. 1969). Das Nestbauverhalten von Ratten weist jedoch im Vergleich zu Mäusen eine Besonderheit auf. Es variiert je nachdem in welcher Lebensphase die Tiere das erste Mal mit dem Nestmaterial in Kontakt kommen. Je früher das Nestmaterial zur Verfügung gestellt wird, desto intensiver wird das Nestbauverhalten im späteren Leben der Tiere ausgeübt (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Aus diesem Grund spielen sowohl das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des ersten Kontakts mit dem Nestmaterial sowie die Art des Nestmaterials eine Rolle (VAN LOO u. BAUMANS 2004). In früheren Veröffentlichungen wurde bereits nachgewiesen, dass das Wohlbefinden von weiblichen und männlichen Ratten durch die Verwendung von Nestmaterial gesteigert wird (RAS et al. 2002). VITALO et al. (2009) wiesen nach, dass die Zugabe von Nestmaterial zu einer schnelleren Wundheilung führte. Die Bereitstellung von passendem Nestmaterial fördert auf diese Weise das Tierwohl und trägt zu einer verbesserten klinischen Relevanz von Tiermodellen bei (JIRKOF 2015). JIRKOF et al. (2013a) konnten zeigen, dass sich eine Belastung bei Mäusen als vermindertes Nestbauverhalten manifestieren kann. Eine Reduktion der Nestkomplexität, die mit Hilfe eines Scoring-Systems bewertet wird, gilt somit als Indikator für Distress (JIRKOF et al. 2013a). Auch kann das Heimkäfingverhalten der Tiere als Analogie zu den Aktivitäten des täglichen Lebens bei Humanpatienten gewertet werden. Diese gelten als diagnostisches Kriterium bei neurologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit (HESSEBERG et al. 2013). Dabei wird bewertet inwieweit die Patienten in der Lage sind, ihre alltägliche häusliche Grundversorgung zu gewährleisten. Dieser Ansatz wird auch bei Epilepsiepatienten verwendet, da belegt ist, dass neuropsychiatrische Defizite die Alltagsfunktionalität deutlich einschränken können (HELMSTAEDTER et al. 2013). Das Nestbauverhalten bei Nagern wird als Luxusverhalten betrachtet und in Tiermodellen herangezogen, um die Aktivitäten des täglichen Lebens zu untersuchen (JIRKOF 2014). Bei einer Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere wird dieses Verhalten als erstes reduziert, während lebenswichtige Funktionen wie beispielsweise die Futteraufnahme weiterhin ausgeführt werden. Demzufolge erlaubt die Auswertung dieses Luxusverhaltens eine Aussage über das Wohlbefinden der Tiere (DEACON 2012; JIRKOF 2014). In einem genetischen Epilepsiemodell bei Mäusen konnte bereits eine negative Korrelation zwischen epileptischen Anfällen und Nestbauverhalten nachgewiesen werden, die indiziert, dass epileptische Aktivität mit Defiziten im Bereich des Nestbauverhaltens assoziiert ist (GHEYARA et al. 2014).

Ein weiterer Parameter, der sich für die Einschätzung der Belastung der Tiere eignen könnte, ist der Verschmutzungsgrad des Nests (Level-of-soiling) (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Dieser Parameter zeigt, wie sauber die Tiere ihren Nestbereich halten, das heißt, ob sie ihren Kot vornehmlich in einem vom Nest entfernten Teil des Käfigs ablegen. In diesem Zusammenhang konnten VAN LOO u. BAUMANS (2004) bereits zeigen, dass Ratten, die das Nestbauverhalten von Geburt an gelernt haben, ihr Nest weniger verschmutzen, als Tiere, denen das Material erst später zur Verfügung gestellt wurde. Die Vermeidung eines verschmutzten Nestbereichs wird als *faecal avoidance* bezeichnet (WALSH et al. 2013). Dieses Verhalten wurde unter anderem auch bei Ratten beobachtet und trägt zur Vermeidung parasitärer Infektionen bei (ROPER et al. 2002; WALSH et al. 2013). In bisherigen Publikationen wurde der Verschmutzungsgrad des Nests noch nicht als Parameter zur Belastungseinschätzung verwendet. Dieser Parameter könnte, ähnlich der Nestkomplexität, zu einer Einschätzung veränderter Aktivitäten des täglichen Lebens herangezogen werden.

### **3.2. Soziale Interaktion**

Der Social-Interaction-Test wurde zum ersten Mal vor 30 Jahren von FILE u. HYDE (1978) beschrieben. In diesem Test wird die Zeit gemessen, in der die Individuen in direktem sozialen Kontakt miteinander stehen (BEERY u. KAUFER 2015). Da die Interaktionspartner in diesem Test ihr Verhalten wechselseitig beeinflussen, ist es wichtig, das Paar als Einheit zu behandeln und Partner mit gleicher Vorgeschichte zu testen (FILE u. SETH 2003). Des Weiteren ist es von Bedeutung, Tiere gleichen Alters, gleichen Geschlechts und gleichen Gewichts miteinander zu testen, da es ansonsten zu Dominanzverhalten kommen kann (FILE u. SETH 2003). Verschiedene Stressoren zeigten bei Labornagern bereits Auswirkungen auf das Sozialverhalten (BEERY u. KAUFER 2015). Je nach Beschaffenheit des Stressors sind unterschiedliche Effekte auf das Sozialverhalten von Ratten beschrieben worden. Ein sozialer Stressor, wie zum Beispiel die soziale Ablehnung durch einen Artgenossen, führt zu sozialem Rückzug (MEERLO et al. 1996). Ist der Stressor nicht sozialer Art, wie zum Beispiel der Geruch von Katzenfell, zeigte sich, dass Ratten mehr Zeit in sozialer Interaktion verbringen (BOWEN et al. 2012). Ein enges Gruppieren (*social buffering*) im Angesicht einer Bedrohung wird auch als „defensive Aggregation“ bezeichnet und kann bei verschiedenen Spezies, wie zum Beispiel Vögel, Fischen und Säugetieren, beobachtet werden (HAMILTON 1971). Auch die negativen psychologischen Auswirkungen eines Stressors können durch das enge Gruppieren (*social buffering*) verringert werden (DAVITZ u. MASON 1955; KIKUSUI et al. 2006). Durch den engen Kontakt mit anderen Gruppenmitgliedern fühlen sich Beutetiere wie Ratten sicherer und weniger gestresst (KIKUSUI et al. 2006). Nach Stressereignissen verbessert die Interaktion mit einem Partner

auch das Schlafverhalten von Ratten (DASILVA et al. 2017). TAYLOR (1981) konnte zeigen, dass gestresste Ratten mehr Kontakt zu Ihren Artgenossen suchten als nicht gestresste Ratten. Hierbei spielt das Hormon Oxytocin eine entscheidende Rolle (siehe 4.2 Oxytocin). Durch Oxytocin werden Sozialkontakte gefördert und durch eine positive Interaktion mit einem Artgenossen können Stressantworten des autonomen Nervensystems und der HPA-Achse gesenkt werden (TAYLOR 2006). Demzufolge spielen Sozialkontakte in Stresssituationen eine entscheidende Rolle (TAYLOR 2006). Die Induktion eines Status epilepticus mittels Pilocarpin führte bei Mäusen zu sozialen Defiziten in der Latenzperiode und in der chronischen Phase (SEO et al. 2013). Ein durch Kainat induzierter Status epilepticus führte bei Ratten zu einem verminderten Sozialverhalten, wohingegen das Amygdala-Kindling-Modell keine derartigen Veränderungen hervorrief (LETTY et al. 1995) oder sogar eine erhöhte soziale Interaktion beobachtet werden konnte (ADAMEC et al. 2004). Auch beim Menschen sind unterschiedliche soziale Reaktionen auf einen Stressor beschrieben worden (TAYLOR 2006; BEERY u. KAUFER 2015). So wird einerseits der soziale Rückzug als diagnostisches Kriterium für eine posttraumatische Belastungsstörung herangezogen (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION 2013). Auch bei Epilepsiepatienten wurden bereits verminderte Sozialkontakte beschrieben, die unter anderem durch die fehlende Kontrollierbarkeit der Anfälle in der Öffentlichkeit zustande kommen kann (POHLMANN-EDEN et al. 2015). Die zugrundeliegenden neuronalen Mechanismen dieser Dysfunktion konnten bisher jedoch nicht geklärt werden. Allerdings wird vermutet, dass veränderte Konzentrationen von Neurotransmittern, Neuronenverluste und die dadurch veränderte Erregungsleitung zu Veränderungen des Sozialverhaltens führen können (SEO et al. 2013). Andererseits wurde in Stresssituationen das Streben nach Zusammengehörigkeit beschrieben (GUMP u. KULIK 1997; TAYLOR 2006). Durch diese Verhaltensweise wird die Überlebenschance des Individuums erhöht, was einen der wichtigsten Aspekte des Gemeinschaftslebens darstellt (KIKUSUI et al. 2006; BOWEN u. MCGREGOR 2014).

### **3.3. Grabverhalten**

Das Grabverhalten wird anhand des Burrowing-Tests untersucht. Dabei wird den Tieren ein Behältnis, meist eine Röhre, zur Verfügung gestellt aus dem sie in einer festgelegten Zeit ein Material, beispielsweise Futterpellets, Sand oder Kies entfernen können. Das Grabverhalten der Tiere lässt sich durch eine vorherige Lernphase steigern (DEACON et al. 2001). Nach der Bestimmung eines Ausgangswertes kann der Test mit demselben Tier mehrfach wiederholt werden (JIRKOF et al. 2013b). Eine Untersuchung des evolutionär bedingten Grabverhaltens nahm zum ersten Mal DEACON et al. (2001) an mit Scrapie infizierten Mäusen vor. Es wurde von ihm als einfache, empfindliche und objektive

ethologische Erfassung beschrieben, bei der die infizierten Tiere eine Verringerung des Grabverhaltens zeigten. Das Grabverhalten wurde ebenso wie das Nestbauverhalten als Luxusverhalten bei Labortieren beschrieben (JIRKOF 2014). Bei Mäusen wurde beobachtet, dass die Tiere die Futterpellets nicht wie erwartet in ihrem Maul zu einem Lagerplatz transportieren, sondern Grabbewegungen zeigen, um die Pellets aus der Röhre zu entfernen (DEACON et al. 2001). Die Futterpellets stellten somit keinen essentiellen Bestandteil des Versuchsaufbaus dar und sowohl Mäuse als auch Ratten zeigten das Grabverhalten auch mit anderen Materialien (DEACON 2009). Der Burrowing-Test wurde bei Ratten mit sub-chronischen Knieentzündungen zur Erfassung akuter Schmerzzustände eingesetzt (RUTTEN et al. 2014a; GOULD et al. 2016). In diesen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Tiere, die einer schmerzhaften Belastung ausgesetzt sind, im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant weniger Grabverhalten zeigen (RUTTEN et al. 2014b; BRYDEN et al. 2015). Nach einer Laparotomie ohne Schmerzmedikation war die Latenzzeit bis zum Beginn des Grabverhaltens der Tiere signifikant erhöht (JIRKOF et al. 2010). Insgesamt scheint die Reduktion eines spontan motivierten Verhaltens, wie beispielsweise des Grabverhaltens, einen aussagekräftigen Indikator für die Früherkennung und Progression von neurologischen Dysfunktionen darzustellen (JIRKOF 2014).

### **3.4. Open-Field**

Das Open-Field wurde von HALL (1934) entwickelt, um die Lokomotion und das angstassoziierte Verhalten von Ratten in einem offenen Feld zu untersuchen. Die Tiere werden dabei einzeln in ein seitlich begrenztes Feld gesetzt und deren spontane Verhaltensweisen innerhalb eines festgelegten Zeitraums beobachtet (CRAWLEY 2007). Faktoren, die das Ergebnis des Tests beeinflussen können, stellen die Entnahme der Tiere aus dem Heimkäfig, die Überführung in das Open-Field durch den Experimentator, das Open-Field und dessen Umgebung sowie alle Erfahrungen, die die Tiere in ihrem bisherigen Leben gesammelt haben, dar (WALSH u. CUMMINS 1976). Es existieren verschiedene Ausführungen des Tests, die sich durch Parameter wie die Größe des Feldes, die untersuchte Zeitspanne oder die Lichtintensität unterscheiden (PRUT u. BELZUNG 2003). Nager als Beutetiere bevorzugen den geschützten Bereich an der Wand des Open-Fields, in dem sie sich mit ihren Vibrissen orientieren können. Dieses Verhalten wird als Thigmotaxis bezeichnet (PRUT u. BELZUNG 2003). Im Open-Field können sowohl Lokomotion als auch angstassoziiertes Verhalten analysiert werden, indem die zurückgelegte Strecke der Tiere sowie deren Aufenthaltsdauer in Wandbereich und Zentrum gemessen werden. Tiere, deren Wohlbefinden gestört ist, weisen eine gesteigerte Thigmotaxis auf und zeigen weniger lokomotorisches Verhalten und vertikale Exploration (KATZ et al. 1981; PRUT u. BELZUNG 2003). Die Aufenthaltsdauer im aversiven Zentrum

kann durch den Einsatz von Anxiolytika erhöht werden. Allerdings wird die Aussagekraft des Open-Fields hinsichtlich der Beurteilung von Angststörungen kontrovers diskutiert, da beim Einsatz verschiedener Anxiolytika nicht die zu erwartenden Resultate beobachtet werden konnten (PRUT u. BELZUNG 2003). Es wurden bereits diverse Auswirkungen von Epilepsiemodellen auf das Verhalten der Tiere im Open-Field beschrieben. So bedingte die Induktion eines elektrischen Status epilepticus eine Hyperaktivität der Tiere (SEEGER et al. 2011) und bei mit Pentylenetetrazol gekindelten Ratten wurde im Open-Field ein defensives Verhalten beobachtet (FRANKE u. KITTNER 2001). Im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells konnte bisher allerdings keine Änderung des Verhaltens der Tiere im Open-Field nachgewiesen werden (HELFER et al. 1996).

### **3.5. Black-and-White-Box**

Die Black-and-White-Box (auch Light-and-Dark-Box) wurde von CRAWLEY u. GOODWIN (1980) das erste Mal beschrieben, um festzustellen, ob mit Anxiolytika behandelte Mäuse ein gesteigertes Explorationsverhalten hinsichtlich des hellen, aversiven Teils einer zweikammerigen Box zeigen. Die Tiere erhalten hierbei die Möglichkeit, fünf Minuten lang eine Box zu erkunden, wobei sie zwischen einer dunklen und einer hellen Kammer wählen können. Die Aktivität der Tiere sollte vor Durchführung dieses Tests in einem Open-Field bestimmt werden, da eine vorliegende Hyperaktivität die Ergebnisse der Black-and-White-Box beeinflussen kann (FILE et al. 2004). Eine verlängerte Aufenthaltsdauer in der dunklen Kammer beziehungsweise eine verkürzte Aufenthaltsdauer in der hellen Kammer sowie eine reduzierte Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die dunkle Kammer sind als gesteigertes angstassoziiertes Verhalten zu werten (BOURIN u. HASCOET 2003; CAMPOS et al. 2013). Analog zu dem natürlichen Explorationsverhalten der Tiere stellt auch angstassoziiertes Verhalten eine natürliche, evolutionär festgelegte Verhaltensweise dar, die dem Überleben der Art dient (CAMPOS et al. 2013). Mit Hilfe der Black-and-White-Box wird der innere Konflikt der Tiere zwischen der Angst vor einer neuen, unbekanntem und hell erleuchteten Umgebung (Neophobie) und der Motivation, die neue Umgebung zu erkunden (BOURIN u. HASCOET 2003; CAMPOS et al. 2013), untersucht. Dabei ist es wichtig zu berücksichtigen, dass ein Tiermodell nicht mit einer humanen Angststörung gleich gesetzt werden kann, sondern dass es sich hierbei lediglich um die Untersuchung eines angstassoziierten Verhaltens handelt (LISTER 1990; CAMPOS et al. 2013). Es ist bekannt, dass chronischer Stress angstassoziierte Verhaltensweisen in Ratten hervorrufen kann (CAMPOS et al. 2013; NORMANDEAU et al. 2017). Auch im Amygdala-Kindling-Modell wurden bereits Änderungen des angstassoziierten Verhaltens beschrieben (THOMAS u. GUNTON 2011; MEDEL-MATUS et al. 2017). Der Amygdala wird im Rahmen der Angstentstehung eine zentrale Rolle zugesprochen (PAPE u. PARE 2010; ASAN et al. 2013). Auch für die

Stressantwort des zentralen Nervensystems ist die Amygdala von großer Bedeutung, da sie die physiologischen und kognitiven Antworten aufeinander abstimmt (ASAN et al. 2013). Die neuronale Plastizität der Amygdala nach Stressereignissen ist essenziell für adaptive Verhaltensänderungen des Individuums, indem sie die HPA-Achse positiv reguliert (ASAN et al. 2013; TRIPATHI et al. 2017). Führen diese Veränderungen allerdings zu einem andauernden Ungleichgewicht, kann dies zu inadäquaten Reaktionen und Angststörungen führen (ASAN et al. 2013). Bei zahlreichen stressassoziierten Angststörungen des Menschen, wie zum Beispiel der posttraumatischen Belastungsstörung, wurden bereits Veränderungen der Amygdala beschrieben (ASAN et al. 2013; DEPPERMAN et al. 2014). Angststörungen wurden ebenfalls bei Epilepsiepatienten als psychiatrische Komorbiditäten beschrieben (POHLMANN-EDEN et al. 2015). TELLEZ-ZENTENO et al. (2007) zeigten, dass die Prävalenz einer Angststörung bei Epilepsiepatienten im Vergleich zu gesunden Menschen doppelt so hoch ist.

### **3.6. Elevated-Plus-Maze**

Das Elevated-Plus-Maze stellt einen Test dar, der häufig eingesetzt wird, um das angstassoziierte Verhalten von Labortieren zu untersuchen (CAMPOS et al. 2013). Die Tiere erhalten in diesem Test die Möglichkeit zwischen zwei offenen und zwei geschlossenen Armen in einer, über dem Boden angebrachten, X-förmigen Apparatur zu wählen (FILE et al. 2004). MONTGOMERY u. MONKMAN (1955) beschrieben zunächst eine Präferenz von Ratten für die sichere Umgebung der geschlossenen Arme der X-förmigen Apparatur. Darauffolgend untersuchten HANDLEY u. MITHANI (1984) den Einfluss verschiedener anxiogener und anxiolytischer Medikamente auf die Anzahl der Übertritte in die geschlossenen beziehungsweise offenen Arme der Apparatur (HANDLEY u. MCBLANE 1993). Um die Sensitivität des Elevated-Plus-Maze zu erhöhen, wurden zusätzliche Parameter in die Messreihe mit aufgenommen, wie zum Beispiel das *Stretching* als Parameter der Risikoabschätzung (BLANCHARD u. BLANCHARD 1989). Die Tiere zeigen dabei eine gestreckte Körperhaltung, um sich vorsichtig in eine ihnen unbekannte Umgebung vorzuwagen (BLANCHARD u. BLANCHARD 1989; WALL u. MESSIER 2001). Ist die Aufenthaltsdauer der Tiere in den aversiven Bereichen des Elevated-Plus-Maze (offene Arme, äußeres 1/3 der offenen Arme) reduziert und in den sicheren Bereichen (geschlossene Arme, Zentrum) erhöht, spricht dies für ein gesteigertes angstassoziiertes Verhalten (RODGERS u. DALVI 1997; SALUM et al. 2000).

In früheren Studien wurden bereits gegensätzliche Effekte des Amygdala-Kindling-Modells auf das Verhalten der Tiere im Elevated-Plus-Maze beschrieben. So konnte sowohl eine verminderte (HELPER et al. 1996; CHEN et al. 2016) als auch eine erhöhte (ADAMEC et al. 2004) Aufenthaltsdauer der gekindelten Tiere in den offenen Armen des Elevated-Plus-

Maze festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt die unterschiedliche Lokalisation der Stimulationselektrode in der rechten (= anxiogen) beziehungsweise der linken (= anxiolytisch) Hemisphäre dar (ADAMEC et al. 2005).

### 3.7. Saccharin-Präferenz-Test

Mit dem Saccharin-Präferenz-Test wird bei Labortieren depressionsassoziiertes Verhalten untersucht (KLEIN et al. 2015). Anhedonie ist ein weit verbreitetes Symptom von Depressionen und wird als die Unfähigkeit Freude beziehungsweise Lust zu empfinden beschrieben (KLEIN et al. 2015). Um anhedonieassoziiertes Verhalten bei den Tieren nachzuweisen, wird überprüft, ob die Tiere den Konsum einer süßen Lösung dem Konsum von reinem Wasser vorziehen. Der Saccharin-Präferenz-Test wird im Heimkäfig der Tiere durchgeführt, wodurch das Risiko fehlerhafter Ergebnisse durch Stress reduziert wird. Dies ist zum Beispiel beim Forced-Swim-Test der Fall, der ebenfalls zur Detektion von depressionsassoziiertem Verhalten eingesetzt werden kann (KLEIN et al. 2015). Depressionen stellen eine der häufigsten Komorbiditäten bei Epilepsieerkrankungen bei Humanpatienten dar (SANKAR u. MAZARATI 2012; FIEST et al. 2013). Sie nehmen einen großen Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen. Der Zusammenhang zwischen Epilepsien und Depressionen wurde bereits im Jahr 400 vor Christus von Hippokrates thematisiert und ist seither Bestandteil einer fortwährenden Debatte (KWON u. PARK 2014). Die Prävalenz epilepsiebedingter Depressionen ist schwierig zu erfassen und variiert von Studie zu Studie. Gründe hierfür sind die unterschiedlichen Klassifizierungen und die schwer umsetzbare Standardisierung bei der Diagnose psychiatrischer Erkrankungen (KANNER 2003). Im Rahmen pharmakoresistenter Epilepsien, bei denen häufig Gemütszustandsstörungen beobachtet werden, sind Prävalenzen von bis zu 55 % beschrieben (KANNER 2003; VALENTE u. BUSATTO FILHO 2013). Weiterhin ist auch bei Depressionen häufig eine Pharmakoresistenz gegenüber Antidepressiva zu beobachten (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005). Die Koinzidenz von Pharmakoresistenz bei Epilepsien und Depressionen könnte durch eine anfallsinduzierte Überexpression von Multidrug-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke des limbischen Systems bedingt sein (LÖSCHER u. POTSCHKA 2005), da Antidepressiva ebenfalls Substrate der Multidrug-Efflux-Pumpe p-Glykoprotein darstellen (O'BRIEN et al. 2012).

Ratten besitzen eine hohe Affinität zu süßen Lösungen und ziehen diese Drogen mit hohem Suchtpotenzial wie Kokain oder Heroin vor (MADSEN u. AHMED 2015). Deshalb kann der Sucrose- oder Saccharin-Präferenz-Test bei Ratten dazu eingesetzt werden, anhedonieassoziiertes durch die Verminderung des Konsums der süßen Lösung zu detektieren (CHEN et al. 2016). Das Rapid-Kindling-Modell (MAZARATI et al. 2007; CHEN et al. 2016) sowie verschiedene chemische Post-Status-Epilepticus-Modelle (MAZARATI



et al. 2008; KLEIN et al. 2015) führten bei Labornagern bereits zu einer anhedonieassoziierten Verhalten. Das Auftreten von depressionsassoziierten Verhalten in diesen Tiermodellen spiegelte die Situation in humanen Patienten mit Temporallappenepilepsie wieder (KANNER 2007). MAZARATI et al. (2007) zeigten, dass Süßstoff (Saccharin) im Vergleich zu Zucker (Sucrose) besser geeignet ist, um anhedonieassoziiertes Verhalten bei Ratten darzustellen. Auch kann die Durchführung des Versuchs mit einer zuckerhaltigen Lösung durch die auf diese Weise erhöhte Energiezufuhr eine Beeinflussung der Ergebnisse verursachen. Demgegenüber erwies sich Zucker bei Mäusen als potenter (KLEIN et al. 2015). Im Amygdala-Kindling-Modell konnte der Zusammenhang von depressionsassoziierten Verhalten und Anfällen mit Hilfe des Sucrose- bzw. Saccharin-Präferenz-Tests bisher nicht bewiesen werden (HELFER et al. 1996; MEDEL-MATUS et al. 2017). Hingegen stellten ADAMEC et al. (2004) sieben Tage nach der Kindling-Prozedur sogar eine Erhöhung des Sucrose-Konsums fest. Weiterhin sind Stressexpositionen in der Lage depressionsassoziiertes Verhalten zu verursachen (MAHAR et al. 2014). Dabei könnte die Dysregulation der HPA-Achse mit einer exzessiven Glucocorticoid-Ausschüttung, die als Konsequenz einer hippocampalen Degeneration entsteht, eine Rolle spielen (siehe Kapitel 4.1) (MAHAR et al. 2014). Tägliche elektrische Stimulationen könnten als milder Stressor depressionsassoziiertes Verhalten bei den Tieren auslösen. Hinsichtlich diverser mittlerer bis schwerer Stressoren konnte bereits eine Beeinträchtigung der Saccharin-Präferenz nachgewiesen werden (BAI et al. 2014). Der Konsum der süßen Lösung reduzierte sich je nach Beschaffenheit des Stressors und dem Geschlecht der Tiere (BAI et al. 2014).

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

Die Veränderung der Mimik von Ratten und Mäusen wird im Grimace-Scale zur Erkennung akuter Schmerzzuständen herangezogen (SOTOCINAL et al. 2011). Dabei werden folgende Parameter erfasst: Stellung der Augenlider, Aufwölbung des Nasenrückens/ der Wangen, Position der Ohren und Position der Tasthaare. Die Veränderung jedes einzelnen Parameters ist als Zeichen für akuten Schmerz zu werten. Auf diese Weise können Tiere, die nach Operationen nicht auf Schmerzmittel ansprechen, erkannt und entsprechende Maßnahmen ergriffen werden.

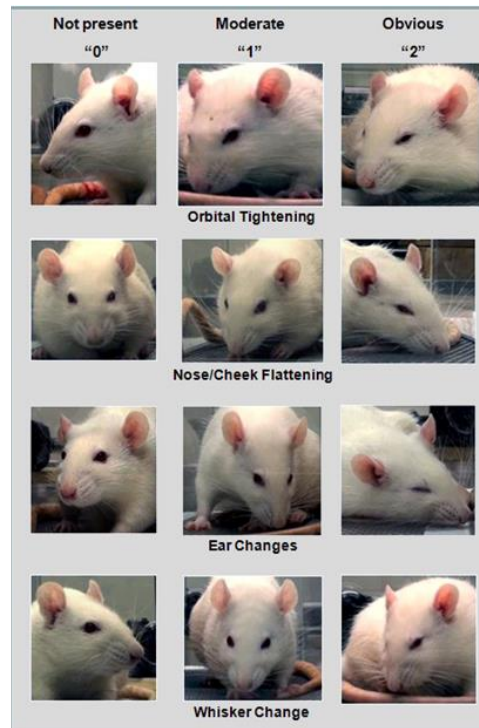


Abbildung 2  
Grimace-Scale für Ratten zur Beurteilung von Schmerzzuständen. Abbildung aus SOTOCINAL et al. (2011).

Der Irwin-Score stellt eine der am häufigsten verwendeten Beurteilungsmethoden für Effekte des zentralen Nervensystems auf das Allgemeinbefinden der Tiere dar (FONCK et al. 2015). Dieses Scoring-System wurde ursprünglich zur Erfassung der Effekte von Therapeutika auf das Verhalten sowie das autonome und zentrale Nervensystem entwickelt (IRWIN 1968). Es werden hierbei unterschiedliche Parameter erfasst, die zu der Einschätzung neurologischer Defizite beitragen. Eine modifizierte Version des Irwin-Scores ist in X. Anhang 4 dargestellt. Auf diese Weise wird eine für neurologische Modelle spezifische Erfassung des Allgemeinzustands der Tiere ermöglicht.

## 4. Biochemische Parameter

Ein Zusammenhang zwischen Stresssituationen und dem Anstieg von Glucocorticoiden und Katecholaminen im Blut wurde bereits durch CANNON (1932) und SELYE (1973) beschrieben. CANNON (1932) stellte fest, dass angesichts einer Bedrohung das Gleichgewicht der physiologischen Vorgänge des Organismus gestört und eine Anpassungsreaktion hervorgerufen werden kann. Dies wurde von ihm als Kampf-oder-Flucht-Reaktion beschrieben. Durch die Ausschüttung unterschiedlicher Hormone wird der Organismus in die Lage versetzt, Stresssituationen mit einer erhöhten Reaktionsbereitschaft zu begegnen (MYERS et al. 2012). Dies umfasst beispielsweise eine Erhöhung der Sauerstoff- und Energieversorgung von Gehirn und Muskulatur (MYERS et al. 2012). Durch die Verschiebung des körpereigenen Gleichgewichts als Reaktion auf Stress können auch eine Vielzahl anderer Hormone, wie zum Beispiel Oxytocin und der Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF), verändert sein (BECKER et al. 2015; MINHAS et al. 2016). Die Stressreaktion betrifft somit nicht nur einzelne Hormone oder Organe, sondern ist vielmehr ein Zusammenspiel des gesamten Körpers als Antwort auf eine Ausnahmesituation. Diese Änderungen sind nicht in jedem Fall als negativ einzustufen, da es sich hierbei größtenteils um evolutionär bedingte, physiologische Anpassungsreaktionen handelt (BEERLING et al. 2011). Besteht die Ausnahmesituation allerdings länger, können negative Auswirkungen auf den Organismus die Folge sein. SELYE u. FORTIER (1950) beschrieben das allgemeine Adaptionssyndrom, durch das die Vorgänge des Organismus als Antwort auf einen Stressor beschrieben werden. Demnach können Stressreaktionen in verschiedene Phasen unterteilt werden: die Alarmreaktion, die Widerstandsphase und die Erschöpfungsphase. Durch die Alarmreaktion findet eine körperliche Anpassung statt, die bei Versuchstieren bereits nach einigen Tagen zu einer Hypertrophie der Nebennieren führt (SELYE 1998). Die Widerstandsphase zeichnet sich durch eine Toleranz gegenüber dem Stressor aus, die in der Erschöpfungsphase in eine irreversible Schädigung des Organismus übergehen kann (SELYE 1998).

### 4.1. Corticosteron

Das Steroidhormon Corticosteron stellt bei Nagetieren das vorherrschende Glucocorticoid dar (GREEN u. MCCORMICK 2016). Es wird als Endprodukt einer dreigeteilten Hormonachse, der HPA-Achse, ausgeschüttet (Abbildung 3). Das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und das antidiuretische Hormon (ADH), die aus dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus sezerniert werden, sowie Stress und Adrenalin fördern die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen (LIGHTMAN 2008; BELDA et al. 2015). Durch ACTH wird die Synthese sowie die Ausschüttung von Corticosteron aus der Nebennierenrinde angeregt.

Corticosteron bindet an Glucocorticoid-Rezeptoren im Hippocampus und limitiert durch diese negative Rückkopplung die ACTH- und CRH-Ausschüttung (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012; BELDA et al. 2015; TRIPATHI et al. 2017). Die basolaterale Amygdala, in der sich ebenfalls Glucocorticoid-Rezeptoren befinden, übt über den Nucleus paraventricularis eine positive Kontrolle auf die HPA-Achse aus (TRIPATHI et al. 2017). Im Falle eines Stressors werden vermehrt Glucocorticoide aus der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Diese binden an Glucocorticoid-Rezeptoren in verschiedenen Körperkompartimenten und lösen dadurch eine Stressreaktion aus. Diese führt unter anderem zu einer Erhöhung der Herzaktivität, des Energiestoffwechsels und der Muskeldurchblutung (MOSTL u. PALME 2002; MYERS et al. 2012; FRANK et al. 2013). Falls eine Stressreaktion jedoch über einen längeren Zeitraum hinweg vorliegt, kann dies zu chronischen Folgen führen. Dabei kommt es zu einer Atrophie und Degeneration von Hippocampusarealen, wodurch der negative Feedback-Mechanismus außer Kraft gesetzt wird (MAHAR et al. 2014; TRIPATHI et al. 2017). Durch fehlende hippocampale Neurogenese und die daraus resultierende Dysfunktion der HPA-Achse können emotionale Defizite und Verhaltensänderungen entstehen (MAHAR et al. 2014). Die basolaterale Amygdala kann im Rahmen einer chronischen Stressreaktion eine Hypertrophie aufweisen, die die Aktivität der HPA-Achse steigert und zu erhöhten Corticosteron-Konzentrationen führt (TRIPATHI et al. 2017). Das pathologische Überangebot an Corticosteron kann eine Resistenz der Glucocorticoid-Rezeptoren bedingen (TRIPATHI et al. 2017).

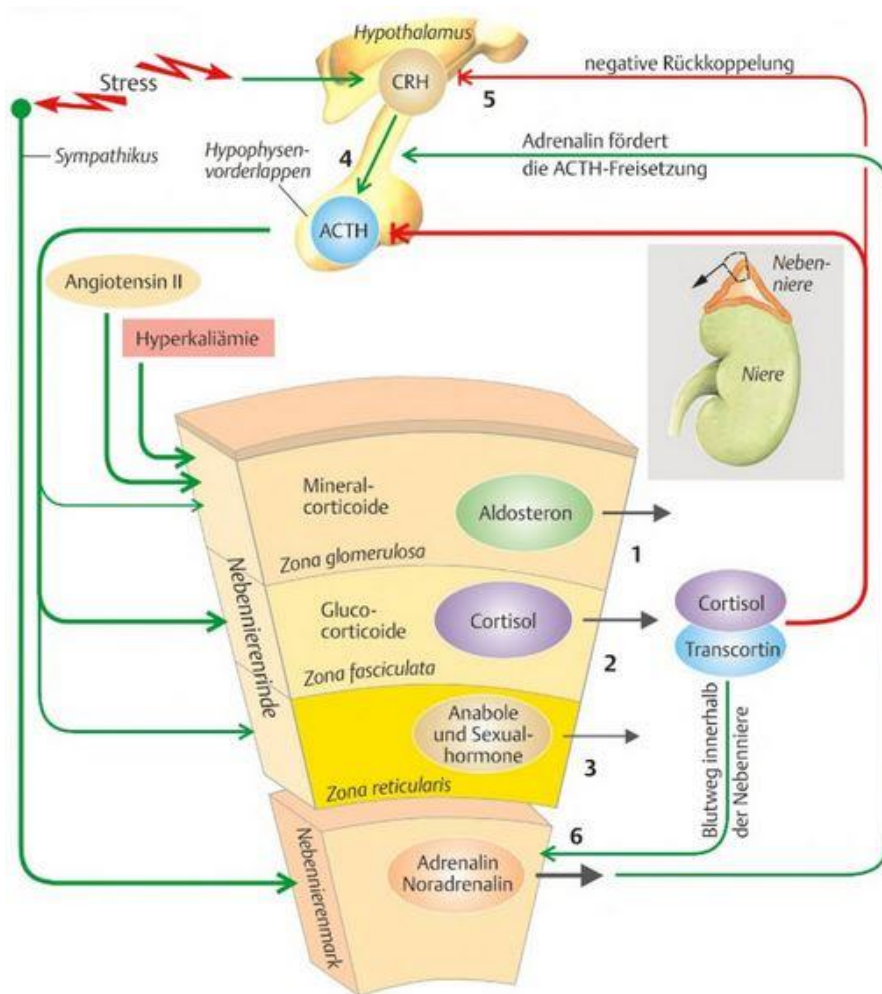


Abbildung 3

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Abbildung nach SILBERNAGL u. DESPOPOULOS (2012) mit freundlicher Genehmigung von Thieme.

Die pulsatile Ausschüttung von CRH, ACTH und Glucocorticoid-Hormon erfolgt beim Menschen in einem zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus, wobei die Konzentrationen am Morgen am höchsten sind und im Tagesverlauf abfallen (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Bei Nagetieren ist aufgrund des inversen Tag-Nacht-Rhythmus ein umgekehrter Verlauf zu beobachten (SCORRANO et al. 2015), der in Abbildung 4 dargestellt ist. Der tageszeitliche Verlauf beruht auf einem schnelleren „ultradianen“ Rhythmus, in dem stündlich eine pulsatile Sekretion durch Aktivierung sowie Hemmung der HPA-Achse erfolgt (WINDLE et al. 1998). Im Fall von chronischem Stress kann die pulsatile Sekretionsfrequenz erhöht sein (LIGHTMAN 2008), während der zirkadiane Rhythmus der Freisetzung stark abflacht oder verschwindet (WINDLE et al. 2001). Nach jedem Freisetzungszyklus gibt es eine Zeitspanne in der die HPA-Achse nicht auf milde Stressreize anspricht. Diese ähnelt der Refraktärzeit im Rahmen der Erregung von Nervenzellen. Bei chronischem Stress ergibt sich durch die erhöhte Frequenz der pulsatilen Ausschüttung auch eine erhöhte „Refraktärzeit“ (WINDLE et al. 2001).

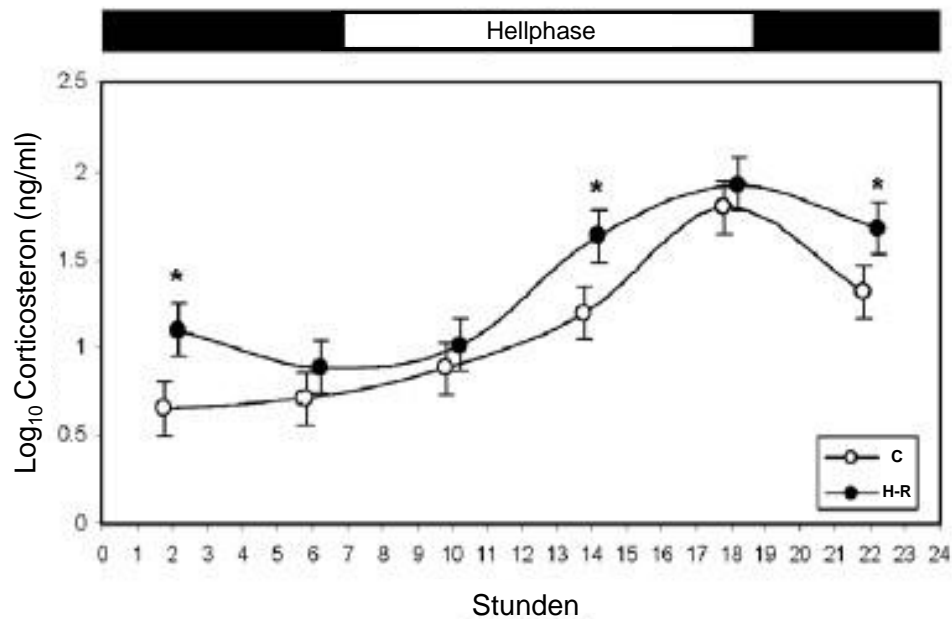


Abbildung 4

Tagesverlauf von Corticosteron im Plasma von Mäusen. Mäuse mit hoher physischer Aktivität (high-runner, H-R) zeigten im Tagesverlauf höhere Werte als die Kontrollgruppe (C). Abbildung aus dem Englischen übersetzt nach MALISCH et al. (2008), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

Die Corticosteron-Konzentrationen weisen jedoch nicht nur tageszeitliche, sondern auch spezies-, stammes-, alters- und geschlechtsspezifische Unterschiede auf (KOLBE et al. 2015). So wurden bei weiblichen Ratten und Mäusen sowohl erhöhte basale als auch stressinduzierte Corticosteron-Konzentrationen beobachtet (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2008). Die geschlechtsspezifischen Unterschiede sind auf eine Sensitivität der HPA-Achse gegenüber gonadalen Steroiden zurückzuführen. Östradiol erhöht die Empfindlichkeit gegenüber Stressoren, wogegen Androgen sie erniedrigt (GREEN u. MCCORMICK 2016). Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die Corticosteron-Konzentration zwar das Stresslevel der Tiere widerspiegelt, eine Unterscheidung zwischen Eu- und Distress damit jedoch nicht möglich ist (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 2008). Es gibt Hinweise darauf, dass hohe Glucocorticoid-Konzentrationen, die durch einen sozialen Stressor ausgelöst wurden, zu einer erhöhten Aggressivität führen, wohingegen hohe Glucocorticoid-Konzentrationen aufgrund eines nicht-sozialen Stressors zu erhöhtem Angstverhalten führen können (WALKER et al. 2017).

Die Messung von Corticosteron im Serum bietet die Möglichkeit einer direkten Einschätzung des Stresslevels der Tiere, da die Werte nachweislich nach unterschiedlichen Stressereignissen ansteigen (WINDLE et al. 2001; BELDA et al. 2015; HEINZMANN et al. 2015). Die höchsten Corticosteron-Konzentrationen sind in Plasma beziehungsweise Serum ungefähr 15 – 30 Minuten nach dem Beginn eines Stressereignisses zu erwarten (BELDA et al. 2015). Bei Mäusen und Ratten muss daher die Möglichkeit einer

Beeinflussung der Serumwerte durch die Aktivierung der HPA-Achse während der Blutentnahme, sowie durch zirkadiane und ultradiane Rhythmen in Betracht gezogen werden (HAEMISCH et al. 1999; LIGHTMAN 2008; SCORRANO et al. 2015). In diesem Fall kann ein regelmäßiges *Handling* der Tiere dazu beitragen, den Stresslevel nachweislich zu senken (DEUTSCH-FELDMAN et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass Amygdala-Kindling die Plasma-Corticosteron-Konzentrationen bei männlichen Wistar-Ratten nicht nachweislich verändert (ADAMEC u. MCKAY 1993). Ein Status epilepticus kann allerdings erhöhte Corticosteron-Konzentrationen hervorrufen (MAZARATI et al. 2009).

Die Messung von Corticosteron in Haarproben stellt eine nicht-invasive Möglichkeit zu einer Beurteilung des Stresslevels im Rahmen der HPA-Achse dar. Beim Menschen wird die Messung von Haarcortisol bereits zur Detektion von Stress genutzt (RUSSELL et al. 2012; STALDER u. KIRSCHBAUM 2012; GAO et al. 2013). Bei Labornagern wird diese Methode erst seit kurzem eingesetzt, um chronischen Stress zu evaluieren (SCORRANO et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die Blut- und Haarproben bei diesen Tieren positiv korrelieren (YU et al. 2015). Im Rahmen verschiedener Stressmodelle, wie zum Beispiel der Immobilisation oder dem chronischen unvorhersehbaren Stress bei Ratten, konnte bereits eine Erhöhung des Corticosteronlevels in Haaren nachgewiesen werden (SCORRANO et al. 2015). Indirekte Parameter, wie zum Beispiel das Gewicht der Nebennieren, scheinen hingegen weniger gut geeignet zu sein, um die Aktivität der HPA-Achse darzustellen (SCORRANO et al. 2015). Da das Haarwachstum bei Ratten nicht gleichmäßig verläuft und ein zeitlicher Abstand von ungefähr drei Tagen zum Stressereignis gewahrt werden muss, eignet sich dieser Parameter nur, um Belastungen über einen größeren Zeitraum hinweg zu messen (LIU et al. 2008). Die Eignung von Haar-Corticosteron zur Beurteilung von sehr hohen und lang anhaltenden Belastungen wird aufgrund einer möglichen Sättigung der Haarmatrix durch eine Akkumulation von Corticosteron kritisch diskutiert (SCORRANO et al. 2015).

Die Messung von Corticosteron im Kot kann anhand von fäkalen Corticosteron-Metaboliten erfolgen (LEPSCHY et al. 2010). Da die Entnahme nicht-invasiv durchgeführt werden kann und die Tiere in ihren normalen Verhaltensweisen nicht gestört werden, erweist sich diese Methode als vorteilhaft gegenüber der invasiven Blutentnahme (KOLBE et al. 2015). Allerdings muss der Zeitpunkt der Kotentnahme genau festgelegt werden, da die Ergebnisse maßgeblich von dem Aktivitätsrhythmus der Tiere beeinflusst werden (TOUMA et al. 2003; CHRISTIANSEN et al. 2012). Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten werden in der Hellphase des Tag-Nacht-Rhythmus mit einem Verzögerungseffekt von etwa zehn Stunden nach einem Stressereignis ausgeschieden (TOUMA et al. 2003). In der

Dunkelphase, der Aktivitätsphase der Tiere, reduziert sich diese Zeit durch eine beschleunigte Darmpassage auf etwa vier Stunden (TOUMA et al. 2003). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass sich die Quantifizierung von fäkalen Corticosteron-Metaboliten eignet, um chronischen Stress bei Ratten darzustellen. Hierzu durchgeführte Studien setzen beispielsweise die Exposition gegenüber unvorhersehbaren Situationen oder eine erhöhte Besatzdichte der Käfige als Stressoren ein (NICHOLSON et al. 2009; CHRISTIANSEN et al. 2012).

#### **4.2. Oxytocin**

Oxytocin wurde zum ersten Mal von DALE (1906) beschrieben. Er stellte fest, dass Hypophysen-Extrakte Kontraktionen des Uterus hervorrufen können. Nachfolgend wurde dieses Hormon von KAMM (1928) als Oxytocin benannt. Oxytocin wird in Neuronen des Hypothalamus synthetisiert und in neurosekretorischen Vesikeln durch Axone bis zum Hypophysenhinterlappen transportiert (LENG u. SABATIER 2016). Durch eine Aktivierung der Hypothalamus-Neurohypophysen-Achse werden die entsprechenden Neurone stimuliert und Oxytocin wird an den Blutstrom abgegeben (MINHAS et al. 2016). Es konnte bereits gezeigt werden, dass chronischer Stress in Nagetiermodellen zu einem Anstieg der Plasma-/Serum-Oxytocin-Konzentrationen führen kann (ONDREJCAKOVA et al. 2010; YOSHIDA et al. 2014). In diesem Zusammenhang weisen die Oxytocin-Konzentrationen weiterhin deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede auf. So ist ein stressinduzierter Anstieg der Oxytocin-Konzentration infolge einer Bewegungseinschränkung vor allem bei ausgewachsenen männlichen und präpubertären weiblichen Tieren zu beobachten (MINHAS et al. 2016). Auch TAYLOR (2006) postuliert, dass Oxytocin als Antwort auf Stressoren in Verbindung mit dem dopaminergen System und dem Opiodsystem ansteigt. Oxytocin steigert das Sozialverhalten der Tiere, wodurch eine Stressreduktion erreicht werden kann (TAYLOR 2006). In Abbildung 5 wird dargestellt, wie die Aktivität der HPA-Achse und somit der Corticosteron-Spiegel durch den Einfluss von Oxytocin reduziert werden kann.



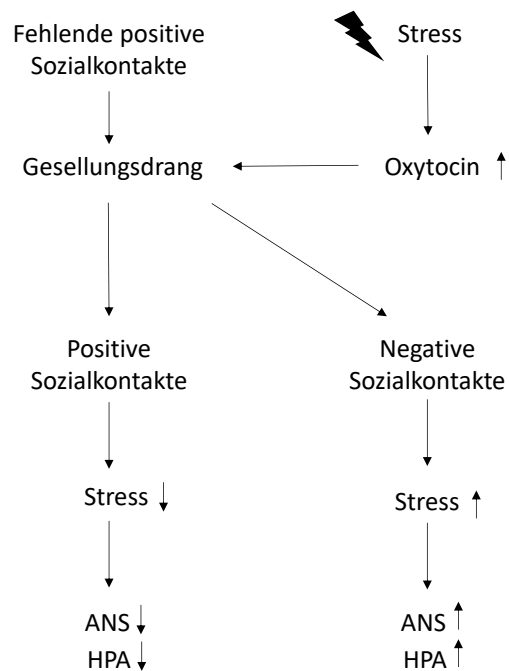


Abbildung 5

Regulation von Stress durch Oxytocin. Je nach Qualität der Sozialkontakte wird die Aktivität der HPA-Achse und des autonomen Nervensystems (ANS) hoch- oder herunterreguliert. Aus dem Englischen übersetzt und modifiziert nach TAYLOR (2006). Mit freundlicher Genehmigung von SAGE journals.

Dies wird am Beispiel der Separation von Jungtieren und deren Muttertier deutlich: Wird das Jungtier vom Muttertier getrennt, resultiert dies in einer Stressreaktion, in deren Folge Oxytocin und Cortisol ansteigen (LEVINE 2000; TAYLOR 2006). Wird das Jungtier nachfolgend mit bekannten Gruppenmitgliedern in Kontakt gebracht, sinken die Cortisol-Konzentrationen wieder (LEVINE 2000). Auch beim Menschen wird Oxytocin in Folge von Stressreaktionen ausgeschüttet und trägt dazu bei, den Umgang mit negativen Situationen zu erleichtern (NISHI et al. 2015). Sowohl in Studien an Tieren als auch bei Menschen reduzierte die exogene Verabreichung von Oxytocin die Stressreaktionen (HEINRICHS et al. 2003; TAYLOR 2006). Bei Humanpatienten konnte Oxytocin das Selbstvertrauen steigern und zu einer gesteigerten sozialen Interaktion führen, die auf diese Weise eine Stressreduktion bedingte (CARDOSO et al. 2013).

#### 4.3. Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF)

Der Wachstumsfaktor BDNF stellt ein Neurotrophin dar, das die Entwicklung, Protektion und Funktion von Nerven- und Gliazellen bei Wirbeltieren reguliert (KOWIANSKI et al. 2017). BDNF wurde erstmals von BARDE et al. (1982) beschrieben und ist somit nach dem Nervenwachstumsfaktor das zweite beschriebene Neurotrophin. BDNF findet sich vor allem in den Dendriten exzitatorischer Nervenzellen und kann durch Membrandepolarisation in

unterschiedlichen Isoformen, wie zum Beispiel pro-BDNF und *mature*-BDNF, freigesetzt werden (DIENI et al. 2012). Diese können an verschiedene Rezeptoren binden und Signalkaskaden auslösen. Das *mature*-BDNF bindet an den hochaffinen Rezeptor Tyrosinkinase B, der durch Autophosphorylierung verschiedene Enzyme aktiviert (PI3K, MAPK, PLC- $\gamma$ , GTPasen), die mit neuronalem Wachstum und Differenzierung assoziiert sind (KOWIANSKI et al. 2017). Auf diese Weise wird die neuronale Plastizität und die Gehirnregeneration nach Insulten gefördert, wodurch Gedächtnisleistung und Kognition gesteigert werden (HUANG u. REICHARDT 2001). Im Falle einer herabgesetzten BDNF-Synthese können die nachfolgenden Signalwege reduziert sein und auf diese Weise das Risiko für Depressionen erhöht werden (DUMAN u. MONTEGGIA 2006). Bereits seit zwei Jahrzehnten gilt BDNF als zentraler Bestandteil der „molekularen und zellulären Theorie von Depressionen“ (DUMAN et al. 1997; DUMAN u. MONTEGGIA 2006). Diese besagt, dass Stress die Freisetzung von BDNF reduzieren und so zu einer verminderten neuronalen Plastizität und Atrophie bestimmter limbischer Gehirnstrukturen führen kann (DUMAN u. MONTEGGIA 2006). Weiterhin können die Konzentrationen an BDNF und Tyrosinkinase B durch selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer im Rahmen einer antidepressiven Therapie (MARTINOWICH u. LU 2008) oder durch Elektrokrampftherapie (ALTAR et al. 2003; SARTORIUS et al. 2009; ENOMOTO et al. 2017) bei Humanpatienten erhöht werden. Die Erhöhung der BDNF-Konzentrationen durch diese Therapieoptionen kann zur hippocampalen Neurogenese beitragen, welche sich positiv auf den Krankheitsverlauf auswirken kann. In verschiedenen Studien konnten erniedrigte BDNF-Konzentrationen bereits in Folge von chronischem Stress und sozialer Ablehnung nachgewiesen werden (GIVALOIS et al. 2001; BARRIENTOS et al. 2003; BECKER et al. 2015; NAERT et al. 2015). Da BDNF, im Gegensatz zu Corticosteron, als spezifischer Marker für Distress gilt, ist es möglich, den einwirkenden Stress auf die Tiere gezielt zu differenzieren und eine Aussage über seine Qualität zu treffen (VASCONCELOS et al. 2015). Erniedrigte BDNF-Konzentrationen lassen sich nach einer chronischen Stressexposition vor allem in Hippocampusarealen nachweisen (LAKSHMINARASIMHAN u. CHATTARJI 2012; DEPPERMAN et al. 2014). Diese Veränderungen der BDNF-Konzentrationen sind Indizien für eine neuronale Adaption auf Distress (VASCONCELOS et al. 2015). Es konnte bereits eine positive Korrelation der BDNF-Konzentrationen in Gehirn- und Serumproben nachgewiesen werden. Demzufolge ist es möglich, Änderungen der BDNF-Serumkonzentration als Biomarker für Depressionen und Distress heranzuziehen (SARTORIUS et al. 2009; KUNDAKOVIC et al. 2015; MATSUOKA et al. 2015). Des Weiteren wurde eine erniedrigte BDNF-Serumkonzentration vor der Induktion eines Status epilepticus bei Sprague Dawley Ratten als ein Prädispositionsfaktor für spätere Komorbiditäten wie depressionsassoziiertes Verhalten beschrieben (BECKER et al. 2015).

#### 4.4. Creatinkinase (CK)

Bei der Creatinkinase (CK) handelt es sich um ein Enzym, das die Regeneration von Adenosintriphosphat aus Adenosindiphosphat katalysiert und damit die Energieversorgung der Zellen sicherstellt (BRUHN et al. 2011). Es existieren drei verschiedene Isoformen, die durch zwei mögliche Typen von Untereinheiten (Muskeltyp (M) oder Gehirntyp (B)) innerhalb des dimeren Enzyms zustande kommen: das Skelettmuskelenzym (CK-MM), das Herzmuskelenzym (CK-MB) oder das Gehirnenzym (CK-BB) (DÖRNER 2009). Eine weitere Isoform ist im Zwischenmembranraum der Mitochondrien (CK-MiMi) zu finden (DÖRNER 2009). Erhöhte Serumkonzentrationen des Enzyms finden sich vorwiegend bei Myokardinfarkten. Sie können aber auch bei erhöhter Muskelaktivität, wie zum Beispiel im Rahmen eines epileptischen Anfalls, vorliegen (BRUHN et al. 2011). In der Humanmedizin stellt die CK einen hochspezifischen postiktalen Marker für die Diagnose epileptischer Anfälle dar (BRIGO et al. 2015). Aufgrund der niedrigen Sensitivität können epileptische Anfälle jedoch bei CK-Konzentrationen im Normbereich nicht ausgeschlossen werden (BRIGO et al. 2015).

#### 4.5. Sexualzyklus

Der Sexualzyklus beschreibt die wiederkehrenden Veränderungen des weiblichen Organismus zur Sicherstellung der Fortpflanzung. Dabei treten speziesspezifische morphologische und histologische Veränderungen der weiblichen Fortpflanzungsorgane sowie Änderungen des Verhaltens auf, die einen Rückschluss auf die vorliegende Zyklusphase liefern können. Allgemein wird der Sexualzyklus in vier verschiedene Phasen unterteilt: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus. Die Differenzierung der Zyklusphasen anhand einer Vaginalzytologie wurde zum ersten Mal von STOCKARD u. PAPANICOLAOU (1917) beim Meerschweinchen beschrieben. Dabei wurde aufgrund des Auftretens unterschiedlicher Zelltypen in der Vaginalschleimhaut eine Differenzierung verschiedener Zyklusphasen vorgenommen. Die Beschreibung der Zyklusphasen der Ratte erfolgte durch LONG u. EVANS (1922). Die Zyklusdauer der Ratte beträgt ungefähr vier bis fünf Tage (GOLDMAN et al. 2007). In diesem Zeitraum können mit Hilfe der Vaginalzytologie drei Phasen differenziert werden: Proöstrus, Östrus, und Diöstrus (GOLDMAN et al. 2007). Die Zyklusphasen kommen durch Schwankungen der Östradiol- und Progesteron-Konzentrationen zustande (CORA et al. 2015). Die Ovulation findet etwa zehn bis zwölf Stunden nach einem starken Anstieg des luteinisierenden Hormons gegen Ende des Proöstrus statt (GOLDMAN et al. 2007). Mit Hilfe der Bestimmung des Zyklusstandes kann eine Aussage über die Funktionalität der Hypophysen-Hypothalamus-Gonaden-Achse getroffen werden (CORA et al. 2015). Die Funktionalität dieser Achse ist für das Gleichgewicht des Hormonhaushalts von großer Bedeutung. Da die Sensitivität gegenüber

---

Stressoren unter dem Einfluss von Östradiol erhöht sein kann, stellt die Bestimmung des Zyklusstandes der Tiere eine Voraussetzung für die richtige Interpretation der Ergebnisse dar (GREEN u. MCCORMICK 2016). Zudem ist bekannt, dass chronischer Stress bei Ratten eine reproduktive Dysfunktion bedingen kann. Dies kann ebenfalls zu einer Beeinträchtigung des Hormonhaushalts führen (GERAGHTY et al. 2013).

## 5. (Patho-) physiologische Parameter

Die Erfassung physiologischer Parameter stellt bei Labortieren eine Herausforderung dar. Die Tiere müssen dafür entweder mit einem Kabel verbunden oder während der Aufzeichnung narkotisiert werden (CESAROVIC et al. 2011). Im Gegensatz dazu bietet die Aufzeichnung der Daten mittels Radiotelemetrie eindeutige Vorteile (KRAMER et al. 2001; LIDSTER et al. 2016). Der Begriff „Telemetrie“ wurde aus dem altgriechischen übernommen und bedeutet so viel wie „Fernmessung“. Dabei werden Biosignale von einem Sender auf einen räumlich getrennten Empfänger übertragen (HUTTEN 2013). Die Tiere können sich frei bewegen und werden nicht in ihren Verhaltensweisen beeinträchtigt, da sich während der Aufzeichnungen keine Person im Raum befinden muss (ARRAS et al. 2007; CESAROVIC et al. 2011). Im Vergleich zu der konventionellen Kabelableitung kann somit eine Reduktion von Stress während der Aufzeichnungsperiode erzielt werden (KRAMER et al. 2001). Dadurch werden mögliche Fehlerquellen bei der Aufzeichnung reduziert und die Variabilität zwischen den Tieren gesenkt, sodass sich die benötigte Tieranzahl um bis zu 70 % reduzieren lässt (VAN ACKER et al. 1996; KRAMER u. KINTER 2003). Demzufolge lassen sich die beiden Komponenten *Reduce* und *Refine* des 3R-Konzepts durch die Nutzung eines telemetrischen Systems umsetzen (HORNETZ 2016). Es können unterschiedliche Parameter, wie zum Beispiel die Herzfrequenz oder die Aktivität der Tiere, erfasst werden und die Aufzeichnung der Daten kann über einen längeren Zeitraum erfolgen, so dass der Tageszeitverlauf der Parameter dargestellt werden kann (KRAMER et al. 2001; ARRAS et al. 2007). Die Messung der Parameter erfolgt objektiv und zuverlässig, so dass diese als Basis für eine Belastungseinschätzung herangezogen werden können (ARRAS et al. 2007). Sie können bei Stress und milden bis moderaten Schmerzen Veränderungen aufweisen, die durch Verhaltensuntersuchungen allein nicht identifiziert werden können (ARRAS et al. 2007; HORNETZ 2016). Eine abdominale Transmitterimplantation beeinflusst sowohl die Futter- und Wasseraufnahme als auch den zirkadianen Rhythmus bei Ratten für die Dauer von höchstens einer Woche (LEON et al. 2004). Hierbei spielt vor allem das Verhältnis der Größe des Transmitters zum Körpergewicht des Tieres eine Rolle (LEON et al. 2004).

In der biomedizinischen Forschung ist der Einsatz der Telemetrie zur Erfassung physiologischer Parameter seit den ersten telemetrischen Untersuchungen im Jahr 1869 stetig angestiegen (KRAMER et al. 2001). Im Rahmen der präklinischen Entwicklung und der Sicherheitspharmakologie wird die Telemetrie genutzt, um durch die Aufzeichnung eines Elektrokardiogramms (EKG) den Effekt eines Wirkstoffs auf physiologische Körperfunktionen zu erfassen (KRAMER et al. 2001). Ferner eignet sich die Telemetrie dazu, Änderungen des autonomen Nervensystems im Rahmen der Stressforschung anzuzeigen (BEERLING et al. 2011). So konnten BEERLING et al. (2011) zeigen, dass

Sprague Dawley Ratten, die mit einer neuen Umgebung konfrontiert wurden, erhöhte Werte hinsichtlich der Aktivität, der Herzfrequenz und des Blutdrucks aufwiesen. Diese Werte korrelierten mit einem Anstieg von Plasma-Corticosteron (BEERLING et al. 2011). Etwa 30 Minuten nach der Exposition kehrten alle Parameter zu Normwerten zurück (BEERLING et al. 2011). Dies ist im Falle einer akuten Stressreaktion nicht als Belastung zu werten, sondern als metabolische Reaktion des Körpers, um entsprechende Verhaltensweisen in einer solchen Situation ausüben zu können (BEERLING et al. 2011).

### **5.1. Zirkadiane Aktivität**

Der zirkadiane Rhythmus bezeichnet die genetisch festgelegte Fähigkeit des Organismus, seine physiologischen Vorgänge innerhalb von etwa 24-stündigen Perioden zu verändern (QUIGG 2000). Dieser Rhythmus dient der Anpassung an wiederkehrende Umweltsituationen und ist sowohl bei Tieren und Menschen im Rahmen des Schlaf-Wach-Rhythmus, als auch bei Pflanzen, wie zum Beispiel im Rahmen des Öffnens und Schließens von Blüten im Tagesverlauf, bekannt (SOLLARS u. PICKARD 2015). Da eine zirkadiane Dysfunktion krankheitsbedingt entstehen und schwerwiegende Folgen nach sich ziehen kann, ist die Erforschung der molekularen Grundlagen der biologischen Uhr Bestandteil von Untersuchungen, die 2017 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden (BARGIELLO et al. 1984; LORENZ et al. 1989; BURKI 2017). Die Forscher identifizierten Gene, die maßgeblich dafür verantwortlich sind, die physiologischen Prozesse des Körpers, wie zum Beispiel Hormonkonzentrationen, Körpertemperatur und Herzfrequenz, mit Hilfe von autoregulatorischen Feedbackprozessen auf den Tageszeitverlauf abzustimmen (BURKI 2017). Der zirkadiane Rhythmus bei Säugetieren wird primär von Neuronen des Nucleus suprachiasmaticus des Hypothalamus gesteuert (MORIN 2013). STEPHAN u. ZUCKER (1972) konnten nachweisen, dass Läsionen in diesem Gehirnbereich bei Ratten zu einer schweren Störung der zirkadianen Rhythmik führen können. Durch den retinohypothalamischen Trakt werden Lichtinformationen von Photorezeptoren und retinalen Ganglienzellen zum Nucleus suprachiasmaticus geleitet und generieren dort den zirkadianen Rhythmus im Tageszeitverlauf (MORIN 2013). Die Aktivität der Neuronen des Nucleus suprachiasmaticus weist, je nachdem ob die Spezies tages- oder nachtaktiv ist, unterschiedliche Höhepunkte auf (QUIGG 2000). Bei nachtaktiven Spezies, wie zum Beispiel Mäusen und Ratten, liegt die Aktivitätsperiode in der Dunkelphase. Durch Stress kann sich der Aktivitätsrhythmus der Tiere verschieben, wodurch sich die Schlafphasen immer mehr in die Dunkelphase verlagern (PAPALE et al. 2005). Nach Laparotomien wurde bereits eine verminderte Aktivität bei Mäusen beschrieben (CESAROVIC et al. 2011). Mit Stress verbundene Haltungsbedingungen in einem Drahtbodenkäfig führten bei Ratten ebenfalls zu einer reduzierten Aktivität, vor allem

in der Dunkelphase (GIRAL et al. 2011). Einmalige soziale Ablehnung resultierte bei Ratten ebenfalls in einer reduzierten Aktivität in der Dunkelphase (MEERLO et al. 1996), wohingegen länger andauernde soziale Ablehnung eine erhöhte Aktivität in der Dunkelphase bedingte (KEENEY et al. 2001).

Anfälle und Epilepsien sind in der Lage, den zirkadianen Rhythmus durch eine Phasenverschiebung zu verändern (QUIGG 2000). Jedoch konnte bislang der Einfluss der Stärke und Dauer der Anfälle auf diese Verschiebung nicht abschließend geklärt werden (QUIGG 2000). QUIGG et al. (2001) konnten zeigen, dass hippocampales Kindling bei Sprague Dawley Ratten Phasenverschiebungen im zirkadianen Temperaturverlauf verursachen kann. Bei Humanpatienten konnte festgestellt werden, dass hauptsächlich Patienten mit pharmakoresistenten Epilepsien unter Schlafstörungen und Rhythmusschwankungen leiden, wohingegen Patienten mit gut therapierten Epilepsien keine Unterschiede zu Kontrollgruppen aufwiesen (UNTERBERGER et al. 2015).

## **5.2. Herzfrequenz und Herzratenvariabilität**

Die Generierung der Herzschläge erfolgt physiologisch über den Sinusknoten im rechten Vorhof des Herzens, der autorhythmisch die intrinsische Herzfrequenz erzeugt. Das autonome Nervensystem ist dazu in der Lage, den Sinusrhythmus des Herzens reflexbasiert anzupassen und damit die Herzfrequenz zu verändern. Sympathikus und Parasympathikus besitzen dabei gegensätzliche Einflüsse auf die Herzfrequenz. Der Sympathikus steigert die Herzfrequenz mit Hilfe von Adrenalin und Noradrenalin, wohingegen der Parasympathikus sie durch Acetylcholin senkt (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Diese Anpassungsfähigkeit der Herzaktivität im Sinne einer Variabilität der Schlag-zu-Schlag-Abfolge wird als Herzratenvariabilität (*Heart rate variability*, HRV) bezeichnet. Die HRV spiegelt demnach das Gleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus wider (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996). Die Ruhefrequenz des Herzens kommt durch den dominanten Einfluss des Parasympathikus gegenüber dem Sympathikus zustande. Dies wird dadurch deutlich, dass ein komplett denerviertes Herz eine in Bezug auf die Ruhefrequenz erhöhte Herzfrequenz aufweist. Änderungen der HRV resultieren demnach hauptsächlich aus einem herabgesetzten kardialen Vagustonus (THAYER u. STERNBERG 2006). Bei einer Absenkung des kardialen Vagustonus verschiebt sich das Gleichgewicht zu Gunsten des Sympathikus, der die Regelmäßigkeit des Herzens erhöht und somit die HRV senkt (THAYER u. STERNBERG 2006).

Die Herzfrequenz unterliegt einer physiologischen zirkadianen Schwankung. Sie ist, bisherigen telemetrischen Messdaten zufolge, bei Mäusen in der Dunkelphase

(Aktivitätsphase) erhöht (LI et al. 1999; STEIN et al. 2006). Weiterhin treten zyklische ultradiane Schwankungen in Analogie zu der HPA-Achse auf (LI et al. 1999; STEIN et al. 2006). Im Tagesverlauf der Herzfrequenz zeigen sich zwei Spitzen zu Beginn und zu Ende der Dunkelphase, wohingegen Tiefstwerte in der Mitte der Hellphase erreicht werden (LI et al. 1999). Durch andauernden Stress kann die zirkadiane Rhythmik der Herzfrequenz gestört werden. Dies kann sich als eine herabgesetzte Amplitude der tageszeitlichen Schwankungen manifestieren (MEERLO et al. 1999; SGOIFO et al. 2002).

Die Fähigkeit, sich wechselnden Umwelteinflüssen anzupassen, bildet die Grundlage für den evolutionären Erfolg eines Individuums. Für eine solche Anpassung und die damit verbundene Gesundheit eines Individuums ist die Variabilität der Schlagabfolge von ausschlaggebender Bedeutung (THAYER et al. 2009). Der Verlust der Variabilität führt zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit und Stabilität, wodurch vermehrt pathologische Vorgänge stattfinden können (THAYER et al. 2009). Eine herabgesetzte HRV gilt als vermindertes Anpassungsvermögen des Herzens und stellt einen Prädispositionsfaktor für eine erhöhte Morbidität und Mortalität hinsichtlich verschiedener Herzerkrankungen des Menschen dar, wie zum Beispiel dem Herztod oder der kongestiven Herzinsuffizienz (LIAO et al. 2002; SANDERCOCK u. BRODIE 2006; THIREAU et al. 2008). Deshalb wird die HRV in der Kardiologie als Marker für autonome Aktivität in präklinischen und klinischen Studien eingesetzt (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996).

Es ist bekannt, dass epileptische Anfälle bei Humanpatienten Herzrhythmusstörungen hervorrufen können (OPHERK et al. 2002; BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Diese können zum Beispiel als iktale Sinustachykardien und -bradykardien auftreten (BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Häufig sind diese Rhythmusstörungen gemeinsam mit einer Temporallappensklerose vorzufinden (OPHERK et al. 2002; SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Zudem ist bei Epilepsiepatienten ein sympathovagales Ungleichgewicht durch erniedrigte HRV-Parameter beschrieben (SEVCENCU u. STRUIJK 2010; LOTUFO et al. 2012). Da eine kardiale Dysfunktion einen der Gründe für das Auftreten von SUDEP darstellen könnte, wird untersucht, ob Herzfrequenz und HRV als Risikoindikatoren herangezogen werden können (TOMSON et al. 2008; JEPPESEN et al. 2014; BAYSAL-KIRAC et al. 2017). In einigen Studien konnte bereits festgestellt werden, dass niedrige HRV-Werte mit einem höheren SUDEP-Risiko assoziiert sind (DEGIORGIO et al. 2010; NOVAK et al. 2015). Die reduzierten HRV-Parameter bei Epilepsiepatienten könnten auf anfallsassoziierte Änderungen in autonomen Zentren zurückzuführen sein (SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Da SUDEP häufig in Schlafphasen auftritt, wird vermutet, dass der zirkadiane Rhythmus eine Rolle in der Pathogenese spielt (RONKAINEN et al. 2005; PERSSON et al. 2007; LAMBERTS et al. 2012). Es konnte bereits festgestellt werden, dass der zirkadiane Rhythmus der HRV bei Patienten mit Temporallappenepilepsie fast



vollständig verschwunden ist (RONKAINEN et al. 2005). Dies ist insbesondere auf eine Absenkung der HRV in der Nacht zurückzuführen (RONKAINEN et al. 2005; PERSSON et al. 2007). Dabei ist nicht abschließend geklärt, inwiefern sich Antiepileptika auf den zirkadianen Rhythmus und die HRV auswirken (RONKAINEN et al. 2005; SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Allerdings wurde ein Verlust der zirkadianen Rhythmik bereits als Folge anderer neurologischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Parkinson, beschrieben (RONKAINEN et al. 2005). In der präklinischen Forschung kann die HRV auch verwendet werden, um die erhöhte Mortalität von Tieren in Status-epilepticus-Modellen zu untersuchen (BEALER et al. 2011). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass chemisches Kindling mittels Pentylenetetrazol eine reduzierte HRV bedingt (MAMALYGA 2013). Anfälle, welche im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells induziert wurden, führten zu einer iktalen Bradykardie mit anschließender Tachykardie (PANSANI et al. 2011). Das Phänomen einer Bradykardie nach Stimulation der Amygdala wird als autonome Konditionierung beschrieben. Diese tritt auf, da die Amygdala über Projektionsbahnen mit dem Vagus verbunden ist und dessen Kerngebiete negativ chronotrope Effekte auf das Herz ausüben (BURHANS u. SCHREURS 2013).

In der Stress- und Schmerzforschung werden HRV-Parameter herangezogen, um eine Belastung von Labortieren einzustufen (ARRAS et al. 2007; KORESH et al. 2016). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass HRV-Werte eine negative Korrelation mit Cortisol-Konzentrationen in Urin und Speichel aufweisen (THAYER u. STERNBERG 2006; LIEW et al. 2016). In unterschiedlichen Stress- und Schmerzmodellen konnte die Validität der HRV bestätigt werden (ARRAS et al. 2007; KORESH et al. 2016). Bei wiederholter Einwirkung des Stressors kann sich die autonome Stressantwort jedoch anpassen (SGOIFO et al. 2002). Diese Habituation hängt maßgeblich von der Kontrollierbarkeit und Vorhersehbarkeit des Stressors ab. Ist der Stressor schlecht zu kontrollieren und vorherzusehen, wird auch die autonome Antwort stärker ausfallen (SGOIFO et al. 2002).

Grundlage für die Bestimmung der HRV ist ein EKG. Die EKG-Kurve ist die graphische Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Summenvektors der Herzerregung (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Sie weist unterschiedliche Wellen auf, die die Erregung des Myokards wiedergeben: die P-Welle (Depolarisation der Vorhöfe), der QRS-Komplex (Depolarisation der Kammern) und die T-Welle (Repolarisation) (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Die Ableitungen nach Einthoven I, II und III sind bipolare Ableitungen in der Frontalebene. Hierbei werden parallele Ableitungen zum Summenvektor als volle Ausschläge dargestellt (R-Zacke), wohingegen senkrechte Ableitungen keinen Ausschlag zeigen (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Jede R-Zacke markiert einen Herzschlag. Alle Herzschläge einer Minute werden als Herzfrequenz (*beats per minute*, bpm) bezeichnet. Der Abstand von einer R-Zacke zur nächsten wird als das Schlag-zu-

Schlag-Intervall (Normal-zu-Normal-Intervall, NN-I oder RR-Intervall, RR-I) bezeichnet und in Millisekunden angegeben (ARRAS et al. 2007; SAMMITO u. BÖCKELMANN 2015). Die beschriebenen Parameter sind beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt. Das RR-Intervall dient als Grundlage für die Berechnung der unterschiedlichen Parameter der HRV. Die Herzfrequenz einer ausgewachsenen Ratte liegt bei 200 bis 500 bpm (ERHARDT et al. 2012).

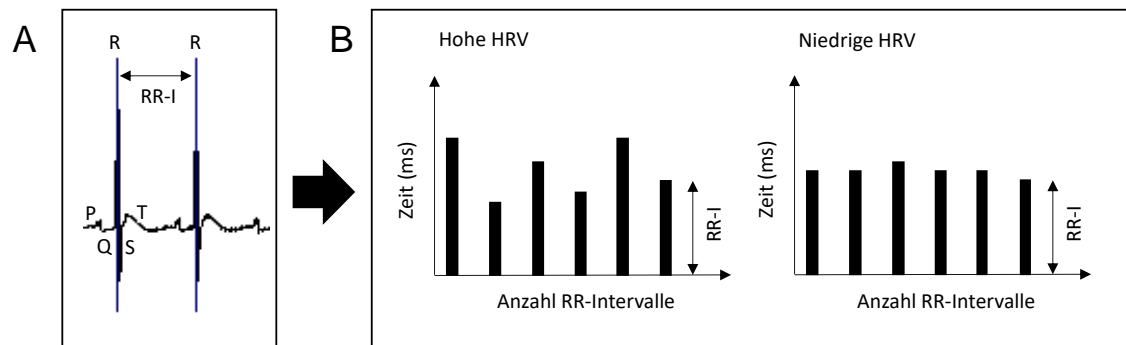


Abbildung 6

Grundlage für das RR-Intervall (RR-I). (A) Darstellung eines EKGs mit zwei Herzschlägen einer Ratte. Es sind P-Welle, QRS-Komplex und T-Welle zu sehen. Jede R-Zacke markiert einen Herzschlag (blaue Linie). Der Abstand zwischen den beiden R-Zacken wird als RR-Intervall bezeichnet. (B) Darstellung eines Tachogramms. Der Anzahl der RR-Intervalle auf der x-Achse wird ein Zeitwert auf der y-Achse zugeordnet. Eine hohe HRV ist durch ein unregelmäßiges RR-Intervall gekennzeichnet und eine niedrige HRV durch ein gleichmäßiges RR-I.

Die Analyse der HRV kann auf kurzen Messzeiträumen, die einen Zeitraum von einigen Minuten widerspiegeln, oder auf einer Langzeitanalyse im Rahmen eines 24-Stunden-EKGs basieren (GEDULDIG 2014). Auf diese Weise können entweder akute Änderungen des autonomen Nervensystems oder eine langfristige sympathovagale Verschiebungen festgestellt werden (GEDULDIG 2014). Die HRV kann durch verschiedene Methoden erfasst werden (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996). Es stehen eine zeitbasierte und eine frequenzbasierte Analysemethoden zur Verfügung. Die Analyse des Zeitbereichs basiert auf den in Abbildung 6 dargestellten RR-Intervallen. Dabei erfolgt entweder eine direkte Messung der RR-Intervalle oder die Unterschiede der einzelnen RR-Intervalle werden analysiert. Hierfür wird die Standardabweichung der RR-Intervalle bestimmt (SDNN). Die SDNN spiegelt alle Komponenten wider, die für die Variabilität der RR-Intervalle innerhalb der Aufzeichnungsperiode verantwortlich sind (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996). Rechnerisch können noch weitere Parameter des Zeitbereichs bestimmt werden. Dazu gehören die Parameter RMSSD, die Quadratwurzel des Mittelwerts über alle Quadrate der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle, und pNNx, der Anteil aller Paare von aufeinanderfolgenden RR-Intervallen mit einer Differenz größer als x ms. Dies wird der zu analysierenden Spezies angepasst (Mensch: 50 ms, Maus: 6 ms, Ratte: 9 ms). Die beiden Parameter RMSSD und pNNx gelten als Maß für die kurzfristigen Anpassungen der

---

parasympathischen Aktivität (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996).

### III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Aufgrund der unterschiedlichen Epilepsietypen und -ätiologien sowie des häufigen Vorkommens pharmakoresistenter Epilepsien besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen Antiepileptika (LÖSCHER u. BRANDT 2010; POTSCHKA u. BRODIE 2012). Zum Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen sowie zur Identifikation neuer Zielstrukturen sind Nagermodelle von ausschlaggebender Bedeutung (ROGAWSKI 2006). Des Weiteren können Anfälle als Nebeneffekte in anderen Forschungsbereichen, wie zum Beispiel in Schlaganfallmodellen und der toxikologischen Prüfung neuer Substanzen auftreten (EASTER et al. 2009; WOLFENSOHN et al. 2013). Die Modelle, durch die bei den Versuchstieren Anfälle induziert werden, können eine große Belastung für die Tiere darstellen (WOLFENSOHN et al. 2013; LIDSTER et al. 2016). Diese Belastung gilt es im Sinne des 3R-Konzepts zu minimieren, indem nicht nur die induzierten Anfälle sondern alle versuchsbedingten Prozeduren in die Überlegungen mit einbezogen werden (WOLFENSOHN et al. 2013). Ratten stellen die in der Epilepsieforschung am häufigsten eingesetzte Versuchstierspezies dar (LIDSTER et al. 2016). Da Ratten jedoch Beutetiere sind und stets versuchen, ihre Leiden vor potenziellen Feinden zu verbergen, ist es sehr schwierig deren Belastung richtig einzuschätzen (ARRAS et al. 2007; JIRKOF et al. 2010). Für die Einstufung der modellspezifischen Belastung der Tiere fehlt es zum momentanen Zeitpunkt an evidenzbasierten Methoden (LIDSTER et al. 2016). Deshalb muss eine Grundlage geschaffen werden, die anstelle einer subjektiven Belastungsbeurteilung eine beweisgestützte, ethisch vertretbare Einschätzung im Sinne des Refinements erlaubt. Dazu ist es essentiell, speziesspezifische Verhaltensweisen sowie biochemische und physiologische Parameter heranzuziehen, um eine möglichst detaillierte Einschätzung des Tierwohls zu erzielen (KRETLOW et al. 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Daten von gekindelten Tieren mit einer elektrodenimplantierten Kontrollgruppe (nachfolgend als Sham bezeichnet) und einer nicht implantierten Kontrollgruppe (nachfolgend als naiv bezeichnet) verglichen. Auf diese Weise soll sowohl eine Einschätzung der durch die Anfälle verursachten Belastung als auch der auf die versuchsbedingten Prozeduren zurückzuführende Belastung ermöglicht werden. Dabei muss beachtet werden, dass sowohl die Anfallsinduktion als auch die daraus resultierenden Epilepsien zu einer Belastung der Tiere führen können (LIDSTER et al. 2016). Epilepsien können mit postiktalen Verhaltensänderungen und Komorbiditäten wie angst- und depressionsassoziiertem Verhalten sowie systemischen Beeinträchtigungen assoziiert sein (LIDSTER et al. 2016). Durch die große Bandbreite, der in diesem Versuchsvorhaben verwendeten Methoden sollen die geeignetsten Parameter für eine

Belastungseinschätzung in einem der am häufigsten verwendeten Epilepsiemodelle, dem Amygdala-Kindling-Modell, evaluiert werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, durch evidenzbasierte Methoden eine modellspezifische Aussage über die Einstufung des Schweregrads der Belastung des Amygdala-Kindling-Modells im Sinne der gesetzlichen Vorgaben zu ermöglichen. Dies soll Forschergruppen dazu dienen, bei der Auswahl zwischen mehreren adäquaten Modellen das Modell mit der niedrigsten Belastung für die Tiere zu wählen, da die Auswahl der Modelle derzeit häufig aus Tradition oder Bequemlichkeit erfolgt (GRONE u. BARABAN 2015). Den Mitarbeitern der Veterinärbehörden soll durch die vorliegende Studie die Bewertung von Tierversuchsanträgen für Epilepsiemodelle und potenzielle Anfallsinduktion erleichtert werden. Die momentan vorliegende Belastungseinstufung durch die Richtlinie 2010/63/EU als mittel bis schwer soll neu bewertet werden (LIDSTER et al. 2016) und der Grundstein für eine evidenzbasierte Einstufung der Belastung der Tiere im Amygdala-Kindling-Modell gelegt werden. Durch die Erfassung unterschiedlicher Parameter soll die Einschätzung der Belastung verbessert werden und eine Reduktion derselben erreicht werden. Auf diese Weise ist es möglich, einen ethisch vertretbaren Tierversuch zu gewährleisten und die präklinische Datenqualität zu verbessern.

In der vorliegenden Studie wurden die Verhaltensuntersuchungen erstmals parallel, das heißt am jeweils darauffolgenden Tag einer Anfallsinduktion durchgeführt und nicht wie in vorherigen Studien nach Abschluss der Kindling-Phase. Dadurch ist es möglich, unmittelbar festzustellen, ob die Tiere in der Früh- oder Spätphase des Kindling-Prozesses Verhaltensänderungen aufweisen.

Folgende Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat das Amygdala-Kindling-Modell auf die Verhaltensweisen der Tiere?
- Welchen Einfluss hat das Amygdala-Kindling-Modell auf biochemische Stressparameter?
- Welchen Einfluss hat das Amygdala-Kindling-Modell auf den zirkadianen Rhythmus der Aktivität, der Herzfrequenz und der HRV?
- Welchen Einfluss hat die Elektrodenimplantation auf die verschiedenen Parameter?
- Welche Parameter sind geeignet, um eine Belastungseinschätzung des Amygdala-Kindling-Modells zu ermöglichen?
- Welche Parameter korrelieren miteinander?

## IV. MATERIAL UND METHODEN

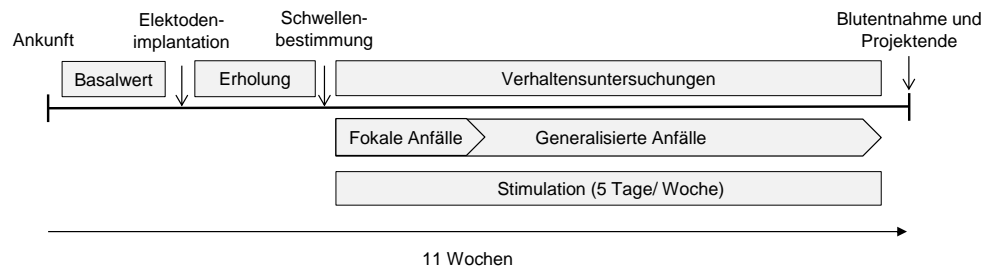
### 1. Versuchstiere

Für die Versuche zur Entwicklung von Beurteilungsschemata zur Einschätzung der Belastung im Amygdala-Kindling-Modell wurden weibliche Sprague Dawley Ratten (Verhaltensuntersuchungen und biochemische Parameter: 200 - 224 g, Envigo, Undine, Italien; telemetrischen Untersuchungen: 200 - 224 g, Envigo, Horst, Niederlande) verwendet. Die Tiere wurden einzeln in „Makrolon Käfigen Typ III“ (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 - 24 °C, 45 - 60 % Luftfeuchtigkeit) in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus (Helligkeitsphase von 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ, beziehungsweise 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ) gehalten. Die Einzelhaltung der Tiere war aufgrund der Implantation der Stimulationselektroden notwendig. Die Tiere wurden mit Futter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum versorgt. Einmal wöchentlich erhielten die Tiere saubere Käfige, welche mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und 14 Gramm neuem Nestmaterial (Enviro Dri<sup>®</sup>, Claus GmbH, Limburgerhof, Deutschland) ausgestattet waren. Nach ihrer Ankunft konnten sich die Tiere bis zum Versuchsbeginn mindestens eine Woche lang an die neuen Umweltbedingungen gewöhnen. Innerhalb dieses Zeitraums wurden die Tiere mit den versuchsdurchführenden Personen vertraut gemacht. Alle Untersuchungen wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ 55.2-1-54-2531-119-14 und AZ 55.2-1-54-2532-105-16) und standen in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und der EU-Richtlinie 2010/63/EU. Bei der Versuchsdurchführung und Veröffentlichung der Ergebnisse wurden die ARRIVE-Guidelines eingehalten (KILKENNY et al. 2010). Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich mit Hilfe eines von der Regierung von Oberbayern geprüften, modellspezifischen Score-Sheets sowie durch den Grimace-Scale und den modifizierten Irwin-Score erfasst (siehe X. Anhang 4). Zusätzlich wurden die Tiere einmal wöchentlich gewogen. Die Gruppeneinteilung und Reihenfolge der Tiere in den Versuchen erfolgte randomisiert (<https://www.randomizer.org/>). Insgesamt wurden 130 Tiere für die Untersuchungen verwendet. Die Tiere wurden randomisiert auf drei Versuchsphasen und drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Der Kindling-Gruppe und der elektrodenimplantierten Gruppe wurde jeweils eine Elektrode implantiert. Die Kindling-Gruppe durchlief das in Abschnitt 3 beschriebene Amygdala-Kindling-Modell. Die Sham-Gruppe durchlief, bis auf die Stimulationen, alle versuchsbedingten Prozeduren. Einer weiteren Gruppe wurde weder eine Elektrode implantiert, noch durchliefen die Tiere die versuchsbedingten Prozeduren. In der ersten Versuchsphase wurden Stimulationen bis zum Stadium generalisierter Anfälle

durchgeführt. Hierbei wurden 20 Tiere in der Kindling-Gruppe, 18 Tiere in der Sham-Gruppe und 18 Tiere in der naiven Gruppe verwendet. In der zweiten Versuchsphase wurden die Stimulationen nur bis zum Stadium fokaler Anfälle durchgeführt. Hierbei wurden 20 Tiere in der Kindling-Gruppe, 18 Tiere in der Sham-Gruppe und 17 Tiere in der naiven Gruppe verwendet. Alle Tiere dieser Gruppen wurden für die Durchführung des Social-Interaction-Tests benötigt. Für alle weiteren Untersuchungen wurden zwölf Tiere aus jeder Gruppe randomisiert ausgewählt. Die restlichen Tiere wurden anschließend in einem anderen Projekt verwendet. Der zeitliche Ablauf der Versuchsphase eins und zwei ist in Abbildung 7 (A) dargestellt. In der dritten Versuchsphase wurde allen Tieren zusätzlich ein Transmitter zur telemetrischen Ableitung des EKGs und der zirkadianen Aktivität implantiert. Die Tiere der naiven Gruppe wurden auf Grund der Transmitterimplantation in dieser Versuchsphase als Kontrollgruppe bezeichnet. In dieser Versuchsphase wurden sechs Tiere in der Kindling-Gruppe, sieben Tiere in der Sham-Gruppe und sechs Tiere in der Kontrollgruppe verwendet. Der zeitliche Ablauf der dritten Versuchsphase ist in Abbildung 7 (B) dargestellt. Unter dem Begriff elektrodenimplantierte Tiere werden nachfolgend die Tiere der Sham- und Kindling-Gruppe für die postoperative Phase zusammengefasst. Direkt im Anschluss an die Versuche wurden die Tiere durch eine Pentobarbital-Injektion (600 mg/kg i.p., Narcoren®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) euthanasiert. Zur Analgesie wurde den Tieren 30 Minuten vor der Euthanasie Metamizol (50 mg/kg peroral, Vetalgin®, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland) in 0,2 prozentiger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin ≥ 98%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verabreicht. Im Anschluss an die Euthanasie wurden die Nebennieren beidseitig entnommen und mit einer Feinwaage (Mettler Toledo, Gießen, Deutschland) gewogen. Darauffolgend wurde eine Perfusionsfixierung durchgeführt. Hierfür wurde durch eine, im linken Herzventrikel platzierte Knopfkanüle zunächst eine 0,01 M phosphatgepufferte 0,9 prozentige Kochsalzlösung und anschließend eine Fixierlösung verabreicht. Die Fixierlösung bestand aus acht prozentigem Paraformaldehyd in 0,2 M Phosphatpuffer (1:1). Auf diese Weise konnte eine schnelle Fixierung des Gehirns mit Hilfe des natürlichen Gefäßsystems erreicht werden. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und zunächst 24 Stunden in vier prozentigem Paraformaldehyd bei 4 °C gelagert. Danach wurden sie in eine 30 prozentige Saccharose-Lösung überführt, um einen ausreichenden Gefrierschutz zu gewährleisten. Die Gehirne wurden mit Hilfe von Isopentan (2-Methylbutan, Honeywell, Offenbach, Deutschland) und flüssigem Stickstoff (Linde AG Gases Division, Pullach, Deutschland) in Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium, Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingefroren und bei – 80 °C gelagert. Die Gehirne der Tiere wurden in einem anderen Projekt, das nicht Teil dieser Arbeit war, verwendet. Sieben Tiere mussten aufgrund eines Implantatverlusts vorzeitig euthanasiert werden und zwei Tiere verstarben während der Anästhesie. Die Daten dieser

Tiere wurden geprüft und nachfolgend bis zum Zeitpunkt ihres Ausscheidens berücksichtigt.

A



B

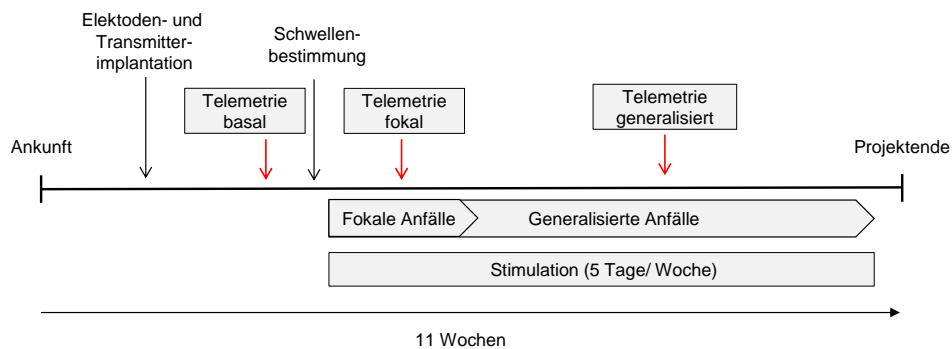


Abbildung 7

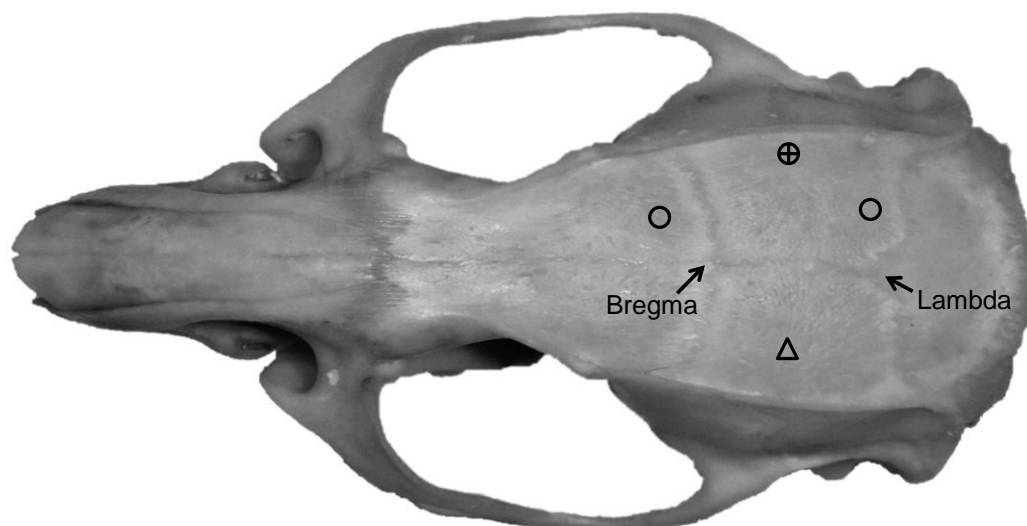
Zeitlicher Ablauf der drei Versuchsphasen. (A) Versuchsaufbau der Versuchsphase eins (generalisierte Anfälle) und zwei (fokale Anfälle). In diesen beiden Versuchsphasen wurden Verhaltensuntersuchungen durchgeführt und biochemische Parameter bestimmt. (B) Versuchsaufbau der Versuchsphase drei (fokale und generalisierte Anfälle). In dieser Versuchsphase wurden die telemetrischen Messdaten von EKG und zirkadianer Aktivität zu drei verschiedenen Zeitpunkten während des Experiments aufgezeichnet.



## 2. Elektrodenimplantation

Die Allgemeinanästhesie für die Implantation der Stimulations- und Ableitungselektrode erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml 0,9 prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland). Zur Analgesie wurde den Tieren sukutan (s.c.) Meloxicam (1 mg/kg, Metacam<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) 30 Minuten vor und 24 Stunden nach der Operation verabreicht. Eine zusätzliche Lokalanästhesie erfolgte durch eine Bupivacain-Injektion s.c. (Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1 : 200 000), Jenapharm<sup>®</sup>, mibe GmbH, Brehna, Deutschland). Die Augen der Tiere wurden durch eine Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknung geschützt. Die Implantationsstelle wurde rasiert und desinfiziert. Eine antibiotische Behandlung der Tiere erfolgte ab einem Tag vor der Operation über insgesamt acht Tage zwei Mal täglich durch Marbofloxacin s.c. (1 mg/kg, Marbocyl<sup>®</sup> FD 1 %, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland). Um ein Auskühlen der Tiere während des Eingriffs zu verhindern, wurden sie auf Wärmepads platziert. Das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde prä- und intraoperativ mittels Zwischenzehen- und Kornealreflex geprüft. Darauffolgend erfolgte mit Hilfe eines Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und des stereotaktischen Atlas von PAXINOS u. WATSON (2005) die genaue Positionierung der bipolaren, mit Teflon ummantelten Ableitungs- und Stimulationselektrode in die rechte basolaterale Amygdala. Die Oberkieferhalterung des Stereotakten wurde auf -3,9 mm eingestellt. So konnte gewährleistet werden, dass sich Bregma (rostraler Kreuzungspunkt der Knochennähte des Schädels) auf einer Höhe mit Lambda (kaudaler Kreuzungspunkt der Knochennähte) befand. Die Koordinaten der genauen Position der Elektrode wurden relativ zu Bregma angegeben: anterioposterior +2,2 mm, lateral +4,7 mm und dorsoventral +8,5 mm. Durch ein in die Schädeldecke gebohrtes Loch wurde die Elektrode in die basolaterale Amygdala implantiert. Zur Befestigung der Elektrode wurden zwei Fixationsschrauben in die Schädeldecke eingesetzt und die Elektrode mittels kaltpolymerisierendem Kunststoff (Paladur<sup>®</sup>, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) an den Schrauben fixiert. Die untere Kunststoffschicht wurden zur Prävention einer postoperativen Wundinfektion mit 2,1 prozentigem Gentamicinsulfat (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) versetzt. Eine weitere Fixationsschraube, die über der linken Hemisphäre platziert wurde, diente zur Befestigung des Erdungsdrahts (Lokalisationen siehe Abbildung 8). Nach vollständiger Befestigung der Elektrode wurde die Wunde durch Einzelknopfnähte mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien) verschlossen. Ungefähr zehn Tage nach der Operation wurden die Fäden gezogen. Postoperativ wurde eine konstante Körpertemperatur der Tiere bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins mit

Hilfe von Wärmepads sichergestellt.



- ⊕ Ableitungs- und Stimulationselektrode
- Fixationsschrauben
- Δ Erdungsschraube

Abbildung 8:

Darstellung der Lokalisation der Stimulations- und Ableitungselektrode, sowie der Fixations- und Erdungsschrauben auf einem Rattenschädel; Foto mit freundlicher Genehmigung von Thomas Licko.

### 3. Amygdala-Kindling-Modell

Nach einer zweiwöchigen Regenerationsphase wurde mit dem Amygdala-Kindling begonnen. Das Kindling wurde dabei analog zu den Studien von PEKCEC et al. (2007) und RUSSMANN et al. (2016) durchgeführt. Die Stimulationen fanden dabei in videoüberwachten Plexiglasschalen statt. Der Steckeraufsatz des Implantats der Tiere wurde mit einem 3-adrigen, abgeschirmtem Kabel der Stimulationseinheit (HSE Type 215E12 SV1, Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) verbunden. Jeder Stimulus dauerte jeweils eine Sekunde und bestand aus monophasischen Rechteckimpulsen mit einer Dauer von einer Millisekunde und einer Frequenz von 50 Hertz. Durch eine *Switchbox* konnte zwischen der EEG-Aufzeichnung und der Stimulation gewechselt werden. Sie wurde mit einem weiteren Stimulator (HSE Type 215E12 Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) verbunden und ermöglichte damit eine kurzzeitige Unterbrechung der Aufzeichnung des EEGs während der Stimulation. Zur Aufzeichnung des EEGs wurden ein Ein-Kanal-Verstärker (BioAmp, ADInstruments LTD., Hastings, UK) und ein Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) verwendet. Durch den Verstärker konnte ein 100-fach stärkeres EEG-Signal erreicht werden. Des Weiteren wurden durch entsprechende Filter Störsignale ausgeschaltet (*low pass* Filter > 5 kHz, *high pass* Filter < 3 Hz). Mit Hilfe des Notch-Filters wurden Störsignale im Bereich von 50 Hz gefiltert. Die Abtastrate betrug 1 kS/s. Die Daten wurden mit Hilfe der Software Labchart 7 (ADInstruments LTD., Hastings, UK) analysiert.

Zu Beginn des Amygdala-Kindlings wurde die initiale Nachentladungsschwelle (*Afterdischarge threshold* (ADT)) als Maß für die Anfallsempfindlichkeit bestimmt. Für die Bestimmung der ADT wurde mit einer Stimulationsstärke von 8  $\mu$ A begonnen. Diese wurde daraufhin jede Minute um 20 % erhöht. Die ADT wird definiert als die niedrigste Stimulationsstärke, die Änderungen des EEGs von mindestens einem Hertz, einer Amplitude von mindestens zwei Mal der Höhe der Basallinie des EEGs, und einer Dauer von mindestens fünf Sekunden hervorruft. Einen Tag nach der Bestimmung der ADT wurde mit dem Amygdala-Kindling begonnen. Dabei wurden die Tiere einmal täglich an fünf Tagen pro Woche mit einer Stromstärke von 580  $\mu$ A stimuliert. Es wurden folgende Parameter aufgezeichnet:

- Anfallsschwere (*seizure severity*, SS), in Tabelle 3 erläutert
- Anfallsdauer (*seizure duration*, SD): visuell beurteilte Dauer des motorischen Anfallsgeschehens
- Nachentladungsdauer (*afterdischarge duration*, ADD): Zeitraum von mindestens fünf Sekunden, in dem anfallstypische Muster mit mindestens einem Hertz und einer Amplitude, die mindestens zwei Mal so hoch ist wie die Basallinie im EEG auftreten.

Diese Muster werden als *Spikes* bezeichnet. In einigen Fällen traten veränderte Nachentladungsmuster auf. Dann wurde die Zeit bis zum ersten Auftreten der Veränderung als ADD1 beschrieben. Der gesamte Zeitraum des Auftretens der *Spikes* wurde als ADD2 bezeichnet. Trat keine derartige Veränderung des Nachentladungsmusters auf, war ADD1 gleich ADD2.

Die Anfallsschwere wurde entsprechend eines modifizierten Scores von RACINE (1972), der in Tabelle 3 dargestellt ist, beurteilt. Die Anfallsdauer wurde anhand der motorischen Anfallsaktivität manuell mit einer Stoppuhr bestimmt.

Tabelle 3: Krampfstadien im Amgdala-Kindling-Modell. Aus dem Englischen übersetzt und modifiziert nach RACINE (1972).

Krampfschwere	Anfallscharakteristika	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen eines oder beider Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln)	Fokale Anfälle
Stadium II	Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen)	
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten um weniger als 45°	Generalisierte Anfälle
Stadium IV	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten um mehr als 45°	
Stadium (V)	Siehe V, ohne Verlust der Stellreflexe (z.B. bei klonischen Krämpfen in Seitenlage)	
Stadium V	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes und Verlust der Stellreflexe (Hintenüberfallen)	

Die tägliche Stimulation wurde so lange fortgeführt, bis 14 - 15 generalisierte Anfälle in Versuchsgruppe eins (20 Tiere), drei fokale Anfälle in Versuchsgruppe zwei (20 Tiere) und 12 generalisierte Anfälle in Gruppe drei (6 Tiere) ausgelöst wurden. Das Amygdala-Kindling wurde jeweils am Nachmittag (13:30 – 15:00 Uhr) durchgeführt. Dadurch sollte vermieden

werden, dass die induzierten Anfälle einen direkten Einfluss auf die Verhaltensuntersuchungen, die jeweils am darauffolgenden Morgen durchgeführt wurden, ausübten. Die Tiere wurden mindestens 30 Minuten vor Beginn der Stimulationen in den Versuchsraum gebracht. Die Sham-Gruppe wurde auf die gleiche Weise behandelt wie die Kindling-Gruppe. Demzufolge wurde die Sham-Gruppe ebenfalls in den Versuchsraum transportiert und von ihrem Heimkäfig in die Versuchsanlage (Plexiglasschale) überführt. Die naive Gruppe hingegen verblieb im Tierhaltungsraum. Durch den Vergleich der drei Gruppen kann sowohl der Effekt der induzierten Anfälle (Vergleich Kindling-Gruppe und Sham-Gruppe), als auch der Elektrodenimplantation und des versuchsbedingten *Handlings* (Vergleich Sham-Gruppe und naive Gruppe) analysiert werden. Zudem kann der kumulierte Effekt von Anfällen, Elektrodenimplantation und versuchsbedingtem *Handling* (Vergleich Kindling-Gruppe und naive Gruppe) beurteilt werden.

## 4. Verhaltensuntersuchungen

Die Verhaltensuntersuchungen wurden während der Kindling-Phase jeweils am Morgen (7:00 – 13:00 Uhr) nach einer Stimulation, an fünf Tagen pro Woche, durchgeführt. Während der ersten Versuchsphase wurden die Verhaltensuntersuchungen an Tieren mit generalisierten Anfällen durchgeführt, während in der zweiten Versuchsphase Tiere mit fokalen Anfällen verwendet wurden. In der ersten Versuchsphase wurden die Verhaltensuntersuchungen in folgender Reihenfolge durchgeführt: Social-Interaction-Test, Burrowing-Test, Open-Field-Test, Black-and-White-Box, Elevated-Plus-Maze, Saccharin-Präferenz-Test. Das Nestbauverhalten, *Latency to start nestbuilding*, der Verschmutzungsgrad des Nests und das Grabverhalten konnten während der Phase mit fokalen und der Früh- und Spätphase generalisierter Anfälle evaluiert werden. Da in der zweiten Versuchsphase nur ein begrenztes Zeitfenster für die Verhaltensuntersuchungen zur Verfügung stand, weil die fokalen Anfälle nach kurzer Zeit in generalisierte Anfälle übergehen, musste die Anzahl der Untersuchungen limitiert werden. Dafür wurden, basierend auf den Daten der ersten Versuchsgruppe, der Social-Interaction-Test, die Black-and-White-Box und das Elevated-Plus-Maze ausgewählt.

Die Untersuchung des Heimkäfigverhaltens (Nestbau, Level-of-soiling, *Latency to start nestbuilding*) und des Burrowing- und Saccharin-Präferenz-Tests konnten im Tierhaltungsraum durchgeführt werden. Alle anderen Verhaltensuntersuchungen wurden in einem schallgeschützten Versuchsraum durchgeführt. Die jeweilige Versuchsanordnung befand sich in der Mitte des Raums und wurde seitlich von schwarzen Vorhängen begrenzt. Zur optimalen Einstellung der Lichtverhältnisse waren vier positionierbare Lampen (Spot Light Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) über der Apparatur angebracht. Die Lichtstärke wurde mittels eines Luxmeters (Voltcraft® MS 1300, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland) überprüft. Mindestens 30 Minuten vor Beginn des Versuchs wurden die Tiere in den Versuchsraum transportiert, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Zur automatisierten Aufzeichnung des Verhaltens der Tiere wurde eine videobasierte (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) Trackingsoftware verwendet (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande). Die Untersuchungen wurden stets durch eine verblindete Person, die den Tieren vertraut war durchgeführt. Alle Versuchsanordnungen wurden nach jedem Tier mit 0,1 prozentiger Essigsäure gereinigt, um veränderte Ergebnisse durch Gerüche des vorangegangenen Tieres zu vermeiden.

### 4.1. Heimkäfigverhalten

Das Nestbauverhalten der Ratten wurde in Anlehnung an die Veröffentlichungen von VAN LOO u. BAUMANS (2004) und JIRKOF et al. (2013a) durchgeführt. Vor dem Beginn aller

Versuche wurde eine Pilotstudie zur Festlegung des optimalen Zeitpunkts der Bestimmung der Nestkomplexität durchgeführt. Dafür wurde ein 24-Stunden-Videomonitoring des Heimkäfigs durchgeführt, um das Nestbauverhalten von Ratten im Tagesverlauf zu beurteilen. Durch diese Pilotstudie zeigte sich ein optimaler Zeitpunkt für die Analyse der Nestkomplexität zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens. Die Nestkomplexität wurde mit Hilfe eines Scoring-Systems bewertet: 0 = Nestmaterial unberührt oder über den ganzen Käfig verteilt, 1 = flaches Nest, 2 = leicht eingedellte Gestalt des Nests, 3 = tiefes Nest. Das Scoring-System ist in Abbildung 9 dargestellt. Vor der Elektrodenimplantation wurde die Nestkomplexität jeden Tag bestimmt, um einen Basiswert im Wochenlauf für jedes Tier zu erhalten. Die Nestkomplexität wurde dann wiederholt nach der Elektrodenimplantation, nach fokalen und nach generalisierten Anfällen überprüft. Da das Nestbauverhalten in der Epilepsieforschung bisher nur in Mausmodellen (GOORDEN et al. 2007; GHEYARA et al. 2014) und nicht in Kombination mit den anderen Verhaltensversuchen getestet wurde, ist es von Bedeutung diesen Test in die Versuchsreihe aufzunehmen.



Abbildung 9  
Scoring-System zur Bewertung der Nestqualität.

Des Weiteren wurde, basierend auf vorangehenden Untersuchungen bei Mäusen (ROCK et al. 2014; HÄGER et al. 2015), ein Test entwickelt, um festzustellen wie schnell Ratten in der Lage sind, nach Zugabe von neuem Nestmaterial mit dem Bau eines neuen Nests zu beginnen (*Latency to start nestbuilding*). Um die Zeit zum Beginn des Nestbaus zu überprüfen, wurden die Tiere nach der wöchentlichen Überführung in einen sauberen Käfig mit neuem Nestmaterial für zehn Minuten beobachtet. Nestbauaktivität wurde dabei definiert als Herumtragen, in den Mund nehmen oder sonstige aktive Interaktionen mit dem Material für mehr als drei Sekunden. Dahingegen wurde es nicht als aktive Interaktion gewertet, wenn die Tiere nur über das Material liefen. Sobald die Tiere eine aktive Interaktion zeigten wurde die Zeit aufgezeichnet. Für Tiere, die in zehn Minuten keine Interaktion zeigten wurde eine Zeit von 600 Sekunden notiert.

Die Verschmutzung des Nests (Level-of-soiling) wurde ebenfalls mit Hilfe eines Scoring-Systems bewertet: 1 = sauber, 2 = leicht verschmutzt, 3 = stark verschmutzt. Dabei wurde bewertet, ob die Tiere den Bereich des Nests frei von Urin und Kot gehalten und in einem

anderen Teil des Käfigs abgelegt hatten. Bewertet wurde dieser Parameter einmal wöchentlich vor dem Austausch der Käfige.

#### **4.2. Social-Interaction-Test**

Der Social-Interaction-Test wurde nach einem Protokoll von HOLTER et al. (2015) und FILE u. SETH (2003) durchgeführt. Für diesen Test ist eine Einzelhaltung der Tiere mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn erforderlich, um die Interaktionszeit der Tiere zu erhöhen (HOLTER et al. 2015). Vor Beginn des Social-Interaction-Tests fand eine Habituation der Tiere an die Versuchsbedingungen statt, um eine Ablenkung der Tiere durch die neue Umgebung zu vermeiden. Hierzu wurden die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in den Versuchsraum transportiert und für zehn Minuten einzeln in die Testkäfige (Makrolon Type IV, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) verbracht. Danach wurden sie wieder in den Heimkäfig und den Tierhaltungsraum verbracht. Am darauffolgenden Tag fand der Social-Interaction-Test statt, bei dem jedes Tier zusammen mit einem Partner für zehn Minuten im Testkäfig beobachtet wurde. Die Partner wurden, um Dominanzverhalten zu vermeiden, nach ähnlichem Gewicht und gleicher Behandlung, wie zum Beispiel Kindling-Kindling, ausgewählt. Für jedes Paar wurde eine Zeit für die aktive soziale Interaktion und eine Zeit für die passive soziale Interaktion festgehalten. Aktive soziale Interaktion wurde definiert als Beriechen oder Folgen des Partners und Pflege- und Spielverhalten. Passive soziale Interaktion wurde definiert als Nebeneinanderliegen oder -sitzen. Die soziale Interaktion soll in dieser Untersuchung überprüft werden, da bekannt ist, dass Distress Veränderungen im Sozialverhalten der Tiere hervorrufen kann (BEERY u. KAUFER 2015).

#### **4.3. Burrowing-Test**

Zur Untersuchung des Grabverhaltens nach RUTTEN et al. (2014a) wurde eine mit Kies gefüllte Plastikröhre (32 cm lang x 10 cm Ø, an der offenen Seite um 6 cm erhöht) verwendet. Für die Untersuchung wurde jede Ratte einzeln in einem Testkäfig (Makrolon Type IV, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) verbracht. Vor allen experimentellen Abläufen wurde ein Training der Tiere durchgeführt, nach dessen Abschluss der Basalwert jedes Tieres bestimmt wurde. An Tag eins erhielt jede Ratte 60 Minuten lang eine leere Röhre. An Tag zwei bis vier hatte jede Ratte zunächst 30 Minuten Zeit sich an den leeren Käfig zu gewöhnen und erhielt anschließend 60 Minuten lang eine mit 2,5 kg Kies (Quartz hell, Körnung 2 – 4 mm, ORBIT GmbH, Usingen, Deutschland) gefüllte Röhre. Die verwendeten Parameter im Burrowing-Test waren die entfernte Menge Kies aus der Röhre und die Zeit bis zum Beginn des ersten Grabverhaltens. Der Basalwert wurde an Tag fünf bestimmt. Das Grabverhalten wurde erneut eine Woche nach der Elektrodenimplantation und während fokalen und generalisierten Anfällen getestet. Tiere, die weniger als 500 g



Kies aus der Röhre entfernten, wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

#### 4.4. Open-Field

Das Open-Field wurde in diesem Versuchsvorhaben verwendet, um die lokomotorische Aktivität der Tiere zu beurteilen. Das Open-Field bestand aus einem schwarzen, runden Kunststoffzylinder mit einem Durchmesser von 85 Zentimetern. Um eine schnellere Durchführung der Untersuchung zu gewährleisten, wurden zwei Open-Fields gleichzeitig verwendet. Es wurde eine ähnliche Lichtintensität wie im Tierhaltungsraum (10-20 Lux) verwendet, um kein angstassoziiertes Verhalten hervorzurufen. Die Tiere wurden einzeln etwa zehn Zentimeter von der Wand entfernt platziert und ihr Verhalten für zehn Minuten beobachtet. Es wurden folgende Parameter erfasst: die gelaufene Strecke, die Geschwindigkeit, die Zeit in Immobilität, die Zeit im Randbereich und im Zentrum sowie die Aufrichtungsfrequenz (*rearing*). Hierfür wurde das Open-Field mit Hilfe der Tracking-Software EthoVision (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) in zwei Zonen (Randbereich und Zentrum) unterteilt. Die Aufrichtungsfrequenz wurde manuell bestimmt.

#### 4.5. Black-and-White-Box

Als Black-and-White-Box wurde eine Plastikkiste mit einer dunklen Box (39 x 20 x 39 cm) mit Deckel und einer hellen Box (39 x 39 x 39 cm) ohne Deckel, die mit einer Lichtintensität von 50 Lux ausgeleuchtet war, verwendet. Beide Boxen waren durch einen Tunnel (10 x 9,8 x 39 cm<sup>3</sup>) verbunden und die Tiere konnten sich frei zwischen beiden Bereichen bewegen. Die Black-and-White-Box befand sich auf einem 80 Zentimeter hohen Tisch. Die Tiere wurden mit Blickrichtung auf den Tunnel in der Mitte der weißen Box platziert und für fünf Minuten beobachtet. Folgende Parameter wurden hierbei erfasst: die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box, die Aufenthaltsdauer in der schwarzen und in der weißen Box sowie die *Stretching postures* als Parameter der Risikoabschätzung, bei dem sich das Tier aus der schwarzen Box in die weiße hineinstreckt ohne sich hineinzuwagen. Die Black-and-White-Box wurde mit Hilfe der Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) überwacht und die Übertritte zwischen den Boxen mit Hilfe der Software manuell festgehalten.

#### 4.6. Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze bestand aus einer kreuzförmigen Plastikapparatur mit einer zentralen Plattform (14 x 14 cm), zwei geschlossenen Armen (15 x 14 x 29 cm) und zwei offenen Armen (50 x 14 cm). Die geschlossenen Arme wurde mit einer Lichtintensität von

zehn Lux und die offenen Arme mit 20 Lux ausgeleuchtet. Das Kreuz befand sich 82 Zentimeter über dem Boden. Die Tiere wurden mit Blickrichtung zum selben geschlossenen Arm in der Apparatur platziert und für fünf Minuten beobachtet. Mit Hilfe der Tracking-Software EthoVision (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) wurden das Zentrum, die geschlossenen und die offenen Arme als einzelne Zonen markiert. Als äversivster Teil des Elevated-Plus-Maze wurde zusätzlich das äußerste Drittel der offenen Arme festgelegt. Folgende Parameter wurden erfasst: die gelaufene Strecke, die Geschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen, die *Stretching postures* und die *Headdips*. Die *Stretching postures* wurden dabei definiert als ein Hervorwagen der Tiere aus einem der geschlossenen Arme in das Zentrum oder die offenen Arme. Die *Headdips* wurden definiert als Herunterschauen der Tiere von einem der offenen Arme. Diese Parameter wurden manuell erfasst.

#### **4.7. Saccharin-Präferenz-Test**

Der Saccharin-Präferenz-Test wurde nach einem Protokoll von KLEIN et al. (2015) durchgeführt. Um Seitenpräferenzen zu vermeiden, wurden während des gesamten Versuchsablaufes zwei Wasserflaschen (700 ml, 70 x 70 mm eckig, Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland) am Käfig befestigt. Der Tränkenippel jeder Flasche hatte einen Durchmesser von einem Millimeter. Der Saccharin-Präferenz-Test fand an insgesamt vier Tagen statt. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 10 dargestellt. Am ersten Versuchstag wurden jeweils 500 Gramm Wasser in beide Flaschen eingewogen und nach 24 Stunden die konsumierte Menge in beiden Seiten gemessen. Am zweiten Tag wurde die Flasche der einen Seite mit 500 Gramm einer 0,1 prozentigen Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefüllt. Die Flasche der anderen Seite wurde mit 500 Gramm Wasser befüllt. Am dritten Tag wurden wieder beide Flaschen mit Wasser gefüllt und am vierten Tag die Flasche der anderen Seite mit der Saccharin-Lösung befüllt. Die konsumierte Menge der Flüssigkeiten wurde immer nach 24 Stunden gemessen, indem die zurückgebliebene Menge ausgewogen wurde.

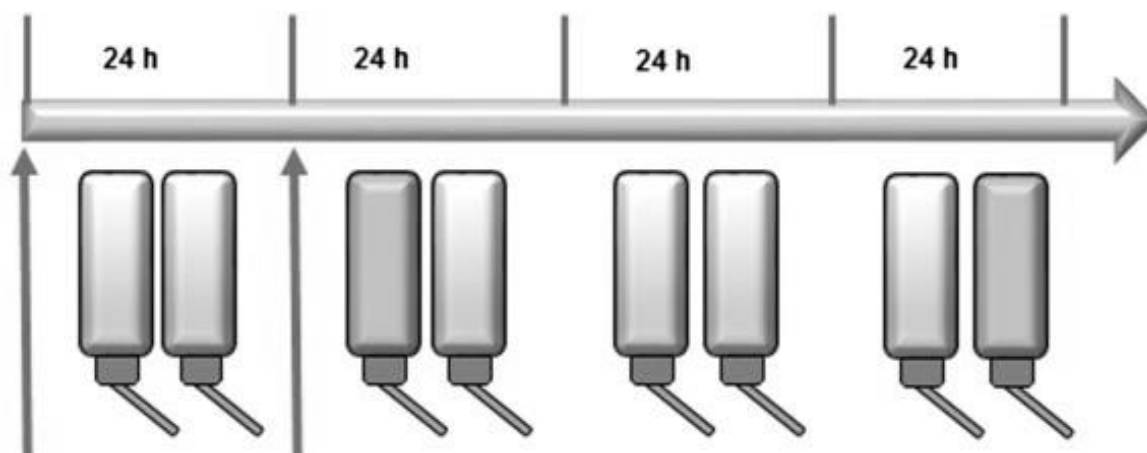


Abbildung 10

Graphische Darstellung des Ablaufs des Saccharin-Präferenz-Tests. An Tag eins und drei wurden den Tieren jeweils zwei Flaschen mit Wasser angeboten (hellgrau). An Tag zwei und vier befand sich auf einer Seite die Saccharin-Lösung (dunkelgrau) und auf der anderen Seite Wasser (hellgrau). Abbildung modifiziert nach KLEIN et al. (2015), mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

## 5. Biochemische Analysen

Biochemische Parameter werden in der vorliegenden Untersuchung herangezogen, um die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen durch objektive Parameter zu stützen. Im Rahmen dieser Studie wurde Corticosteron sowohl im Serum als auch in Kot und Haaren gemessen. Dadurch konnte die Aussagekraft dieses Parameters verstärkt werden und eine Aussage über verschiedene Zeitfenster innerhalb des Versuchsablaufs getroffen werden.

### 5.1. Analyse von Haarproben

Zur Analyse von Corticosteron in den Haarproben wurde den Tieren nach ihrer Ankunft die Haare in einem ungefähr 4 x 4 cm großen Areal im Nacken abrasiert. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Einflüsse von Ereignissen, welche vor dem Start der Untersuchungen möglicherweise mit Stress verbunden waren (z.B. Aufzucht, Transport) von der Analyse ausgeschlossen werden konnten. Nach vier Wochen (unmittelbar vor der Elektrodenimplantation) wurden die nachgewachsenen Haare abrasiert und dienten zur Ermittlung des Corticosteron-Basalwertes für jedes Tier. Anschließend wuchsen die Haare für die Dauer des gesamten Versuchsablaufs nach und wurden am Versuchsende erneut entnommen. Bis zu ihrer Auswertung wurden die Haarproben lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse der Proben wurde in einem spezialisierten Analyselabor (Clemens Kirschbaum, Dresden LABservice GmbH, Dresden, Deutschland) nach einem Protokoll von GAO et al. (2013) mit Hilfe einer Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) durchgeführt. Für die Probenaufbereitung erfolgte zunächst ein Waschvorgang der Haarsegmente mit Isopropanol. Anschließend wurden die Haarproben für die Dauer von mindestens zwölf Stunden getrocknet. Darauffolgend wurde die gleiche Menge jeder Haarprobe mit Methanol versetzt und in einem Trockenschrank 18 Stunden lang bei 45 °C getrocknet. Im Weiteren wurde der Alkohol mit Hilfe eines Stickstoffkondensators bei 65 °C verdampft und die Proben mit destilliertem Wasser wiederhergestellt. Anschließend konnten die Corticosteron-Konzentrationen mit Hilfe der LC-MS/MS bestimmt werden. Die Corticosteron-Konzentration in den final entnommenen Haarproben wurde mit dem Basalwert verglichen und lieferte Informationen über das während des gesamten Versuchsablaufs auftretende Stresslevel der Tiere.

### 5.2. Analyse von Kotproben

Die Kotproben zur Bestimmung der fäkalen Corticosteron-Metaboliten wurden sowohl vor der Elektrodenimplantation als auch in den Phasen mit fokalen und generalisierten Anfällen gesammelt. Zur genauen Bestimmung des Zeitpunkts des Kotabsatzes wurden die Tiere

morgens zwischen 7:00 und 9:00 Uhr in einen frischen Käfig umgesetzt und nach drei Stunden der abgesetzte Kot aus dem Käfig entnommen. Die Kotproben wurden anschließend bei - 20 °C eingefroren. Für die Analyse der Proben musste zunächst eine Extraktion durchgeführt werden, um die fäkalen Corticosteron-Metaboliten aus dem Kot freizusetzen. Dafür wurden die Kotproben in einem Trockenschrank bei 60 °C getrocknet und anschließend mit Hilfe eines Spatels zu einem Pulver zerstoßen. Nachfolgend wurden je 0,1 Gramm Kot in ein Reagenzglas abgewogen und mit zwei Millilitern 80 prozentigem Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Anschließend wurden die Reagenzgläser bei Raumtemperatur 30 Minuten lang auf einem Multi-Vortex (RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) geschüttelt und für zehn Minuten mit 3500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert. Fünf Mikroliter des Überstands wurden abpipettiert und mit 495 Mikrolitern Essigsäure versetzt. Die Analyse des Überstands erfolgte mit Hilfe eines von TOUMA et al. (2003) und LEPSCHY et al. (2010) beschriebenen Enzymimmunoassay (EIA) durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme in der Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie des Departments für Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, Österreich. Hierbei handelte es sich um einen  $5\alpha$ -Pregnan- $3\beta$ , $11\beta$ , $21$ -Triol-20-one EIA, der eigens für die Bestimmung von fäkalen Corticosteron-Metaboliten bei Mäusen (TOUMA et al. 2003) und Ratten (LEPSCHY et al. 2010) entwickelt worden ist. Da es durch die Entnahme von Kotproben möglich ist, nicht-invasiv wiederholt Informationen über die Synthese und Ausschüttung von Corticosteron zu erhalten, können Information über das Stresslevel der Tiere in unterschiedlichen Projektphasen geliefert werden.

### **5.3. Analyse von Serumproben**

Zur Gewinnung der Serumproben wurde nach Abschluss des Amygdala-Kindlings und der Verhaltensuntersuchungen retrobulbär Blut entnommen. Da bekannt ist, dass die Blutentnahme sowie die hierfür notwendige Anästhesie selbst eine Belastung für die Tiere darstellen (MAHL et al. 2000; HOHLBAUM et al. 2017), wurde die Blutentnahme nur einmalig am Ende der Untersuchungen durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte zwischen 9:00 und 10:30 Uhr 36 Stunden nach dem letzten induzierten Anfall unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran (Isofluran CP<sup>®</sup>, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland). Dies war erforderlich, um den Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die Ergebnisse möglichst gering zu halten. Die Blutentnahme wurde entsprechend den Empfehlungen der GV-SOLAS et al. (2009) mit einer maximalen Blutentnahmemenge von 10 % des Blutvolumens durchgeführt. Das Blut wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 30 µl Antiprotease (Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) aufgefangen und nach 30 Minuten Koagulationszeit bei 1500 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde

bei -80 °C eingefroren. Da die Menge des retrobulbär entnommenen Bluts nicht für die Analyse aller biochemischen Parameter ausreichte, wurde nach der Euthanasie der Tiere am darauffolgenden Tag zusätzlich eine Herzpunktion durchgeführt. Die auf diese Weise gewonnenen Blutproben wurden auf die gleiche Weise wie die zuvor entnommenen Proben behandelt. Falls für die Analyse das Blut der Herzpunktion verwendet wurde ist dies im entsprechenden Abschnitt erwähnt. In den Serumproben wurden Corticosteron, Oxytocin, BDNF und CK bestimmt.

Die Corticosteron-Werte im Serum wurden mit Hilfe eines kommerziellen ELISAs (Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922, Demeditec, Kiel, Deutschland) bestimmt. Der ELISA wurde entsprechend den Vorgaben in der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Standards, die Kontrollen sowie die Proben wurden je in Duplikaten in eine mit polyklonalem Kaninchen-anti-Corticosteron-Antikörper beschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zusammen mit einem Inkubationspuffer und einem Enzymkonjugat (Corticosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert) wurde die Platte zwei Stunden lang auf einem Plattformschüttler (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Deutschland) mit 600 rpm bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden vier Waschschriffe durchgeführt und eine Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) hinzugegeben. Es folgte eine lichtgeschützte 30-minütige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Anschließend wurde eine Stopplösung (Salzsäure 2N) hinzugegeben und die Extinktion mit Hilfe eines ELISA-Messgeräts und der zugehörigen Software (Gen 5 microplate reader, Biotek; Gen 5 Imager Software, Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen. Die optische Dichte der Mittelwerte der Duplikate der Standards wird als sigmoidaler Kurvenverlauf der Antigen-Antikörper-Reaktion dargestellt (Abbildung 11). Diese Standardkurve stellt die Grundlage für die Berechnung der Corticosteron-Konzentration in den Serumproben dar. Die Kalkulation der Standardkurve basierte auf einer 4-Parameter-Logistik-Funktion, die eine sehr hohe Genauigkeit gewährleistet. Die Corticosteron-Werte werden in ng/ml dargestellt. Die Normalwerte von Corticosteron im Serum liegen laut der Produkthanleitung bei weiblichen Ratten morgens bei 53,9 – 332,1 ng/ml und nachmittags bei 292,5 – 819,0 ng/ml. Im Rahmen der vorliegenden Studie liefert die Untersuchung von Serum-Corticosteron einen Vergleichswert zu den Corticosteron-Konzentrationen in Haar- und Kotproben.

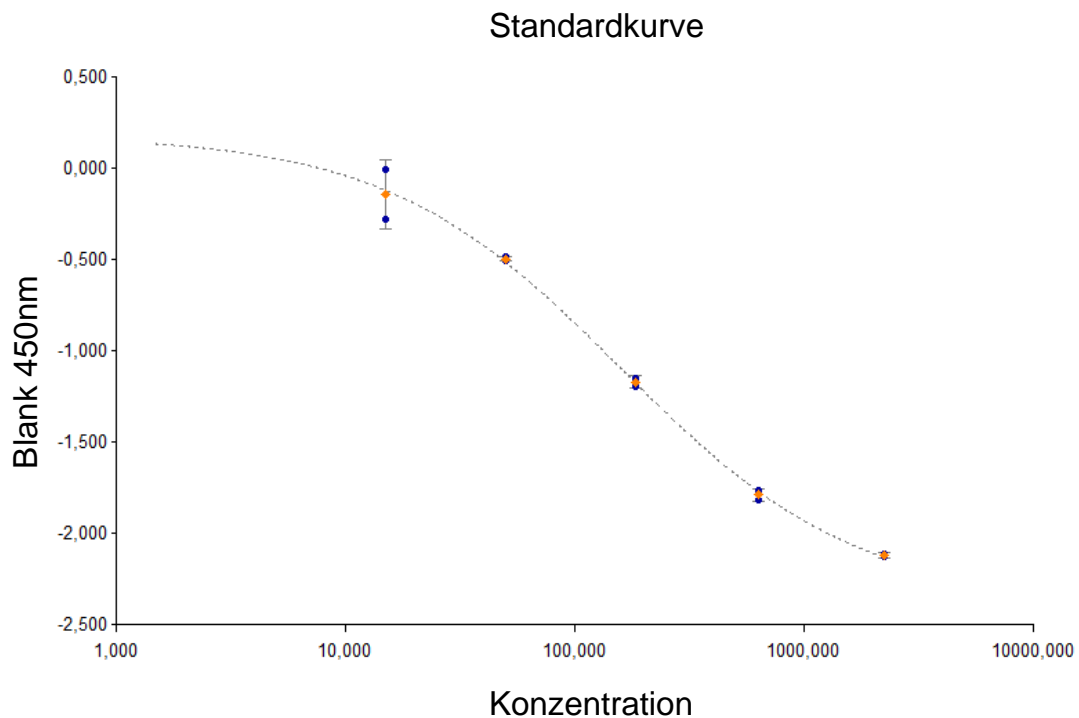


Abbildung 11

Standardkurve mit sigmoidalem Kurvenverlauf für die Corticosteron-Konzentration Bestimmung. Die Kurve wurde mit Hilfe einer 4-Parameter-Logistik Funktion erstellt.

Für die Bestimmung der Oxytocin-Werte im Serum wurde ebenfalls ein kommerzieller ELISA (Oxytocin ELISA kit, ADI-900-153A, Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz) verwendet. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, wurde vor Bestimmung der Werte eine Extraktion des Serums durchgeführt (LENG u. SABATIER 2016). Dafür wurden Festphasenextraktionskartuschen (3 ml HyperSep™ C18 Kartuschen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) verwendet. Die Proben wurden zunächst mit gleichem Volumen 0,1 prozentiger Trifluoressigsäure (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) versehen und bei 17000 x g abzentrifugiert (Mikro-Ultrazentrifuge RC M150 GX, Sorvall Products L.P., Newtown, CT, USA). Der Überstand wurde in die bereits mit Acetonitril (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) und TFA gewaschenen Kartuschen gegeben. Nach erneuten Waschschritten mit TFA wurde das Probenmaterial mit einer Lösung aus 95 % Acetonitril und 5 % 0,1 prozentigem TFA aus den Kartuschen gespült. Anschließend wurde die Flüssigkeit über Nacht in einem Vakuum-Kondensator (Speed Vac Plus SC210A, Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland) mit Kühlkammer (Freezmobile 12SL Sentry, VirTis, SP Scientific, Warminster, PA, USA) verdampft. Bis zur Durchführung der Messung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Zu Beginn des ELISA wurden die Proben mit dem beigefügten Assay-Buffer wiederhergestellt. Zur Herstellung des Standards wurde die Oxytocin-Standardlösung mit einer Konzentration von 10000 pg/mL in insgesamt sieben Schritten mit dem Assay-Buffer

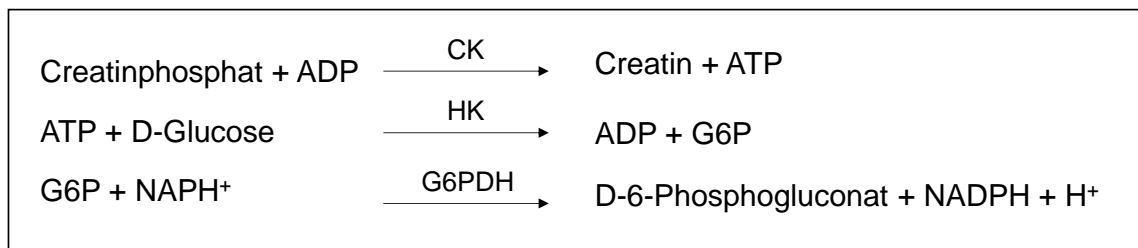
verdünnt. Dadurch entstanden Standardlösungen mit den Konzentrationen 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, und 15,6 pg/mL. Die Standards, Kontrollen und Proben wurden zusammen mit dem Oxytocin-Konjugat (alkalische Phosphatase mit Oxytocin) und dem Oxytocin-Antikörper (polyklonaler Kaninchenantikörper) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Goat anti-Rabbit IgG Microtiter Plate) pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für 24 Stunden. Anschließend wurden drei Waschschriffe durchgeführt und pNpp-Substrat (p-Nitrophenylphosphat in Puffer) hinzugefügt. Nach einer weiteren Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Stopplösung Trinatriumphosphat hinzugegeben und die Platte mit Hilfe des beschriebenen ELISA-Messgeräts bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Korrektur von 570 - 590 nm ausgelesen. Die Oxytocin-Konzentrationen wurden ebenfalls mit Hilfe einer 4-Parameter-Logistik-Funktion anhand der Standardkurve errechnet. Die Oxytocin-Werte werden in pg/ml dargestellt. Die Basalkonzentrationen liegen bei präpubertären weiblichen Ratten bei < 5 pg/ml und bei ausgewachsenen weiblichen Tieren bei circa 25 pg/ml (MINHAS et al. 2016). Unter chronischem Stress kann die Konzentration bei präpubertären Tieren auf circa 25 pg/ml ansteigen (MINHAS et al. 2016).

Die Bestimmung der BDNF-Werte erfolgte durch den Kooperationspartner Prof. Rainer Hellweg an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Berlin, Deutschland. Das verwendete Verfahren wurde zuvor von HELLWEG et al. (2003) beschrieben. Im Rahmen dieses Vorgehens wurden die Serumproben im Verhältnis 1:20 mit Probenpuffer verdünnt und mit Hilfe eines hochsensitiven und hochspezifischen ELISA (Promega Inc., Mannheim, Deutschland) ausgewertet. Die Analyse wurde in einer adaptierten fluorometrischen Form durchgeführt, die diese Arbeitsgruppe zur Bestimmung des Nervenwachstumsfaktors (NGF) verwendet. Dazu wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit primärem monoklonalen Anti-BDNF-Antikörper beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend erfolgten vier Waschschriffe. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand mit der gleichen Menge 0,1 prozentigem NP-40 gemischt. Standards, Kontrollen und Proben wurden in Duplikaten in die Platte pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach vier Waschschriffen wurde ein sekundärer, polyklonaler Anti-BDNF-Antikörper in die 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden erneut vier Waschschriffe durchgeführt und anschließend ein Anti-Huhn IgY-alkalische-Phosphatase-Konjugat hinzugegeben. Danach erfolgte eine weitere Inkubation bei Raumtemperatur für die Dauer von eineinhalb Stunden. Darauffolgand wurden vier Waschschriffe mit dem Waschpuffer und zwei Waschschriffe mit dem Substratpuffer durchgeführt (0,1 M Natriumphosphate, pH 8.7, 1mM MgCl<sub>2</sub>). Anschließend wurde ein Enzymreagenz hinzugegeben (1 mM AttoPhos substrate, Promega Inc., Mannheim, Deutschland). Die Extinktion wurde mit einer Wellenlänge von 440 nm in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Labsystems Fluoroskan II, GMI Inc., MN,



USA) gemessen. Die BDNF-Konzentration wurde mit Hilfe der Regressionsgeraden der Standardkurve bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 1 pg/ml. Die zu erwartende Normalkonzentration von BDNF in Rattenserum liegt bei ungefähr 1100 pg/ml (SARTORIUS et al. 2009).

Für die Bestimmung der katalytischen Aktivität der CK wurde das im Rahmen der finalen Herzpunktion gewonnene Blut verwendet. Die Analyse erfolgte durch die Medizinische Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland. Es handelte sich hierbei um eine Routinebestimmung entsprechend der Empfehlungen der *International Federation of Clinical Chemistry* (ORDER et al. 1991) und der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie (BERGMEYER et al. 1977). Zur Durchführung der Probenanalyse wurde ein Hochdurchsatzgerät verwendet (Cobas Integra® 400 plus System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die Bestimmungsmethode beruht auf der Umsetzung von Creatinphosphat und Adenosindiphosphat zu Creatin und Adenosintriphosphat, die durch die CK katalysiert wird. Das Adenosintriphosphat dient als Kofaktor für die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat. Bei der Oxidation von Glucose-6-Phosphat entsteht NADPH + H<sup>+</sup>. Die Bildungsgeschwindigkeit des NADPH + H<sup>+</sup> ist somit direkt proportional zu der katalytischen Aktivität der CK. Abbildung 12 zeigt die vollständige zugrundeliegende Reaktion. Die katalytische Aktivität der CK wird durch eine Messung der Extinktionszunahme bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt.



ADP = Adenosindiphosphat    G6P = Glucose-6-Phosphat  
 ATP = Adenosintriphosphat    NADP = Nicotinamidadeninukleotidphosphat

Abbildung 12

Zugrundeliegende Reaktion bei der Bestimmung der katalytischen Aktivität der CK. Aus der Bestellinformation „Creatin Kinase“ von cobas® Enzyme (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Die katalytische Aktivität der CK wurde mit Hilfe einer automatisierten Messung durch den Cobas Integra® mit einem Umrechnungsfaktor von U/L x 0,0167 = µkat/L bestimmt. Dabei wurde ein Messbereich von 7 – 2000 U/L abgedeckt (ROCHE 2008). Falls eine Probe eine höhere Konzentration aufwies, wurde sie 1:10 verdünnt und erneut analysiert (ROCHE 2008).

#### **5.4. Bestimmung des Sexualzyklus**

Am Ende der Untersuchungen wurde bei allen Tieren ein Vaginaltupfer entnommen, um deren Zyklusstand zu bestimmen. Die Tupferprobe wurde unter Allgemeinanästhesie mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml 0,9 prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland) unmittelbar vor der Euthanasie der Tiere entnommen. Dazu wurde ein Wattetupfer in 0,9 prozentige isotonische Natriumchlorid-Lösung getaucht. Mit drehenden Bewegungen wurde ein Abstrich der Vaginalschleimhaut entnommen. Dieser wurde auf einem Objektträger ausgerollt und getrocknet. Anschließend wurde eine Diff-Quick-Färbung (Diff-Quick® Schnellfärbeset, Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) durchgeführt und die angefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgewertet. Die Auswertung der Zytologie erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Otzdorff in der chirurgischen und gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München, Deutschland. Anhand der vorliegenden Zelltypen konnte bestimmt werden, in welcher Zyklusphase sich die Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme befanden.

## 6. Telemetriemessungen

### 6.1. Transmitterimplantation

Die Implantation des Transmitters erfolgte im Rahmen derselben Allgemeinanästhesie, die auch für die zuvor beschriebene Elektrodenimplantation verwendet wurde. Das analgetische, antibiotische sowie postoperative Management entsprach ebenso dem der Elektrodenimplantation. Zusätzlich erfolgte eine Lokalanästhesie mit Bupivacain (Bupivacain 0,5 %; Jenapharm, Deutschland) an der Implantationsstelle. Den Tieren wurde ein kommerzieller Transmitter der Firma DSI (Data Sciences International, St.Paul, MN, USA) implantiert. Hierbei handelte es sich um den Typ ETA-F10 mit einem Gewicht von 1,6 Gramm (Abbildung 13). Der Transmitter konnte mittels eines Magneten aktiviert und der Status mit Hilfe eines Radios überprüft werden. Sobald sich das Radio in der Nähe eines aktivierten Transmitters befand, war ein hoher Ton wahrzunehmen.

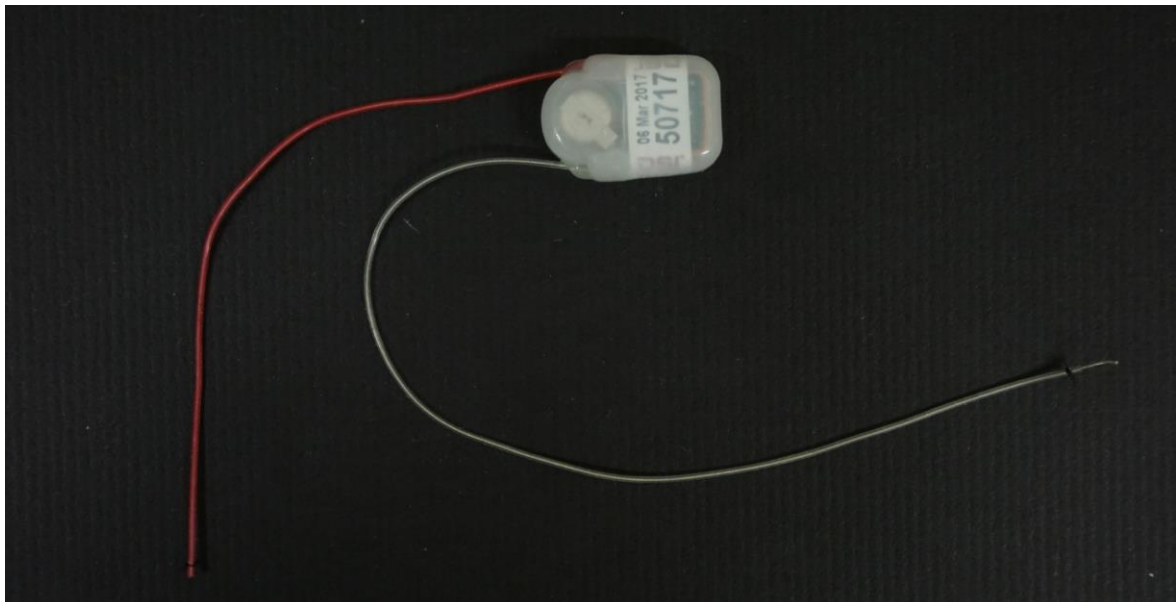


Abbildung 13  
Telemetrie-Transmitter ETA-F10 der Firma DSI (Data Sciences International, St.Paul, MN, USA).

Die subkutane Implantation des Transmitters erfolgte am ventralen Abdomen. Das Tier wurde in Rückenlage gebracht und die Haut mit einem kleinen Schnitt auf Höhe des linken Rippenbogens eröffnet. Anschließend wurde stumpf eine subkutane Tasche präpariert, in welcher der sterile Transmitter platziert wurde. Von der Position des Transmitters aus wurde ein subkutaner Tunnel präpariert, um die Drahtschlingen, welche für die Ableitung des EKGs benötigt wurden, in die entsprechende Position zu bringen. Der positive Draht wurde auf der Höhe des linken Rippenbogens etwa einen Zentimeter lateral des Sternums und der negative Draht auf Höhe des rechten Schulterblatts auf dem Brustkorb des Tieres

platziert (Abbildung 14). Ein abisolierter Teil des Drahtes wurde mit Hilfe einer Kanüle (20Gx1 HS-Einmal Injektionskanülen, Henry Schein®, Melville, USA) intramuskulär angebracht und mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien) fixiert, um einen sicheren Halt der Elektroden sicherzustellen. Die Hautschnitte wurden durch eine Einzelknopfnahnt mit dem gleichen nicht-resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Nach etwa zehn Tagen wurden die Fäden der Hautnaht, gemeinsam mit denen im Rahmen der Elektrodenimplantation gesetzten Nähten, gezogen. Die Transmitter wurden nach jeder Benutzung mit einer Enzymlyösung (Terg-a-zyme® enzyme detergent, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) und einer Sterilisationslösung (Actril®, cold sterilant, Medivators Inc. Minneapolis, USA) behandelt.

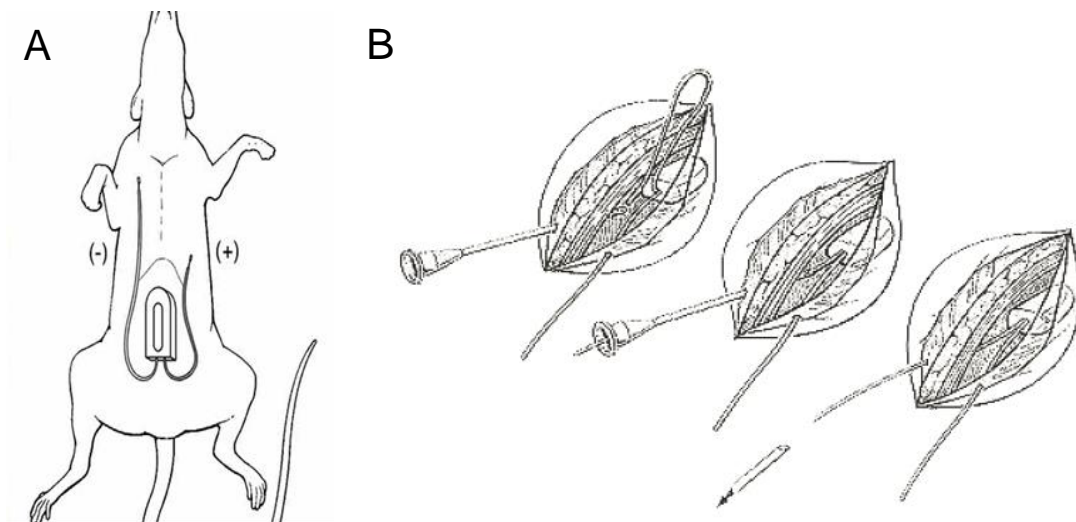


Abbildung 14

Implantation des Transmitters. (A) Positionierung der Elektroden des Transmitters zur Ableitung des EKGs. (B) Intramuskuläre Fixierung des Ableitungsdrahtes. Aus dem DSI Device Surgical Manual, mit freundlicher Genehmigung von DSI.

## 6.2. Datenaufzeichnung

Da die Messung von EKG und Aktivität durch Radiotelemetrie erfolgte, konnten sich die Tiere während der Aufzeichnung frei bewegen. Von den Elektroden des Transmitters wurde die Erregungsfront der Herzaktion als bipolare Ableitung II nach Einthoven abgeleitet. Die Aktivität der Tiere wurde anhand der Änderung der Distanz des Transmitters zu den Antennen der Receiver-Platten in Anzahl pro Minute (*counts per minute*, cpm) gemessen. Da die Transmitter für diese Untersuchung subkutan implantiert wurden, konnten keine Informationen über die Körperkerntemperatur ermittelt werden. Der Transmitter sendete die

aufgezeichneten Informationen mittels Radiowellen an die zugehörigen Receiver-Platten (RPC-1, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA), die sich unter dem Heimkäfig der Tiere befanden. Jeder Receiver-Platte war nur ein Transmitter zugeordnet, um Interferenzen der Aufzeichnungen zu vermeiden. Von der Receiver-Platte wurde das Signal aus Radiowellen in ein digitales Signal umgewandelt und an eine Matrix (MX 2.0, Data Science International, St.Paul, MN, USA) weitergeleitet. Die Matrix filterte das Signal und verarbeitete es weiter. Die Matrix war über einen *Switch* (Cisco Small Business Switch, Data Science International, St.Paul, MN, USA) mit dem Aufzeichnungscomputer verbunden, an dem die Aufzeichnung, Speicherung und Auswertung der Daten mittels der Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA) erfolgte. Der Aufbau der gesamten Anlage ist in Abbildung 15 dargestellt. Folgende Parameter wurden während der Analyse aufgezeichnet: Herzfrequenz, RR-Intervall und die Aktivität (*Total activity*, TA). Zusätzlich wurden die Tiere mit drei Kameras (Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) überwacht, um stündlich die Nestkomplexität zu beurteilen. Dadurch konnten Informationen über die Nestbauaktivität der Tiere im Tagesverlauf ermittelt werden.

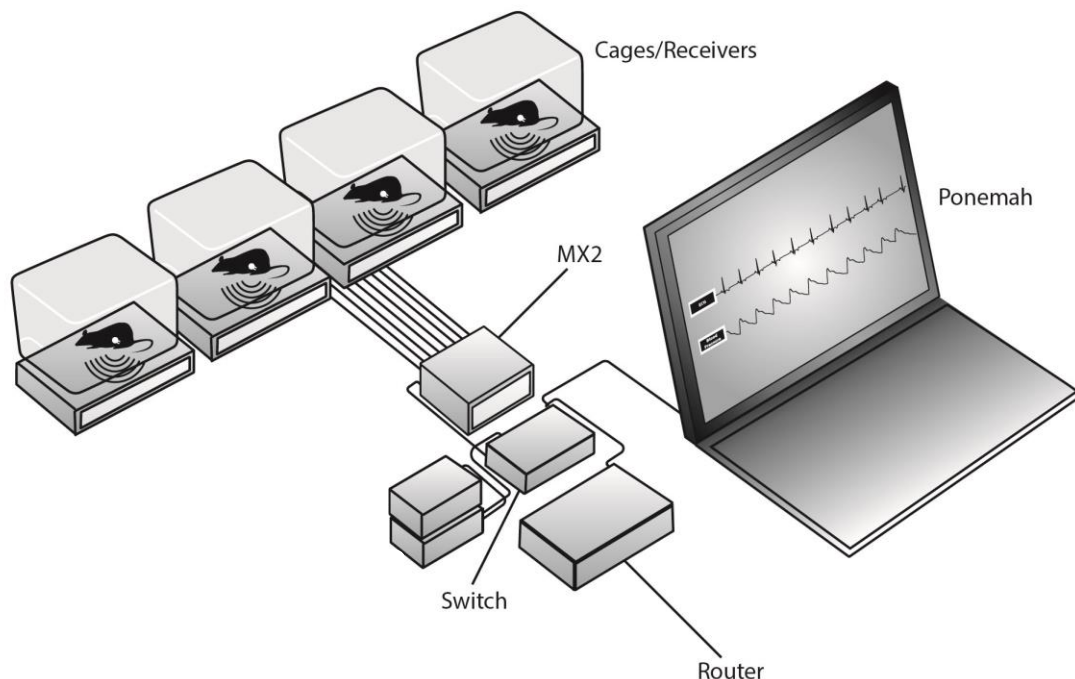


Abbildung 15

Aufbau der Telemetrie Anlage, mit freundlicher Genehmigung von DSI.

Nach einer zweiwöchigen Regenerationsphase wurde vor Beginn des Amygdala-Kindlings der Basalwert für jedes Tier bestimmt. Dazu wurden die Daten der Tiere über einen Zeitraum von 24 Stunden aufgezeichnet. Anschließend wurde mit dem Amygdala-Kindling begonnen. Die Aufzeichnungen wurden auch während der täglichen Stimulationen durchgeführt, um die direkten Auswirkungen der induzierten Anfälle auf die Herzfrequenz

der Tiere zu erfassen. Hierfür wurden die Daten der Tiere jeweils fünf Minuten vor und nach der Stimulation aufgezeichnet. Um die Langzeitauswirkung der induzierten Anfälle auf das Wohlbefinden der Tiere zu untersuchen, wurden Aufzeichnungen während verschiedener Phasen des Kindling-Prozesses (fokale und generalisierte Anfälle) durchgeführt. Da das Amygdala-Kindling täglich etwa zwei Stunden in Anspruch nahm, war jeweils eine Aufzeichnungsperiode von 22 Stunden vor Beginn des nächsten Amygdala-Kindlings möglich.

### 6.3. Datenauswertung

Die Auswertung der Langzeitaufzeichnungen erfolgte für die Hell- und Dunkelphasen getrennt, da die unterschiedliche Aktivität der Tiere in den beiden Phasen mögliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen maskieren könnten. Für die Auswertung wurde die Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20 und 6.30, Data Science International, St. Paul, MN, USA) mit dem EKG-Analyse-Modul (Electrocardiogram Analysis Software Module v5.30, Data Science International, St. Paul, MN, USA) verwendet. Damit konnte eine automatisierte Erkennung der R-Zacken des EKGs, wie in Abbildung 16 dargestellt, durchgeführt werden.

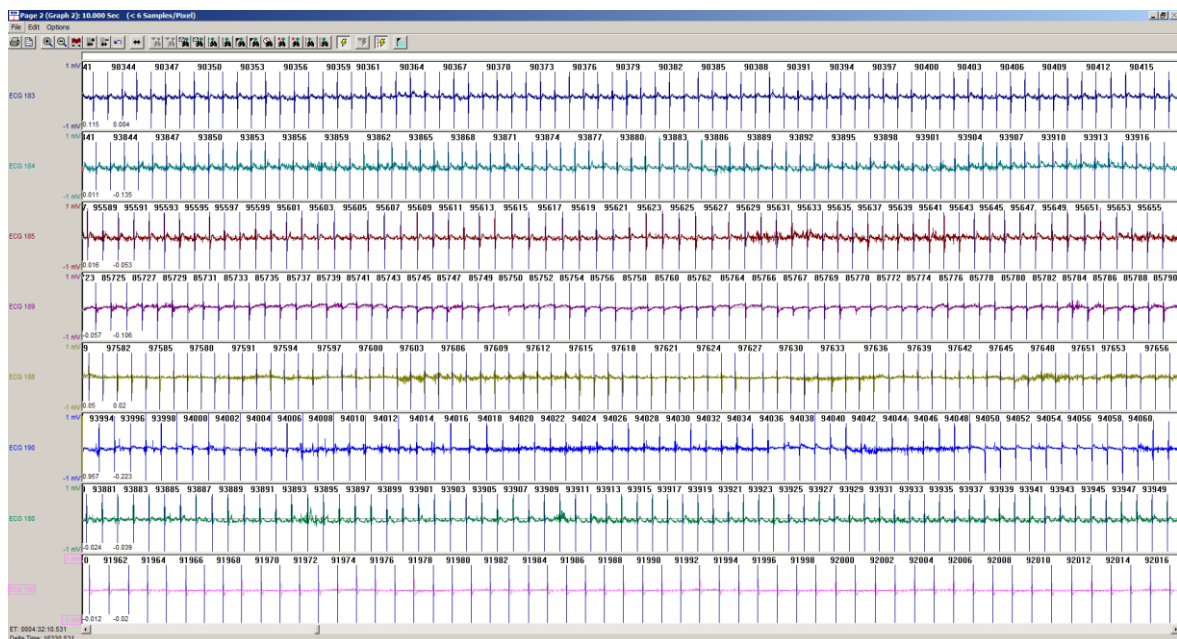


Abbildung 16

Detektion der R-Zacken mit Hilfe des EKG-Analyse-Moduls anhand einer Beispielsequenz von acht Tieren.

Die Erkennung der QRS-Komplexe erfolgte automatisiert mit Hilfe des EKG-Analyse-Moduls, das in Abbildung 17 dargestellt ist. Die Software identifizierte mit Hilfe von tierspezifischen Grenzwerten die einzelnen R-Zacken und konnte darauf basierend die verschiedenen Parameter für jedes Tier bestimmen.

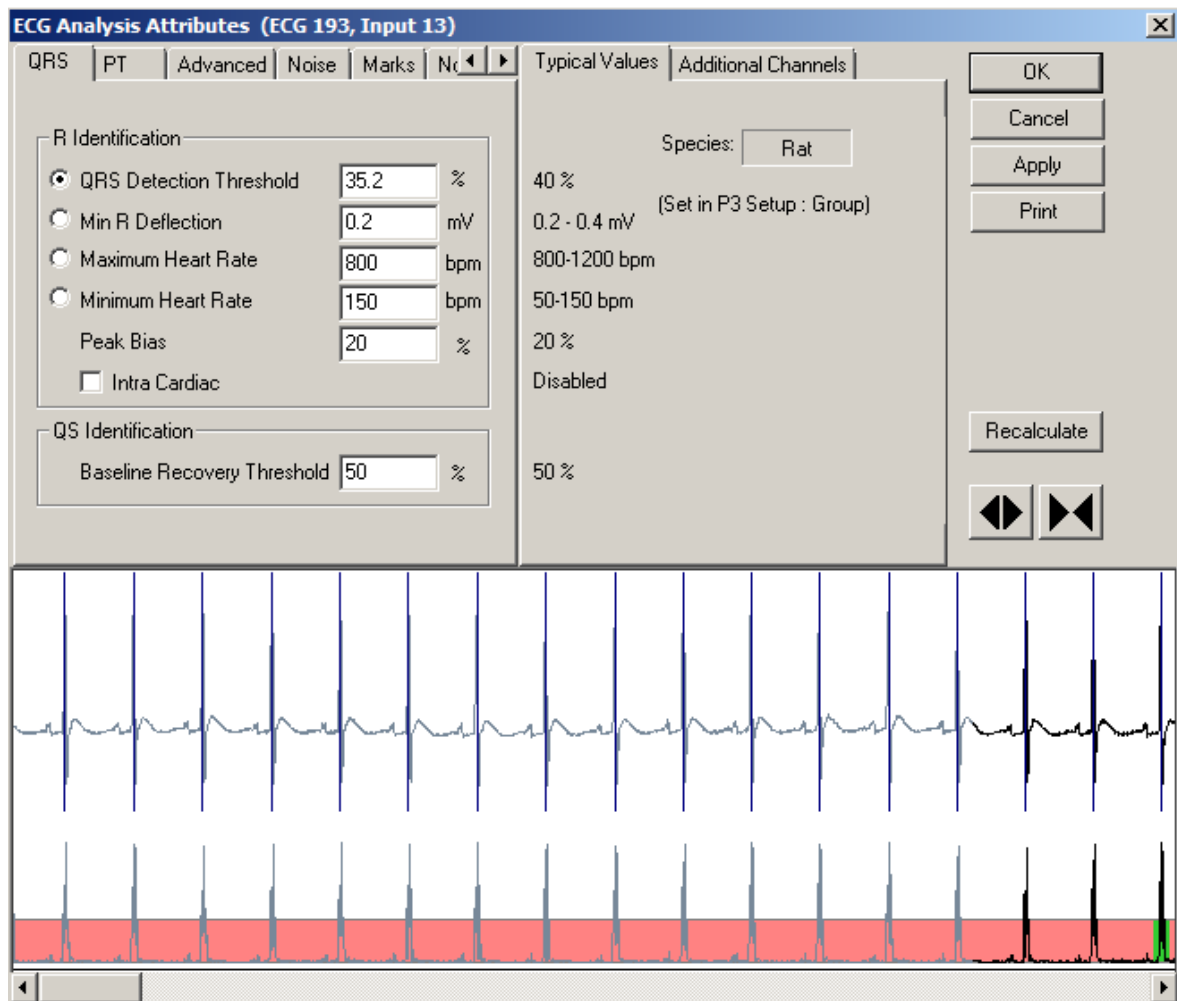


Abbildung 17  
Einstellungen für die tierspezifische Identifikation der R-Zacken.

Um Artefakte auszuschließen, wurde der Störfilter des EKG-Analyse-Moduls verwendet. Auf diese Weise konnten Regionen, in denen keine R-Zacken detektiert werden konnten, aus der Analyse ausgeschlossen werden (*bad data marks*). Der Ausschluss einer Störsequenz ist in Abbildung 18 dargestellt.

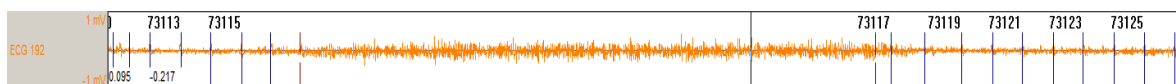


Abbildung 18  
Beispielhafte Darstellung einer *bad data mark* (rote unterbrochene Linie).

Da einige EKGs eine niedrigere Amplitude aufwiesen, mussten die Grenzwerte individuell angepasst werden. Für die Auswertung der Rohdaten wurden die Aufzeichnungsintervalle mit Hilfe der „Loggin Rate“ in fünf Minuten Intervalle zusammengefasst. So konnten alle Datenpunkte innerhalb einer Phase in chronologischer Reihenfolge dargestellt werden. Mit Hilfe der Software Ponemah® wurde eine Analyse der Parameter der Zeitdomäne der HRV durchgeführt. Dadurch konnten folgende Parameter bestimmt werden:

- Mittlere Herzfrequenz in bpm
- Mittleres RR-Intervall in ms
- SDNN: die Standardabweichung der RR-Intervalle in ms, als Maß für die gesamte Variabilität des autonomen Nervensystems

$$SDNN = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (RR_i - \overline{RR})^2}$$

- RMSSD: die Quadratwurzel des Mittelwerts aller Quadrate der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle in ms, als Maß für kurzfristige Änderungen der RR-Intervalle und somit für die Erholungsfähigkeit des Herzens

$$RMSSD = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} (RR_{i+1} - RR_i)^2}$$

- pNN9: Anteil aller aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die sich um mehr als neun Millisekunden unterscheiden in %. pNN9 korreliert stark mit RMSSD und gilt als Maß für die parasympathische Aktivierung des Herzens.

$$pNN9 = \frac{NN9}{N-1} \times 100 \%$$



## 7. Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Der Vergleich der drei Versuchsgruppen Kindling, Sham und Naiv erfolgte mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (one-way ANOVA) für parametrische Daten und einem Kruskal-Wallis-Test für nichtparametrische Daten. Für den Vergleich der drei Versuchsgruppen über mehrere aufeinanderfolgende Tage wurde eine wiederholte zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) durchgeführt. Als Post-hoc-Test wurde die Bonferroni-Korrektur für parametrische Daten und ein Dunn's Test für nichtparametrische Daten verwendet. Für einen Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen wurde ein ungepaarter t-Test für parametrische Daten und ein Mann-Whitney-U-Test für nichtparametrische Daten angewandt. Für die Analyse des Zyklusstands wurde der exakte Fisher-Test angewandt. Als Signifikanzwert wurde  $p < 0.05$  bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Ausreißer-Werte wurden nach der 3- $\sigma$ -Regel aus dem Datensatz entfernt. Die Daten entsprechender Tiere wurden für alle Parameter des jeweiligen Tests entfernt.

Die Korrelationsmatrix nach Spearman sowie die Grafiken der telemetrischen Messungen wurden mit Hilfe der Software R in Version 3.3.2. (R-CORE-TEAM 2016) erstellt. Die Korrelationsmatrix wurde durch das R-Paket "corrplot" (WEI u. SIMKO 2016) graphisch dargestellt. Bei fehlenden Daten wurde das entsprechende Tier von der jeweiligen Korrelation ausgeschlossen. Die Berechnung und Darstellung der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) erfolgte durch das R-Paket "made4" (CULHANE et al. 2005). Vor der PCA wurden die Daten zentriert und skaliert, was dazu führte, dass jede in der PCA enthaltene Variable einen Mittelwert von null und eine Standardabweichung von eins aufwies. Die Daten der telemetrischen Messungen wurden durch das R-Paket „ggplot“ (WICKHAM 2009) graphisch dargestellt. Die Glättung der Liniendiagramme basierte auf einer LOESS-Regression mit einer Spanne von 0,15. Des Weiteren wurden für die telemetrischen Messungen Kastengrafiken (Boxplots) erstellt. Die Länge der Whisker wurde auf maximal das 1,5-Fache des Interquartilsabstands (IQR) beschränkt (Tukey-Boxplot).

## V. ERGEBNISSE

### 1. Verhaltensuntersuchungen

#### 1.1. Heimkäfig- und Grabverhalten

Der zirkadiane Rhythmus des Nestbauverhaltens wurde im Rahmen einer Pilot-Studie analysiert, um die höchste Nestkomplexität im Tagesverlauf und damit den optimalen Zeitpunkt für die tägliche Beurteilung zu finden (Abbildung 19). Dazu wurde die Nestkomplexität jeden Tag zwischen 07:00 und 09:00 Uhr beurteilt. Das Amygdala-Kindling fand an fünf Tagen pro Woche jeweils zwischen 13:30 und 15:00 Uhr statt.

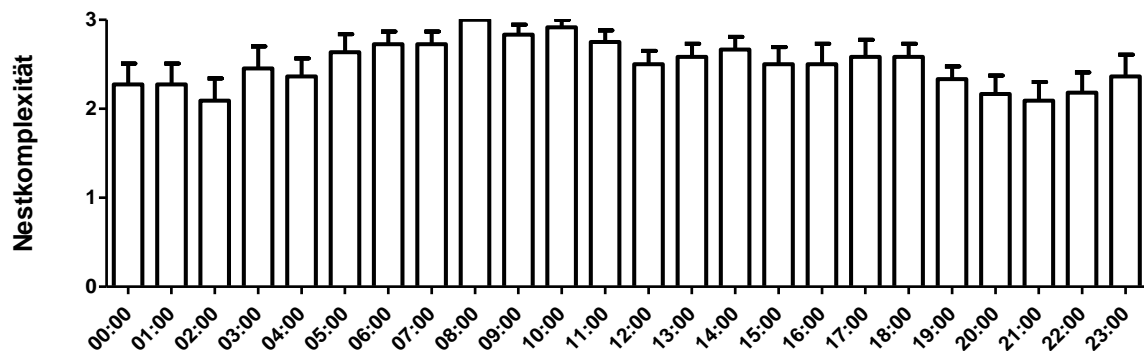


Abbildung 19  
Zirkadianer Rhythmus der Nestkomplexität (n = 4). Die Grafik zeigt Mittelwert und SEM.

Bei der Auswertung des Nestbauverhaltens der Tiere vor der Elektrodenimplantation konnte festgestellt werden, dass die Tiere die Höchstwerte der Nestkomplexität an Tag fünf nach der Zugabe von neuem Nestmaterial erreichten (Abbildung 20 A). Mit zunehmender Verschmutzung der Käfige gegen Ende der Woche nahm die Nestkomplexität wieder ab. Des Weiteren wurde die Auswirkung der Elektrodenimplantation auf das Nestbauverhalten der Tiere untersucht (Abbildung 20 B). Dazu wurde den Tieren nach der Elektrodenimplantation neues Nestmaterial zur Verfügung gestellt. Es zeigte sich, dass das Nestbauverhalten der Tiere an den Tagen nach der Operation im Vergleich zu den naiven Tieren nicht signifikant verändert war und die Tiere ihre Nester auf gleiche Weise aufbauten.

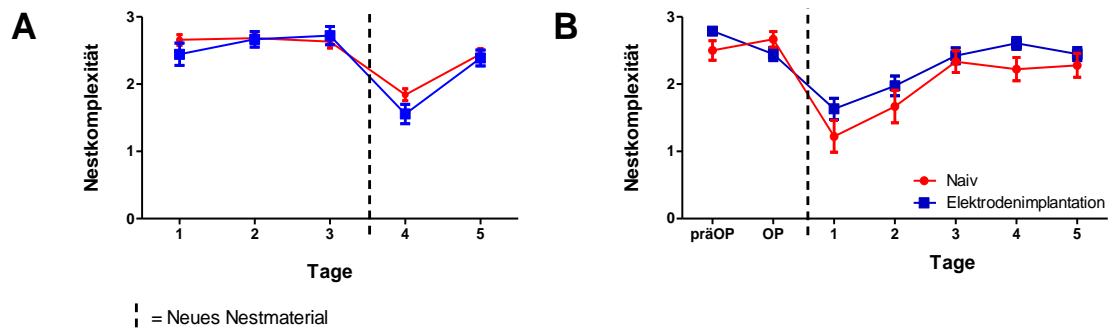


Abbildung 20

Basalwert und postoperativer Wert der Nestkomplexität. (A) Die Basalwerte der Nestkomplexität über fünf Tage unterschieden sich nicht zwischen der naiven Versuchsgruppe sowie der späteren elektrodenimplantierten Versuchsgruppe. (B) Die Nestkomplexität vor und nach der Elektrodenimplantation unterschied sich nicht im Vergleich zu der naiven Versuchsgruppe. (Naiv n = 18, Elektrodenimplantiert n = 38). Die Grafik zeigt den Mittelwert und den SEM.

Während der Phase der fokalen Anfälle wurde die Nestkomplexität an drei aufeinanderfolgenden Tagen analysiert. Auf Grund der begrenzten Dauer der Phase der fokalen Anfälle war eine längere Beobachtungszeit nicht möglich. Trotz der täglichen Induktion von fokalen Anfällen konnte keine Veränderung der Nestkomplexität festgestellt werden (Abbildung 21 A).

Während der Phase der generalisierten Anfälle konnte jedoch eine Veränderung des Nestbauverhaltens beobachtet werden (Abbildung 21 B). Die Nestkomplexität wurde an den Tagen zwischen dem neunten und dem dreizehnten generalisierten Anfall beurteilt. Neues Nestmaterial wurde in diesem fünftägigen Beobachtungszeitraum an Tag vier hinzugegeben, um zu beurteilen, ob Unterschiede beim Aufbau des Nests vorlagen. An den Tagen des zehnten und elften generalisierten Anfalls zeigte sich im Vergleich zu der naiven Gruppe eine signifikant erniedrigte Nestkomplexität. Am Tag nach der Zugabe von neuem Nestmaterial konnte eine signifikant erniedrigte Nestkomplexität im Vergleich zu der Sham-Gruppe beobachtet werden.

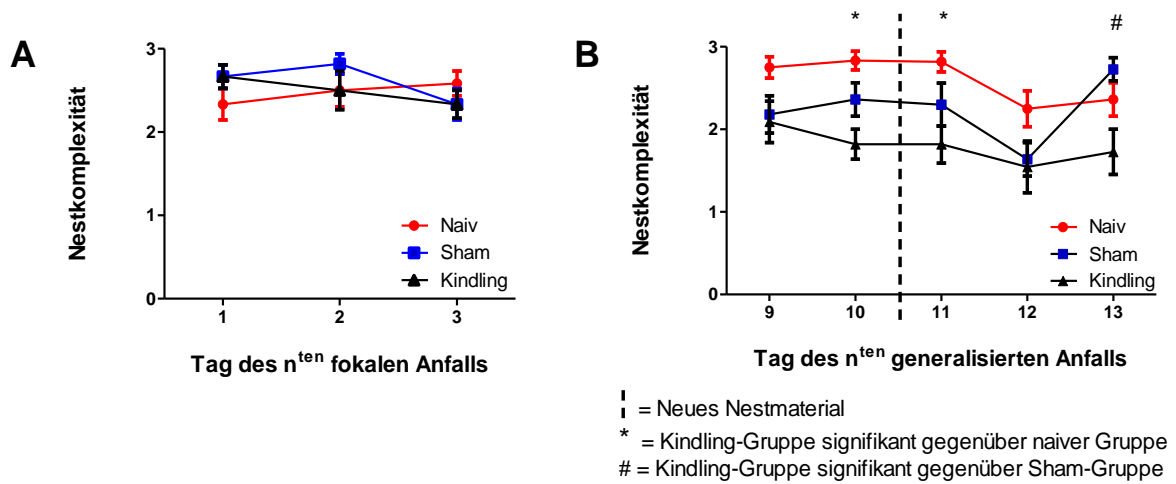


Abbildung 21

Nestkomplexität während den Phasen fokaler und generalisierter Anfälle. (A) Die Nestkomplexität an drei aufeinanderfolgenden Tagen während der Phase fokaler Anfälle zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (n = 12 pro Gruppe). (B) Die Nestkomplexität an fünf aufeinanderfolgenden Tagen während der Phase generalisierter Anfälle zeigte signifikante Unterschiede der Kindling-Gruppe zu der naiven Gruppe und der Sham-Gruppe (Naiv n = 12, Sham und Kindling n = 11). Die Grafik zeigt den Mittelwert und den SEM.

Zusätzlich wurde die Zeit bis zum Beginn des Nestbauverhaltens (LTNB) nach Zugabe von neuem Nestmaterial einmal pro Woche sowohl während der Phase mit fokalen als auch während der Phase der generalisierten Anfälle bestimmt. Die LTNB wurde am Tag des zweiten fokalen Anfalls (Abbildung 22 A) und am Tag des zehnten generalisierten Anfalls (Abbildung 22 B) bestimmt. Dieser Parameter zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

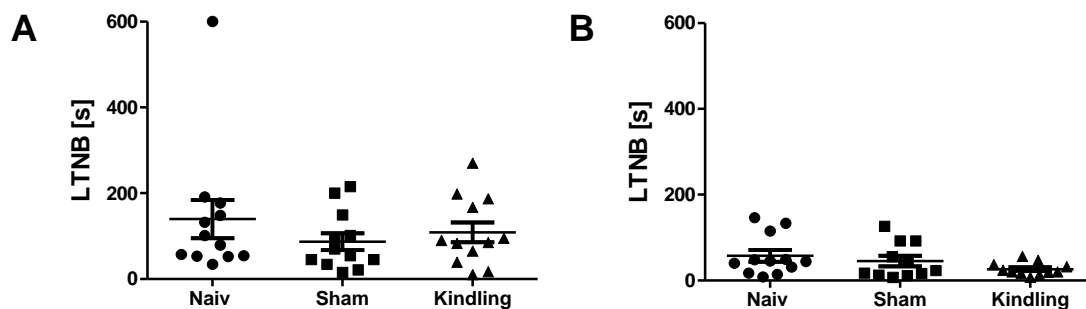


Abbildung 22

LTNB. (A) Die LTNB in der Phase fokaler Anfälle zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (n = 12 pro Gruppe). (B) Die LTNB in der Phase generalisierter Anfälle zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Naiv n = 12, Sham und Kindling n = 11). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Des Weiteren wurde der Verschmutzungsgrad des Nests einmal wöchentlich vor dem Umsetzen der Tiere in neue Käfige bestimmt. Tiere mit fokalen Anfällen zeigten keine Veränderungen des Verschmutzungsgrads, wohingegen Tiere mit generalisierten Anfällen im Vergleich zu den naiven Tieren stärker verschmutzte Nester aufwiesen (Abbildung 23). Dies war sowohl während der frühen Phase (fünfter generalisierter Anfall, Abbildung 23 B) als auch während der Spätphase der generalisierten Anfälle (zehnter generalisierter Anfall, Abbildung 23 C) der Fall.

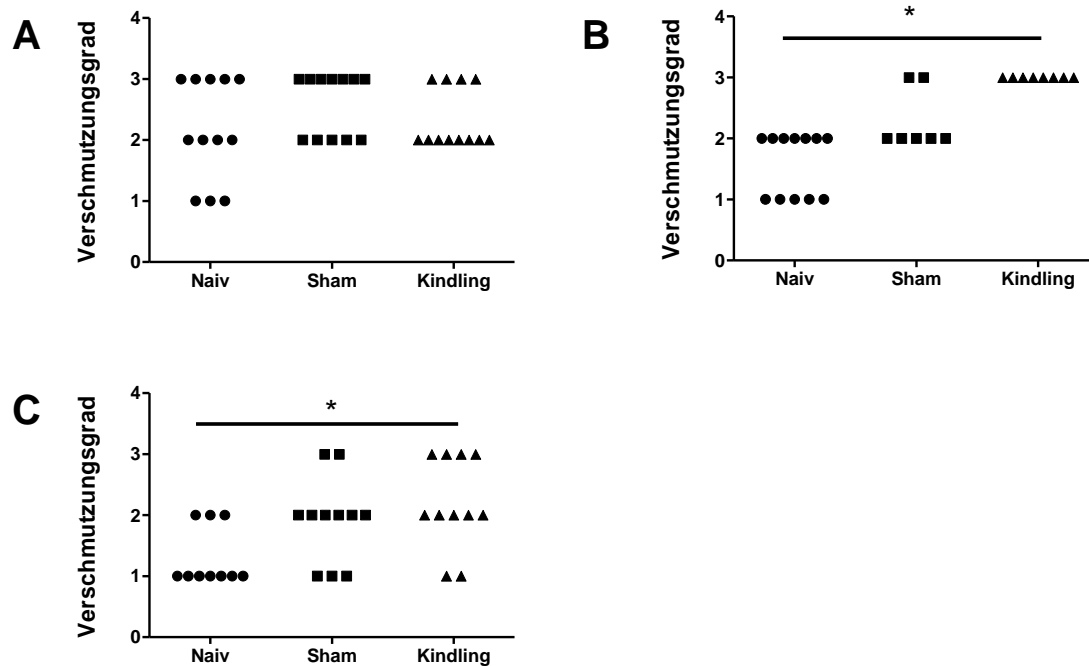


Abbildung 23

Verschmutzungsgrad der Nester. (A) Der Verschmutzungsgrad in der Phase der fokalen Anfälle zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $n = 12$ ). (B - C) Sowohl während der Frühphase der generalisierten Anfälle (fünfter generalisierter Anfall, B) als auch während der Spätphase der generalisierten Anfälle (zehnter generalisierter Anfall, C) war die Nestverschmutzung der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe signifikant erhöht. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere.

Eine Untersuchung des Grabverhaltens der Tiere mit Hilfe des Burrowing-Tests erfolgte nur während der ersten Versuchsphase (Simulationen bis zu einem Stadium generalisierter Anfälle). Wie bereits beschrieben, erfolgte vor dem Beginn der Versuche ein Training der Tiere. Dieses fand vor der Elektrodenimplantation statt. Der Basalwert der gegrabenen Menge an Kies sowie die Zeit bis zum Beginn des Grabverhaltens wurde an Tag fünf des Trainings erhoben (Abbildung 24). Im Verlauf des Trainings konnte sowohl ein deutlicher Anstieg der Menge des aus der Röhre entfernten Kieses als auch ein schnellerer Beginn des Grabverhaltens festgestellt werden. Diese Werte dienten im weiteren Verlauf der Untersuchungen als Basalwerte für jedes Tier. Nach Bestimmung der Basalwerte wurden

zwei Tiere, die weniger als 500 g Kies aus der Röhre entfernt hatten, von allen weiteren Untersuchungen ausgeschlossen und in einem anderen Projekt verwendet.

Im Anschluss an die Trainingsphase wurde der Burrowing-Test sowohl nach der Elektrodenimplantation als auch im Verlauf des Amygdala-Kindlings durchgeführt. In der ersten Versuchsphase umfasste das Amygdala-Kindling sowohl eine Phase mit fokalen als auch eine Phase der generalisierten Anfälle. Sieben Tage nach der Elektrodenimplantation wies kein Parameter signifikante Unterschiede zu den naiven Tieren auf (Abbildung 25). Weiterhin konnten weder während der Phase der fokalen Anfälle (Abbildung 26) noch während der Phase der generalisierten Anfälle signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 27).

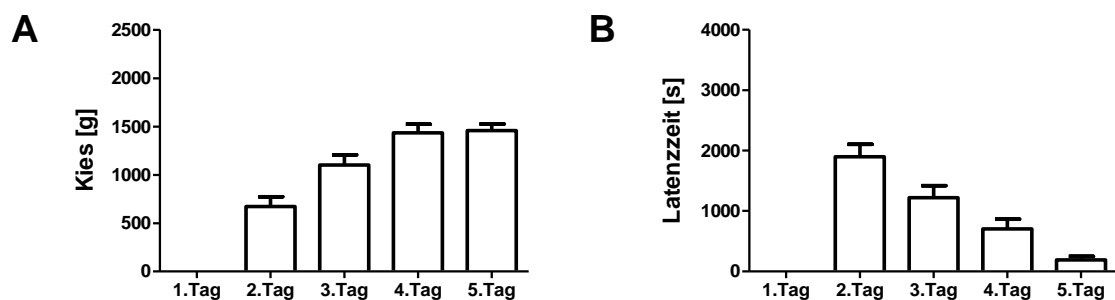


Abbildung 24

Trainingsphase des Burrowing-Tests. (A) Die aus der Röhre entfernte Kiesmenge stieg bis zum vierten Tag der Trainingsphase kontinuierlich an ( $n = 56$ ). (B) Die Zeit bis zum Beginn des Grabverhaltens fiel während der Trainingsphase kontinuierlich ab ( $n = 56$ ). Die Grafik zeigt den Mittelwert und den SEM.

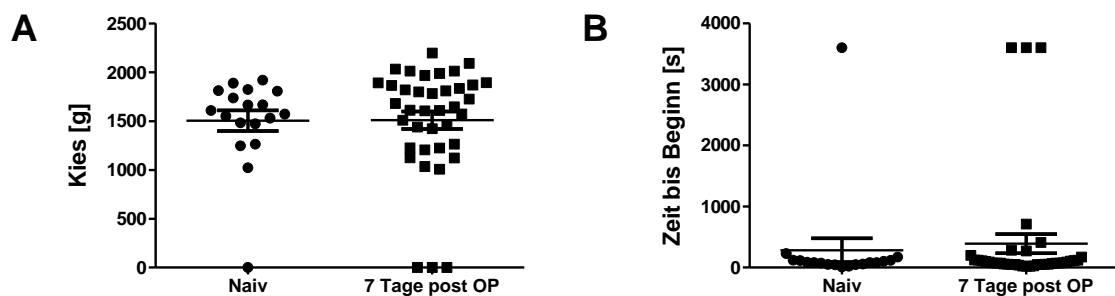


Abbildung 25

Burrowing-Test sieben Tage nach Elektrodenimplantation (post OP). Die Analyse der aus der Röhre entfernten Kiesmenge (A) und die Analyse der Zeit bis zu Beginn des Grabverhaltens (B) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Naiv  $n = 18$  und elektrodenimplantierte Tieren  $n = 38$ ). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

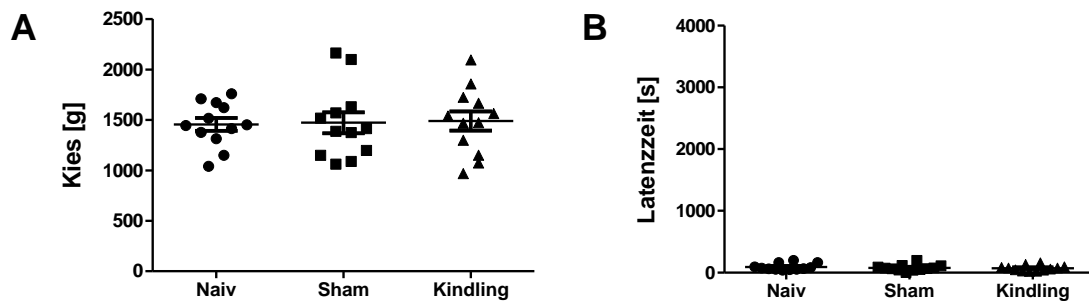


Abbildung 26

Burrowing-Test während der Phase der fokalen Anfälle. Die Analyse der aus der Röhre entfernten Kiesmenge (A) und die Analyse der Zeit bis zu Beginn des Grabverhaltens (B) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (n = 12 pro Gruppe). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

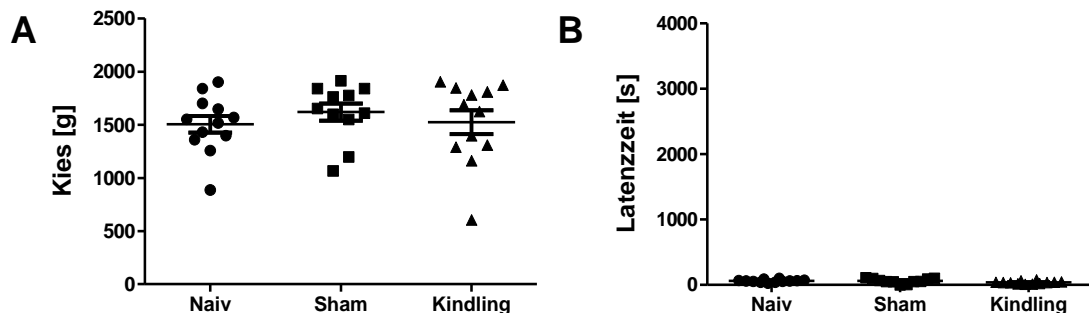


Abbildung 27

Burrowing-Test während der Phase der generalisierten Anfälle. Die Analyse der aus der Röhre entfernten Kiesmenge (A) und die Analyse der Zeit bis zu Beginn des Grabverhaltens (B) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Naiv und Kindling n = 12, Sham n = 11). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

## 1.2. Soziale Interaktion

Im Rahmen des Social-Interaction-Tests wurden jeweils die Tiere einer Versuchsgruppe miteinander verpaart. Aufgrund der hohen Aktivität der Tiere wurde die passive soziale Interaktion nur sehr selten beobachtet und wird demzufolge nicht gesondert dargestellt. Die naive Tiergruppe verbrachte sowohl in der Phase der fokalen Anfälle als auch in der Phase der generalisierten Anfälle etwa 50 % der Zeit in aktiver sozialer Interaktion. Für beide Phasen konnte eine signifikant erhöhte aktive Interaktionszeit der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe nachgewiesen werden (Abbildungen 28). Dagegen war die Interaktionszeit der Kindling-Gruppe während der Phase der fokalen Anfälle im Vergleich zu der Sham-Gruppe signifikant erniedrigt (Abbildung 28 A). In der Phase der generalisierten Anfälle wiesen die Tiere der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven

Gruppe eine signifikant erhöhte Interaktionszeit auf. Im Vergleich zu der Sham-Gruppe konnte dagegen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 28 B).

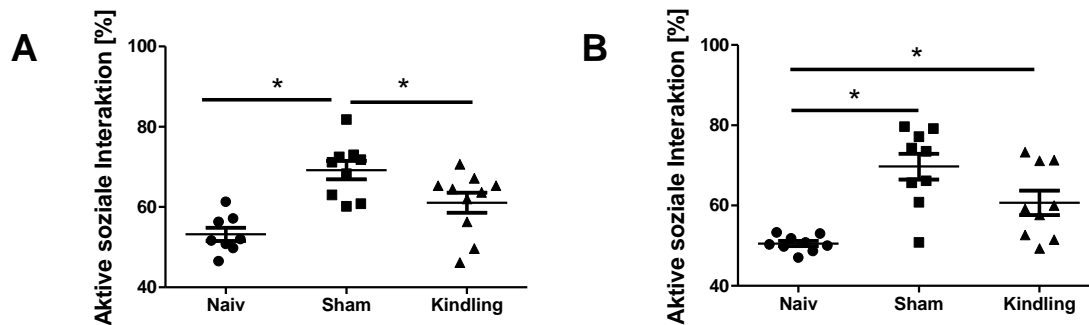


Abbildung 28

Aktive soziale Interaktion während den Phasen der fokalen und generalisierten Anfälle. (A) Während der Phase der fokalen Anfälle war der prozentuale Anteil aktiver sozialer Interaktionen in der Sham-Gruppe sowohl im Vergleich zu der naiven Gruppe als auch zu der Kindling-Gruppe signifikant erhöht (Naiv n = 8 Paare, Sham n = 9 Paare, Kindling n = 10 Paare). (B) Auch während der Phase der generalisierten Anfälle war der prozentuale Anteil aktiver sozialer Interaktionen in der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe signifikant erhöht. Zudem wiesen in dieser Phase auch die Tiere der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe eine vermehrte aktive soziale Interaktion auf (n = 9 Paare pro Gruppe). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Im Rahmen der Auswertung der aktiven sozialen Interaktion muss jedoch beachtet werden, dass ein großes Interesse der Tiere für das Implantat ihres Interaktionspartners zu verzeichnen war. Die durch das Implantat veränderte aktive Interaktionszeit der Tiere muss demzufolge bei der Bewertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### 1.3. Lokomotion und angstassoziiertes Verhalten

Die Lokomotion der Tiere wurde mit Hilfe des Open-Field-Tests anhand der Parameter zurückgelegte Strecke, mittlere Geschwindigkeit, *Rearing* Frequenz, Immobilität und Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen (Zeit im Zentrum, Zeit in Thigmotaxis) untersucht. Bei keinem Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen beobachtet werden (Abbildung 29). Weiterhin wurde die Dauer des Versuchs von insgesamt zehn Minuten für die ersten und letzten fünf Minuten separat analysiert. Hierdurch ergaben sich jedoch ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen (Daten nicht gezeigt). Da es während der Phase der fokalen Anfälle auf Grund der kurzen Zeitspanne bis zur Entwicklung generalisierter Anfälle nicht möglich war, alle Verhaltensuntersuchungen durchzuführen und in der Phase der generalisierten Anfälle keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden konnten, wurde der Einfluss der fokalen Anfälle auf die Parameter des Open-Fields nicht untersucht.



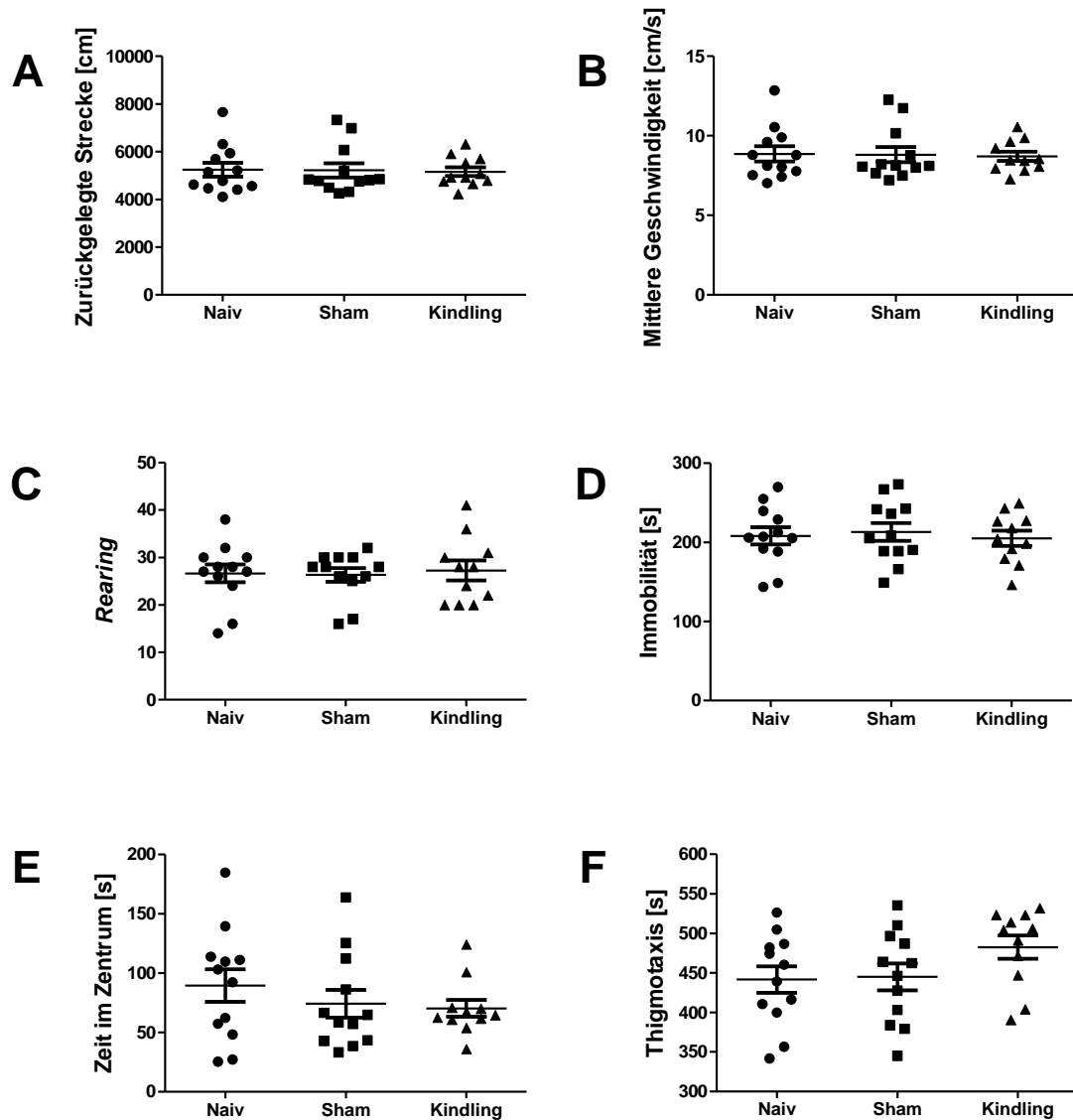


Abbildung 29

Open-Field-Test während der Phase der generalisierten Anfälle. Bei keinem der analysierten Parameter konnten signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden (Naiv und Sham  $n = 12$ , Kindling  $n = 11$ ). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Das angstassoziierte Verhalten der Tiere wurde mit Hilfe der Black-and-White-Box und des Elevated-Plus-Maze untersucht. Diese Untersuchungen wurden sowohl während der Phase mit generalisierten, als auch in der Phase der fokalen Anfälle durchgeführt. In der Black-and-White-Box wurden die Parameter Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box, die gesamte Aufenthaltsdauer in der schwarzen und weißen Box sowie die *stretching postures* bestimmt. Im Elevated-Plus-Maze wurden die Parameter zurückgelegte Strecke, Geschwindigkeit, Aufenthaltsdauer in den einzelnen Zonen sowie *stretching postures* und *headdips* bestimmt. Während der Phase der fokalen Anfälle konnten bei keinem Parameter der beiden Verhaltenstests signifikante Unterschiede zwischen den

Tiergruppen festgestellt werden (Abbildung 30 und Abbildung 31). In der Phase der generalisierten Anfälle wies die Kindling-Gruppe jedoch im Vergleich zu der naiven Gruppe eine erniedrigte Aufenthaltsdauer in der weißen Box sowie eine dementsprechend erhöhte Aufenthaltsdauer in der schwarzen Box auf. Allerdings konnten auch in dieser Phase keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen hinsichtlich der Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box sowie den *stretching postures* festgestellt werden.

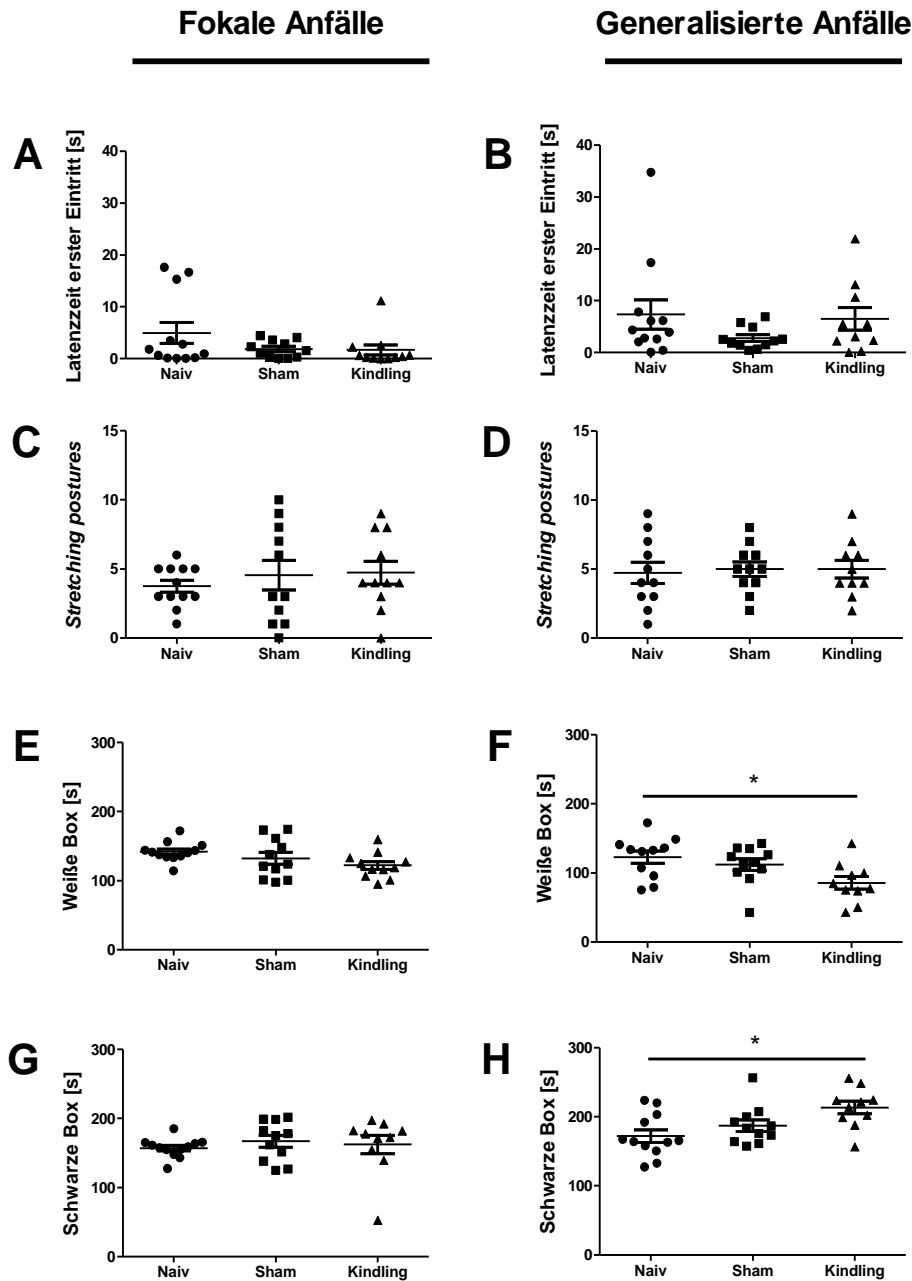


Abbildung 30

Black-and-White-Box. Weder während der Phase der fokalen Anfälle (A, C, E, G) noch während der Phase der generalisierten Anfälle (B, D, F, H) konnten zwischen den Tiergruppen Unterschiede hinsichtlich der Parameter Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box (A, B), und *stretching postures* (C, D) festgestellt werden. In der Phase der fokalen Anfälle unterschieden sich die Tiergruppen zudem nicht hinsichtlich ihrer Aufenthaltsdauer in der schwarzen bzw. weißen Box (E, G). In der Phase der generalisierten Anfälle wies jedoch die Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe eine signifikant erniedrigte Aufenthaltsdauer in der weißen Box (F) sowie eine dementsprechend erhöhte Aufenthaltsdauer in der schwarzen Box (H) auf (Fokale Anfälle: Naiv n = 12, Sham und Kindling n = 11, Generalisierte Anfälle: Naiv n = 12, Sham n = 11, Kindling n = 10). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Im Elevated-Plus-Maze wies die Kindling-Gruppe während der Phase der generalisierten Anfälle eine im Vergleich zu der naiven Gruppe reduzierte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen und eine dementsprechend erhöhte Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen auf. Des Weiteren konnte in dieser Phase bei der Kindling-Gruppe eine erniedrigte Anzahl von *headdips* im Vergleich zu der naiven Gruppe beobachtet werden. In diesem Verhaltensparadigma stellt das äußerste Drittel der offenen Arme den für die Tiere aversivsten Bereich dar. Die Auswertung dieses Parameters ergab, dass sowohl die Tiere der Sham-Gruppe als auch die Tiere der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe eine signifikant reduzierte Aufenthaltsdauer in diesem Bereich aufwiesen (Abbildung 31).

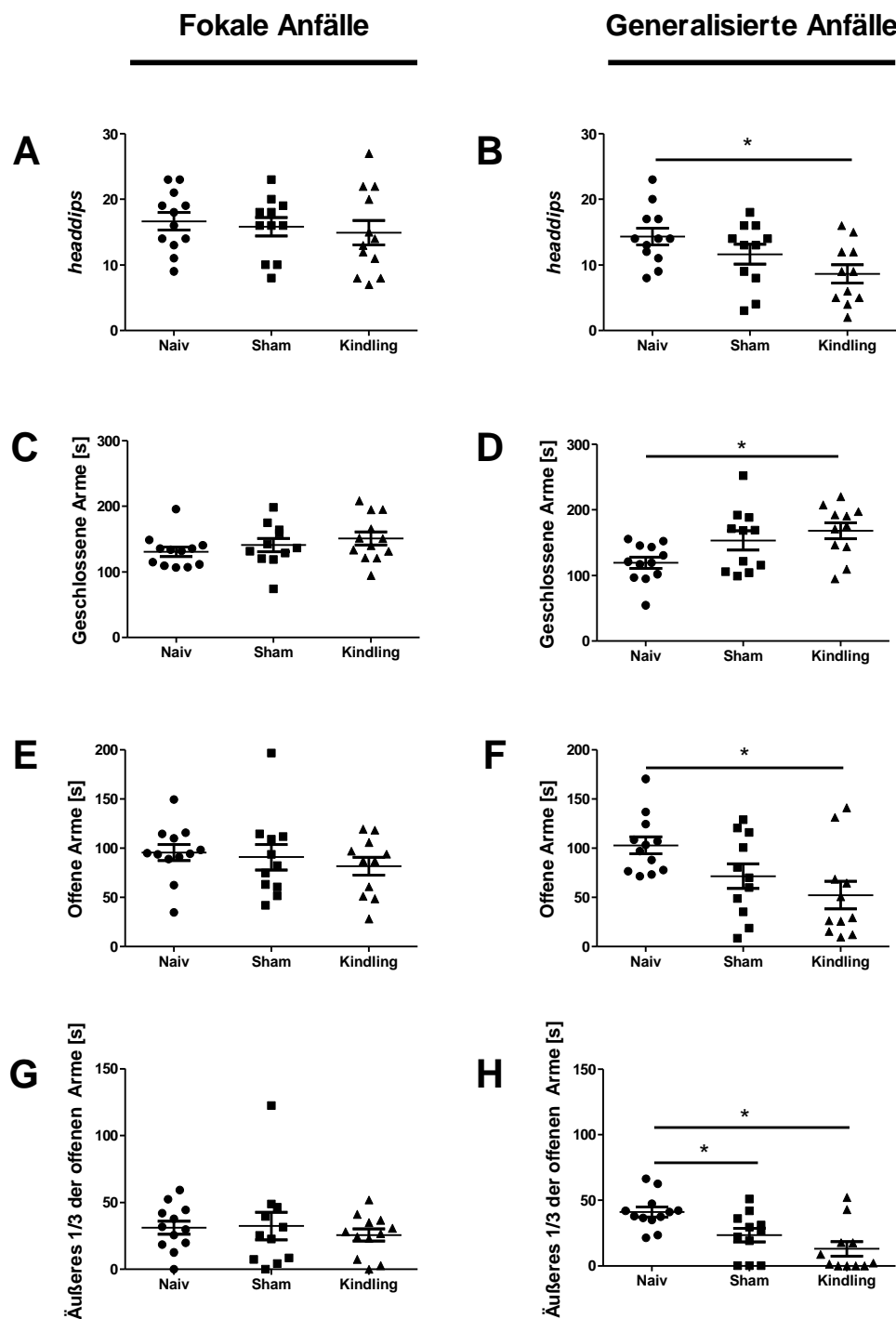


Abbildung 31

Elevated-Plus-Maze. Während der Phase der fokalen Anfälle wurden hinsichtlich der untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt (A, C, E, G). Während der Phase der generalisierten Anfälle zeigte die Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe eine reduzierte Anzahl an *headdips* (B). In dieser Phase wies die Kindling-Gruppe zudem eine im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe reduzierte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen (F) und eine dementsprechend erhöhte Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen (D) auf. Hinsichtlich des äußersten Drittels der offenen Arme konnte sowohl bei den Tieren der Sham-Gruppe als auch bei den Tieren der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe eine reduzierte Aufenthaltsdauer nachgewiesen werden (H) (Fokale Anfälle: Naiv und Kindling  $n = 12$ , Sham  $n = 11$ . Generalisierte Anfälle: Naiv  $n = 12$ , Sham und Kindling  $n = 11$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

### 1.4. Präferenzverhalten

Anhedonieassoziiertes Verhalten wurde mit Hilfe des Saccharin-Präferenz-Tests analysiert. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls lediglich während der ersten Versuchsphase der generalisierten Anfälle durchgeführt. An den Tagen, an denen eine Saccharin-Lösung angeboten wurde (Tag 2 und 4), zeigten alle drei Versuchsgruppen eine signifikante Präferenz für die Saccharin-Lösung gegenüber dem reinen Wasser. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Tiere am darauffolgenden Tag, an dem sich in beiden Flaschen wieder Wasser befand, die Flasche auf der Seite auf der sich zuvor die süße Lösung befunden hatte, bevorzugten (Abbildung 32 A). Zwischen den drei Versuchsgruppen konnte an keinem Versuchstag ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Menge der konsumierten Saccharin-Lösung festgestellt werden (Abbildung 32 B).

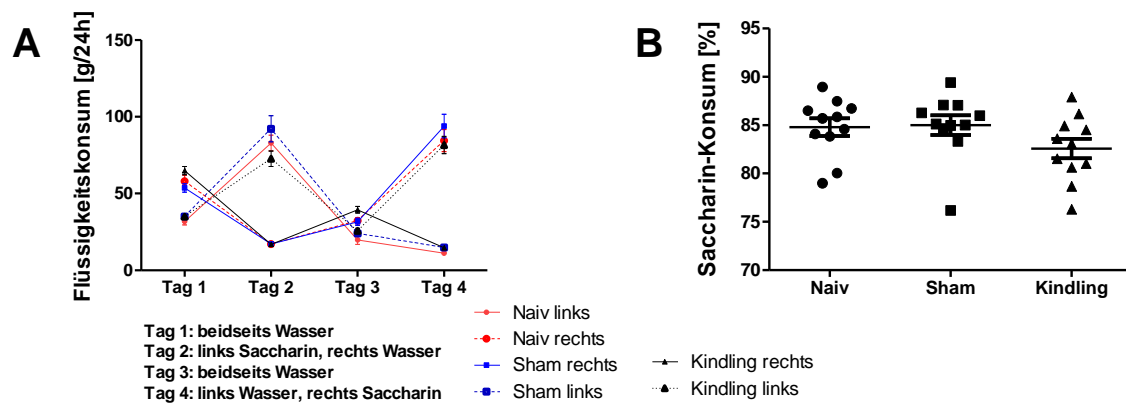


Abbildung 32

Saccharin-Präferenz-Test während der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Verlauf des Wasser- und Saccharin-Konsums im Verlauf der vier Testtage. (B) Prozentualer Anteil des Saccharin-Konsums am gesamten Flüssigkeitskonsum am Tag 2 und 4 (Mittelwert). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen ( $n = 11$  pro Gruppe). (A) zeigt den Mittelwert und den SEM; (B) zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

### 1.5. Allgemeinbefinden und Körpergewicht

Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde mit dem Grimace-Scale und dem Irwin-Score beurteilt. Der Irwin-Score diente dazu, neurologische Defizite zu detektieren wohingegen mit Hilfe des Grimace-Scales akute Schmerzzustände erfasst wurden. Während dem Zeitraum der Elektrodenimplantation und des Amygdala-Kindlings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Das Gewicht der Tiere wurde während des gesamten Projekts wöchentlich erfasst. Die Gewichtsentwicklung der Tiere wies dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen auf (Abbildung 33).

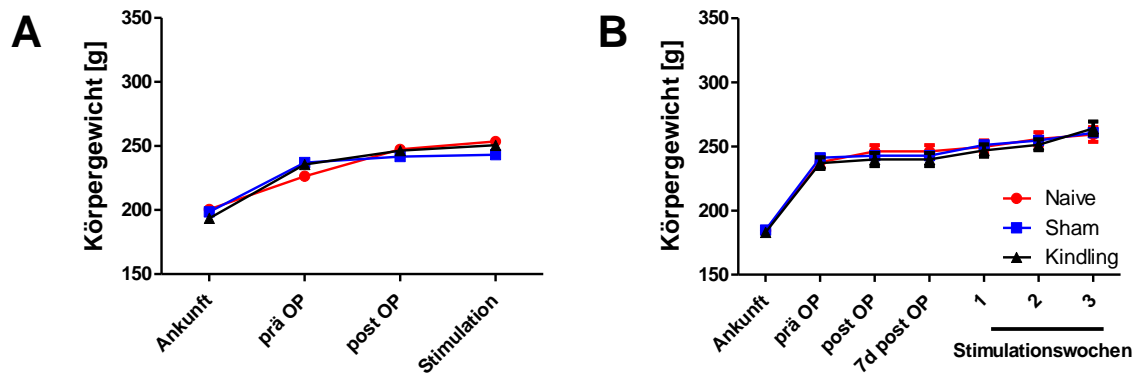


Abbildung 33

Entwicklung des Körpergewichts der Tiere. Wöchentlicher Verlauf des Gewichts in den Versuchsphasen mit fokalen (A) und generalisierenden Anfällen (B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt werden (Fokale Anfälle: n = 12 pro Gruppe, Generalisierte Anfälle: Naiv n = 12, Sham und Kindling n = 11). Die Grafik zeigt den Mittelwert und den SEM.

## 2. Biochemische Analysen

### 2.1. Corticosteron

Um den Einfluss der durch den Versuchsablauf bedingten Prozeduren (Elektrodenimplantation sowie Induktion der epileptischen Anfälle) auf die Corticosteron-Konzentration beurteilen zu können, wurden Haarproben der Tiere analysiert. Dabei wurden die Haarproben sowohl während der ersten Versuchsphase als auch während der zweiten Versuchsphase zu Beginn (Basalwert) und zum Versuchsende entnommen. Im Rahmen der Auswertung wurde der Basalwert jedes Tiers mit dem gemessenen Wert zu Versuchsende verglichen ( $\Delta$ -Wert). In keiner der beiden Versuchsphasen konnte für den absoluten Wert zu Versuchsende oder den  $\Delta$ -Wert ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 34).

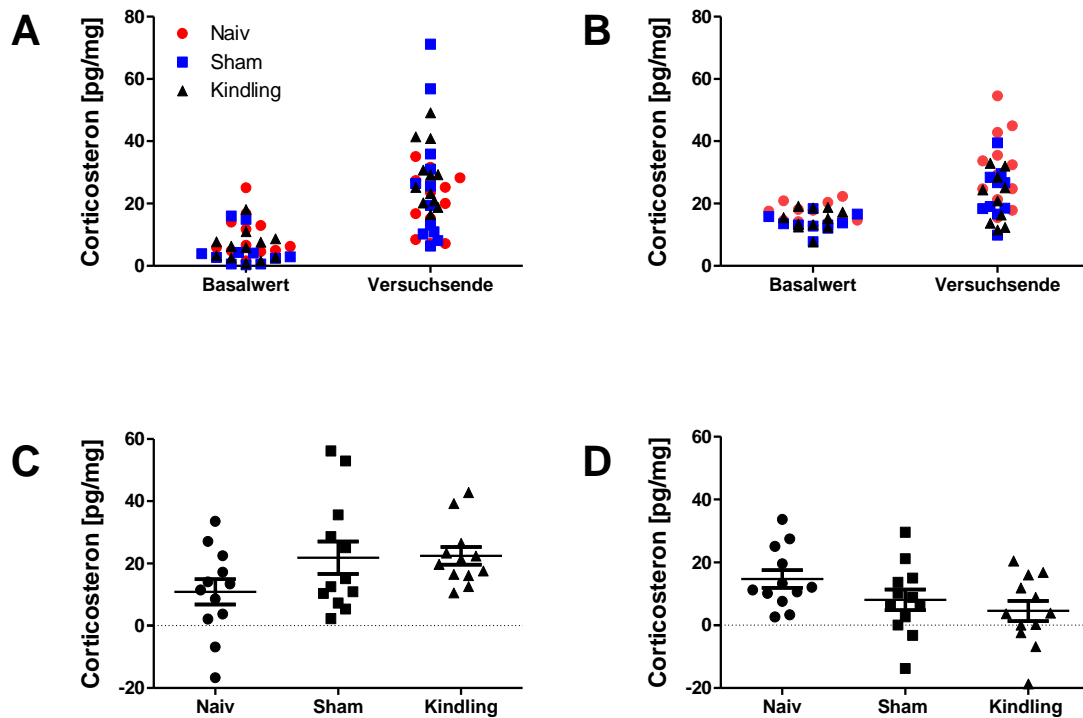


Abbildung 34

Corticosteron-Konzentrationen in Haarproben. Absolute Corticosteron-Konzentrationen zu Versuchsbeginn (Basalwert) und -ende in den Phasen der fokalen (A) und generalisierten Anfällen (B).  $\Delta$ -Wert der Corticosteron-Konzentrationen in den Phasen der fokalen (C) und generalisierten Anfällen (D). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Die Messung der fäkalen Corticosteron-Metaboliten zur Bestimmung eines Basalwertes für jedes Tier erfolgte vor der Elektrodenimplantation. Darauffolgend wurden die fäkalen Corticosteron-Metaboliten sowohl während der Phase der fokalen als auch der Phase der



generalisierten Anfälle bestimmt (Abbildung 35). Anschließend wurde der Basalwert von jedem Tier mit dem Wert der jeweiligen Versuchsphase verglichen ( $\Delta$ -Wert). In keiner der beiden Phasen konnte für die absoluten Werte der fäkalen Corticosteron-Metaboliten oder die  $\Delta$ -Werte signifikante Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

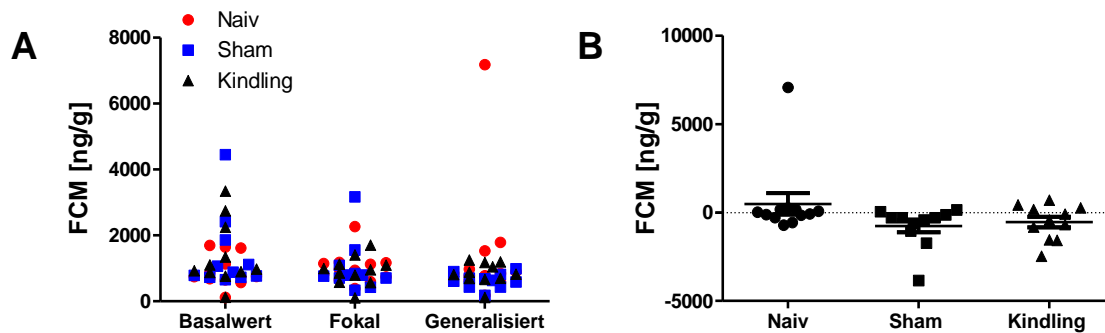


Abbildung 35

Konzentrationen fäkaler Corticosteron-Metaboliten (FCM). (A) FCM-Konzentrationen vor der Elektrodenimplantation (Basalwert) und während den Phasen fokaler und generalisierter Anfälle. (B)  $\Delta$ -Wert der FCM-Konzentrationen während der Phase der generalisierten Anfälle (Naiv n = 12, Sham n = 11, Kindling n = 11). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Um eine zusätzliche Belastung der Tiere durch mehrfache Blutentnahmen zu vermeiden, wurden die Serumproben lediglich am Ende der Projekte entnommen. Die Messung der Corticosteron-Konzentrationen im Serum ergab am Ende der Phase der fokalen Anfälle eine signifikante Erniedrigung der Corticosteron-Werte in der Sham-Gruppe gegenüber der naiven Gruppe. Die Kindling-Gruppe wies jedoch keine signifikanten Unterschiede gegenüber den beiden anderen Gruppen auf (Abbildung 36 A). Am Ende der Phase der generalisierten Anfälle zeigte die Kindling-Gruppe hingegen eine signifikante Erniedrigung der Corticosteron-Konzentration gegenüber der naiven Gruppe (Abbildung 36 B).

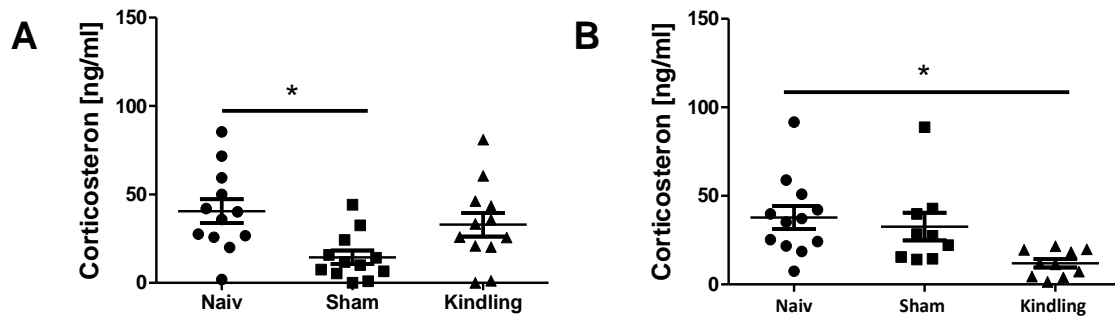


Abbildung 36

Corticosteron-Konzentrationen im Serum zu Versuchsende. (A) Am Ende der Phase der fokalen Anfälle waren die Corticosteron-Konzentrationen der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe signifikant reduziert ( $n = 12$  pro Gruppe). (B) Am Ende der Phase der generalisierten Anfälle waren die Corticosteron-Konzentrationen der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe signifikant reduziert (Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 9$ , Kindling  $n = 10$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Zur Überprüfung der Aktivität der HPA-Achse wurde das Gewicht beider Nebennieren ermittelt. Das Gewicht der beiden Nebennieren wies weder am Ende der Phase der fokalen, noch am Ende der Phase der generalisierten Anfälle signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (Abbildung 37).

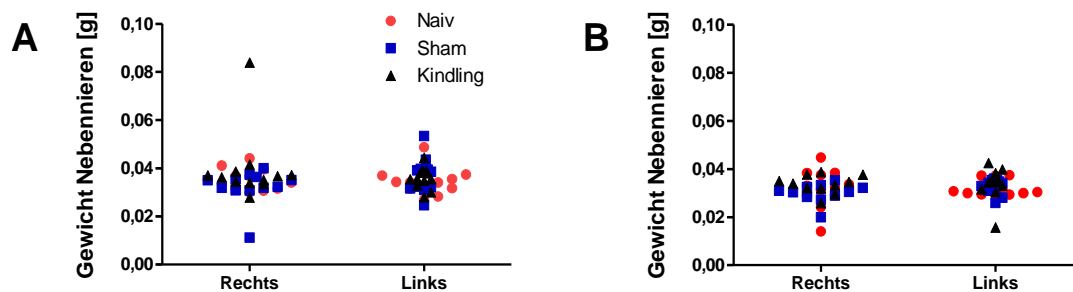


Abbildung 37

Gewicht der rechten und linken Nebenniere während der Phase der fokalen (A) und generalisierten Anfälle (B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen werden (Fokal:  $n = 12$  pro Gruppe, Generalisiert: Naiv  $n = 12$ , Sham und Kindling  $n = 11$ ). Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere.

## 2.2. Oxytocin

Am Ende der Phase der generalisierten Anfälle wiesen die Oxytocin-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen auf (Abbildung 38). In der Sham-Gruppe konnte eine relativ hohe Varianz in Bezug auf die Werte der einzelnen Tiere festgestellt werden. Da am Ende der Phase der generalisierten Anfälle keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden konnten, erfolgte im Anschluss an die



## 2.4. Creatinkinase (CK)

Die Bestimmung der CK-Konzentrationen erfolgte aus dem mittels Herzpunktion entnommenen Blut. Dabei zeigte sich weder als Konsequenz der Elektrodenimplantation, noch in Folge der induzierten Anfälle ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 40).

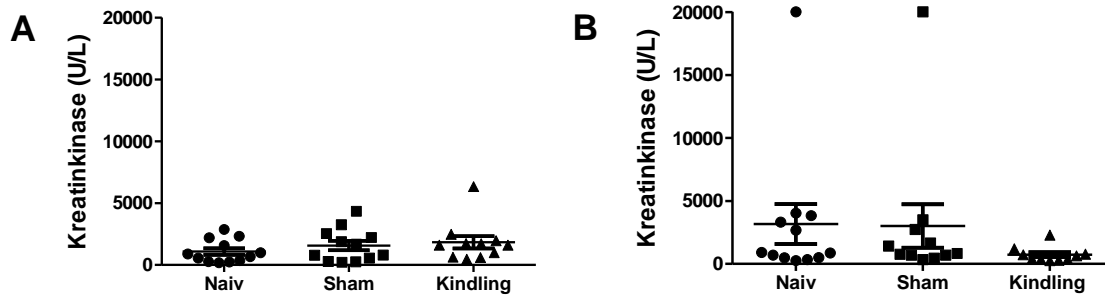


Abbildung 40

CK-Konzentrationen. Weder am Ende der Phase der fokalen Anfälle (A, Naiv und Sham  $n = 12$ , Kindling  $n = 11$ ), noch am Ende der Phase der generalisierten Anfälle (B, Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 11$ , Kindling  $n = 10$ ) wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

## 2.5. Zyklusstand

Der Zyklusstand der Tiere am Ende der ersten und zweiten Versuchsphase ist in Abbildung 41 dargestellt. Am Ende der Phase der fokalen Anfälle konnte in der Sham-Gruppe bei der Hälfte der Tiere ein Östrus nachgewiesen werden. In den anderen beiden Versuchsgruppen befanden sich die Mehrheit der Tiere in einer anderen Zyklusphase. Am Ende der Phase der generalisierten Anfälle konnte in der naiven Gruppe bei der Hälfte der Tiere ein Östrus nachgewiesen werden. Sowohl in der Sham-Gruppe, als auch in der Kindling-Gruppe befand sich jeweils nur ein Tier im Östrus. In beiden Versuchsphasen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

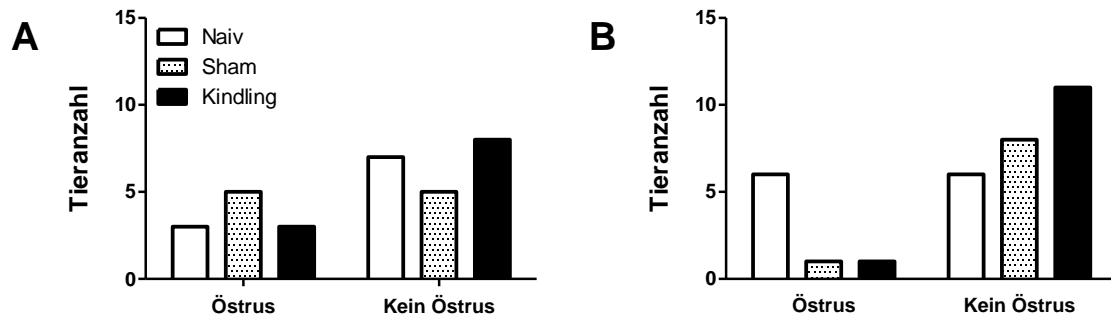


Abbildung 41

Zyklusstand der Tiere. Weder während der Phase der fokalen Anfälle (A, Naiv und Sham  $n = 10$ , Kindling  $n = 11$ ), noch während der Phase der generalisierten Anfälle (B, Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 9$ , Kindling  $n = 12$ ) wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die Grafik zeigt die absolute Tieranzahl.

### 3. Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse

#### 3.1. Korrelationsmatrix

Für die Daten der ersten Versuchsphase der generalisierten Anfälle wurde eine Korrelationsmatrix nach Spearman erstellt. Mithilfe der Korrelationsmatrix wurden alle in dieser Versuchsphase erhobenen Parameter analysiert. In Abbildung 42 ist die Korrelationsmatrix mit *heatmaps* für die einzelnen Parameter dargestellt. Die Abkürzungen der verwendeten Parameter sind in Tabelle 4 erläutert. Der Korrelationskoeffizient gibt den linearen Zusammenhang zweier Parameter an. Sein Wert liegt zwischen minus eins und eins. Bei einem positiven Wert liegt ein positiver linearer Zusammenhang, bei einem negativen Wert ein negativer linearer Zusammenhang der beiden Parameter vor. Ist der Wert null, liegt kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern vor.

Tabelle 4: Abkürzungen der verwendeten Parameter

Parameter	Einheit	Test	Bedeutung
NB_focal	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten während der Phase der fokalen Anfälle.
NB_gen	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten an einem Tag mit generalisierten Anfällen.
NB_difference	Score 0-3	Nestbauverhalten	Differenz der Nestscores zwischen dem Tag, an dem die Tiere neues Nestmaterial erhielten und fünf Tagen danach.
LTNB_5 <sup>th</sup> seizure	Sekunden	Nestbauverhalten	Zeitdauer bis zum Beginn des Nestbauverhaltens am Tag des fünften generalisierten Anfalls.
LTNB_10 <sup>th</sup> seizure	Sekunden	Nestbauverhalten	Zeitdauer bis zum Beginn des Nestbauverhaltens am Tag des zehnten generalisierten Anfalls.
LS_focal	Score 1-3	Nestverschmutzung	Nestverschmutzung an einem Tag mit fokalen Anfällen.
LS_5 <sup>th</sup> seizure	Score 1-3	Nestverschmutzung	Nestverschmutzung am Tag des fünften generalisierten Anfalls.
LS_10 <sup>th</sup> seizure	Score 1-3	Nestverschmutzung	Nestverschmutzung am Tag des zehnten generalisierten Anfalls.
SI_percentage	%	Social-Interaction-Test	Zeitdauer der aktiven sozialen Interaktion. Für jedes Paar wurde ein Wert generiert.
BUR_Gravel_focal	Gramm	Burrowing	Aus der Röhre entfernter Kies während der Phase der fokalen Anfälle.
BUR_Time_focal	Sekunden	Burrowing	Zeitdauer bis zum Beginn des Grabverhaltens während der Phase der fokalen Anfälle.
BUR_Gravel_gen	Gramm	Burrowing	Aus der Röhre entfernter Kies während der Phase der generalisierten Anfälle.
BUR_Time_gen	Sekunden	Burrowing	Zeitdauer bis zum Beginn des Grabverhaltens während der Phase der fokalen Anfälle.
BUR_Gravel_gen_d	Gramm	Burrowing	Differenz zwischen dem aus der Röhre entfernten Kies während der Phase der generalisierten Anfälle und dem Basalwert.

BUR_Time_gen_d	Sekunden	Burrowing	Differenz zwischen der Zeitdauer bis zum Beginn des Grabverhaltens während der Phase der generalisierten Anfälle und dem Basalwert.
OF_distance	Zentimeter	Open-Field	Zurückgelegte Strecke im Open-Field.
OF_rearing	Anzahl	Open-Field	<i>Rearing</i> -Frequenz
OF_immobility	Sekunden	Open-Field	Zeitdauer der Immobilität.
OF_wall	Sekunden	Open-Field	Zeitdauer der Thigmotaxis.
OF_center	Sekunden	Open-Field	Aufenthaltsdauer im Zentrum.
BWB_WB	Sekunden	Black-and-White-Box	Aufenthaltsdauer in der weißen Box.
BWB_LT	Sekunden	Black-and-White-Box	Latenzzeit bis zum ersten Übertritt in die schwarze Box.
BWB_streching	Anzahl	Black-and-White-Box	<i>Stretching</i> -Frequenz.
EPM_immobility	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Zeitdauer der Immobilität.
EPM_streching	Anzahl	Elevated-Plus-Maze	<i>Stretching</i> -Frequenz.
EPM_headdip	Anzahl	Elevated-Plus-Maze	<i>Headdips</i> -Frequenz.
EPM_closedarms	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Aufenthaltsdauer auf den geschlossenen Armen.
EPM_openarms	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen.
EPM_open1.3	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Aufenthaltsdauer auf dem äußeren 1/3 der offenen Arme.
SP_percentage	%	Saccharin-Präferenz	Anteil des Saccharin-Konsums am Flüssigkeitskonsum während der Testtage.
Cort_Hair_d	pg/mg	Corticosteron	Differenz zwischen Basal- und Endkonzentration des Corticosteron in den Haarproben.
Cort_Serum	ng/ml	Corticosteron	Absolute Corticosteron-Werte im Serum am Ende des Projekts.
Cort_Feces_focal_d	ng/g	Corticosteron	Differenz zwischen der Basalkonzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten und deren Konzentration während der Phase der fokalen Anfälle.
Cort_Feces_gen_d	ng/g	Corticosteron	Differenz zwischen der Basalkonzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten und deren Konzentration während der Phase der generalisierten Anfälle.
Oxytocin	pg/ml	Oxytocin	Absolute Oxytocin-Konzentration im Serum am Ende der Versuchsphase.
BDNF	pg/ml	BDNF	Absolute BDNF-Konzentration im Serum am Ende der Versuchsphase.
Weight_gain	Gramm	Gewichtszunahme	Differenz zwischen dem Körpergewicht der Tiere zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende.
Adrenal_Glands	Gramm	Nebennieren	Gewicht der Nebennieren.
Init. ADT	µA	Anfallsinduktion	Initiale Anfallsschwelle
Init. SD	Sekunden	Anfallsinduktion	Initiale Anfallsdauer
Total SD	Sekunden	Anfallsinduktion	Totale Anfallsdauer
Mean SD	Sekunden	Anfallsinduktion	Mittlere Anfallsdauer

In einigen Verhaltenstests wurden mehrere verschiedene Parameter erhoben, wie zum Beispiel im Elevated-Plus-Maze. Die Korrelationsmatrixanalyse zeigte diesbezüglich eine Korrelation zwischen den Parametern eines Verhaltenstests auf. Im Elevated-Plus-Maze konnte eine positive Korrelation zwischen der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen und den *headdips* nachgewiesen werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Tiere umso mehr *headdips* zeigten, je mehr Zeit sie auf den offenen Armen verbrachten. Umgekehrt wurde eine negative Korrelation zwischen der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen und der Anzahl an *headdips* festgestellt. Dies bedeutet, dass die Tiere umso weniger *headdips* zeigten, je länger ihre Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen war. Des Weiteren wiesen hinsichtlich des Elevated-Plus-Maze die Parameter Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen und *stretching postures* eine Korrelation auf.

Weiterhin konnten ebenso Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern der unterschiedlichen Tests aufgezeigt werden. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman wurde dabei für alle Parameter bestimmt.

Eine positive Korrelation wiesen folgende Parameter auf:

- **EPM\_stretching** und **LS\_10thseizure** (0,57)
- **SP\_percentage** und **EPM\_openarms** (0,50) sowie **SP\_percentage** und **EPM\_open1/3** (0,55)
- **BWB\_WB** und **Cort\_Serum** (0,54)
- **Oxytocin** und **BDNF** (0,51)

Eine negative Korrelation konnte zwischen folgenden Parametern festgestellt werden:

- **BDNF** und **LTNB\_10thseizure** (-0,52)
- **SP\_percentage** und **EPM\_closedarms** (-0,50)



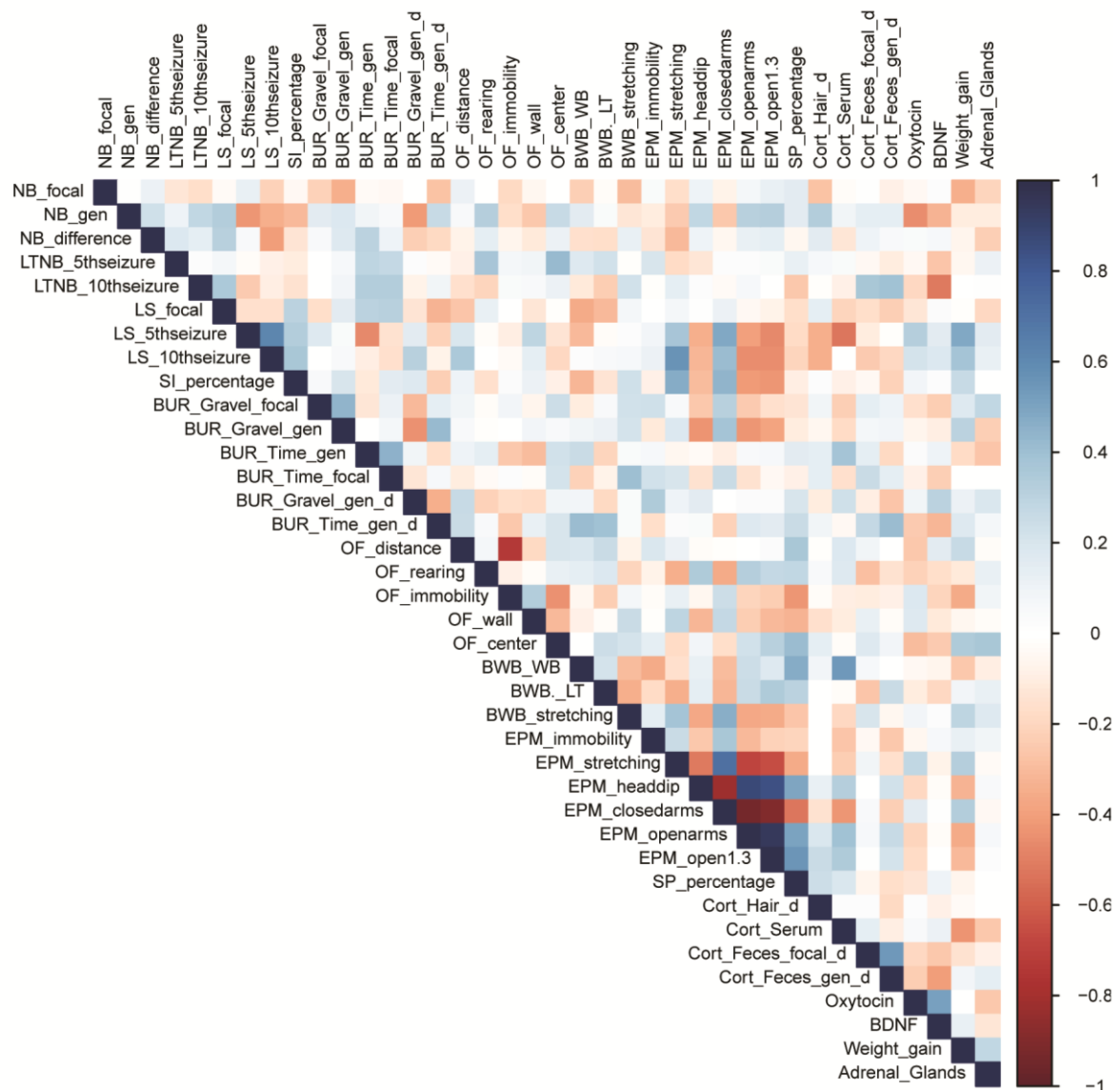


Abbildung 42

Korrelationsmatrix nach Spearman. Korrelation zwischen Verhaltensanalysen und biochemischen Parametern (n = 27-34).

Für normalverteilte Parameter wurde zusätzlich eine Korrelationsanalyse nach Pearson durchgeführt, um die Validität der Ergebnisse zu überprüfen. Folgende Paare wiesen eine signifikante Korrelation nach Spearman, aber nicht nach Pearson auf: OF\_rearing - EPM\_stretching, OF\_immobility - weight\_gain, OF\_center - adrenal\_glands, BWB\_WB - EPM\_immobility, EPM\_closed arms - cort\_Serum, EPM\_open arms - cort\_Serum, cort\_Serum - weight\_gain. Die Aussage der Korrelationsmatrix verändert sich dadurch allerdings nicht. Zusätzlich wurde eine Korrelationsmatrix für die Darstellung von Korrelationen zwischen den Anfallsparametern sowie allen Parametern aus Verhaltens- und biochemischen Analysen erstellt. Hier zeigte sich, dass einige Parameter des Elevated-Plus-Maze mit der initialen Anfallsschwelle korrelieren (Abbildung 43).

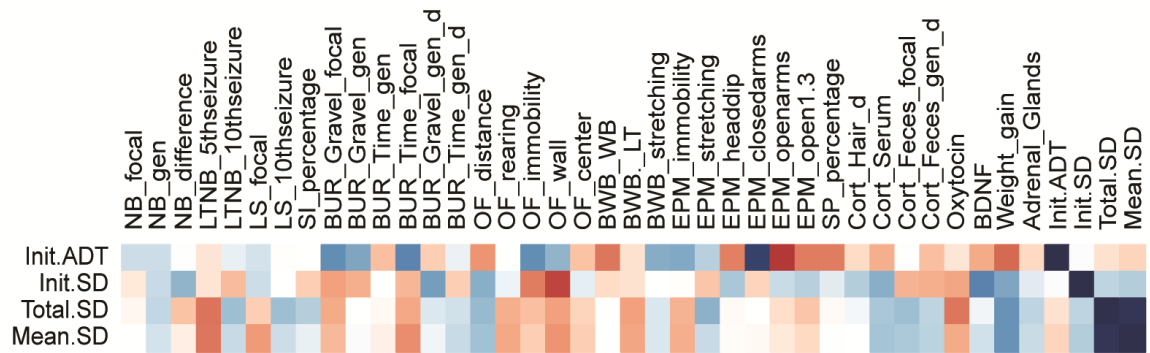


Abbildung 43

Korrelationen zwischen den erhobenen Anfallsparemtern und den Parametern aus Verhaltens- und biochemischen Analysen (n = 10-11). Farblgende siehe Abbildung 42.

### 3.2. Hauptkomponentenanalyse (PCA)

Die Daten, welche für die Erstellung der PCA verwendet wurden, entsprachen dem Datensatz der Korrelationsmatrix. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 dargestellt. Die Daten der vorliegenden Analyse wurde mit Hilfe der PCA strukturiert und graphisch dargestellt. Dazu wurden die verschiedenen Parameter in Hauptkomponenten (*Principal components*, PC) zusammengefasst. Durch dieses Vorgehen können Muster im Datensatz identifiziert werden, die bei der alleinigen Betrachtung der Parameter unentdeckt bleiben. Die ersten beiden PCs erklären 28 % der gesamten Varianz des Datensatzes (PC1: 17,22 %, PC2: 10,75 %). Es konnte eine signifikante Separation der drei Versuchsgruppen entlang von PC1 festgestellt werden ( $F(2,31) = 11,64, p < 0,001$ ). Der Post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der naiven Gruppe und der Kindling-Gruppe ( $p < 0,001$ ), sowie zwischen der naiven Gruppe und der Sham-Gruppe an ( $p = 0,045$ ). Zwischen der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Separation der Versuchsgruppen entlang von PC1 ist allein auf verschiedene Verhaltensparameter zurückzuführen. Die biochemischen Parameter trugen nicht zu einer Aufspaltung der Versuchsgruppen bei. Die zehn Parameter, die hauptsächlich zu einer Aufspaltung der Gruppen beitrugen sind in Abbildung 44 B rot markiert. Es zeigte sich, dass es sich bei fünf der zehn Parameter um Parameter des Elevated-Plus-Maze handelte. Die anderen fünf Parameter stellten die Aufenthaltsdauer im Wandbereich des Open-Fields, die Zeitdauer in aktiver sozialer Interaktion, der Verschmutzungsgrad der Nester während der frühen und der späten Phase generalisierter Anfälle und der prozentuale Saccharin-Konsum dar. PC2 zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

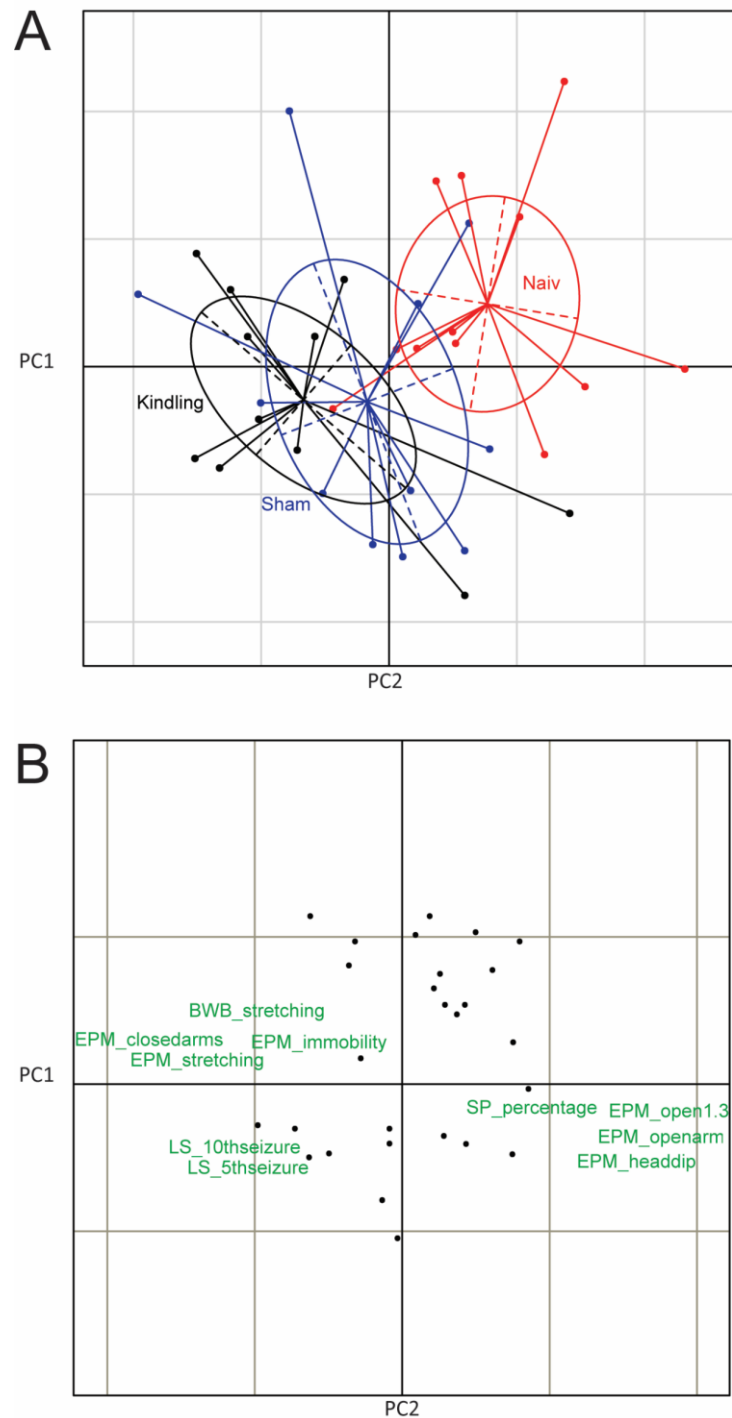


Abbildung 44

PCA. (A) Aufspaltung der drei Versuchsgruppen anhand von PC1. Die naive Gruppe unterschied sich signifikant von der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert den individuellen Datensatz eines Tiers. (B) Die Gewichtung der einzelnen Parameter in der PCA. Je weiter ein Parameter vom Mittelpunkt entfernt liegt, desto größer ist sein Einfluss auf die betreffende Komponente. Die Top 10 Komponenten sind rot markiert.

## 4. Telemetrische Messungen

### 4.1. Zirkadiane Aktivität

Die Aufzeichnungen mittels Radiotelemetrie wurden in der dritten Versuchsphase durchgeführt. In dieser Versuchsphase erfolgten die Implantationen des Telemetrie Transmitter und der Stimulations- und Ableitungselektrode sowie die Induktion fokaler und generalisierter Anfälle. Die Tiere der naiven Gruppe wurden in dieser Versuchsphase auf Grund der Transmitterimplantation als Kontrollgruppe bezeichnet. Die Aufzeichnungen erfolgten in dieser dritten Versuchsphase in drei Zeiträumen: Während der postoperativen Phase an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zwei Wochen nach der Implantation sowie jeweils an drei Tagen in der Phase der fokalen und generalisierten Anfälle. In der postoperativen Phase wurden die Sham-Gruppe und die spätere Kindling-Gruppe als elektrodenimplantierte Gruppe zusammengefasst. Dadurch konnten Informationen über die Aktivität der Tiere sowohl während der Schlafphase (entspricht der Hellphase) als auch während der Aktivitätsphase (entspricht der Dunkelphase) aufgezeichnet werden. Es zeigte sich jeweils bei allen Versuchsgruppen eine höhere Aktivität in der Dunkelphase als in der Hellphase. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs in der postoperativen Phase (Abbildung 45 A) und in der Phase der fokalen und generalisierten Anfälle (Abbildung 46 A und 47 A) war der Höhepunkt der Aktivität zu Beginn und am Ende der Nacht zu erkennen. In der postoperativen Phase konnte zudem eine signifikant erhöhte Aktivität der elektrodenimplantierten Tiere (entspricht Sham- und Kindling-Gruppe) gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Diese zeichnete sich sowohl in der Hell- als auch in der Dunkelphase ab (Abbildung 45 B). Der Kontrollgruppe wurde ausschließlich ein Transmitter implantiert, wohingegen der elektrodenimplantierten Gruppe ein Transmitter sowie eine Stimulations- und Ableitungselektrode implantiert wurden.

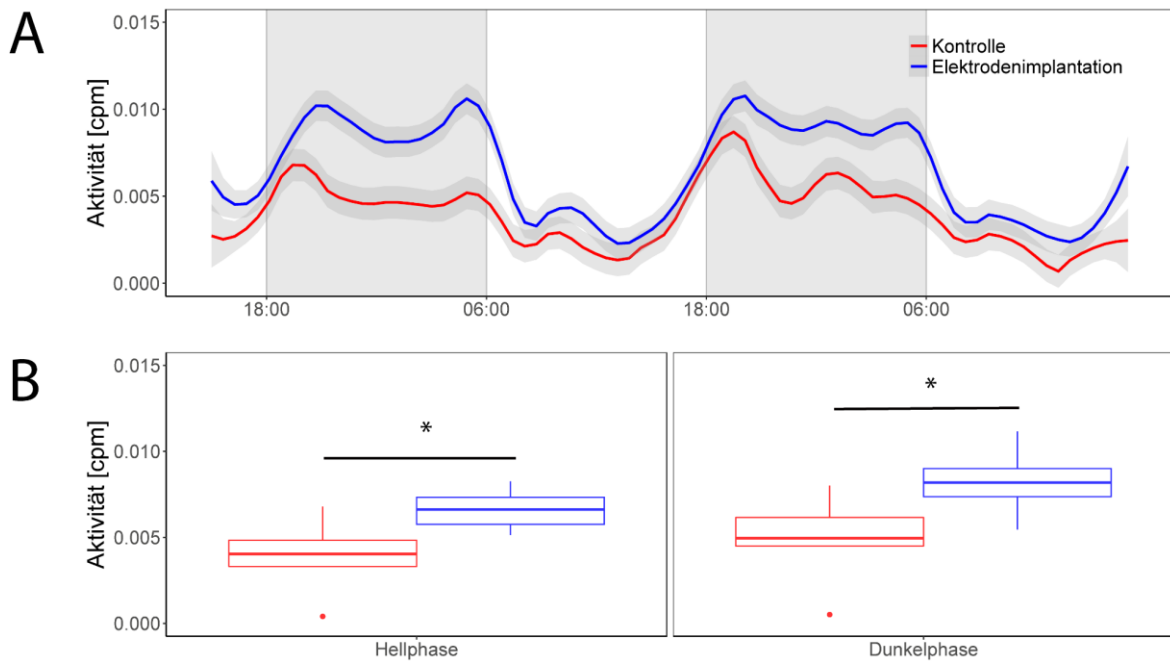


Abbildung 45

Aktivität in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf der Aktivität. (B) Aktivität in der Hell- und Dunkelphase. Die elektrodenimplantierten Tiere zeigten sowohl in der Hellphase als auch in der Dunkelphase eine erhöhte Aktivität im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe und Kindling-Gruppe  $n = 6$ , Sham-Gruppe  $n = 7$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ . Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt.

Der Kurvenverlauf der zirkadianen Aktivität der Tiere in der Phase der fokalen Anfälle ist in Abbildung 46 A dargestellt. Dieser weist zwei Höhepunkte zu Beginn und am Ende der Dunkelphase sowie Tiefstwerte in der Mitte der Hellphase auf. Es konnte kein Einfluss der fokalen Anfälle auf die zirkadiane Aktivität festgestellt werden. Auch die Elektrodenimplantation besaß in dieser Phase keinen Einfluss auf die zirkadiane Aktivität der Tiere (Abbildung 46 B).

Der Kurvenverlauf der zirkadianen Aktivität in der Phase der generalisierten Anfälle ist in Abbildung 47 A dargestellt. In dieser Phase konnten ebenfalls zwei Höhepunkte der Aktivität in der Dunkelphase sowie Tiefstwerte in der Hellphase nachgewiesen werden. Allerdings bleibt die zirkadiane Aktivität der Kindling-Gruppe im Vergleich zu den beiden anderen Tiergruppen in der Hellphase erhöht. In der Kontroll- sowie der Sham-Gruppe fiel die Aktivität zu Beginn der Hellphase um 6:00 Uhr rapide ab. Die statistische Auswertung zeigte eine signifikant erhöhte Aktivität der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe in beiden Hellphasen (Abbildung 47 B). Die separate Analyse der Hellphase, zeigte, sowohl vormittags (vor dem Kindling) als auch nachmittags, eine erhöhte Aktivität der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abbildung 48).

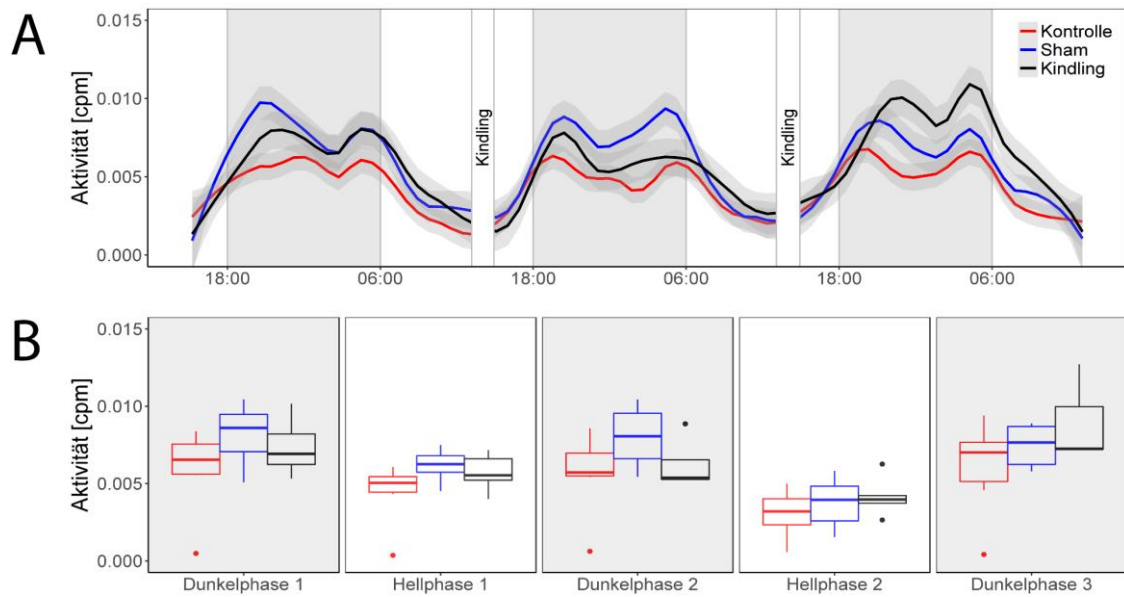


Abbildung 46

Aktivität während der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Aktivität. (B) Aktivität in den Hell- und Dunkelphasen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Kontroll- und Kindling-Gruppe  $n = 6$ , Sham-Gruppe  $n = 7$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

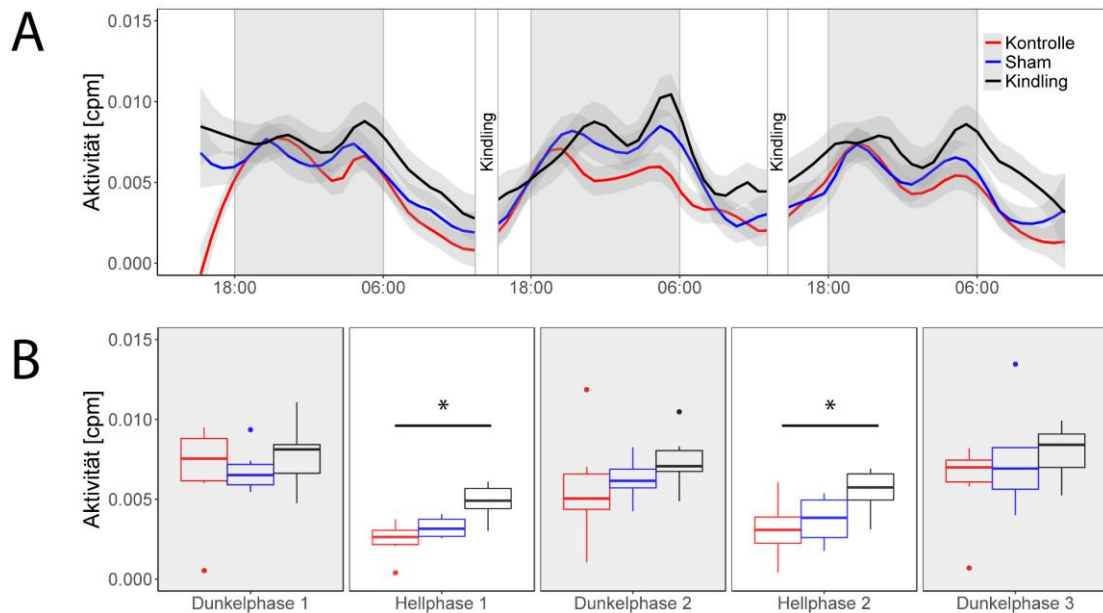


Abbildung 47

Aktivität während der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Aktivität. (B) Aktivität in den Hell- und Dunkelphasen. In beiden Hellphasen wurde eine signifikant erhöhte Aktivität der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt (Kontrollgruppe und Kindling-Gruppe:  $n = 6$ , Sham-Gruppe  $n = 7$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

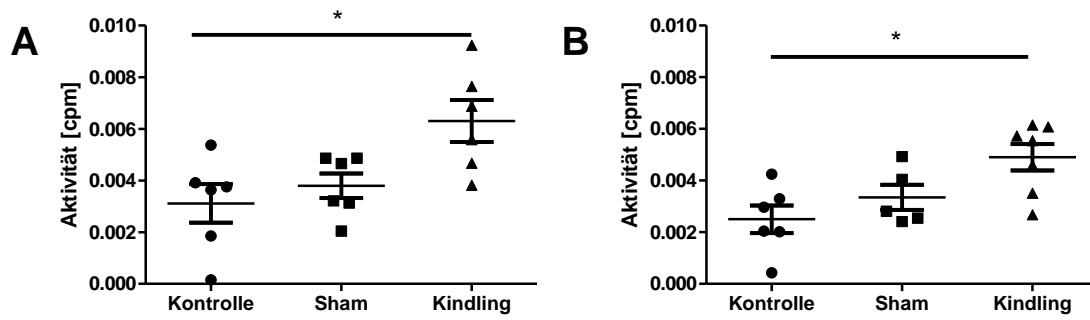


Abbildung 48

Aktivität der Tiere am Vor- und Nachmittag in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Mittelwerte der Aktivität der Hellphasen am Vormittag vor der Stimulation. (B) Mittelwerte der Aktivität der Hellphasen am Nachmittag direkt im Anschluss an die Stimulation. Sowohl am Vor- als auch am Nachmittag war die Aktivität der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht (Kontrollgruppe und Kindling-Gruppe:  $n = 6$ , Sham-Gruppe  $n = 7$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Des Weiteren wurde durch eine Videoanalyse der zirkadiane Verlauf des Nestbauverhaltens beurteilt. Dafür wurde die Nestkomplexität stündlich beurteilt. Diese Analyse wurde sowohl während der postoperativen Phase (Abbildung 49 A), als auch an einem Tag in der Phase der generalisierten Anfälle durchgeführt (Abbildung 49 B). Die Nestkomplexität sowie deren zirkadianer Rhythmus unterschieden sich zu keinem der beiden Zeitpunkte zwischen den Versuchsgruppen.

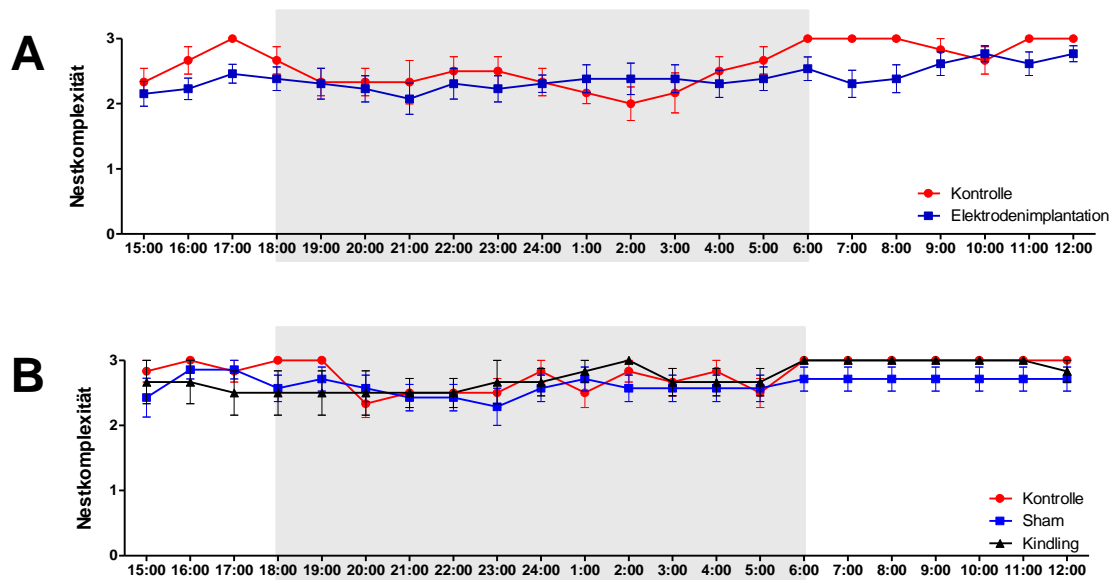


Abbildung 49

Zirkadianer Rhythmus der Nestkomplexität. (A) Stündlicher Verlauf der Nestkomplexität in der postoperativen Phase zwei Wochen nach der Implantation des Transmitters und der Elektrode. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen beobachtet. (B) stündlicher Verlauf der Nestkomplexität während der Phase der generalisierten Anfälle. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Kontroll- und Kindling-Gruppe:  $n = 6$ , Sham-Gruppe  $n = 7$ ). Die Grafik zeigt die Mittelwerte und den SEM.



#### 4.2. Herzfrequenz (HR)

Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der Herzfrequenz in der gesamten dritten Versuchsphase zeigte sich eine höhere Herzfrequenz in der Aktivitätsphase der Tiere (entspricht der Dunkelphase) als in der Ruhephase (entspricht der Hellphase) (Abbildungen 50, 52 und 54 A). Die Herzfrequenz wies in der gesamten Phase in allen Versuchsgruppen, wie in der Literatur bereits beschrieben (LI et al. 1999), zwei Höhepunkte jeweils zu Beginn und am Ende der Dunkelphase auf. Tiefstwerte der Herzfrequenz waren jeweils in der Hellphase zu verzeichnen. Der Verlauf der RR-Intervalle, verhielt sich jeweils gegensätzlich (Abbildungen 51, 53 und 56 A).

In der postoperativen Phase unterschieden sich weder die mittlere Herzfrequenz noch das mittlere RR-Intervall der Kontrollgruppe von der elektrodenimplantierten Gruppe (Abbildungen 50 B und 51 B).

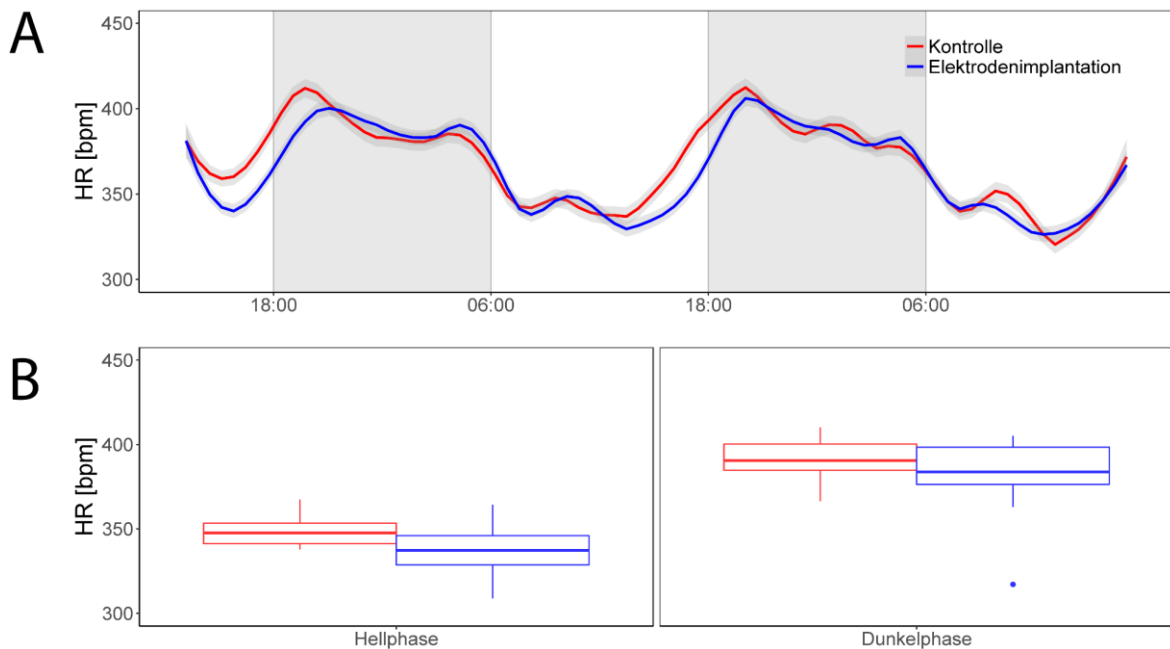


Abbildung 50

Herzfrequenz (HR) in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf der Herzfrequenz. (B) Herzfrequenz in der Hell- und Dunkelphase. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

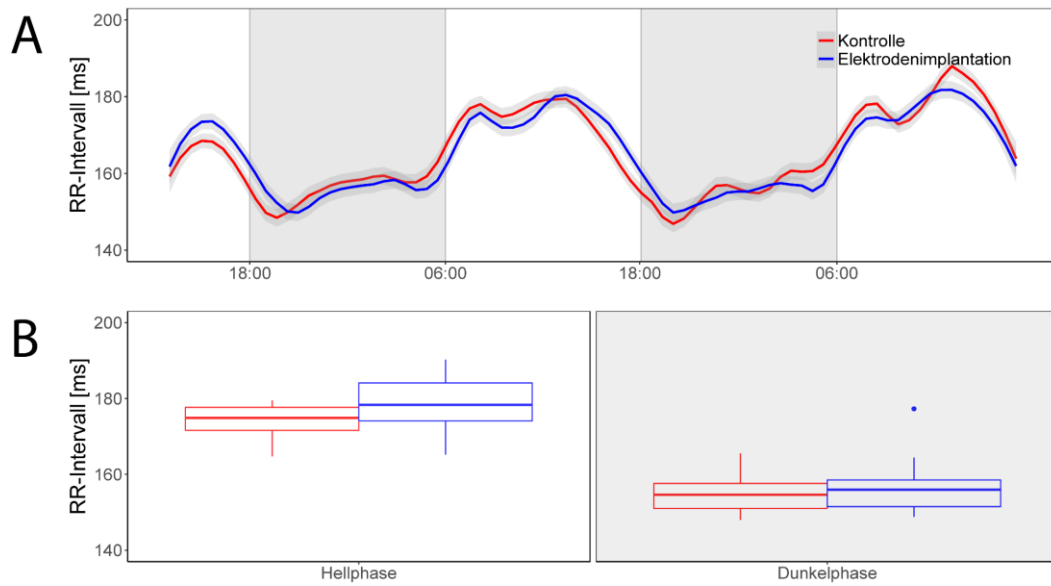


Abbildung 51

RR-Intervalle in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf der RR-Intervalle. (B) Mittelwerte der RR-Intervalle in der Hell- und Dunkelphase. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

Während der Phase der fokalen Anfälle konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen hinsichtlich der Herzfrequenz und der RR-Intervalle festgestellt werden (Abbildungen 52 B und 53 B).

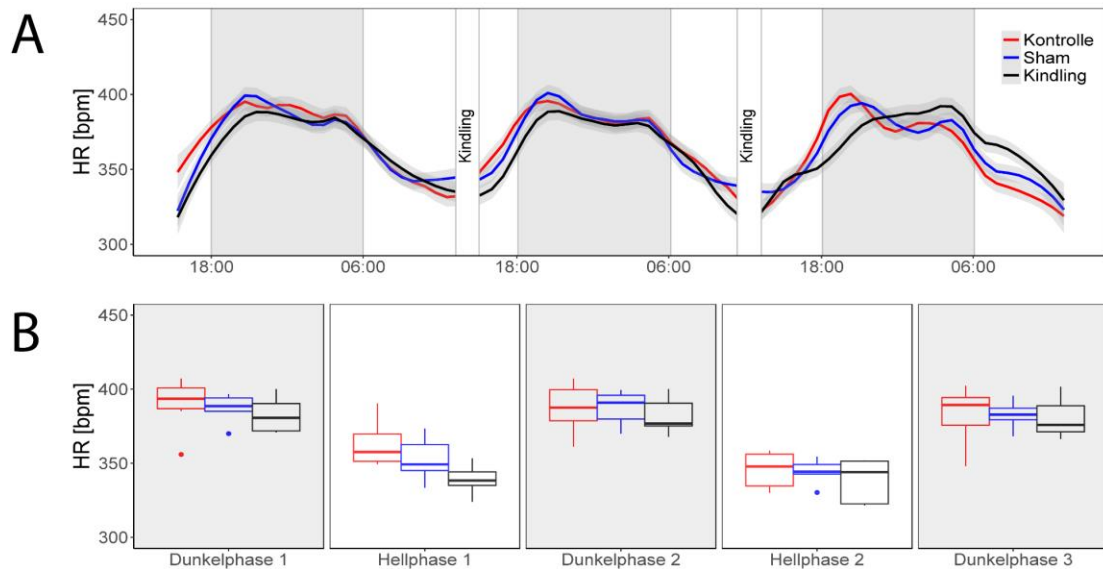


Abbildung 52

Herzfrequenz während der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Herzfrequenz. (B) Mittelwerte der Herzfrequenz in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

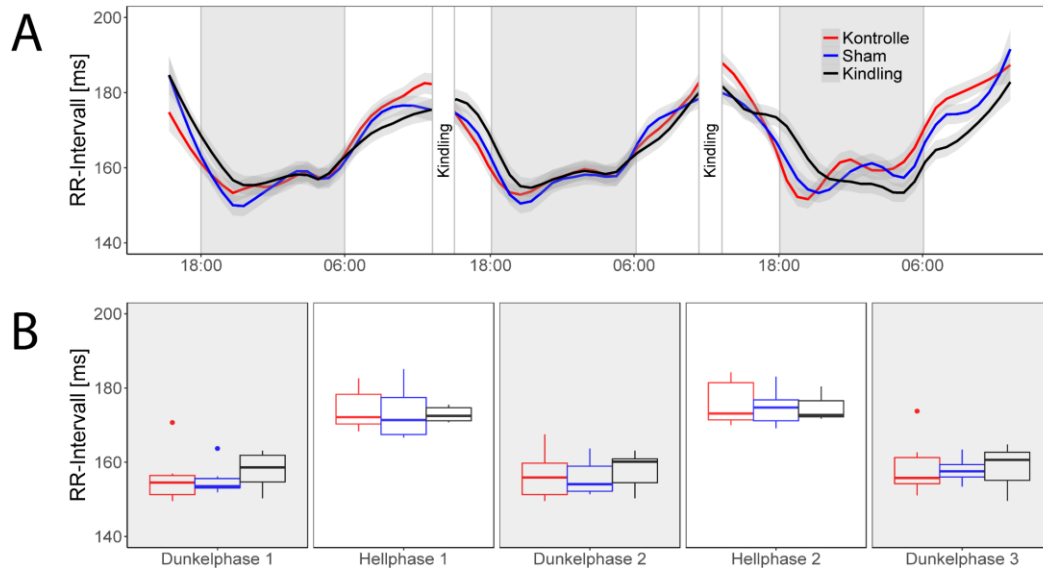


Abbildung 53

RR-Intervall während der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf der RR-Intervalle. (B) Mittelwerte der RR-Intervalle in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

Während der Phase der generalisierten Anfälle konnte in der Hellphase ein Einfluss der induzierten Anfälle sowohl auf die Herzfrequenz als auch das RR-Intervall nachgewiesen werden. In den Dunkelphasen unterschied sich der Kurvenverlauf der Herzfrequenz (Abbildung 54 A) nicht zwischen den Tiergruppen. In allen Versuchsgruppen traten die charakteristischen Höhepunkte der Herzfrequenz jeweils zu Beginn und am Ende der Dunkelphase auf. Für die Hellphase konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe nicht entsprechend der beiden anderen Gruppen abfiel und keine vergleichbaren Tiefstwerte aufwies. Ein signifikanter Unterschied der Herzfrequenz der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe konnte für beide Hellphasen nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wies die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe lediglich in der ersten Hellphase signifikant erhöhte Werte auf (Abbildung 54 B). Im Rahmen der Auswertung wurde die Hellphase zudem in Vor- und Nachmittag unterteilt. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe sowohl vor der Stimulation als auch danach erhöht war (Abbildung 55).

Der Herzfrequenz entsprechend, erhöhten sich die RR-Intervalle der Kindling-Gruppe während der Hellphase nicht analog zu den RR-Intervallen der beiden anderen Versuchsgruppen (Abbildung 56 A). Die RR-Intervalle der Kindling-Gruppe waren im Vergleich zu der Sham-Gruppe in beiden Hellphasen reduziert und im Vergleich zu der Kontrollgruppe in der ersten Hellphase erniedrigt (Abbildung 56 B). Auch bei der separaten Analyse der RR-Intervalle für den Vor- und Nachmittag zeigte sich am Vormittag eine Erniedrigung der RR-Intervalle der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe und der Sham-Gruppe. Am Nachmittag waren die RR-Intervalle der Kindling-Gruppe im Vergleich zu der Sham-Gruppe erniedrigt (Abbildung 57).

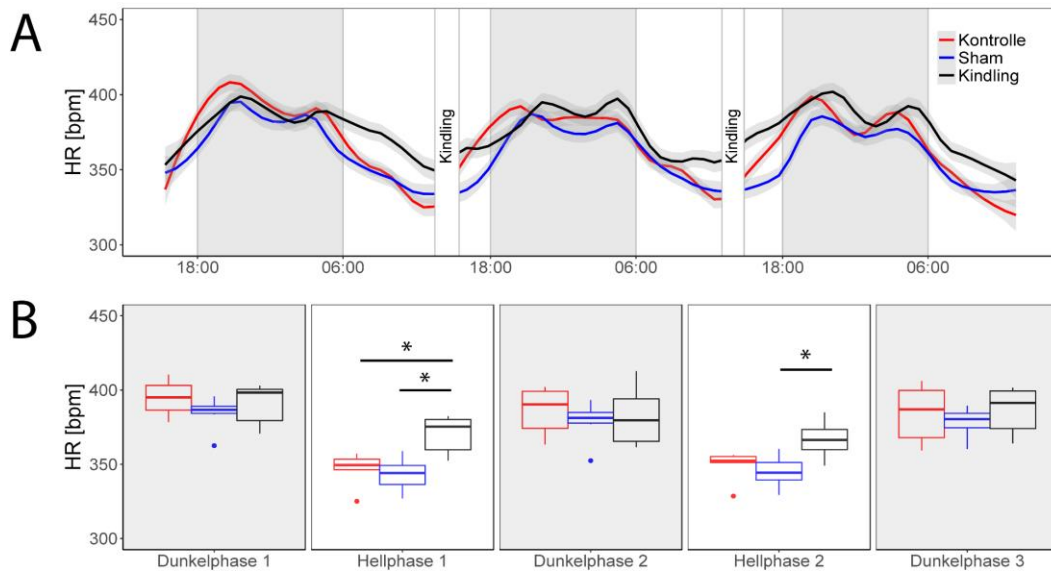


Abbildung 54

Herzfrequenz während der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Herzfrequenz. (B) Herzfrequenz in den Hell- und Dunkelphasen. In der ersten und zweiten Hellphase wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. In der ersten Hellphase war die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe und der Kontrollgruppe erhöht. In der zweiten Hellphase war die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe erhöht (Gruppengrößen  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ . Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt.

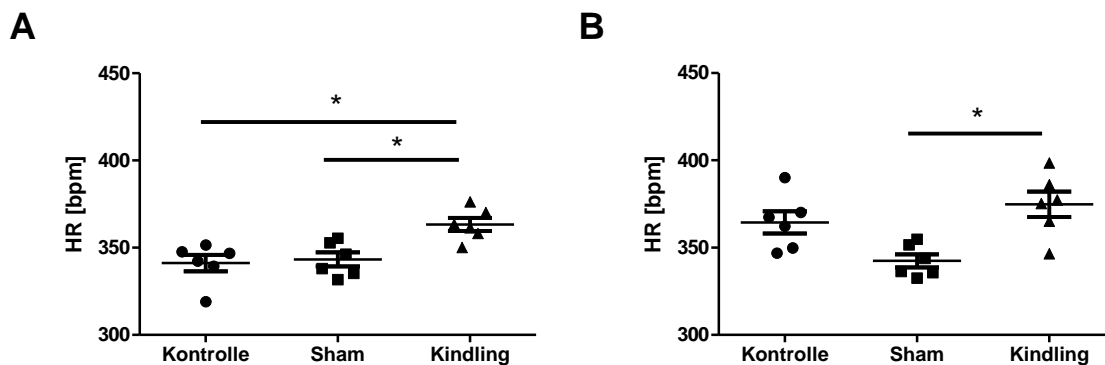


Abbildung 55

Herzfrequenz der Tiere am Vor- und Nachmittag in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Mittelwerte der Hellphasen am Vormittag vor der Stimulation. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt. (B) Mittelwerte der Hellphasen am Nachmittag direkt im Anschluss an die Stimulation. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe festgestellt (Gruppengröße  $n = 6$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

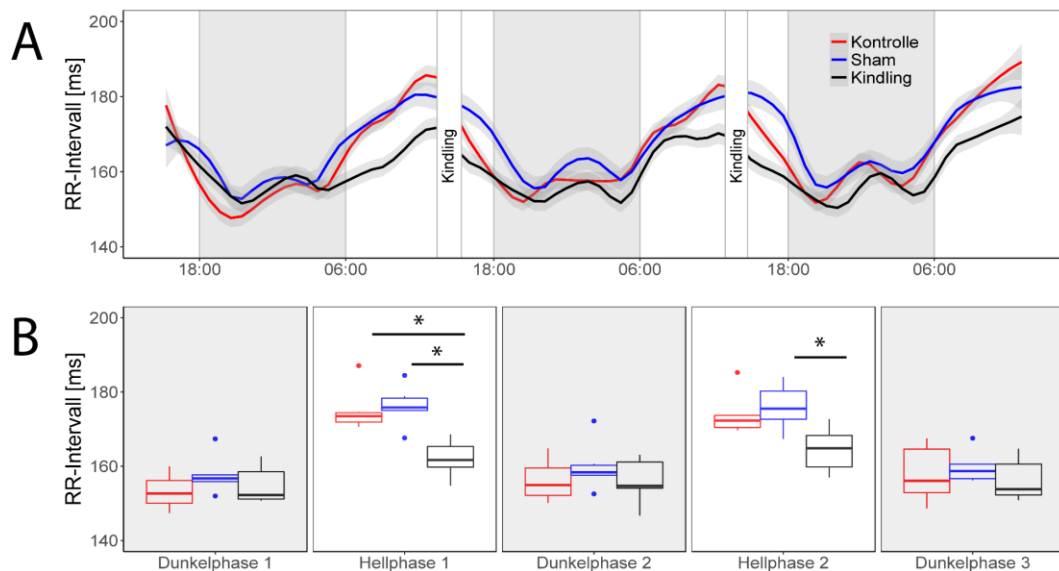


Abbildung 56

RR-Intervalle während der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf der RR-Intervalle. (B) RR-Intervalle in den Hell- und Dunkelphasen. In der ersten und zweiten Hellphase wurden signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. In der ersten Hellphase war die Kindling-Gruppe signifikant gegenüber der Sham-Gruppe und der Kontrollgruppe erniedrigt. In der zweiten Hellphase war die Kindling-Gruppe signifikant gegenüber der Sham-Gruppe erniedrigt (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ . Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt.

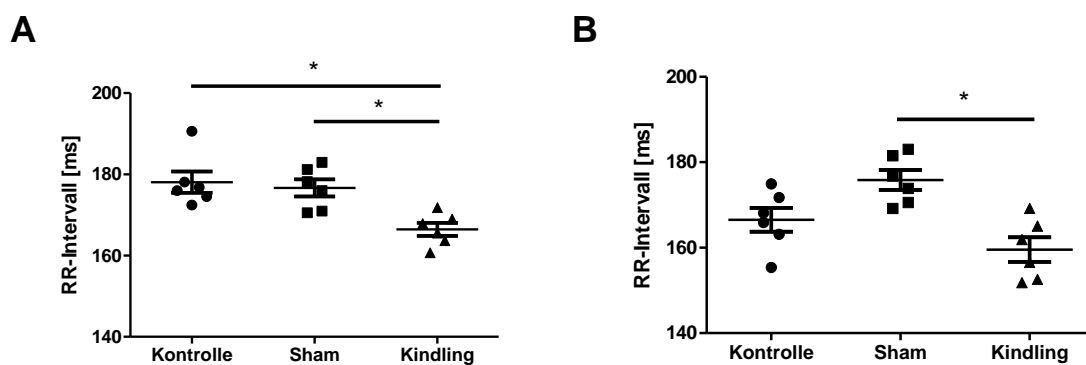


Abbildung 57

RR-Intervalle der Tiere am Vor- und Nachmittag in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Mittelwerte der Hellphasen am Vormittag vor der Stimulation. Es wurden signifikante Unterschiede zwischen der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt. (B) Mittelwerte der Hellphasen am Nachmittag direkt im Anschluss an die Stimulation. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kindling-Gruppe und der Sham-Gruppe festgestellt (Gruppengröße  $n = 6$ ). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Grafik zeigt die Werte der einzelnen Tiere, den Mittelwert und den SEM.

Zusätzlich zu der Analyse des zirkadianen Verlaufs der Herzfrequenz wurde der unmittelbare Effekt der Stimulationen und der dadurch induzierten Anfälle auf die Herzfrequenz untersucht. Dafür wurde sowohl die Herzfrequenz der Kindling-Gruppe als

auch die der Sham-Gruppe jeweils fünf Minuten vor und nach dem Stimulus aufgezeichnet. Diese Aufzeichnungen erfolgten in der Phase der fokalen Anfälle (zweite und dritte Stimulation) sowie in der Phase der generalisierten Anfälle (elfte bis dreizehnte Stimulation). Die Kontrollgruppe verblieb während dieser Zeit im Tierhaltungsraum und wurde nicht überwacht. Die in Abbildung 58 A und B dargestellten Aufzeichnungen wurden während der fokalen Anfälle erstellt und spiegeln die in Abbildung 52 markierten Zeiträume des Kindlings wider. Die fokalen Anfälle zeigten keine Auswirkungen auf die Herzfrequenz der Tiere.

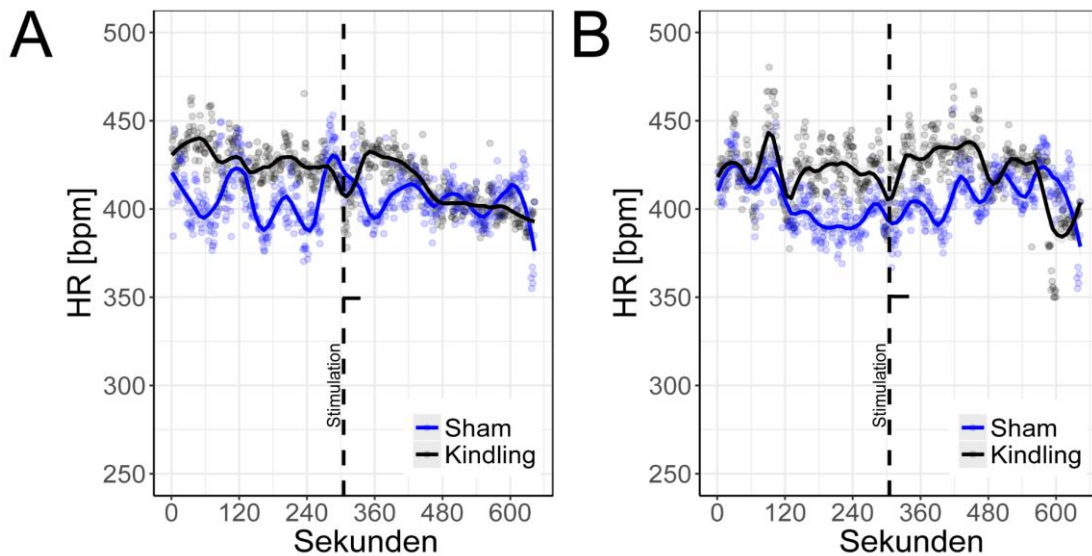


Abbildung 58

Iktale Herzfrequenz in der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Herzfrequenz während der zweiten Stimulation. (B) Kurvenverlauf der Herzfrequenz während der dritten Stimulation. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich am Tag der zweiten und dritten Stimulation, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm zeigen die LOESS-Regression und die Punkte den Mittelwert der Gruppe über fünf Minuten. Die unterbrochene Linie markiert den Stimulationszeitpunkt und die horizontale Linie markiert die motorische Anfallsdauer (A: 32 s; B: 47 s).

Während der Phase der generalisierten Anfälle konnte ein mit dem Auftreten eines generalisierten Anfalls einhergehender rapider Abfall der Herzfrequenz beobachtet werden (Abbildung 59). Diese initiale Bradykardie dauerte 36 bis 41 Sekunden an. Darauf folgte eine Normalisierung der Herzfrequenz. Während der elften und dreizehnten Stimulation (Abbildung 59 A und C) zeigte sich daraufhin ein erneuter Abfall der Herzfrequenz. Anschließend erfolgte bis zum Ende des Aufnahmezeitraums keine erneute Normalisierung der Herzfrequenz. Während der zwölften Stimulation (Abbildung 59 B) zeigte sich ebenfalls eine initiale Bradykardie und eine darauffolgende Normalisierung der Herzfrequenz. Ein erneuter Abfall der Herzfrequenz war bei dieser Stimulation nicht zu verzeichnen. Die mittlere Dauer der motorischen Anfallsaktivität während der elften Stimulation betrug 78 Sekunden (Abbildung 59 A), während der zwölften Stimulation 69 Sekunden (Abbildung 59 B).

B) und während der dreizehnten Stimulation 87 Sekunden (Abbildung 59 C).

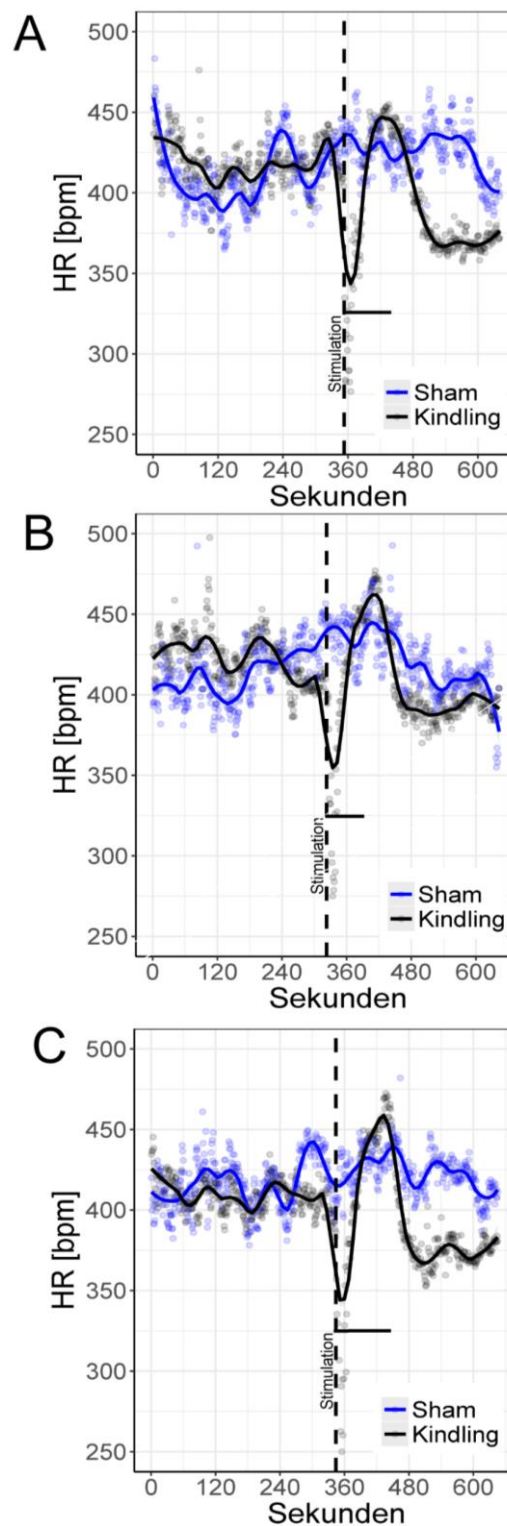


Abbildung 59

Iktale Herzfrequenz in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf der Herzfrequenz während der elften Stimulation, (B) während der zwölften Stimulation und (C) während der dreizehnten Stimulation. Es ist ein rapider Abfall der Herzfrequenz der Kindling-Gruppe zum Stimulationszeitpunkt zu erkennen. Danach erreicht die Herzfrequenz wieder den Normbereich. In (A) und (C) ist zu erkennen, dass die Herzfrequenz ein weiteres Mal rapide abfällt (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm zeigen die LOESS-Regression und die Punkte den Mittelwert der Gruppe über fünf Minuten. Die unterbrochene Linie markiert den Stimulationszeitpunkt



---

und die horizontale Linie markiert die motorische Anfallsdauer (A: 78 s; B: 69 s, C:87 s).

### 4.3. Herzratenvariabilität (HRV)

Für die Untersuchung der HRV-Parameter wurde die in Kapitel II 5.2. beschriebene zeitbasierte Analyseverfahren verwendet. Hierbei wurden SDNN, RMSSD und pNN9 analysiert. Die gesamte Variabilität der Herzfrequenz wurde durch SDNN bestimmt. Die kurzzeitige Variabilität sowie spontane Anpassungen der Herzfrequenz wurden durch RMSSD und pNN9 analysiert. In der postoperativen Phase (15 – 18 Tage nach der Elektrodenimplantation) konnten für keinen Parameter der HRV Unterschiede zwischen den Tiergruppen nachgewiesen werden. Dies wird durch den Vergleich der elektrodenimplantierten Gruppe mit der Kontrollgruppe in den Abbildungen 60 – 62 B ersichtlich. In der postoperativen Phase wurden die Tiere der späteren Sham- und Kindling-Gruppe als elektrodenimplantierte Gruppe zusammengefasst. Auch nach 21 bis 23 Tagen (entspricht der Phase der fokalen Anfälle) und 34 bis 36 Tagen (entspricht der Phase der generalisierten Anfälle) zeigte die Elektrodenimplantation keinen Einfluss auf die analysierten HRV-Parameter. Dies wird durch den Vergleich der Sham-Gruppe mit der Kontrollgruppe in den Abbildungen 63 – 68 B ersichtlich. Weiterhin wies die Kindling-Gruppe weder während der Phase der fokalen Anfälle, noch während der Phase der generalisierten Anfälle Unterschiede zu den beiden anderen Tiergruppen auf. Dies wird für die Phase der fokalen Anfälle in den Abbildungen 63 - 65 und für die Phase der generalisierten Anfälle in den Abbildungen 66 - 68 dargestellt.

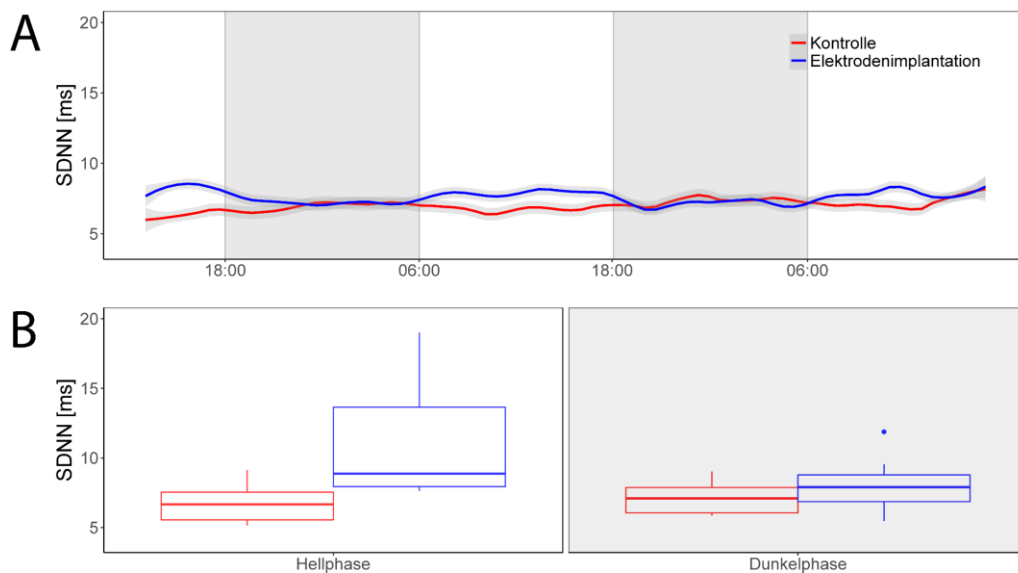


Abbildung 60

SDNN in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf der SDNN. (B) Mittelwerte der SDNN in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

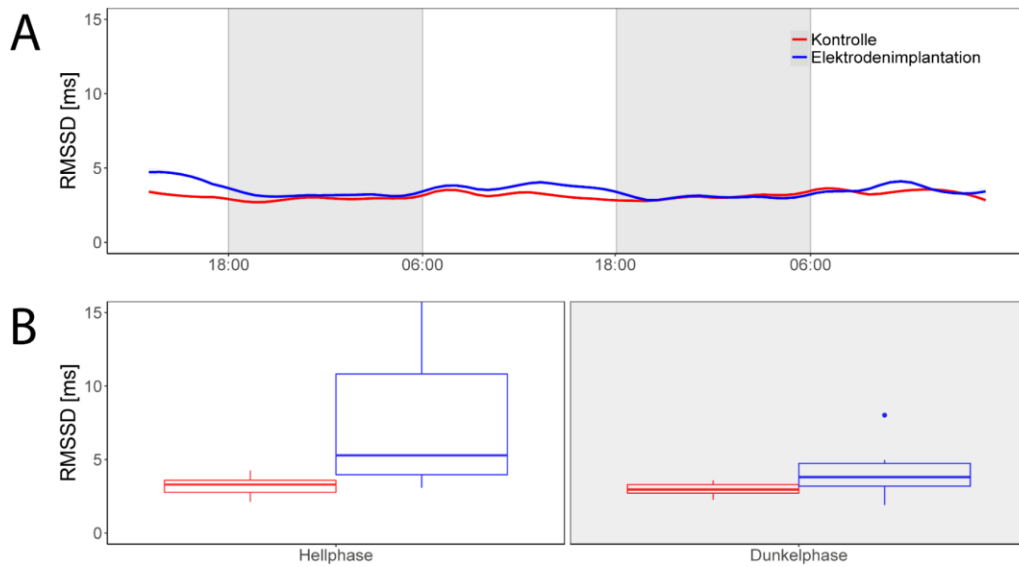


Abbildung 61

RMSSD in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf der SDNN. (B) Mittelwerte der SDNN in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

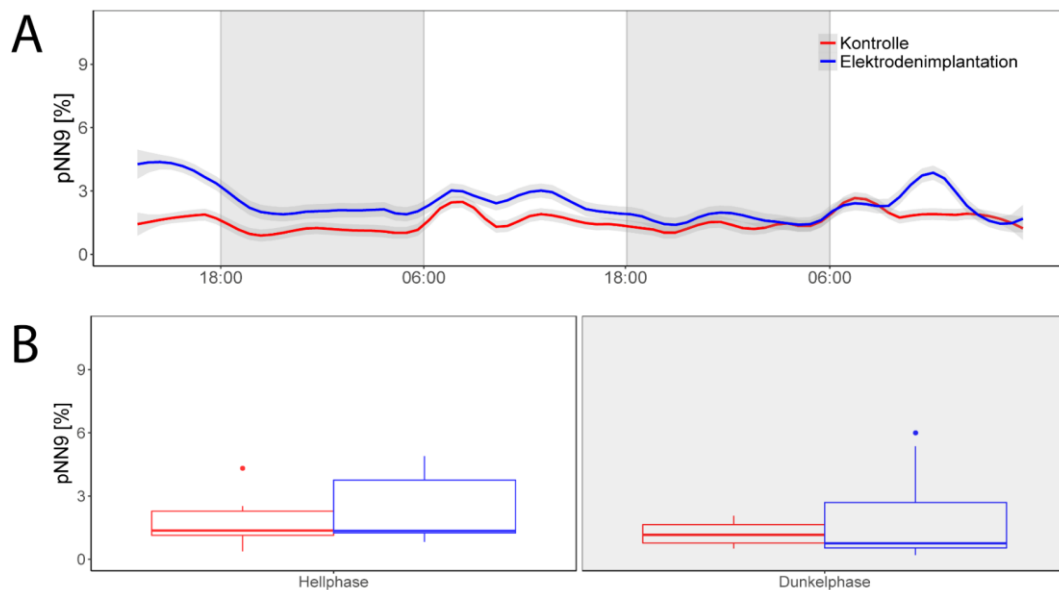


Abbildung 62

pNN9 in der postoperativen Phase. (A) Kurvenverlauf von pNN9. (B) Mittelwerte von pNN9 in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

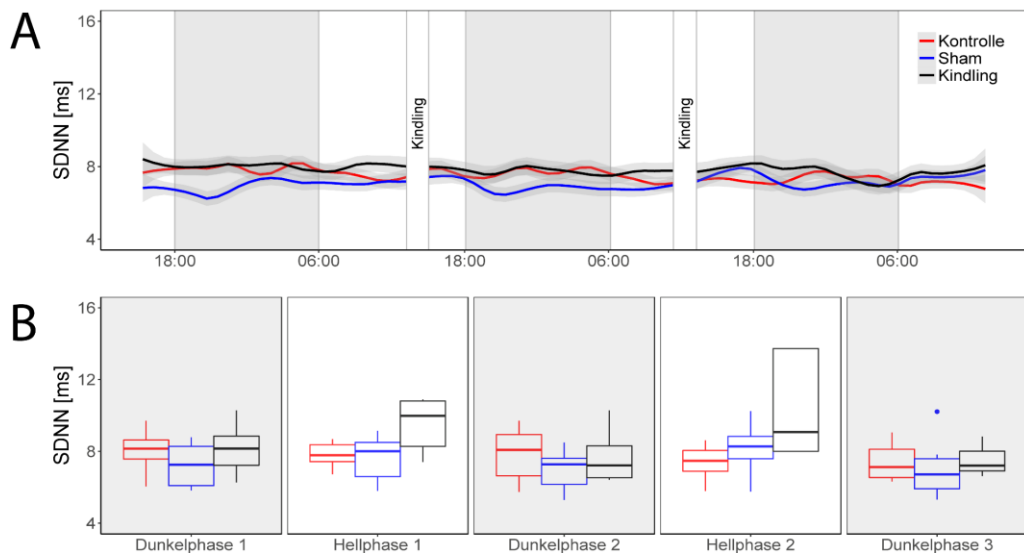


Abbildung 63

SDNN in der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf der SDNN. (B) Mittelwerte der SDNN in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

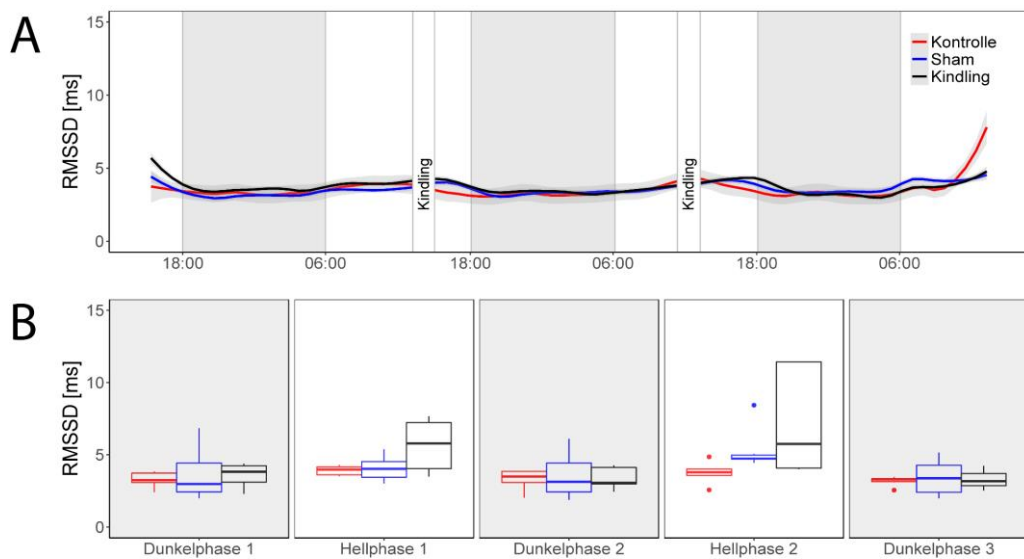


Abbildung 64

RMSSD in der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf von RMSSD. (B) Mittelwerte von RMSSD in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

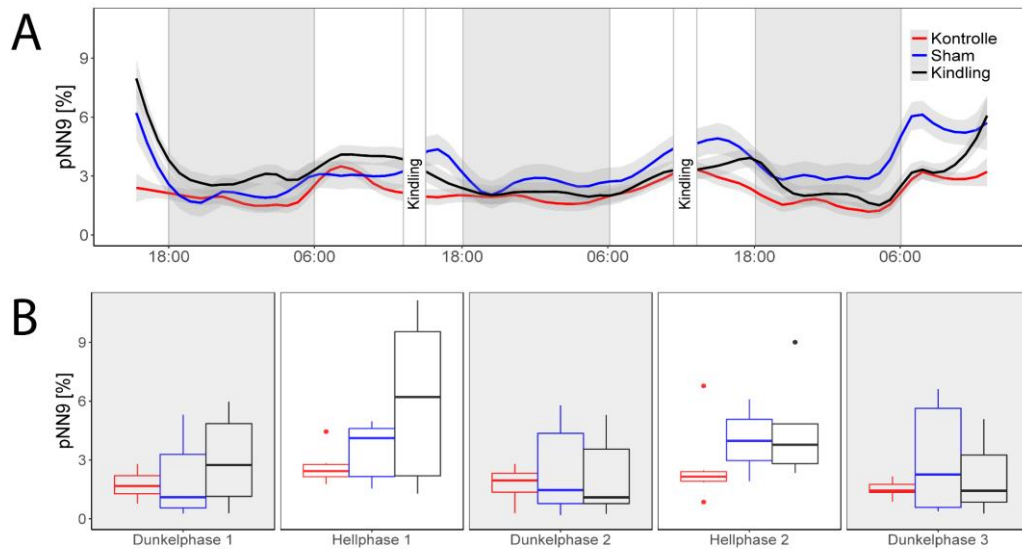


Abbildung 65

pNN9 in der Phase der fokalen Anfälle. (A) Kurvenverlauf von RMSSD. (B) Mittelwerte von RMSSD in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die Gruppengröße der Kindling-Gruppe unterschied sich an Tag zwei und drei, da einige Tiere bereits generalisierte Anfälle entwickelten (Tag zwei  $n = 5$ , Tag drei  $n = 3$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

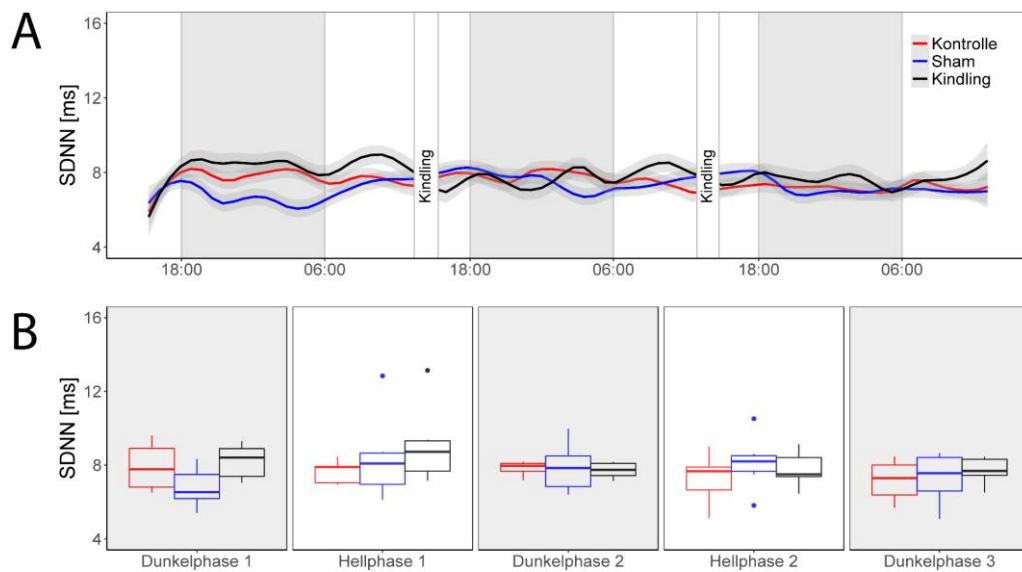


Abbildung 66

SDNN in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf von RMSSD. (B) Mittelwerte von RMSSD in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ .

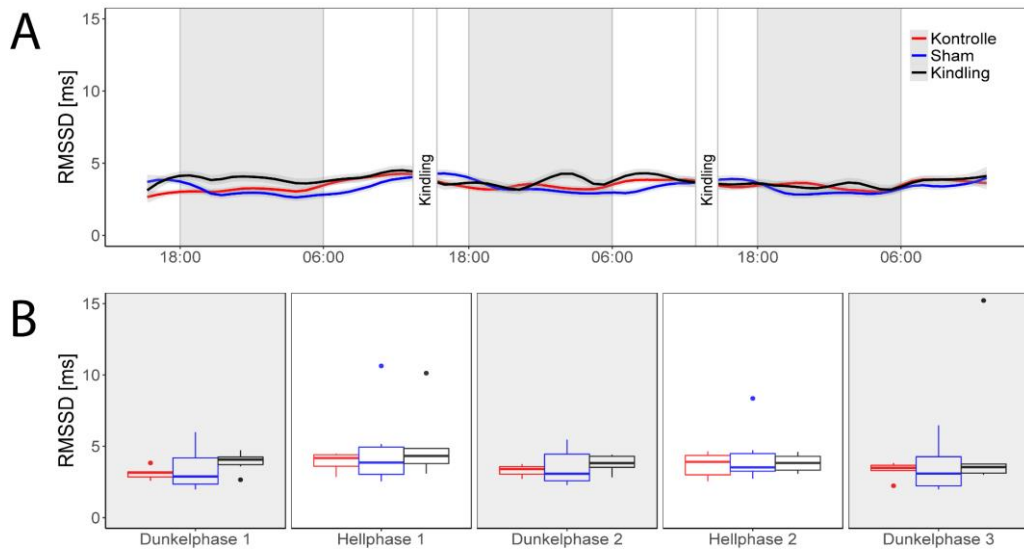


Abbildung 67

RMSSD in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf von RMSSD. (B) Mittelwerte von RMSSD in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times IQR$ .

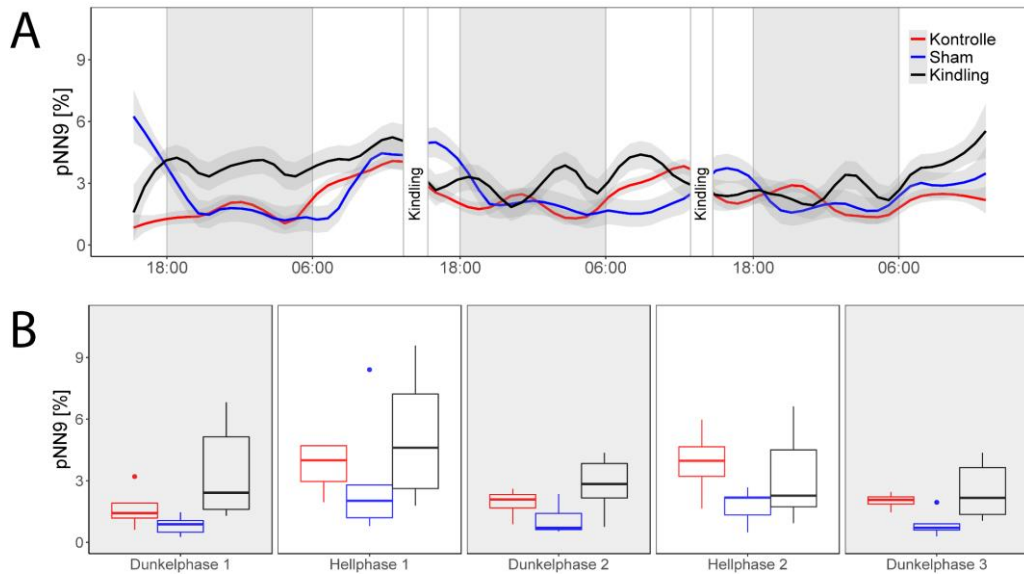


Abbildung 68

pNN9 in der Phase der generalisierten Anfälle. (A) Kurvenverlauf von RMSSD. (B) Mittelwerte von RMSSD in den Hell- und Dunkelphasen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Gruppengröße  $n = 6$ ). Die durchgezogenen Linien in Diagramm (A) zeigen die LOESS-Regression und die graue unterlegte Fläche zeigen das 95 % Konfidenzintervall. Die Boxplots in Diagramm (B) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times IQR$ .

## VI. DISKUSSION

Gemäß dem aktuellen Stand der Wissenschaft steht bislang noch kein Ansatz für eine therapeutische Modifikation der Epileptogenese zur Verfügung (LÖSCHER u. BRANDT 2010; PITKÄNEN et al. 2015). Die gängigen Therapeutika ermöglichen lediglich eine Modulation der Anfälle und nicht des zugrundeliegenden epileptogenen Netzwerks. Zudem leidet eine große Anzahl an Patienten unter wiederkehrenden epileptischen Anfällen, die nicht medikamentös kontrolliert werden können (PACKER et al. 2014). Deswegen besteht in der Epilepsieforschung weiterhin ein hoher Bedarf an Tiermodellen. Deren Einsatz trägt maßgeblich zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden pathophysiologischen der Epileptogenese bei. Basierend auf diesen Mechanismen können neue Zielstrukturen für Antiepileptika identifiziert werden (ROGAWSKI 2006; LÖSCHER 2016). Das Amygdala-Kindling-Modell stellt ein Epilepsiemodell mit hoher prädiktiver Validität dar, das in der Epilepsieforschung häufig verwendet wird (KANDRATAVICIUS et al. 2014; LÖSCHER 2017). Des Weiteren treten epileptische Anfälle im Rahmen von Tiermodellen anderer neurologischer Erkrankungen sowie toxikologischer Studien häufig als Nebeneffekt auf (WOLFENSOHN et al. 2013). Epileptische Anfälle sowie versuchsbedingte Eingriffe, wie zum Beispiel eine Elektrodenimplantation, stellen potenziell belastende Ereignisse dar, die im Rahmen rechtlicher Vorgaben (RL 2010/63/EU, Tierschutzversuchstierverordnung) eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung erfordern (LIDSTER et al. 2016). Diese Belastungseinschätzung trägt zu der ethischen Vertretbarkeit der Tierversuche sowie zu einer Verbesserung der Datenqualität bei. Eine Belastung der Tiere kann in Epilepsiemodellen durch unterschiedliche Aspekte bedingt sein (WOLFENSOHN et al. 2013). Dabei konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden, inwiefern die für die Anfallsinduktion benötigten operativen Eingriffe (Elektrodenimplantation) sowie die Anfälle selbst und die sich daraus ergebenden psychiatrischen Komorbiditäten zu einer Belastung der Tiere beitragen (LIDSTER et al. 2016). In der vorliegenden Studie wurde daher eine komplexe Analyse der belastungsassoziierten Veränderungen bei Ratten im Amygdala-Kindling-Modell durchgeführt, um geeignete Parameter für eine modell- und speziesspezifische Belastungseinschätzung der verwendeten Tiere auszuwählen. Die Korrelationsmatrixanalyse und die PCA bieten dabei die Möglichkeit einer Auswahl von relevanten Parametern. Um den direkten Einfluss der Stärke und Dauer der induzierten Anfälle sowie aller damit verknüpften Prozeduren darzustellen, wurden die Untersuchungen während verschiedener Phasen des Kindling-Prozesses durchgeführt.

## 1. Belastungseinschätzung der Elektrodenimplantation

Eine separate Belastungseinschätzung der Elektrodenimplantation und der versuchsbedingten Prozeduren wurde durch den Vergleich zwischen der naiven Kontrollgruppe und der Sham-Gruppe ermöglicht. Die versuchsbedingten Prozeduren bestanden in der vorliegenden Studie aus dem, mit dem Amygdala-Kindling-Modell verknüpften, *Handling* der Tiere. Die Beurteilung einer durch Elektrodenimplantation verursachten Belastung ist nicht nur für die Epilepsiemodelle relevant, sondern kann zusätzlich auf andere Modelle neurologischer Erkrankungen übertragen werden. Zudem ist eine Elektrodenimplantation für die Untersuchung der Anfallstendenz neuer pharmakologischer Substanzen im Rahmen von EEG-Untersuchungen notwendig (DRINKENBURG et al. 2015). Die Belastungseinschätzung kann demnach als evidente Basis für eine Vielzahl wissenschaftlicher Forschungsbereiche angesehen werden. Vergleichbare Elektrodenimplantationen werden bei Humanpatienten im Rahmen der tiefen Hirnstimulation als alternative Behandlungsmethode bei verschiedenen neurologischen Erkrankungen durchgeführt und in der Regel von den Patienten gut akzeptiert (ALESCH u. KAISER 2011; WELLMER et al. 2012).

Für die Belastungseinschätzung der Elektrodenimplantation wurden in der vorliegenden Studie Verhaltensuntersuchungen durchgeführt, die eine Basis zur Detektion neuropsychiatrischer Komorbiditäten im Amygdala-Kindling-Modell lieferten. Dazu wurde zunächst das Nestbauverhalten der Tiere, die Nestverschmutzung und die Zeit bis zur ersten Interaktion mit dem Nestmaterial untersucht. Hierfür wurde das Nestmaterial des Züchters verwendet, das die Tiere schon seit ihrer Geburt kannten. Dies trägt bei Ratten zu einem verbesserten spontanen Nestbauverhalten bei, da es sich bei Ratten im Gegensatz zu dem Nestbauverhalten bei Mäusen um ein erlerntes Verhalten handelt (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Speziesspezifische Verhaltensweisen, wie das Nestbauverhalten, wurden in vorherigen Studien bereits zur Untersuchung des Wohlbefindens von Labornagern genutzt (GASKILL et al. 2013; JIRKOF et al. 2013a). Sowohl die Tiere der naiven Kontrollgruppe als auch der Sham-Gruppe wiesen in der vorliegenden Untersuchung gut konstruierte Nester auf. Die Tiere verarbeiteten das angebotene Nestmaterial unmittelbar nach der Elektrodenimplantation auf vergleichbare Weise wie in der Woche vor der Operation und wiesen keinen Unterschied zu der naiven Kontrollgruppe auf. Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass postoperative Schmerzzustände mit einer Reduktion der Nestkomplexität einhergehen, die durch die Verabreichung effektiver Analgetika ausbleibt (JIRKOF et al. 2013a; NEGUS et al. 2015). Deshalb ist anzunehmen, dass in der vorliegenden Studie durch das im Rahmen der Elektrodenimplantation angewandte Analgesie-Protokoll eine effektive Analgesie erreicht wurde. Dafür sprechen zudem die fehlenden Anzeichen von Schmerzzuständen, welche mit Hilfe des Grimace-



Scales sowie des Irwin-Scores erfasst wurden. Auch während der chronischen Phase der Elektrodenimplantation (drei und fünf Wochen nach Elektrodenimplantation) zeigten sich hinsichtlich des Nestbauverhaltens keine signifikanten Unterschiede zwischen der naiven Kontrollgruppe und Sham-Gruppe. Der Verschmutzungsgrad der Nester und die Zeit bis zur ersten Interaktion mit dem Nestmaterial wiesen während der chronischen Phase der Elektrodenimplantation ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zu der naiven Kontrollgruppe auf.

Weiterhin konnte durch die Untersuchung des Grabverhaltens keine Beeinträchtigung der Tiere durch die Elektrodenimplantation nachgewiesen werden. Da akute Schmerzzustände mit einer Reduktion des Grabverhaltens einhergehen (JIRKOF et al. 2010; RUTTEN et al. 2014b), kann somit angenommen werden, dass die Elektrodenimplantation keine derartige Belastung für die Tiere darstellte.

Die Untersuchung der sozialen Interaktion der Tiere ergab jedoch, dass die Tiere der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe signifikant mehr Zeit in aktiver sozialer Interaktion verbrachten. Diese Veränderung konnte sowohl drei als auch fünf Wochen nach der Implantation beobachtet werden. Es könnte sich hierbei um eine Auswirkung der Elektrodenimplantation als nicht-sozialer Stressor handeln. Demnach könnte die Elektrodenimplantation zu einer erhöhten sozialen Interaktion im Rahmen des *social buffering* (enges Gruppieren) geführt haben. Durch dieses Verhalten fühlen sich die Tiere sicherer und weniger gestresst (KIKUSUI et al. 2006). Nach einer erneuten Auswertung der Videoanalyse wurde allerdings deutlich, dass sich die Interaktion der Tiere hauptsächlich auf das Implantat beschränkte und keine Anzeichen für eine enge Gruppierung vorlagen. Das Interesse der Ratten für das Implantat ihres Interaktionspartners muss deshalb bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Es ist zu vermuten, dass die signifikant erhöhte Interaktionszeit der Tiere der Sham-Gruppe durch die Neugierde der Tiere gegenüber dem Implantat ihres Gegenübers bedingt war. Dies könnte zu einer Verzerrung der Ergebnisse geführt haben. Die soziale Interaktion implantierter Tiere muss somit unter diesen Vorbehalten interpretiert werden. In zukünftigen Studien könnte eine andere Variante des Social-Interaction-Tests gewählt werden, bei der die Tiere nicht in direktem Kontakt miteinander stehen.

Ein Einfluss der Elektrodenimplantation auf das angstassoziierte Verhalten der Tiere konnte fünf Wochen nach der Elektrodenimplantation beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine signifikant reduzierte Aufenthaltsdauer der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe im äußeren Drittel der offenen Arme des Elevated-Plus-Maze. Es ist bekannt, dass chronischer Stress angstassoziiertes Verhalten bei Labornagern hervorrufen kann (CAMPOS et al. 2013). Daher ist es möglich, dass eine chronische Elektrodenimplantation mit einer milden Belastung für die Versuchstiere einhergeht. Vorherige Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass erhöhte Glucocorticoid-

Konzentrationen aufgrund nicht-sozialer Stressoren zu einem erhöhten Angstverhalten bei Ratten führten (WALKER et al. 2017). Ein erhöhtes Stresslevel könnte demnach zu erhöhten Corticosteron-Konzentrationen geführt haben, die wiederum zu einem angstassoziierten Verhalten beitragen. Allerdings konnte weder in den Haar-, Kot- oder Serumproben der Tiere ein Anstieg der Corticosteron-Konzentrationen nachgewiesen werden. Drei Wochen nach der Elektrodenimplantation konnte bei den Tieren der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe sogar eine signifikante Reduktion der Serum-Corticosteron-Konzentrationen nachgewiesen werden. Eine weitere Erklärung für die Auswirkung der Elektrodenimplantation auf das angstassoziierte Verhalten der Ratten könnte eine mechanische Beeinträchtigung der Amygdala darstellen. Durch eine Läsion der Amygdala kann der positive Feedback-Mechanismus auf die HPA-Achse außer Kraft gesetzt werden, wodurch herabgesetzte Corticosteron-Konzentrationen auftreten können (TRIPATHI et al. 2017). Somit fehlt die Möglichkeit einer Anpassung des Organismus an Stresssituationen, was sich unter Umständen in einem gesteigerten angstassoziierten Verhalten manifestieren kann. TRIPATHI et al. (2017) setzten eine Inaktivierung der basolateralen Amygdala aus diesem Grund ein, um der überschießenden Corticosteron-Produktion und der daraus resultierenden Resistenz der Glucocorticoid-Rezeptoren bei chronischem Stress entgegenzuwirken. Da sich anhand keines weiteren Parameters des Elevated-Plus-Maze und der Black-and-White-Box angstassoziiertes Verhalten nachweisen ließ, konnten die festgestellten Veränderungen als gering eingestuft werden. Auch die Ergebnisse des Saccharin-Präferenz-Tests lieferten keine Hinweise auf ein anhedonieassoziiertes Verhalten bei den Tieren der Sham-Gruppe. Ein stress-induziertes depressionsassoziiertes Verhalten ist zudem aufgrund der unveränderten beziehungsweise reduzierten Corticosteron-Werte unwahrscheinlich. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass weitere Faktoren, wie zum Beispiel eine beeinträchtigte Erregungsleitung im Serotoninsystem, eine Rolle bei der Entstehung von Depressionen spielen und Anhedonie nur eines von mehreren depressionsassoziierten Symptomen darstellt (MAHAR et al. 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit und der durchgeführten Literaturrecherche ergaben sich jedoch keine Anhaltspunkte für das vermehrte Auftreten von depressionsassoziiertem Verhalten nach einer Elektrodenimplantation. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei den Tieren keine derartigen Veränderungen vorlagen. Überdies indizieren die Analysen der biochemischen Parameter, dass keine chronische Belastung der elektrodenimplantierten Tiere vorlag. Erniedrigte BDNF-Konzentrationen wurden bereits in Zusammenhang mit chronischem Stress beschrieben (DEPPERMAN et al. 2014; BECKER et al. 2015). Die unveränderten BDNF-Werte der Tiere der Sham-Gruppe nach der Implantation lassen darauf schließen, dass bei den Tieren während der postoperativen Phase kein anhaltender Distress vorlag. Auch die unveränderten Konzentrationen an Oxytocin und Corticosteron sprechen daher

im Rahmen der vorliegenden Studie gegen eine Stresseinwirkung, die das Gleichgewicht des Hormonhaushalts der Tiere beeinflusste. Da die Serumproben nur einmalig am Ende der Untersuchungen entnommen wurden und zu diesem Zeitpunkt keine Veränderungen vorlagen, ist davon auszugehen, dass die Verhaltensparameter für die Detektion von Stress im Rahmen der Elektrodenimplantation sensitiver als die biochemischen Parameter waren. Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss beachtet werden, dass sich die Sham-Gruppe zwar einerseits in den meisten Parametern nicht von den naiven Kontrolltieren unterschieden, aber andererseits auch keine signifikanten Unterschiede zu den gekindelten Tieren auftraten. Dies bedeutet, dass die Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Gruppe bei der Betrachtung einzelner Parameter zwar in den meisten Fällen keine Hinweise auf eine erhöhte Belastung aufwies, diese aber trotzdem nicht signifikant niedriger war als die der gekindelten Tiere.

In der PCA konnte nachfolgend ein signifikanter Unterschied zwischen der naiven Kontrollgruppe und der Sham-Gruppe anhand der ersten Hauptkomponente (PC 1) nachgewiesen werden. Dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte allein auf Verhaltensparameter zurückgeführt werden, wohingegen die biochemischen Parameter nicht zu einer Differenzierung der Versuchsgruppen beitrugen. Durch die PCA konnte gezeigt werden, dass vor allem das Elevated-Plus-Maze und die Nestverschmutzung wichtige Parameter darstellen, die für eine Belastungseinschätzung der Elektrodenimplantation herangezogen werden können.

Anhand der Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass die Sham-Gruppe eine geringe Belastung im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe aufwies.

Bei der Untersuchung der Aktivität zeigte sich eine Hyperaktivität der Sham-Tiere 15 bis 18 Tage nach der Elektrodenimplantation im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe. Eine durch die Elektrodenimplantation hervorgerufene Hyperaktivität könnte auf Läsionen im Bereich der Amygdala zurückzuführen sein. Vorherige Studien zeigten bereits widersprüchliche Effekte von Amygdala-Läsionen auf die Aktivität von Versuchstieren. In diesen Studien kam es bei Läsionen der medialen Amygdala 30 Minuten nach der Operation zu einem Anstieg der Aktivität, wohingegen zwölf Stunden nach der Operation eine Reduktion der Aktivität beobachtet wurde (KORCZYNSKI u. FONBERG 1979). Postnatale Läsionen der Amygdala bei Ratten führten im späteren Leben der Tiere zu gesteigerter Aktivität (DIERGAARDE et al. 2004). Eine Hyperaktivität konnte in der vorliegenden Dissertation nur 15 bis 18 Tage nach der Elektrodenimplantation festgestellt werden. Falls es sich bei der beobachteten Hyperaktivität um einen Effekt der Lokalisation der Elektrode im Gehirn der Tiere handelte, ist daher zu vermuten, dass dieser Effekt transient war. Jedoch sollte in weiterführenden Studien überprüft werden, ob durch die Elektrodenimplantation möglicherweise eine Hypoaktivität der Tiere in der frühen postoperativen Phase bedingt wird.

Weiterhin verursachte die Elektrodenimplantation zu keinem Zeitpunkt Veränderungen der Herzfrequenz und der HRV. Da ein erhöhtes Stressniveau in der Regel mit einer erhöhten Herzfrequenz und einer erniedrigten HRV einhergeht (THAYER u. STERNBERG 2006; LIEW et al. 2016), ist hinsichtlich der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Elektrodenimplantation von keiner erhöhten Belastung für die Tiere auszugehen.

Zusammenfassend ließen sich Auswirkungen der Elektrodenimplantation und des versuchsbedingten *Handlings* auf das Sozialverhalten, das angst-assoziierte Verhalten und die Aktivität der Tiere feststellen. Die Erhöhung der aktiven sozialen Interaktion kann wahrscheinlich auf das Interesse der Tiere am Implantat ihres Interaktionspartners zurückgeführt werden. Das geringgradige angst-assoziierte Verhalten könnte einen Hinweis auf einen Einfluss der Elektrodenimplantation auf das Wohlbefinden der Tiere darstellen. Auch die PCA wies auf einen Effekt der Elektrodenimplantation hin. Da jedoch alle weiteren Parameter keine Anzeichen für eine Belastung der elektrodenimplantierten Tiere aufwiesen, kann die Belastung der Elektrodenimplantation als geringgradig eingestuft werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass eine Vielzahl an Faktoren das Wohlbefinden der Tiere beeinträchtigen können und diese Belastungseinschätzung lediglich als Basis für eine modell-, labor- und fallspezifische Beurteilung der Belastung zu werten ist.

## 2. Belastungseinschätzung der wiederholten Anfälle

Eine Einschätzung der Belastung des Amygdala-Kindling-Modells erfolgte durch den Vergleich der gekindelten Tiere mit der naiven Kontrollgruppe. Hierbei musste berücksichtigt werden, dass verschiedene Faktoren zu einer Belastung der Tiere beigetragen haben könnten. Die gekindelten Tiere durchliefen alle versuchsbedingten Prozeduren und durchlebten zusätzlich wiederholte Stimulationen mit daraus resultierenden Anfällen, die in Dauer und Schwere zunahmen. Ein Vergleich der Sham-Gruppe mit den gekindelten Tieren ermöglichte eine Einschätzung der durch die wiederholten Anfälle bedingten Belastung. Die vorliegende Untersuchung ermöglicht somit einerseits eine Aussage über die durch das Amygdala-Kindling-Modell induzierte Belastung, sowie andererseits über die durch die wiederholten Anfälle verursachte Belastung.

Studien bei Epilepsiepatienten zeigen ein häufiges Auftreten von neuropsychiatrischen Komorbiditäten, die durch Veränderungen von gemeinsamen Netzwerkstrukturen zustande kommen könnten (POHLMANN-EDEN et al. 2015). Da das Amygdala-Kindling-Modell nur teilweise als Modell der humanen Epileptogenese angesehen wird (LÖSCHER 2017) und bisher nur einzelne Aspekte der assoziierten Verhaltenskomorbiditäten analysiert wurden (THOMAS u. GUNTON 2011; MEDEL-MATUS et al. 2017), sind die komplexen Auswirkungen der Netzwerkalterationen auf Verhaltensweisen sowie biochemische und autonome Funktionen im Amygdala-Kindling-Modell nicht bekannt. Die umfassende Analyse der Veränderungen von Verhaltensweisen sowie biochemischer und pathophysiologischer Parameter ermöglicht Einblicke in die modellspezifische Belastung. Der Ursprung der psychiatrischen Komorbiditäten könnte einerseits auf epileptiforme Veränderungen der Gehirnstrukturen oder andererseits auf stressassoziierte homöostatische Veränderungen zurückzuführen sein. Bei der Bewertung der Ergebnisse muss davon ausgegangen werden, dass die psychiatrischen Komorbiditäten in jedem Fall eine Belastung für die Tiere darstellen. Dies kann aus der Belastung durch vergleichbare Komorbiditäten bei Human- und Veterinärpatienten geschlossen werden, die hauptsächlich für die reduzierte Lebensqualität der Patienten verantwortlich sind (BOYLAN et al. 2004; PACKER u. VOLK 2015; POHLMANN-EDEN et al. 2015). Das Auftreten psychiatrischer Komorbiditäten in Tiermodellen bedarf deshalb eingehender Betrachtung.

Das Nestbauverhalten stellt ein natürliches Verhalten von Nagern dar, das bei Stress reduziert sein kann und zu den Beeinträchtigungen der Aktivitäten des täglichen Lebens bei Epilepsiepatienten in Bezug gesetzt werden kann (DEACON 2012). Diese Aktivitäten können sowohl bei Humanpatienten als auch in Tiermodellen zu einer Einschätzung der krankheitsbedingten, neurokognitiven Defizite herangezogen werden (DEACON 2012; HELMSTAEDTER et al. 2013). In einem genetischen Mausmodell für frühkindliche

Epilepsie konnten bereits Defizite des Nestbauverhaltens beobachtet werden (GHEYARA et al. 2014). Die vorliegenden Analysen zeigten ebenfalls ein Defizit des Nestbauverhaltens der gekindelten Tiere während der Phase der generalisierten Anfälle. Es kann ausgeschlossen werden, dass die Reduktion des Nestbauverhaltens durch die tägliche Entfernung der Tiere aus ihrem Heimkäfig im Rahmen der Versuchsprozedur zustande kam, da dies auch in der Sham-Gruppe ersichtlich gewesen wäre. Stattdessen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Nestkomplexität der Kindling-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe. Während der Phase der fokalen Anfälle konnten keine Auswirkungen auf das Nestbauverhalten festgestellt werden. Das reduzierte Nestbauverhalten kommt demnach wahrscheinlich durch den chronischen Stress der wiederholten Induktion der Anfälle beziehungsweise durch kognitive Defizite aufgrund veränderter Netzwerkstrukturen zustande. Die Veränderungen könnten demnach mit der Anfallslänge und -dauer korreliert sein. Die gekindelten Tiere wiesen während der Phase der generalisierten Anfälle weiterhin einen erhöhten Verschmutzungsgrad der Nester im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe auf. Die Tiere sind somit während der Phase der generalisierten Anfälle nicht in der Lage, die Sauberkeit ihrer Nester zu gewährleisten. Der Verschmutzungsgrad könnte somit einen geeigneten Parameter zur Belastungseinschätzung darstellen. Kognitive Defizite könnten die Ursache für die reduzierte Fähigkeit zur Ausübung dieser natürlichen Verhaltensweise darstellen. Die Konstruktion und Aufrechterhaltung eines sauberen Nests erfordert sowohl Motivation als auch kognitive Fähigkeiten der Tiere. Dies konnte bereits in Alzheimer- und Downsyndrom-Mausmodellen gezeigt werden (FILALI u. LALONDE 2009; HELLER et al. 2014). Epileptische Anfälle und chronischer Stress können die kognitiven Fähigkeiten der Tiere beeinträchtigen (FOURNIER et al. 2013; NANINCK et al. 2015) und zu einer Reduktion der Nestqualität führen. Auch könnte eine Erschöpfung der Tiere durch das wiederholte Anfallsgeschehen eine reduzierte Nestqualität bedingen. Da ein intaktes Nestbauverhalten das Wohlbefinden von Labortieren widerspiegelt (GASKILL et al. 2013; JIRKOF 2015), könnten die wiederholten Anfälle auch zu einem verminderten Wohlbefinden der Versuchstiere geführt und auf diese Weise eine verminderte Nestqualität bedingt haben. Daher sollten weitergehende Untersuchungen überprüfen, auf welche Ursache die reduzierte Nestqualität zurückzuführen ist.

In früheren Untersuchungen konnte die Zeit bis zum Beginn des Nestbauverhaltens als geeigneter Parameter zur Belastungseinschätzung bei Mäusen verwendet werden (ROCK et al. 2014; HÄGER et al. 2015). In der vorliegenden Untersuchung konnte der modifizierte Test zur Untersuchung der ersten Interaktion mit dem Nestmaterial bei Ratten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Gruppen aufzeigen. Da die anderen Parameter des Heimkäfigverhaltens jedoch Veränderungen aufwiesen, ist zu vermuten, dass dieser Parameter keine valide Methode zur Belastungseinschätzung im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells bei Ratten darstellt.

Des Weiteren zeigten die Tiere der Kindling-Gruppe keine Beeinträchtigung des Grabverhaltens. Die tägliche Stimulation scheint somit wahrscheinlich keine akuten Schmerzzustände hervorzurufen. Durch epileptische Anfälle können muskuläre Mikroläsionen („Muskelkater“) hervorgerufen werden (SHORVON 2010). Ein solcher Zustand würde unter Umständen auch mit einer Reduktion des Grabverhaltens einhergehen. Muskuläre Mikroläsionen können zudem mit einer Erhöhung der CK-Konzentrationen einhergehen. Da bei der Kindling-Gruppe weder ein verändertes Grabverhalten noch eine erhöhte CK-Konzentration nachgewiesen werden konnte, sind Mikroläsionen als beeinträchtigender Faktor sehr unwahrscheinlich.

Für eine Einschätzung der im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells auftretenden Belastung erwiesen sich das Nestbauverhalten und der Nestverschmutzungsgrad demnach als sensitivere Parameter als die Zeit bis zur ersten Interaktion mit dem Nestmaterial und das Grabverhalten. Nestbauverhalten und Nestverschmutzung können somit zu der Entwicklung von Beurteilungsschemata beitragen.

Aus Studien bei Epilepsiepatienten ist ein herabgesetztes Sozialverhalten der betroffenen Patienten bekannt (POHLMANN-EDEN et al. 2015). Eine soziale Dysfunktion könnte durch Neuronenverluste während der Epileptogenese bedingt sein, die zu kognitiven Defiziten und reduzierter Informationsverarbeitung führen (SZEMERE u. JOKEIT 2015). In der vorliegenden Untersuchung wurde die soziale Interaktion der Kindling-Gruppe aufgrund der implantatassoziierten Verzerrung der Ergebnisse lediglich mit der Sham-Gruppe verglichen. Hier zeigte sich während der Phase der fokalen Anfälle eine signifikant erniedrigte Interaktion der Kindling-Gruppe. Während der Phase der generalisierten Anfälle konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zu der Sham-Gruppe festgestellt werden. Dies könnte implizieren, dass es sich hierbei um eine, durch die frühe Epileptogenese bedingte soziale Dysfunktion der Tiere handelt. Eine stressassoziierte Beeinträchtigung des Sozialverhaltens würde sich als Erhöhung der sozialen Interaktion manifestieren, da es sich bei der Kindling-Prozedur um einen Stressor nicht-sozialer Art handelte. Allerdings stellt der Social-Interaction-Test aufgrund der Verzerrung der Ergebnisse durch die Implantate einen instabilen Parameter dar, der einer weitergehenden Evaluation bedarf.

In der Black-and-White-Box und im Elevated-Plus-Maze zeigte sich angstassoziiertes Verhalten der gekindelten Ratten als reduzierte Aufenthaltsdauer in den aversiven Bereichen im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe. Eine elektrische Stimulation der Amygdala kann zu angstassoziiertem Verhalten bei Labortieren führen, da die Amygdala eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Angst spielt (THOMAS u. GUNTON 2011). Direkte Verbindungen der Amygdala mit Bereichen des Hirnstammes ermöglichen eine Antwort des autonomen Nervensystems auf angstassoziierte Reize (THOMAS u. GUNTON 2011). PAPE u. PARE (2010) stellten fest, dass unter dem Einfluss von Angst eine erhöhte synaptische Plastizität in der Amygdala entsteht und auf diese Weise angstassoziierte

Reaktionen begünstigt werden können. Die Effizienz der afferenten Neuronen der Amygdala kann durch das Phänomen der lang andauernden Verstärkung der Synapsen (*long-term potentiation*) erhöht werden (PAPE u. PARE 2010). Es ist bekannt, dass die wiederholte Stimulation der Amygdala die morphologische und funktionale neuronale Plastizität fördern kann (HELFER et al. 1996; HARTY et al. 2013). Bei Patienten, die unter chronischem Stress und Angststörungen leiden, kann die Amygdala aufgrund neuroplastizitärer Vorgänge vergrößert sein (DEPPERMAN et al. 2014). Eine signifikante Vergrößerung der Amygdala konnte ebenfalls in Subgruppen von Patienten mit Temporallappenepilepsie in Kombination mit psychiatrischen Komorbiditäten festgestellt werden (TEBARTZ VAN ELST et al. 2002; COAN et al. 2013), wohingegen eine alleinige Temporallappenepilepsie in der Regel mit einer Zerstörung der Amygdala einhergeht (ARONIADOU-ANDERJASKA et al. 2008). Im Falle dieser Subgruppen von Patienten könnte ein Neuronenuntergang im Rahmen der Epilepsieerkrankung neuroinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt haben. Eine Regeneration durch neuroplastizitäre Vorgänge könnte anschließend zu einer Hypertrophie geführt haben. Die Hypertrophie der Amygdala ist wiederum mit erhöhten psychiatrischen Komorbiditäten assoziiert, die bei Epilepsiepatienten doppelt so häufig auftreten wie bei Menschen ohne Epilepsie (TELLEZ-ZENTENO et al. 2007). Die neuronale Plastizität wird unter anderem durch BDNF und über den Neurotransmitter Glutamat vermittelt. Eine Freisetzung von Glutamat in der Amygdala durch eine elektrische Stimulation könnte die synaptische Plastizität fördern. LUNA-MUNGUIA et al. (2011) konnten bereits erhöhte interiktale Glutamat-Konzentrationen bei Ratten, die das Amygdala-Kindling-Modell durchlaufen haben, feststellen. HARTY et al. (2013) konnten zeigen, dass das Amygdala-Kindling die relative Erregbarkeit der Neuronen durch Plastizität der Axonsegmente steigern kann und dies die pathologischen Prozesse der Epileptogenese fördert. Demnach könnte das angstassoziierte Verhalten im Rahmen von Epilepsieerkrankungen sowie des Amygdala-Kindling-Modells durch eine Steigerung der neuronalen Plastizität mit Zunahme exzitatorischer Neurone zustande kommen. Diese sind durch Projektionsbahnen mit Zentren verbunden, die eine autonome angstassoziierte Reaktion auslösen können. In vorherigen Studien konnten sowohl angstassoziierte als auch anxiolytische Auswirkungen des Kindlings festgestellt werden (ADAMEC et al. 2005). Es existieren Hinweise darauf, dass diese Divergenz der Verhaltensänderungen durch die Lokalisation der Stimulationselektrode bedingt ist (ADAMEC et al. 2005; THOMAS u. GUNTON 2011). In Einklang mit vorherigen Studien von ADAMEC et al. (2005) steht, dass die Stimulation der rechten basolateralen Amygdala in der vorliegenden Studie angstassoziiertes Verhalten auslöste. Das Amygdala-Kindling-Modell mit Stimulation der rechten basolateralen Amygdala reflektiert auf diese Weise die Komorbiditäten der Epilepsiepatienten. Dies trägt zu der Validität dieses Modells bei. Andere Faktoren, wie zum Beispiel das Angstniveau



des einzelnen Tiers vor der Stimulation, müssen allerdings zusätzlich berücksichtigt werden (ADAMEC et al. 2005). Da bekannt ist, dass psychiatrische Komorbiditäten die Lebensqualität von Epilepsiepatienten negativ beeinträchtigen (KANNER 2011, 2016), muss davon ausgegangen werden, dass das im Amygdala-Kindling-Modell beobachtete gesteigerte angstassoziierte Verhalten der Kindling-Gruppe eine Belastung für die Tiere darstellte.

Der Saccharin-Präferenz-Test hingegen konnte in der vorliegenden Arbeit kein anhedonieassoziiertes Verhalten als Folge des Amygdala-Kindling-Modells mit fokalen und generalisierten Anfällen aufzeigen. In vorherigen Studien wurden im Rahmen des *Rapid*-Kindlings und chemischer Status-Epilepticus-Modelle in diesem Verhaltenstest eine Reduktion des Saccharin-Konsums beobachtet (MAZARATI et al. 2007; KLEIN et al. 2015; CHEN et al. 2016), wohingegen ein bis drei Mal tägliche Stimulationen den Konsum nicht reduzierten (ADAMEC et al. 2004; MEDEL-MATUS et al. 2017). Es wird vermutet, dass anhedonieassoziiertes Verhalten in Status-Epilepticus-Modellen durch die schwere Neurodegeneration vieler Gehirnareale, wie zum Beispiel des Temporallappens und der Amygdala, verursacht wird (KLEIN et al. 2015; LÖSCHER 2017). Die vorliegende Studie konnte bestätigen, dass Amygdala-Kindling keine Reduktion des Saccharin-Konsums bei Ratten bedingt. Es ist daher möglich, dass durch dieses Modell keine Veränderungen von Gehirnarealen induziert werden, die in die Ausprägung von anhedonieassoziiertem Verhalten involviert sind. Das in dieser Untersuchung verwendete Stimulationsprotokoll könnte demnach zu morphologischen Änderungen der Gehirnstruktur geführt haben, die zwar in der Lage waren, angstassoziiertes Verhalten hervorzurufen, nicht aber anhedonieassoziiertes Verhalten. Weitere Einflussfaktoren, wie das Alter und das Geschlecht der Tiere (PIJLMAN et al. 2003; BAI et al. 2014), sollten in zukünftigen Studien überprüft werden.

Es kann angenommen werden, dass die beobachteten Veränderungen nicht transient waren und auch nach Abschluss der Kindling-Prozedur bestehen blieben. Diese Annahme basiert auf den Ergebnissen von HELFER et al. (1996), die zeigten, dass ähnliche neuropsychiatrische Komorbiditäten im Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten auch sieben bis zehn Tage nach dem letzten induzierten Anfall nachzuweisen sind. Im Elevated-Plus-Maze konnten HELFER et al. (1996) in Übereinstimmung mit der vorliegenden Studie angstassoziiertes Verhalten und keine Änderungen im Sucrose-Präferenz-Test und im Open-Field nachweisen. Diese Veränderungen sprechen für eine Beteiligung des epileptogenen Netzwerks an der Entstehung der psychiatrischen Komorbiditäten. Zusammenfassend kann das angstassoziierte Verhalten demnach als geeigneter Parameter für die Belastungseinschätzung des Amygdala-Kindling-Modells in Betracht gezogen werden. Weitere Untersuchungen müssen die Validität dieses Parameters allerdings bestätigen.

Die Beeinflussung der Homöostase eines Organismus kann Änderungen unterschiedlicher biochemischer und physiologischer Parameter hervorrufen. Veränderungen der Konzentrationen von Corticosteron, Oxytocin und BDNF wurden bereits im Zusammenhang mit Stress beschrieben (LEPSCHY et al. 2010; BECKER et al. 2015; SCORRANO et al. 2015; MINHAS et al. 2016). Die nicht-invasive Entnahme von Kot- und Haarproben zur Messung von Corticosteron besitzt den Vorteil, dass die Ergebnisse nicht durch den im Rahmen der Blutentnahme verursachten Stress verfälscht werden. Die Ergebnisse der Haarproben spiegeln die kumulativen Auswirkungen der gesamten Versuchsprozedur auf die Corticosteron-Werte wider, wohingegen Kot- und Serum-Analysen nur eine Aussage über einen kurzen Zeitraum erlauben. Durch keine dieser Untersuchungsmethoden konnte ein Anstieg der Corticosteron-Konzentration nachgewiesen werden. Da das Gewicht der Nebennieren keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufwies, kann eine funktionelle Hypertrophie der Nebennieren ausgeschlossen werden. Eine funktionelle Hypertrophie kann durch eine dauerhaft erhöhte Corticosteron-Produktion im Rahmen einer Exposition gegenüber chronischem Stress zustande kommen. Auf Grund des fehlenden Anstiegs der Corticosteron-Konzentrationen und der unveränderten Nebennieren kann davon ausgegangen werden, dass die Tiere im Amygdala-Kindling-Modell nicht durch chronischen Stress belastet waren. Während der Phase der generalisierten Anfälle konnten bei den gekindelten Tieren signifikant erniedrigte Corticosteron-Werte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse einer Studie von DEUTSCH-FELDMAN et al. (2015) wiesen ebenfalls erniedrigte Corticosteron-Konzentrationen in Sprague Dawley Ratten nach wiederholtem *Handling* der Tiere auf. Demnach könnten die täglich durchgeführten Versuchsprozeduren zu einer Gewöhnung der Kindling-Tiere an zunächst stressassoziierte Prozeduren geführt haben. Weiterhin konnte der von MINHAS et al. (2016) beschriebene stressinduzierte Anstieg der Oxytocin-Konzentration nicht nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass die Ausschüttung von Oxytocin für die Steigerung der Sozialkontakte zur Stressreduktion nicht notwendig war. Erniedrigte BDNF-Konzentrationen können als Parameter für Distress herangezogen werden (MATSUOKA et al. 2015). Da weder während der Phase der fokalen Anfälle noch während der Phase der generalisierten Anfälle eine Veränderung der BDNF-Konzentration vorlag, ist nicht von einem Distress der Tiere auszugehen.

Bei der Analyse des Zyklusstands zeigte sich, dass sich jeweils die Hälfte der Tiere der naiven Kontrollgruppe im Östrus befand. Dahingegen befand sich jeweils nur ein Tier der Kindling- und Sham-Gruppe im Östrus. Die statistische Analyse zeigte allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Da sich chronischer Stress durch Änderungen der Hypophysen-Hypothalamus-Gonaden-Achse (GERAGHTY et al. 2013) auf die biochemischen Parameter und das Verhalten der Tiere auswirken kann, sollte dieser interessante Befund in weiteren Studien untersucht werden. Dafür müsste der Verlauf des

Zyklus über mehrere Tage analysiert werden. In dieser Untersuchung sollte zusätzlicher Stress durch die Entnahme einer Tupferprobe am wachen Tier vermieden werden.

Bei der Betrachtung Verhaltensanalysen und den biochemischen Parametern ergaben sich insbesondere Unterschiede in den Verhaltensparametern zwischen der naiven Kontrollgruppe und der Kindling-Gruppe. So konnte eine signifikante Beeinflussung von Nestbauverhalten, sozialer Interaktion und angstassoziertem Verhalten im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells festgestellt werden. Da der Social-Interaction-Test im Amygdala-Kindling-Modell keine valide Erfassung der Ergebnisse ermöglichte, kann er in diesem Modell nicht als Parameter für die Belastungseinschätzung empfohlen werden. Im Gegensatz dazu können angstassoziertes Verhalten und Nestbauverhalten geeignet sein, um die durch das Amygdala-Kindling-Modell verursachte Belastung darzustellen.

Diese These sollte mit Hilfe der Korrelationsmatrixanalyse weitergehend untersucht werden und Parameter ausgewählt werden, die sich für eine zukünftige evidenzbasierte Belastungseinschätzung eignen. Die Korrelationsmatrix soll eine Grundlage für die Auswahl geeigneter Parameter in der Routineüberwachung dienen. Es zeigte sich eine Korrelation der einzelnen Parameter des Elevated-Plus-Maze. Dies spricht für eine gute Validität des Tests. Weiterhin zeigte sich eine Korrelation zwischen angstassoziertem Verhalten und Heimkäfigverhalten. Dies deutet darauf hin, dass das Heimkäfigverhalten dazu geeignet ist, aufwendigere Untersuchungen, wie zum Beispiel das Elevated-Plus-Maze zu ersetzen. Vor allem der Nestverschmutzungsgrad zeigte sich als relevanter Parameter für die Belastungseinstufung des Amygdala-Kindling-Modells. Das Heimkäfigverhalten wird somit als Standardparameter für Anfallsmodelle empfohlen. Zur Übertragbarkeit der Ergebnisse auf andere Epilepsiemodelle und zur Präzisierung des Scoring-Systems sollten weitergehende Studien durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der PCA zeigten, dass die zehn wichtigsten Parameter mit dem größten Beitrag zur ersten Hauptkomponente aus den Verhaltensanalysen stammten. Es wurde eine Aufspaltung der Gruppen entlang der ersten Hauptkomponente ersichtlich. Es ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der naiven Kontrollgruppe und den beiden anderen Versuchsgruppen feststellen. Dies implizierte eine hauptsächliche Belastung der Tiere durch die Implantation der Elektrode und durch weiteres versuchsbedingtes *Handling*. Die wiederholten Anfälle führten demnach zu einer zusätzlichen geringgradigen Belastung, weshalb sich in den Einzelanalysen häufig signifikante Unterschiede zwischen der Kindling-Gruppe und der naiven Kontrollgruppe ergaben, wohingegen sich keine signifikanten Unterschiede zu der Sham-Gruppe zeigten. Die Parameter mit der stärksten Korrelation zu der ersten Hauptkomponente der PCA stammten aus dem Elevated-Plus-Maze und dem Heimkäfigverhalten. Mit Hilfe der Strukturierung durch Korrelationsmatrixanalyse und PCA konnten weitere Hinweise für die Effizienz des Elevated-Plus-Maze und des Heimkäfigverhaltens für eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung des Amygdala-

Kindling-Modells erhoben werden. Auf der Basis dieser Analysen kann das Amygdala-Kindling-Modell nachfolgend mit anderen Epilepsiemodellen verglichen werden.

Einen weiteren Fokus der vorliegenden Studie stellte die Untersuchung des Einflusses von wiederholten Anfällen auf das autonome Nervensystem dar. Änderungen des autonomen Nervensystems können sowohl eine akute Folge der Anfälle als auch ein chronischer Effekt des sich ausbildenden epileptogenen Netzwerks sein, und Auswirkungen auf den zirkadianen Rhythmus haben. QUIGG et al. (2001) konnten bereits eine Phasenverschiebung des zirkadianen Temperaturverlaufs bei Ratten im Amygdala-Kindling-Modell nachweisen. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weisen auf eine Störung der Ruhephase bei den Tieren mit generalisierten Anfällen hin. Die gekindelten Tiere zeigten im gesamten Tagesverlauf sowohl vor als auch nach der Induktion der Anfälle eine höhere Aktivität. Die Erhöhung der Aktivität kann demnach nicht allein auf die Störung der Schlafphase durch die versuchsbedingten Prozeduren des Kindlings zurückgeführt werden. Auch das Fehlen signifikanter Änderungen bei der Sham-Gruppe im Vergleich zu der naiven Kontrollgruppe spricht für eine anfallsbedingte Erhöhung der Aktivität. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs in der Kindling-Gruppe zeigte sich gegen Ende der Dunkelphase eine erhöhte Aktivität, die zu Beginn der Hellphase nicht entsprechend der anderen beiden Gruppen abfiel und während des Tagesverlaufs kontinuierlich auf einem höheren Niveau verblieb. Dies impliziert, dass die Tiere durch die täglich induzierten Anfälle in ihrer Schlafphase aktiver waren. Studien aus der Humanmedizin weisen in die gleiche Richtung. So wurden Schlafstörungen und Rhythmuschwankungen bei Patienten mit Epilepsien beschrieben, die in hohem Maße die Lebensqualität der Betroffenen beeinträchtigen (DE WEERD et al. 2004; UNTERBERGER et al. 2015). Möglicherweise war das Wohlbefinden der gekindelten Tiere ebenfalls durch eine Störung der Schlafphase beeinträchtigt. Psychiatrische Komorbiditäten wie Angst und Depressionen können bei Epilepsiepatienten einen Grund für die häufig mit Epilepsie einhergehenden Schlafstörungen darstellen (DE WEERD et al. 2004; VAN MILL et al. 2010). Epileptogene morphologische Veränderungen der Gehirnstrukturen können die neuronalen Signalwege des Nucleus suprachiasmaticus beeinflussen und auf diese Weise zu Anomalitäten des zirkadianen Rhythmus führen. Die funktionalen Anomalitäten könnten durch Zellverlust in Regionen des Hypothalamus, die Efferenzen des Nucleus suprachiasmaticus empfangen, ausgelöst werden (QUIGG 2000). Während der Phase der fokalen Anfälle konnten keine Auswirkungen auf die Aktivität der Tiere beobachtet werden. Die Anfallsdauer und -stärke sowie die entstandenen neuronalen Veränderungen könnten somit bei der Regulation des zirkadianen Rhythmus eine Rolle spielen.

Der zirkadiane Verlauf der Nestkomplexität zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die festgestellte Hyperaktivität der Tiere in der Hellphase führte weder zu

einer Zerstörung noch zu einem komplexeren Aufbau der Nester. Anhand des Nestbauverhaltens konnte demnach keine veränderte Rhythmik der speziespezifischen Verhaltensweisen der Tiere durch die Reduktion der Ruhezeit festgestellt werden.

In Analogie zu vorherigen Studien von PANSANI et al. (2011) und RUIZ-SALINAS et al. (2016) konnte in der vorliegenden Studie eine Erhöhung der Herzfrequenz und eine signifikante Erniedrigung des RR-Intervalls in der Schlafphase (Hellphase) als Effekt der wiederholten generalisierten Anfälle festgestellt werden. Die vorherigen Studien erfassten die Herzfrequenz jedoch nur in einem sehr kurzen Zeitraum (30 Sekunden) wohingegen in der vorliegenden Studie die Herzfrequenz innerhalb des Amygdala-Kindling-Modells zum ersten Mal durch eine kontinuierliche Aufzeichnung über mehrere Tage ermittelt wurde. Die Betrachtung des Kurvenverlaufs zeigte eine Erhöhung der Ruheherzfrequenz und gleichsam eine Erniedrigung des RR-Intervalls in der gesamten Hellphase. Bei Humanpatienten sind Alterationen der autonomen Funktionen in den inter-, post- und iktalen Phasen durch den Einfluss fokaler und generalisierter Anfälle beschrieben worden (LOTUFO et al. 2012; RAMADAN et al. 2013). Deshalb ist davon auszugehen, dass es sich bei der Veränderung der Ruheherzfrequenz um eine dauerhafte Beeinträchtigung der Tiere durch modifizierte Netzwerkstrukturen handelte. Die durch das epileptogene Netzwerk erhöhte Erregbarkeit des Gehirns könnte demnach eine erhöhte Herzfrequenz bedingen (RUIZ-SALINAS et al. 2016). Die bereits von LUNA-MUNGUIA et al. (2011) beschriebenen erhöhten interiktalen Glutamat-Konzentrationen könnten eine Erklärung für die erhöhte Herzfrequenz der gekindelten Tiere sein, da die Amygdala direkt in die autonome kardiovaskuläre Kontrolle eingebunden ist. Die bei Epilepsiepatienten beschriebene anfallsassoziierte Katecholamin-Ausschüttung könnte zu einer mittelfristigen Erhöhung der Herzfrequenz führen (RAMADAN et al. 2013).

BEERLING et al. (2011) beschrieben einen Anstieg der Aktivität und der Herzfrequenz bei Ratten in Korrelation mit erhöhten Corticosteron-Werten als kurzfristige Stressreaktion. Wird dieses Phänomen nur über eine kurze Zeit nach der Exposition gegenüber dem Stressor beobachtet, kann dies lediglich als eine metabolische Anpassung des Körpers verstanden werden. Da in der vorliegenden Studie eine kontinuierliche Erhöhung der Herzfrequenz in der Ruhephase vorlag, ist von einer dauerhaften Belastung der Tiere auszugehen. Dieses Ergebnis muss in Kombination mit den Ergebnissen der Aktivität betrachtet werden, da eine erhöhte körperliche Aktivität zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führt. Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die aufgrund der wiederholten Anfälle veränderten Netzwerkstrukturen sowohl eine Ursache für die erhöhte Aktivität der Tiere als auch für den damit korrelierten Anstieg der Herzfrequenz darstellen. Die genaue Analyse der veränderten Schaltkreise der autonomen Regulation durch den Kindling-Prozess muss allerdings in weiterführenden Untersuchungen evaluiert werden. Bei der Belastungseinschätzung des Amygdala-Kindling-Modells anhand der

telemetrischen Messdaten ist in Betracht zu ziehen, dass die HRV-Parameter zu keinem Zeitpunkt verändert waren. Diese erwiesen sich in vorherigen Studien als valide Parameter für die autonome Stressantwort (ARRAS et al. 2007; KORESH et al. 2016). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Lebensqualität der Tiere zwar durch eine verkürzte Ruhephase und eine Herzfrequenzerhöhung beeinträchtigt wurde, es aber nicht zu dauerhaften autonomen Verschiebungen kam. Autonome Beeinträchtigungen in Form von erniedrigten HRV-Parametern sind bei Epilepsiepatienten beschrieben (LOTUFO et al. 2012; BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Es besteht allerdings die Annahme, dass diese Verschiebungen erst bei einer fortgeschrittenen Epilepsieerkrankung entstehen (PERSSON et al. 2007). Es ist möglich, dass die Veränderungen der HRV-Parameter von dem jeweiligen Stimulationsprotokoll abhängig sind. In weiteren Untersuchungen sollte somit geklärt werden, ob eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz und -dauer zu einer Veränderung der HRV-Parameter führen.

Die Untersuchung der iktalen Auswirkung der Stimulation zeigte einen unmittelbaren Abfall der Herzfrequenz nach der Induktion des Anfalls durch den elektrischen Stimulus in der Amygdala. Diese iktale Bradykardie kann in direktem Zusammenhang mit der elektrischen Depolarisation der Neuronen der Amygdala stehen. Die Projektion der Neuronen der Amygdala in Kerngebiete des Vagus kann in einer parasympathische Reduktion der Herzfrequenz resultieren (BURHANS u. SCHREURS 2013). Es konnte bereits belegt werden, dass die durch das Kindling ausgelöste Bradykardie ebenfalls parasympathisch bedingt ist (PANSANI et al. 2011). Der Einfluss kardiogener Änderungen wird in Zusammenhang mit SUDEP diskutiert (SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Bei Patienten wurden bereits Tachy- und Bradykardien beschrieben (SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Der Kurvenverlauf der iktalen Herzfrequenz in der vorliegenden Untersuchung zeigte eine biphasische Bradykardie mit rapidem Abfall der Herzfrequenz zu Beginn, einer darauffolgenden Rückkehr zu Normwerten und einer anschließenden zweiten länger andauernden Bradykardie. Das Auftreten einer länger andauernden iktalen Bradykardie und daraus resultierende Asystolen könnten das Risiko eines Herzversagens mit plötzlichem Tod steigern. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben somit nicht nur Relevanz für eine Belastungseinschätzung des Amygdala-Kindling-Modells, sondern liefern auch wichtige Einblicke in die pathologischen Aspekte von SUDEP. Direkte Untersuchung der Mechanismen an Humanpatienten werden durch die Einnahme von Antiepileptika erschwert und können nur schwer als Grundlage herangezogen werden. Das Amygdala-Kindling-Modell kann somit geeignet sein, Mechanismen anfallsassoziierter Veränderungen der Herzfrequenz darzustellen und damit zu der Erforschung von SUDEP beizutragen. Die Validität des Amygdala-Kindling-Modells bezüglich SUDEP sollte daher in nachfolgenden Studien eingehend evaluiert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Erhöhungen der Aktivität und der Herzfrequenz sowie die Erniedrigung des RR-Intervalls als Konsequenz des veränderten zirkadianen Rhythmus betrachtet werden können. Die wiederholten Anfälle führten zu einer reduzierten Schlafperiode der Tiere während der Ruhephase. Eine reduzierte Lebensqualität durch Schlafstörungen bei Epilepsiepatienten deutet darauf hin, dass auch die Labortiere durch derartige Auswirkungen belastet sein könnten. Die unveränderten HRV-Parameter sprechen allerdings dafür, dass sich die autonomen Veränderungen auf die zirkadiane Rhythmik beschränkten und keine Beeinträchtigungen der sympathovagalen Balance verursachten. Die deutlichen iktalen Auswirkungen des Kindlings sind auf eine unmittelbare autonome Antwort auf die Stimulation der Amygdala zurückzuführen. Es wurde bereits eine Steigerung der autonomen Antwort in Form einer Bradykardie im Verlauf des Kindling-Prozesses nachgewiesen (PANSANI et al. 2011). Es ist möglich, dass eine Kombination aus Änderungen der Netzwerkstrukturen durch die wiederholte Stimulation sowie die Induktion von Hormonausschüttungen zu einer dauerhaften Störung der zirkadianen Rhythmik der Tiere führte.

### 3. Schlussfolgerung

Bei der Betrachtung aller vorliegenden Analysen zeigte sich ein Vorteil der Verhaltens- und Telemetrieanalysen gegenüber den biochemischen Parametern. Als Methoden für eine Belastungseinschätzung des Amygdala-Kindling-Modells sollten zukünftig vor allem das Heimkäfigverhalten, das angstassoziierte Verhalten und die Parameter der telemetrischen Messungen berücksichtigt werden. Die im Rahmen des Amygdala-Kindling-Modells auftretende Belastung kann anhand dieser Parameter sowohl auf die versuchsassoziierten Prozeduren als auch auf die wiederholt induzierten Anfälle zurückgeführt werden. Demnach kann die Belastung als kumulativer Effekt verstanden werden. Die wiederholt induzierten Anfälle könnten eine beginnende Ausbildung epileptogener Netzwerkstrukturen bedingt haben, die zu psychiatrischen Komorbiditäten in Form von angstassoziiertem Verhalten führten. Durch diese Komorbiditäten könnte eine Beeinflussung des Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere zustande gekommen sein. Eine zusätzliche Belastung der Versuchstiere wird in diesem Tiermodell durch die bei Human- und Veterinärpatienten beschriebenen Auswirkungen neuropsychiatrischer Komorbiditäten und Schlafstörungen auf die Lebensqualität impliziert. Allerdings ließen sich in der vorliegenden Studie weder depressionsassoziiertes Verhalten, Defizite des Grabverhaltens oder sympathovagale Verschiebungen beobachten. Deshalb kann das Amygdala-Kindling-Modell, basierend auf der im Rahmen dieser Studie nachgewiesenen geringen Belastung über einen längeren Zeitraum, als Modell mit einer mittleren Belastung vorgeschlagen werden. Ein eindeutiger Vorteil des Amygdala-Kindling-Modells gegenüber anderen Epilepsiemodellen liegt in der Kontrollierbarkeit der Anfallsstärke, -dauer und -häufigkeit. Es ist zu vermuten, dass das ausgewählte Stimulationsprotokoll über die Schwere der neuropsychiatrischen und autonomen Komorbiditäten und somit über die den Tieren zugefügte Belastung entscheidet. Dies wird durch die gänzlich fehlenden Hinweise auf eine Belastung der Tiere mit fokalen Anfällen deutlich. Deshalb kann das Amygdala-Kindling-Modell als Modell mit zahlreichen Möglichkeiten zu einem modellspezifischen Refinement verstanden werden. Dies lässt sich beispielsweise in toxikologischen Studien umsetzen, in denen häufig nur ein einzelner Anfall ausgelöst werden muss, um die Anfallstendenz eines neuen Medikaments zu überprüfen (WOLFENSOHN et al. 2013). Aus der vorliegenden Studie lassen sich Hinweise auf geeignete Parameter für eine modellspezifische Belastungsbeurteilung in der Routineüberwachung ableiten. So könnte die Analyse des Heimkäfigverhaltens von Nagern eine praxisrelevante Verhaltensuntersuchung darstellen, durch die zeitintensivere Untersuchungen zur Belastungseinschätzung der Tiere ersetzt werden könnten. Die vorliegende Studie lieferte umfassende Informationen über den Einfluss der Elektrodenimplantation und der wiederholt induzierten Anfälle. Dies soll zudem dazu beitragen, die Forschungsgemeinschaft auf die Relevanz der aktiven Umsetzung des 3R-



Konzepts aufmerksam zu machen. Letztendlich konnte diese Studie eine Basis für die Implementierung einer geringeren Belastung der Versuchstiere in Epilepsiemodellen bereitstellen, auf deren Grundlage nun weitere Untersuchungen folgen können.

#### **4. Limitationen und Ausblick**

Hinsichtlich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten müssen verschiedene Limitationen beachtet werden. Zum einen können viele verschiedene Faktoren, wie unter anderem das Alter, die Spezies und das Geschlecht, einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse nehmen. In dieser Studie wurde die Belastungseinschätzung an weiblichen Tieren vorgenommen. Bei weiblichen Tieren kann durch den Einfluss des Sexualzyklus eine höhere Varianz der Ergebnisse auftreten. Dies kann einerseits dazu beitragen, robuste Parameter für eine Einschätzung zu identifizieren, aber andererseits die Detektion einer Belastung erschweren. Zum anderen können sich modell- und laborspezifische Faktoren auf das Wohlbefinden auswirken. Dazu gehört unter anderem die aufgrund der Elektrodenimplantation notwendige Einzelhaltung der Tiere. Da Ratten soziale Tiere sind, für die ein Leben im Gruppenverband für das Wohlbefinden von entscheidender Bedeutung ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Einzelhaltung im Amygdala-Kindling-Modell eine zusätzliche Belastung der Tiere darstellt. Weitere modellspezifische Faktoren stellen die Lokalisation der Stimulationselektrode und das Stimulationsprotokoll dar. In der vorliegenden Untersuchung konnte dargelegt werden, dass beide Faktoren die Ergebnisse der Analysen maßgeblich beeinflussen können. In welchem Ausmaß dies zu einer Beeinträchtigung des Tierwohls führen kann, muss in weiterführenden Untersuchungen evaluiert werden. Weiterhin können die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen durch die jeweilige Abfolge der durchgeführten Tests beeinflusst werden. Das Durchleben der vorherigen Tests hat einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere in den folgenden Untersuchungen. Aufgrund der genannten Faktoren kann die vorliegende Untersuchung lediglich als Basis für eine modellspezifische Belastungseinschätzung dienen. Eine fallassozierte Abwägung ist für jede Versuchsanordnung notwendig. Auch kann die vorliegende Untersuchung nicht die tägliche Beurteilung der Tiere anhand modellspezifischer Score-Sheets ersetzen.

Eine weitere Limitation stellt die Analyse der biochemischen Parameter dar. Trotz der Tatsache, dass es sich hierbei um objektive Parameter handelt, existieren mögliche Fehlerquellen bei der Interpretation der Ergebnisse. Dies können individuelle und tageszeitliche Schwankungen des Hormonhaushalts sowie die Entnahmemethode mit Tiermanipulation sein. Die Serumproben wurden nur einmalig am Ende der Untersuchungen entnommen. Eine Darstellung des Verlaufs der Hormonkonzentrationen im Projektverlauf könnte neue Informationen liefern und die Validität der biochemischen

Parameter zur Belastungseinschätzung im Amygdala-Kindling-Modell steigern. Dies gilt ebenso für die Analyse des Sexualzyklus. Es wäre von großem Interesse, darzustellen, ob das Modell zu einer nachhaltigen Beeinflussung des Sexualzyklus führen kann. Die limitierte Präzision des Scoring-Systems des Nestbaverhaltens und der Nestverschmutzung können eine begrenzte Aussagekraft dieser Parameter bedingen. Weiterhin sollte die im Rahmen der Elektrodenimplantation auftretende frühe postoperative Belastung mit Hilfe einer videobasierten Gesichtserkennung zur Überwachung des Grimace-Scales in den ersten postoperativen Tagen bestimmt werden.

Die durch die vorliegende Untersuchung entwickelten Methoden zur Belastungseinschätzung sollen in Zukunft bei weiteren häufig genutzten Epilepsiemodellen angewendet werden. Hierfür wurde für jede Untersuchung ein entsprechendes Standardprotokoll angefertigt, welches eine exakte Durchführung innerhalb der Arbeitsgruppe sowie in anderen Laboren ermöglicht. Dies trägt maßgeblich zu einer verbesserten Standardisierung der Belastungseinschätzung bei, auf deren Basis ein evidenzbasierter Vergleich des Wohlbefindens der Versuchstiere in verschiedenen Modellen ermöglicht wird. Eine erste Einschätzung des Wohlbefindens der Tiere in Status-Epilepticus-Modellen lässt vermuten, dass durch eine erhöhte Mortalität und die gravierenden neuropathologischen Merkmale in diesen Modellen eine erhöhte Belastung vorliegt. Diese Annahme muss jedoch durch valide Daten bestätigt werden. Die PCA soll eine modellübergreifende Analyse des gesamten Datensatzes ermöglichen. Neben den in dieser Arbeit etablierten Methoden sollen in weiterführenden Studien belastungsassoziierte Aktivitätsmuster im Gehirn identifiziert werden. Diese umfassen Messungen der metabolischen Aktivität und der Serotonin-Rezeptorbindung mittels Positronen-Emissions-Tomographie-Studien. Dieser weitgreifende Überblick soll Forschergruppen dabei helfen, Modelle mit einer möglichst geringen Belastung zu priorisieren. Weiterhin soll die Legimitation der Modelle geprüft werden, um eine optimale Durchführung des 3R-Konzepts in der Epilepsieforschung zu gewährleisten. Abschließend sollen die aussagekräftigsten Parameter in die Routineüberwachung übertragen werden und auf diese Weise die zum momentanen Zeitpunkt häufig inadäquate schematische Belastungseinschätzung maßgeblich verbessern. Im Rahmen der nationalen Forschergruppe werden derzeit auf Grundlage der erarbeiteten Methoden die Belastungen in Tiermodellen aus vielfältigen Forschungsbereichen miteinander verglichen. Auf diese Weise wird eine Belastungseinschätzung im Sinne der rechtlichen Vorgaben ermöglicht, die nachfolgend in der Routineüberwachung in allen Tierversuchseinrichtungen zur Anwendung kommen kann. Dadurch wird sowohl das Tierwohl als auch die präklinische Datenqualität gesichert.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien stellen sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin eine der häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen weltweit dar. In beiden Fällen lassen sich die Anfälle bei etwa 30 % der Patienten nicht medikamentös kontrollieren. Daher ist es essentiell neue Angriffsstrukturen für Antiepileptika zu identifizieren. Das hierfür notwendige Verständnis der pathophysiologischen Hintergründe von Epilepsien und die Entwicklung der bisherigen drei Generationen von Antiepileptika basiert hauptsächlich auf der Durchführung von Tierversuchen. Zusätzlich zu den Versuchstieren, die in der Epilepsieforschung eingesetzt werden, treten auch bei Versuchstieren in vielen anderen Forschungsbereichen Anfälle auf. In welchem Ausmaß die versuchsbedingten Prozeduren sowie die Anfälle selbst eine Belastung für die Tiere darstellen, ist bisher nicht geklärt.

In der europäischen Union ist in der Richtlinie 2010/63/EU gesetzlich festgehalten, dass der Nutzen jedes Tierversuchs die den Tieren zugefügten Schmerzen, Leiden und Schäden übersteigen muss. Der auf die Versuchstiere einwirkende Stress beeinflusst zudem die Qualität der erhobenen Daten. Eine evidenzbasierte Belastungseinstufung von Epilepsiemodellen und den dabei auftretenden epileptischen Anfällen ist daher als Grundlage für die Entscheidungen von Behörden und Forschergruppen im Rahmen der Durchführung von Tierversuchen dringend notwendig. Als Teilprojekt einer nationalen Forschungsgemeinschaft, deren Fokus auf der evidenzbasierten Belastungseinstufung liegt, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von wiederholten epileptischen Anfällen auf das Wohlbefinden von Ratten untersucht. Hierfür wurden verschiedene Verhaltensuntersuchungen durchgeführt, um das Heimkäfigverhalten, das Sozialverhalten, das Grabverhalten und das angst- und depressionsassoziierte Verhalten der Tiere zu untersuchen. Des Weiteren wurden biochemische Stressparameter in Serum-, Kot- und Haarproben evaluiert und mit Hilfe implantierter Telemetrie-Transmitter die lokomotorische Aktivität sowie die Herzfrequenz der Tiere erfasst. Dadurch konnten umfassende Informationen über die Verhaltensänderungen sowie die Änderungen biochemischer und physiologischer Parameter im Amygdala-Kindling-Modell erhoben werden. Diese Daten ermöglichen Rückschlüsse auf eine durch das Modell verursachte Belastung der Tiere. Der Vergleich von drei Versuchsgruppen (Kindling-Gruppe, elektrodenimplantierte Kontrollgruppe, naive Kontrollgruppe) während der Phasen der fokalen und generalisierten Anfälle ermöglichte hierbei sowohl eine Aussage über die Belastung durch die fokalen und generalisierten Anfälle als auch durch die gesamte Versuchsprozedur.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte ein signifikanter Einfluss der Elektrodenimplantation auf das angstassoziierte Verhalten sowie die lokomotorische Aktivität der Tiere beobachtet werden. Die fokalen Anfälle führten in der vorliegenden Studie

weder zu Unterschieden hinsichtlich der Verhaltensweisen noch der biochemischen und physiologischen Parameter. In der Phase der generalisierten Anfälle zeigten sich Änderungen des Nestbauverhaltens, der Nestverschmutzung und des angstassoziierten Verhaltens. Des Weiteren konnten in dieser Phase eine erhöhte lokomotorische Aktivität und Herzfrequenz der Tiere in ihrer Ruhephase nachgewiesen werden. Die Analyse der biochemischen Parameter ergab eine erniedrigte Konzentration an Corticosteron im Serum als Konsequenz der Elektrodenimplantation und der wiederholten generalisierten Anfälle. Alle weiteren Parameter der Verhaltensanalysen sowie die biochemischen und physiologischen Parameter ergaben keine Hinweise auf einen Einfluss der generalisierten Anfälle auf das Wohlbefinden der Tiere. Zusätzlich wurden eine Korrelationsmatrixanalyse und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um geeignete Parameter für eine Belastungseinschätzung identifizieren und die Tiergruppen parameterübergreifend vergleichen zu können. Die Korrelationsmatrixanalyse zeigte, dass die Beurteilung des Nestbauverhaltens im Amygdala-Kindling-Modell dazu geeignet ist, bei der Belastungseinstufung aufwendigere Verhaltensuntersuchungen zu ersetzen. Aus der vorliegenden Studie lassen sich somit geeignete Parameter für eine modellspezifische Belastungsbeurteilung in der Routineüberwachung ableiten. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen der naiven Kontrollgruppe und den beiden anderen Versuchsgruppen (elektrodenimplantierte Kontrollgruppe und Kindling-Gruppe) auf. Die beiden letzteren Gruppen unterschieden sich nicht voneinander. Aufgrund der beschriebenen Auswirkungen auf Verhaltensparameter, lokomotorische Aktivität und Herzfrequenz wird das Amygdala-Kindling-Modell als Tiermodell mit einer mittleren Belastung für die Versuchstiere vorgeschlagen. Die Studie soll dazu beitragen, geeignete Scoring-Systeme für die evidenzbasierte Belastungseinstufung zu entwickeln. Des Weiteren kann die Forschungsgemeinschaft auf die Relevanz der aktiven Umsetzung des 3R-Konzepts aufmerksam gemacht werden. Mit Hilfe der etablierten Methoden soll nachfolgend die in anderen Epilepsiemodellen auftretende Belastung eingestuft werden. Durch die Auswahl des mit dem Forschungsziel zu vereinbarenden Modells mit der jeweils geringstmöglichen Belastung für die Versuchstiere bieten sich Möglichkeiten zum Refinement in der Epilepsieforschung. Zudem werden in der vorliegenden Studie Möglichkeiten zu einem modellspezifischen Refinement aufgezeigt. Auf diese Weise soll zukünftig eine möglichst geringe Belastung der Versuchstiere in Epilepsiemodellen implementiert werden. Im Rahmen der nationalen Forschergruppe werden die Belastungen in Tiermodellen aus vielfältigen Forschungsbereichen miteinander verglichen. Auf diese Weise wird eine Belastungseinschätzung im Sinne der rechtlichen Vorgaben ermöglicht, die nachfolgend in der Routineüberwachung in allen Tierversuchseinrichtungen zur Anwendung kommen kann. Dadurch wird sowohl das Tierwohl als auch die präklinische Datenqualität gesichert.

## VIII. SUMMARY

### **Evidence-based severity assessment in epilepsy models: Investigations in the amygdala kindling model in rats**

Epilepsies are one of the most common chronic neurological diseases in dogs and cats. Furthermore, around 65 million people worldwide are affected by epilepsies. In veterinary and human medicine, seizures are not medically controlled in about 30 % of patients. Therefore, it is essential to identify new target regions for antiepileptic drugs. Our understanding of the pathophysiological mechanisms of epilepsies and the discovery of the previous three generations of antiepileptic drugs is mainly based on knowledge gained through animal experimentation. In addition to the experimental animals in epilepsy models, experimental animals in many other research areas can exhibit seizure activity. To justify the use of experimental animals according to the legal regulations, a harm-benefit analysis weighing the potential benefits with the expected harm to the animal is required. Additionally, the burden of the animals affects the preclinical data quality. Therefore, evidence-based severity assessment schemes should be used to analyse the actual harm of the experimental animals. This should provide a basis for decisions by authorities and research groups. As part of a national research consortium focused on evidence-based severity assessment in different disease models, this study set out to explore the impact of repeated seizures and procedures on the well-being of the experimental animals. Comprehensive information was obtained about the overall pattern of neurobehavioral, biochemical and physiological alterations associated with the amygdala kindling model of epilepsy. For this purpose, various behavioural investigations were carried out, including the analysis of home cage behaviour, social interaction, burrowing behaviour, and behaviour associated with anxiety and depression. Furthermore, biochemical stress parameters in serum, faeces and hair samples were analysed. For the recording of home cage activity and heart rate a telemetry transmitter was implanted. Various parameters were assessed during the phases of focal and generalised seizures and within different experimental groups. Thereby data about the impact of electrode-implantation and repeated induced seizures in different experimental phases were obtained. Electrode-implantation exerted effects on anxiety-associated behaviour and increased locomotor activity levels two weeks following surgery. Analysis in kindled rats excluded any relevant impact of focal seizures on behavioural, biochemical and physiological parameters. Assessment in rats with generalised seizures revealed an impact on nest complexity, nest soiling and anxiety-associated behaviour. Additionally, an impact of generalised seizures on locomotor activity and heart rate became evident during the resting phase of the animals. Analysis of biochemical parameters revealed a lowered serum corticosterone concentration because

of electrode-implantation and repeated seizures. In contrast other parameters of the behavioural, biochemical analysis as well as heart rate variability remained unaffected as a consequence of generalised seizures. In addition, a correlation matrix analysis and a principal component analysis were performed to identify suitable parameters for severity assessment and to compare the experimental groups. Cross-correlation matrix suggested the scoring of nest complexity and nest maintenance as valuable parameter for severity assessment in the amygdala kindling model, which could replace more elaborate behavioural analyses in the future. Principal component analysis revealed significant differences between the naive control group and the other two experimental groups (electrode-implanted control group and Kindling group). The latter two groups did not differ from each other.

Overall the findings argue against a persistent level of distress and suggest a classification of the amygdala kindling model as a model with moderate severity based on longer-lasting mild impact on behavioural patterns as well as activity and heart rate in the resting phase. In conclusion, the present study provides information about suitable parameters for a model-specific stress assessment in routine monitoring. Additionally, evidence-based severity assessment schemes can be developed based on this study, which should help to implement the 3R concept in epilepsy research. The choice of a model with the lowest severity offers possibilities for refinement in epilepsy research in terms of the legal regulations. Data from the national research consortium is intended to compare the burden in animal models from various research fields. This ensures animal welfare as well as preclinical data quality.

## 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

ADAMEC, R., T. SHALLOW u. P. BURTON (2005): Anxiolytic and anxiogenic effects of kindling--role of baseline anxiety and anatomical location of the kindling electrode in response to kindling of the right and left basolateral amygdala. *Behav Brain Res* 159, 73-88

ADAMEC, R. E. u. D. MCKAY (1993): Amygdala kindling, anxiety, and corticotrophin releasing factor (CRF). *Physiology & behavior* 54, 423-431

ALESCH, F. u. I. KAISER (2011): Tiefe Hirnstimulation: ein Ratgeber für Betroffene bei Morbus Parkinson. Springer-Verlag 115-124

ALTAR, C. A., R. E. WHITEHEAD, R. CHEN, G. WORTWEIN u. T. M. MADSEN (2003): Effects of electroconvulsive seizures and antidepressant drugs on brain-derived neurotrophic factor protein in rat brain. *Biol Psychiatry* 54, 703-709

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, F. E. (2013): Diagnostic and statistical manual of mental disorders, DSM-5. Washington

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

ARONIADOU-ANDERJASKA, V., B. FRITSCH, F. QASHU u. M. F. BRAGA (2008): Pathology and pathophysiology of the amygdala in epileptogenesis and epilepsy. *Epilepsy Res* 78, 102-116

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 veterinary research* 3, 16

ASAN, E., M. STEINKE u. K. P. LESCH (2013): Serotonergic innervation of the amygdala:

targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochemistry and cell biology* 139, 785-813

BAI, M., L. ZHANG, X. ZHU, Y. ZHANG, S. ZHANG u. L. XUE (2014): Comparison of depressive behaviors induced by three stress paradigms in rats. *Physiology & behavior* 131, 81-86

BARDE, Y. A., D. EDGAR u. H. THOENEN (1982): Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *The EMBO journal* 1, 549-553

BARGIELLO, T. A., F. R. JACKSON u. M. W. YOUNG (1984): Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*. *Nature* 312, 752-754

BARRIENTOS, R. M., D. B. SPRUNGER, S. CAMPEAU, E. A. HIGGINS, L. R. WATKINS, J. W. RUDY u. S. F. MAIER (2003): Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. *Neuroscience* 121, 847-853

BAUMANS, V. (2005): Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. . *Rev. Sci. Tech.* 24, 503-513

BAUMANS, V., P. 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 Behav* 71, 60-64

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. *Ann Neurol* 78, 128-136

BEERLING, W., J. M. KOOLHAAS, A. AHNAOU, J. A. BOUWKNECHT, S. F. DE BOER, P. MEERLO u. W. H. DRINKENBURG (2011): Physiological and hormonal responses to novelty exposure in rats are mainly related to ongoing behavioral activity. *Physiology &*



behavior 103, 412-420

BEERY, A. K. u. D. KAUFER (2015): Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. *Neurobiology of stress* 1, 116-127

BEGHI, E. (2009): Accidents and injuries in patients with epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics* 9, 291-298

BEHR, C., M. A. GOLTZENE, G. KOSMALSKI, 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. POTSCSKA, 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

BERG, A. T., S. F. BERKOVIC, M. J. BRODIE, J. BUCHHALTER, J. H. CROSS, W. VAN EMDE BOAS, J. ENGEL, J. FRENCH, T. A. GLAUSER, G. W. MATHERN, S. L. MOSHE, D. NORDLI, P. PLOUIN u. I. E. SCHEFFER (2010): Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51, 676-685

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

BERTRAM, E. (2007): The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 2, 65-74

BIALER, M. u. H. S. WHITE (2010): Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature reviews. Drug discovery* 9, 68-82

BLAKEMORE, C., J. MACARTHUR CLARK, T. NEVALAINEN, M. OBERDORFER u. A. SUSSMAN (2012): Implementing the 3Rs in neuroscience research: a reasoned approach. *Neuron* 75, 948-950

BLANCHARD, R. J. u. D. C. BLANCHARD (1989): Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13 Suppl, 3-14

BORCHERS, D. u. J. LUY (2009): Der ethisch vertretbare Tierversuch: Kriterien und Grenzen. mentis Verlag GmbH 10

BOURIN, M. u. M. HASCOET (2003): The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55-65

BOUT, H. J., J. M. FENTENER VAN VLISSINGEN u. E. D. KARSSING (2014): Evaluating the ethical acceptability of animal research. *Lab Anim (NY)* 43, 411-414

BOWEN, M. T., K. KEATS, M. D. KENDIG, V. CAKIC, P. D. CALLAGHAN u. I. S. MCGREGOR (2012): Aggregation in quads but not pairs of rats exposed to cat odor or bright light. *Behavioural processes* 90, 331-336

BOWEN, M. T. u. I. S. MCGREGOR (2014): Oxytocin and vasopressin modulate the social response to threat: a preclinical study. *The international journal of neuropsychopharmacology* 17, 1621-1633

BOYLAN, L., L. FLINT, D. LABOVITZ, S. JACKSON, K. STARNER u. O. DEVINSKY (2004): Depression but not seizure frequency predicts quality of life in treatment-resistant epilepsy. *Neurology* 62, 258-261

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

BRYDEN, L. A., J. R. NICHOLSON, H. DOODS u. A. PEKCEC (2015): Deficits in spontaneous burrowing behavior in the rat bilateral monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: an objective measure of pain-related behavior and analgesic efficacy. *Osteoarthritis Cartilage* 23, 1605-1612

BURHANS, L. B. u. B. G. SCHREURS (2013): Inactivation of the central nucleus of the amygdala blocks classical conditioning but not conditioning-specific reflex modification of rabbit heart rate. *Neurobiology of learning and memory* 100, 88-97

BURKI, T. (2017): Nobel Prize awarded for discoveries in circadian rhythm. *The Lancet* 390, e25

CAMPOS, A. C., M. V. FOGACA, D. C. AGUIAR u. F. S. GUIMARAES (2013): Animal models of anxiety disorders and stress. *SciELO Analytics* 35 Suppl 2, 101-111

CANNON, W. B. (1932): *The wisdom of the body*. W.W. Norton & Company, Inc First edition, 19-312

CARDOSO, C., M. A. ELLENBOGEN, L. SERRAVALLE u. A. M. LINNEN (2013): Stress-induced negative mood moderates the relation between oxytocin administration and trust: evidence for the tend-and-befriend response to stress? *Psychoneuroendocrinology* 38, 2800-2804

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

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. *Front Behav Neurosci* 10, 129

CHRISTIANSEN, S., E. V. BOUZINOVA, R. PALME u. O. WIBORG (2012): Circadian activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is differentially affected in the rat chronic mild stress model of depression. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 15, 647-657

COAN, A. C., M. E. MORITA, B. M. CAMPOS, F. P. G. BERGO, B. Y. KUBOTA u. F. CENDES (2013): Amygdala enlargement occurs in patients with mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis with early epilepsy onset. *Epilepsy & Behavior* 29, 390-394

CORA, M. C., L. KOOISTRA u. G. TRAVLOS (2015): Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol* 43, 776-793

CRAWLEY, J. u. F. K. GOODWIN (1980): Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13, 167-170

CRAWLEY, J. N. (2007): What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice, 226-266

CULHANE, A. C., J. THIOULOUSE, G. PERRIÈRE u. D. G. HIGGINS (2005): MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data. *Bioinformatics* 21, 2789-2790

CURIA, G., D. LONGO, G. BIAGINI, R. S. JONES u. M. AVOLI (2008): The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172, 143-157

DALE, H. H. (1906): On some physiological actions of ergot. *The Journal of physiology* 34, 163-206

DARWIN, C. (1872): *The expression of emotion in animals and man*. London: Methuen. (1877), A biographical sketch of an infant. *Mind* 2, 285-294

DASILVA, J. K., E. HUSAIN, Y. LEI, G. L. MANN, A. R. MORRISON u. S. TEJANI-BUTT (2017): Social partnering alters sleep in fear-conditioned Wistar rats. *PLoS One* 12, e0186017

DAVITZ, J. R. u. D. J. MASON (1955): Socially facilitated reduction of a fear response in rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 48, 149-151

DE WEERD, A., S. DE HAAS, A. OTTE, D. K. TRENITE, G. VAN ERP, A. COHEN, M. DE KAM u. J. VAN GERVEN (2004): Subjective sleep disturbance in patients with partial epilepsy: a questionnaire-based study on prevalence and impact on quality of life. *Epilepsia* 45, 1397-1404

DEACON, R. (2012): Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE* e2607

DEACON, R. M. (2009): Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res* 200, 128-133

DEACON, R. M., J. M. RALEY, V. H. PERRY u. J. N. RAWLINS (2001): Burrowing into prion disease. *Neuroreport* 12, 2053-2057

DEGIORGIO, C. M., P. MILLER, S. MEYMANDI, A. CHIN, J. EPPS, S. GORDON, J. GORNBEIN u. R. M. HARPER (2010): RMSSD, a Measure of Heart Rate Variability, Is Associated With Risk Factors For SUDEP: The SUDEP-7 Inventory. *Epilepsy & behavior : E&B* 19, 78-81

DELGADO, J. R. u. M. SEVILLANO (1961): Evolution of repeated hippocampal seizures in the cat. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 13, 722-733

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

DEPPERMANN, S., H. STORCHAK, A. J. FALLGATTER u. A. C. EHLIS (2014): Stress-induced neuroplasticity: (mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD--a critical overview. *Neuroscience* 283, 166-177

DEUTSCH-FELDMAN, M., R. PICETTI, K. SEIP-CAMMACK, Y. ZHOU u. M. J. KREEK (2015): Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotrophic and corticosterone concentrations in Sprague-Dawley compared with Lewis rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 54, 35-39

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

DIERGAARDE, L., M. A. GERRITS, A. STUY, B. M. SPRUIJT u. J. M. VAN REE (2004): Neonatal amygdala lesions and juvenile isolation in the rat: differential effects on locomotor and social behavior later in life. *Behavioral neuroscience* 118, 298-305

DÖRNER, K. (2009): *Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen [Taschenlehrbuch]. 7. vollständig überarbeitete Auflage*, 477-479

DRINKENBURG, W. H., A. AHNAOU u. G. S. RUIGT (2015): Pharmacology-EEG Studies in Animals: A History-Based Introduction to Contemporary Translational Applications. *Neuropsychobiology* 72, 139-150

DUMAN, R. S., G. R. HENINGER u. E. J. NESTLER (1997): A molecular and cellular theory of depression. *Archives of general psychiatry* 54, 597-606

DUMAN, R. S. u. L. M. MONTEGGIA (2006): A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59, 1116-1127

EASTER, A., M. E. BELL, J. R. DAMEWOOD, JR., W. S. REDFERN, J. P. VALENTIN, M. J. WINTER, C. FONCK u. R. A. BIALECKI (2009): Approaches to seizure risk assessment in preclinical drug discovery. *Drug discovery today* 14, 876-884

ENOMOTO, S., K. SHIMIZU, M. NIBUYA, E. SUZUKI, K. NAGATA u. T. KONDO (2017): Activated Brain-Derived Neurotrophic Factor/TrkB Signaling in Rat Dorsal and Ventral Hippocampi Following 10-Day Electroconvulsive Seizure Treatment. *Neuroscience letters* 660, 45-50

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,

ESMAELPOUR, K., V. SHEIBANI, M. SHABANI u. J. MIRNAJAFI-ZADEH (2017): Effect of low frequency electrical stimulation on seizure-induced short- and long-term impairments in learning and memory in rats. *Physiology & behavior* 168, 112-121

FERDOWSIAN, H. R. u. J. P. GLUCK (2015): The ethical challenges of animal research. *Camb Q Healthc Ethics* 24, 391-406

FESTING, S. u. R. WILKINSON (2007): The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. EMBO Rep 8, 526-530

FIEST, K. M., J. DYKEMAN, S. B. PATTEN, S. WIEBE, G. G. KAPLAN, C. J. MAXWELL, A. G. BULLOCH u. N. JETTE (2013): Depression in epilepsy: a systematic review and meta-analysis. Neurology 80, 590-599

FILALI, M. u. R. LALONDE (2009): Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APP<sup>swe</sup>/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. Brain research 1292, 93-99

FILE, S. E. u. J. R. HYDE (1978): Can social interaction be used to measure anxiety? Br J Pharmacol 62, 19-24

FILE, S. E., A. S. LIPPA, B. BEER u. M. T. LIPPA (2004): Animal tests of anxiety. Curr Protoc Neurosci Chapter 8, Unit 8 3

FILE, S. E. u. P. SETH (2003): A review of 25 years of the social interaction test. Eur J Pharmacol 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

FISHER, S. E. u. J. E. REASON (1988): Handbook of life stress, cognition and health. 34, 629-648

FOEX, B. A. (2007): The ethics of animal experimentation. Emerg Med J 24, 750-751

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

FOURNIER, N. M., J. J. BOTTERILL, W. N. MARKS, A. J. GUSKJOLEN u. L. E. KALYNCHUK (2013): Impaired recruitment of seizure-generated neurons into functional memory networks of the adult dentate gyrus following long-term amygdala kindling. *Exp Neurol* 244, 96-104

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

FRANKE, H. u. H. KITTNER (2001): Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats. *Pharmacol Biochem Behav* 70, 291-303

GALANOPOULOU, A. S., P. S. BUCKMASTER, K. J. STALEY, S. L. MOSHE, E. PERUCCA, J. ENGEL, JR., W. LÖSCHER, J. L. NOBELS, A. PITKÄNEN, J. STABLES, H. S. WHITE, T. J. O'BRIEN u. M. SIMONATO (2012): Identification of new epilepsy treatments: issues in preclinical methodology. *Epilepsia* 53, 571-582

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. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 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

GEDULDIG, N. (2014) EKG-Studien der TASK-1-defizienten Maus-Analyse von EKG-Zyklus, Herzfrequenzvariabilität und Heart-Rate-Turbulence. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Dissertation.

GERAGHTY, A., S. MUROY, S. ZHAO, L. KRIEGSFELD, G. BENTLEY u. D. KAUFER (2013): Chronic stress causes an increase in RFRP expression and leads to reproductive dysfunction in the adult female rat. Program No 37504III1 2013 Neurosci Meet Plan Wash DC Soc Neurosci 2013 Online

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. *Ann Neurol* 76, 443-456

GILBERT, M. E. u. D. P. CAIN (1981): A developmental study of kindling in the rat. *Brain research* 254, 321-328

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. *Lab Anim* 45, 247-253

GIVALOIS, L., F. MARMIGERE, F. RAGE, G. IXART, S. ARANCIBIA u. L. TAPIA-ARANCIBIA (2001): Immobilization stress rapidly and differentially modulates BDNF and TrkB mRNA expression in the pituitary gland of adult male rats. *Neuroendocrinology* 74, 148-159

GODDARD, G. V. (1967): Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214, 1020-1021

GODDARD, G. V. (1983): The kindling model of epilepsy. *Trends in Neurosciences* 6, 275-279

GODDARD, G. V., D. C. MCINTYRE u. C. K. LEECH (1969): A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Experimental neurology* 25, 295-330

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. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 80, 84-97

GOORDEN, S. M., G. M. VAN WOERDEN, L. VAN DER WEERD, J. P. CHEADLE u. Y. ELGERSMA (2007): Cognitive deficits in Tsc1+/- mice in the absence of cerebral lesions and seizures. *Ann Neurol* 62, 648-655

GOULD, S. A., H. DOODS, T. LAMLA u. A. PEKCEC (2016): Pharmacological characterization of intraplantar Complete Freund's Adjuvant-induced burrowing deficits. *Behav Brain Res* 301, 142-151

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

GRONE, B. P. u. S. C. BARABAN (2015): Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. Nat Neurosci 18, 339-343

GUMP, B. B. u. J. A. KULIK (1997): Stress, affiliation, and emotional contagion. Journal of personality and social psychology 72, 305-319

GV-SOLAS, DÜLSNER A., HACK R., KRÜGER C., PILS M., SCHERER K., SCHMELTING B., SCHMIDT M., WEINERT H. u. T. JOURDAN (2009): Empfehlung zur Blutentnahme bei Versuchstieren, insbesondere kleinen Versuchstieren. Fachinformation aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte und Arbeitskreis 4 in der TVT 5-15

HAEMISCH, A., G. GUERRA u. J. FURKERT (1999): Adaptation of corticosterone-but not beta-endorphin-secretion to repeated blood sampling in rats. Lab Anim 33, 185-191

HÄGER, 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

HAMILTON, W. D. (1971): Geometry for the selfish herd. Journal of theoretical biology 31, 295-311

HANDLEY, S. L. u. J. W. MCBLANE (1993): An assessment of the elevated X-maze for studying anxiety and anxiety-modulating drugs. Journal of pharmacological and toxicological methods 29, 129-138

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

HARTY, R. C., T. H. KIM, E. A. THOMAS, L. CARDAMONE, N. C. JONES, S. PETROU u.

V. C. WIMMER (2013): Axon initial segment structural plasticity in animal models of genetic and acquired epilepsy. *Epilepsy Research* 105, 272-279

HAWKINS, P., D. B. MORTON, O. BURMAN, N. DENNISON, P. HONESS, M. JENNINGS, S. LANE, V. MIDDLETON, J. V. ROUGHAN, S. WELLS u. K. WESTWOOD (2011): A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim* 45, 1-13

HEINRICHS, M., T. BAUMGARTNER, C. KIRSCHBAUM u. U. EHLERT (2003): Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. *Biol Psychiatry* 54, 1389-1398

HEINZMANN, J. M., S. KLOIBER, G. EBLING-MATTOS, M. BIELOHUBY, R. PALME, F. HOLSBOER, M. UHR, M. ISING, C. TOUMA u. S. MCILWRICK (2015): Mice selected for extremes in stress reactivity reveal key endophenotypes of major depression: A translational approach. *Psychoneuroendocrinology* 61, 56

HELPER, V., C. DERANSART, C. MARESCAUX u. A. DEPAULIS (1996): Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences. *Neuroscience* 73, 971-978

HELLER, H. C., A. SALEHI, B. CHULUUN, D. DAS, B. LIN, S. MOGHADAM, C. C. GARNER u. D. COLAS (2014): Nest building is impaired in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome and rescued by blocking 5HT2a receptors. *Neurobiology of learning and memory* 116, 162-171

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. *Exp Neurol* 183, 346-354

HELMSTAEDTER, C., F. DROEGE u. J. A. WITT (2013): Assessing activities of daily living in patients with epilepsy. *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 81, 452-458

HERCK, H. V., BAUMANS, V. AND DE BOER, S.F. (1994): Assessment of discomfort in laboratory animals. In: Cohen, I.R. and Miller, A., (Eds.): *Autoimmune disease models. A guidebook* Academic Press., New York, S. pp. 303-320.

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. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 202, 471-476

HESSEBERG, K., H. BENTZEN, A. H. RANHOFF, K. ENGEDAL u. A. BERGLAND (2013): Disability in instrumental activities of daily living in elderly patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 36, 146-153

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

HOLTER, S. M., J. EINICKE, B. SPERLING, A. ZIMPRICH, L. GARRETT, H. FUCHS, V. GAILUS-DURNER, M. HRABE DE ANGELIS u. W. WURST (2015): Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 5, 291-309

HORDER, M., R. C. ELSE, W. GERHARDT, M. MATHIEU u. E. J. SAMPSON (1991): International Federation of Clinical Chemistry, Scientific Division Committee on Enzymes: approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 29, 435-456

HORNETZ, L. (2016) Telemetrische Untersuchungen zur Belastung von Mäusen durch verschiedene Methoden der Blutentnahme, Kennzeichnung und durch chronischen Stress. LMU München, Tierärztliche Fakultät, Dissertation.

HUANG, E. J. u. L. F. REICHARDT (2001): Neurotrophins: Roles in Neuronal Development and Function. *Annual Review of Neuroscience* 24, 677-736

HUANG, H., H. ZHOU u. N. WANG (2015): Recent Advances in Epilepsy Management. *Cell biochemistry and biophysics* 73, 7-10

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

HUTTEN, H. (2013): Biotelemetrie: angewandte biomedizinische Technik. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

ILAE (1985): Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 26, 268-278

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

JEPPESEN, J., A. FUGLSANG-FREDERIKSEN, R. BRUGADA, B. PEDERSEN, G. RUBBOLI, P. JOHANSEN u. S. BENICZKY (2014): Heart rate variability analysis indicates preictal parasympathetic overdrive preceding seizure-induced cardiac dysrhythmias leading to sudden unexpected death in a patient with epilepsy. *Epilepsia* 55, 67-71

JIRKOF, P. (2014): Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 234, 139-146

JIRKOF, P. (2015): Effects of experimental housing conditions on recovery of laboratory mice. *Lab Anim (NY)* 44, 65-70

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. *Front Behav Neurosci* 4, 165

JIRKOF, P., T. FLEISCHMANN, N. CESAROVIC, A. RETTICH, J. VOGEL u. M. ARRAS (2013a): Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim* 47, 153-161

JIRKOF, P., K. LEUCHT, N. CESAROVIC, M. CAJ, F. NICHOLLS, G. ROGLER, M. ARRAS u. M. HAUSMANN (2013b): Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Lab Anim* 47, 274-283

KANDRATAVICIUS, L., P. A. BALISTA, C. LOPES-AGUIAR, R. N. RUGGIERO, E. H. UMEOKA, N. GARCIA-CAIRASCO, L. S. BUENO-JUNIOR u. J. P. LEITE (2014): Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 10, 1693-1705

KANNER, A. M. (2003): Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biol Psychiatry* 54, 388-398

KANNER, A. M. (2007): Epilepsy and mood disorders. *Epilepsia* 48 Suppl 9, 20-22

KANNER, A. M. (2011): Anxiety disorders in epilepsy: the forgotten psychiatric comorbidity. *Epilepsy currents* 11, 90-91

KANNER, A. M. (2016): Psychiatric comorbidities in epilepsy: Should they be considered in the classification of epileptic disorders? *Epilepsy Behav* 64, 306-308

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 and biobehavioral reviews* 5, 247-251

KEARSLEY-FLEET, L., D. G. O'NEILL, H. A. VOLK, D. B. CHURCH u. D. C. BRODBELT (2013): Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *The Veterinary record* 172, 338

KECK, M., G. ANDROSOVA, F. GUALTIERI, A. WALKER, E. L. VON RUDEN, V. RUSSMANN, C. A. DEEG, S. M. HAUCK, R. KRAUSE u. H. POTSCHKKA (2017): A systems level analysis of epileptogenesis-associated proteome alterations. *Neurobiol Dis* 105, 164-178

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

KIKUSUI, T., J. T. WINSLOW u. Y. MORI (2006): Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 2215-2228

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

KLEIN, S., J. P. BANKSTAHL, W. LÖSCHER u. M. BANKSTAHL (2015): Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 263, 263-271

KOBOW, K., S. AUVIN, F. JENSEN, W. LÖSCHER, I. MODY, H. POTSCSKA, D. PRINCE, A. SIERRA, M. SIMONATO, A. PITKÄNEN, A. NEHLIG u. J. M. RHO (2012): Finding a better drug for epilepsy: antiepileptogenesis targets. *Epilepsia* 53, 1868-1876

KOLBE, T., R. PALME, A. TICHY u. T. RULICKE (2015): Lifetime Dependent Variation of Stress Hormone Metabolites in Feces of Two Laboratory Mouse Strains. *PLoS One* 10, e0136112

KORCZYNSKI, R. u. E. FONBERG (1979): Spontaneous locomotor activity and food and water intake in rats with medial amygdala lesions. *Acta neurobiologiae experimentalis* 39, 227-240

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. *Behav Brain Res* 308, 128-142

KOWIANSKI, P., G. LIETZAU, E. CZUBA, M. WASKOW, A. STELIGA u. J. MORYS (2017): BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cellular and molecular neurobiology* 38, 579-593

KRAMER, K., L. KINTER, B. P. BROCKWAY, H. P. VOSS, R. REMIE u. B. L. VAN ZUTPHEN (2001): The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemporary topics in laboratory animal science* 40, 8-16

KRAMER, K. u. L. B. KINTER (2003): Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiological genomics* 13, 197-205

KRETLOW, A., D. BUTZKE, M. E. GOETZ, B. GRUNE, M. HALDER, F. HENKLER, M. LIEBSCH, R. NOBILING, M. OELGESCHLAEGER u. K. REIFENBERG (2010): Implementation and enforcement of the 3Rs principle in the field of transgenic animals used

for scientific purposes. Report and recommendations of the BfR expert workshop, May 18-20, 2009, Berlin, Germany. *Altex* 27, 117-134

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

KWON, O. Y. u. S. P. PARK (2014): Depression and anxiety in people with epilepsy. *J Clin Neurol* 10, 175-188

LAKSHMINARASIMHAN, H. u. S. CHATTARJI (2012): Stress leads to contrasting effects on the levels of brain derived neurotrophic factor in the hippocampus and amygdala. *PLoS One* 7, e30481

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

LENG, G. u. N. SABATIER (2016): Measuring Oxytocin and Vasopressin: Bioassays, Immunoassays and Random Numbers. *J Neuroendocrinol* 28, 1-13

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 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. *Lab Anim* 44, 192-198

LETTY, S., M. LERNER-NATOLI u. G. RONDOUIN (1995): Differential impairments of spatial memory and social behavior in two models of limbic epilepsy. *Epilepsia* 36, 973-982

LEVINE, S. (2000): Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Eur J Pharmacol* 405, 149-160

LI, P., S. H. SUR, R. E. MISTLBERGER u. M. MORRIS (1999): Circadian blood pressure



and heart rate rhythms in mice. *The American journal of physiology* 276, R500-504

LIAO, D., M. CARNETHON, G. W. EVANS, W. E. CASCIO u. G. HEISS (2002): Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Diabetes* 51, 3524-3531

LIDSTER, K., J. G. JEFFERYS, I. BLUMCKE, V. CRUNELLI, P. FLECKNELL, B. G. FRENGUELLI, W. P. GRAY, R. KAMINSKI, A. PITKÄNEN, 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. *J Neurosci Methods* 260, 2-25

LIEW, W. S., M. SEERA, C. K. LOO, E. LIM u. N. KUBOTA (2016): Classifying Stress From Heart Rate Variability Using Salivary Biomarkers as Reference. *IEEE transactions on neural networks and learning systems* 27, 2035-2046

LIGHTMAN, S. L. (2008): The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 20, 880-884

LISTER, R. G. (1990): Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics* 46, 321-340

LIU, L. Y., D. S. GUO, X. Y. XIN u. J. FANG (2008): Observation of a system of linear loops formed by re-growing hairs on rat skin. *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 291, 858-868

LONG, J. A. u. H. M. EVANS (1922): The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. 6, 148

LORENZ, L. J., J. C. HALL u. M. ROSBASH (1989): Expression of a *Drosophila* mRNA is under circadian clock control during pupation. *Development (Cambridge, England)* 107, 869-880

LÖSCHER, W. (2002a): Animal models of drug-resistant epilepsy. In: *Novartis Foundation symposium*, 149-166

LÖSCHER, W. (2002b): 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

LÖSCHER, W. (2016): Fit for purpose application of currently existing animal models in the discovery of novel epilepsy therapies. *Epilepsy Res* 126, 157-184

LÖSCHER, 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. u. C. BRANDT (2010): Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacological reviews* 62, 668-700

LÖSCHER, W., H. KLITGAARD, R. E. TWYMAN u. D. SCHMIDT (2013): New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery* 12, 757-776

LÖSCHER, W. u. H. POTSCHKA (2005): Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6, 591-602

LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (1994): Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation? *Epilepsy Res* 17, 95-134

LÖSCHER, W. u. D. SCHMIDT (2011): Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52, 657-678

LOTUFO, P. A., L. VALIENGO, I. M. BENSENOR u. A. R. BRUNONI (2012): A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs. *Epilepsia* 53, 272-282

LUNA-MUNGUÍA, H., S. OROZCO-SUAREZ u. L. ROCHA (2011): Effects of high frequency electrical stimulation and R-verapamil on seizure susceptibility and glutamate and GABA release in a model of phenytoin-resistant seizures. *Neuropharmacology* 61, 807-814

MADSEN, H. B. u. S. H. AHMED (2015): Drug versus sweet reward: greater attraction to

and preference for sweet versus drug cues. *Addict Biol* 20, 433-444

MAGUIRE, M. J., C. F. JACKSON, A. G. MARSON u. S. J. NOLAN (2016): Treatments for the prevention of Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP). The Cochrane database of systematic reviews 7, Cd011792

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

MAHL, A., P. HEINING, P. ULRICH, J. JAKUBOWSKI, M. BOBADILLA, W. ZELLER, R. BERGMANN, T. SINGER u. L. MEISTER (2000): Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein. *Lab Anim* 34, 351-361

MALISCH, J. L., C. W. BREUNER, F. R. GOMES, M. A. CHAPPELL u. T. GARLAND (2008): Circadian pattern of total and free corticosterone concentrations, corticosteroid-binding globulin, and physical activity in mice selectively bred for high voluntary wheel-running behavior. *General and comparative endocrinology* 156, 210-217

MAMALYGA, M. L. (2013): Heart rate regulation at different levels of convulsive readiness. *Bulletin of experimental biology and medicine* 155, 425-428

MARTINOWICH, K. u. B. LU (2008): Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 33, 73-83

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, A., D. SHIN, S. AUVIN, R. CAPLAN u. R. SANKAR (2007): Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav* 10, 377-383

MAZARATI, A., 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. *Neurobiol Dis* 34, 457-461

MAZARATI, A., P. SIDDARTH, R. A. 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

MCEWEN, B. S. (1998): Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 840, 33-44

MEDEL-MATUS, J. S., D. SHIN, R. SANKAR u. A. MAZARATI (2017): Kindling epileptogenesis and panic-like behavior: Their bidirectional connection and contribution to epilepsy-associated depression. *Epilepsy Behav* 77, 33-38

MEERLO, P., G. J. OVERKAMP, S. DAAN, R. H. VAN DEN HOOFDAKKER u. J. M. KOOLHAAS (1996): Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 1, 21-32

MEERLO, P., A. SGOIFO, S. F. DE BOER u. J. M. KOOLHAAS (1999): Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behavioral neuroscience* 113, 1283-1290

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

MONTGOMERY, K. C. u. J. A. MONKMAN (1955): The relation between fear and exploratory behavior. *Journal of comparative and physiological psychology* 48, 132-136

MORALES, J. C., C. ALVAREZ-FERRADAS, M. RONCAGLIOLO, M. FUENZALIDA, M. WELLMANN, F. J. NUALART u. C. BONANSCO (2014): A new rapid kindling variant for induction of cortical epileptogenesis in freely moving rats. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 200

MORIN, L. P. (2013): Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Exp Neurol* 243, 4-20

MOSHÉ, S. L., E. PERUCCA, P. RYVLIN u. T. TOMSON (2015): Epilepsy: new advances. *The Lancet* 385, 884-898

MOSTL, E. u. R. PALME (2002): Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology* 23, 67-74

MYERS, B., J. M. MCKLVEEN u. J. P. HERMAN (2012): Neural Regulation of the Stress Response: The Many Faces of Feedback. *Cellular and molecular neurobiology* 32, 683-694

NAERT, G., C. ZUSSY, C. TRAN VAN BA, N. CHEVALLIER, Y. P. TANG, T. MAURICE u. L. GIVALOIS (2015): Involvement of Endogenous Brain-Derived Neurotrophic Factor in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *J Neuroendocrinol* 27, 850-860

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

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

NEGUS, S. S., B. NEDDENRIEP, A. A. ALTARIFI, F. I. CARROLL, M. D. LEITL u. L. L. MILLER (2015): Effects of ketoprofen, morphine, and kappa opioids on pain-related depression of nesting in mice. *Pain* 156, 1153-1160

NGUGI, A. K., C. BOTTOMLEY, I. KLEINSCHMIDT, J. W. SANDER u. C. R. NEWTON (2010): Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. *Epilepsia* 51, 883-890

NICHOLSON, A., R. D. MALCOLM, P. L. RUSS, K. COUGH, C. TOUMA, R. PALME u. M. V. WILES (2009): The response of C57BL/6J and BALB/cJ mice to increased housing density. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 48, 740-753

NISHI, D., K. HASHIMOTO, H. NOGUCHI, Y. KIM u. Y. MATSUOKA (2015): Serum oxytocin, posttraumatic coping and C-reactive protein in motor vehicle accident survivors by gender. *Neuropsychobiology* 71, 196-201

NORMANDEAU, C. P., A. P. VENTURA-SILVA, E. R. HAWKEN, S. ANGELIS, C. SJAARDA, X. LIU, J. M. PEGO u. E. C. DUMONT (2017): A Key Role for Neurotensin in Chronic-Stress-Induced Anxiety-Like Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 43, 285-293

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

O'BRIEN, F. E., T. G. DINAN, B. T. GRIFFIN u. J. F. CRYAN (2012): Interactions between antidepressants and P-glycoprotein at the blood–brain barrier: clinical significance of in vitro and in vivo findings. *Br J Pharmacol* 165, 289-312

ONDREJCAKOVA, M., J. BAKOS, A. GARAFOVA, L. KOVACS, R. KVETNANSKY u. D. JEZOVA (2010): Neuroendocrine and cardiovascular parameters during simulation of stress-induced rise in circulating oxytocin in the rat. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 13, 314-322

ONGERTH, T., V. RUSSMANN, S. FISCHBORN, K. BOES, C. SIEGL u. H. POTSCHKA (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. *Eur J Pharmacol* 740, 72-80

OPHERK, C., J. COROMILAS u. L. J. HIRSCH (2002): Heart rate and EKG changes in 102 seizures: analysis of influencing factors. *Epilepsy Research* 52, 117-127

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. *The Veterinary record* 177, 306-315

PANSANI, A. P., D. B. COLUGNATI, G. H. SCHOORLEMMER, E. Y. SONODA, E. A. CAVALHEIRO, R. M. ARIDA, F. A. SCORZA u. S. L. CRAVO (2011): Repeated amygdala-kindled seizures induce ictal rebound tachycardia in rats. *Epilepsy Behav* 22, 442-449

PAPALE, L. A., M. L. ANDERSEN, I. B. ANTUNES, T. A. ALVARENGA u. S. TUFIK (2005): Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain research* 1060, 47-54

PAPE, H. C. u. D. PARE (2010): Plastic Synaptic Networks of the Amygdala for the Acquisition, Expression, and Extinction of Conditioned Fear. *Physiological reviews* 90, 419-463

PAXINOS, G. u. C. WATSON (2005): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney

PEKCEC, A., M. MUHLENHOFF, R. GERARDY-SCHAHN u. H. POTSCHKA (2007): Impact of the PSA-NCAM system on pathophysiology in a chronic rodent model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 27, 54-66

PERSSON, H., E. KUMLIEN, M. ERICSON u. T. TOMSON (2007): Circadian variation in heart-rate variability in localization-related epilepsy. *Epilepsia* 48, 917-922

PERUCCA, E., J. FRENCH u. M. BIALER (2007): Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *The Lancet. Neurology* 6, 793-804

PIJLMAN, F. T., G. WOLTERINK u. J. M. VAN REE (2003): Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. *Behav Brain Res* 139, 131-138

PITKÄNEN, A. u. K. LUKASIUK (2009): Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. *Epilepsy Behav* 14 Suppl 1, 16-25

PITKÄNEN, A., K. LUKASIUK, F. E. DUDEK u. K. J. STALEY (2015): *Epileptogenesis*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 5, a022822

POHLMANN-EDEN, B., A. ALDENKAMP, G. A. BAKER, C. BRANDT, F. CENDES, R. CORAS, C. E. CROCKER, C. HELMSTAEDTER, M. JONES-GOTMAN, A. M. KANNER, A. MAZARATI, M. MULA, M. L. SMITH, A. OMISADE, J. TELLEZ-ZENTENO u. B. P.

HERMANN (2015): The relevance of neuropsychiatric symptoms and cognitive problems in new-onset epilepsy - Current knowledge and understanding. *Epilepsy Behav* 51, 199-209

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. (2000): Circadian rhythms: interactions with seizures and epilepsy. *Epilepsy Res* 42, 43-55

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

QUIRCE, C. M., M. ODIO u. J. M. SOLANO (1981): The effects of predictable and unpredictable schedules of physical restraint upon rats. *Life sciences* 28, 1897-1902

RACINE, R. J. (1972): Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 32, 281-294

RAMADAN, M., N. EL-SHAHAT, A. A. OMAR, M. GOMAA, T. BELAL, S. A. SAKR, M. ABU-HEGAZY, H. HAKIM, H. A. SELIM u. S. OMAR (2013): Interictal electrocardiographic and echocardiographic changes in patients with generalized tonic-clonic seizures. *International heart journal* 54, 171-175

RAS, T., M. VAN DE VEN, E. G. PATTERSON-KANE u. K. NELSON (2002): Rats' preferences for corn versus wood-based bedding and nesting materials. *Lab Anim* 36, 420-425

ROCHE (2008): Creatin Kinase Liquid Reagent. COBAS INTEGRA 400/800 Product Information, Mannheim: Roche Diagnostics

ROCK, M. L., A. Z. KARAS, K. B. RODRIGUEZ, M. S. GALLO, K. PRITCHETT-CORNING, R. H. KARAS, M. ARONOVITZ u. B. N. GASKILL (2014): The time-to-integrate-to-nest test as an indicator of wellbeing in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53, 24-28



RODGERS, R. J. u. A. DALVI (1997): Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 21, 801-810

ROGAWSKI, M. A. (2006): Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 68, 22-28

RONKAINEN, E., H. ANSAKORPI, H. V. HUIKURI, V. V. MYLLYLA, J. I. ISOJARVI u. J. T. KORPELAINEN (2005): Suppressed circadian heart rate dynamics in temporal lobe epilepsy. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 76, 1382-1386

ROPER, T., T. JACKSON, L. CONRADT u. N. BENNETT (2002): Burrow use and the influence of ectoparasites in Brants' whistling rat *Parotomys brantsii*. *Ethology* 108, 557-564

RUIZ-SALINAS, I., L. ROCHA, B. A. MARICHAL-CANCINO u. C. M. VILLALON (2016): Cardiovascular Alterations during the Interictal Period in Awake and Pithed Amygdala-Kindled Rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 119, 165-172

RUSSELL, E., G. KOREN, M. RIEDER u. S. VAN UUM (2012): Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 37, 589-601

RUSSELL, W. M. S. u. R. L. BURCH (1959): *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, London

RUSSMANN, V., J. D. SALVAMOSER, M. L. RETTENBECK, T. KOMORI u. H. POTSCHKA (2016): Synergism of perampanel and zonisamide in the rat amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 57, 638-647

RUTTEN, K., A. ROBENS, S. J. READ u. T. CHRISTOPH (2014a): Pharmacological validation of a refined burrowing paradigm for prediction of analgesic efficacy in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 18, 213-222

RUTTEN, K., K. SCHIENE, A. ROBENS, A. LEIPELT, T. PASQUALON, S. J. READ u. T. CHRISTOPH (2014b): Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 18, 204-212

SALUM, C., S. MORATO u. A. C. ROQUE-DA-SILVA (2000): Anxiety-like behavior in rats: a computational model. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society* 13, 21-29

SAMMITO, S. u. I. BÖCKELMANN (2015): Analyse der Herzfrequenzvariabilität. *Herz* 40, 76-84

SANDERCOCK, G. R. u. D. A. BRODIE (2006): The role of heart rate variability in prognosis for different modes of death in chronic heart failure. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* 29, 892-904

SANKAR, R. u. A. MAZARATI (2012): *Neurobiology of Depression as a Comorbidity of Epilepsy*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda

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

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990): Kindling: basic mechanisms and clinical validity. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 76, 459-472

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

SCHULZE-BONHAGE, A. u. A. KÜHN (2008): *Unpredictability of Seizures and the Burden of Epilepsy*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim

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. *FASEB J* 29, 859-867

SEEGER, N., C. ZELLINGER, A. RODE, F. ROLOFF, G. BICKER, V. RUSSMANN, S. FISCHBORN, H. WENDT u. H. POTSCSKA (2011): The erythropoietin-derived peptide

mimetic pHBSA affects cellular and cognitive consequences in a rat post-status epilepticus model. *Epilepsia* 52, 2333-2343

SELYE, H. (1973): The evolution of the stress concept. *American scientist* 61, 692-699

SELYE, H. (1975): Stress and distress. *Comprehensive therapy* 1, 9-13

SELYE, H. (1998): A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 10, 230-231

SELYE, H. u. C. 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. *Exp Neurol* 241, 38-44

SEVCENCU, C. u. J. J. STRUIJK (2010): Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy. *Epilepsia* 51, 725-737

SGOIFO, A., C. POZZATO, P. MEERLO, T. COSTOLI, M. MANGHI, D. STILLI, G. OLIVETTI u. E. MUSSO (2002): Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 5, 23-35

SHORVON, S. (2010): *Handbook of epilepsy treatment*. John Wiley & Sons, Oxford

SILBERNAGL, S. u. A. DESPOPOULOS (2012): *Taschenatlas Physiologie*. Thieme, Ludwigsburg

SMITH BAILEY, K. u. C. W. DEWEY (2009): The seizing cat. Diagnostic work-up and therapy. *Journal of feline medicine and surgery* 11, 385-394

SOLLARS, P. J. u. G. E. PICKARD (2015): *The Neurobiology of Circadian Rhythms*. The

Psychiatric clinics of North America 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. MCDUGALL, 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. *Mol 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. Biomedical engineering* 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 of the United States of America* 69, 1583-1586

STOCKARD, C. R. u. G. N. PAPANICOLAOU (1917): A RHYTHMICAL "HEAT PERIOD" IN THE GUINEA-PIG. *Science (New York, N.Y.)* 46, 42-44

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): Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93, 1043-1065

TAYLOR, G. T. (1981): Fear and affiliation in domesticated male rats. *Journal of comparative and physiological psychology* 95, 685

TAYLOR, S. E. (2006): Tend and befriend: Biobehavioral bases of affiliation under stress. *Current directions in psychological science* 15, 273-277

TEBARTZ VAN ELST, L., D. BAEUMER, L. LEMIEUX, F. G. WOERMANN, M. KOEPP, S. KRISHNAMOORTHY, P. J. THOMPSON, D. EBERT u. M. R. TRIMBLE (2002): Amygdala

pathology in psychosis of epilepsy: A magnetic resonance imaging study in patients with temporal lobe epilepsy. *Brain* 125, 140-149

TELLEZ-ZENTENO, J. F., S. B. PATTEN, N. JETTE, J. WILLIAMS u. S. WIEBE (2007): Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 48, 2336-2344

THAYER, J. F., A. L. HANSEN, E. SAUS-ROSE u. B. H. JOHNSEN (2009): Heart rate variability, prefrontal neural function, and cognitive performance: the neurovisceral integration perspective on self-regulation, adaptation, and health. *Annals of behavioral medicine : a publication of the Society of Behavioral Medicine* 37, 141-153

THAYER, J. F. u. E. STERNBERG (2006): Beyond heart rate variability: vagal regulation of allostatic systems. *Ann N Y Acad Sci* 1088, 361-372

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

THOMAS, E. u. D. J. GUNTON (2011): Kindling of the lateral septum and the amygdala: effects on anxiety in rats. *Physiology & behavior* 104, 653-658

THURMAN, D. J., E. BEGHI, C. E. BEGLEY, A. T. BERG, J. R. BUCHHALTER, D. DING, D. C. HESDORFFER, W. A. HAUSER, L. KAZIS, R. KOBAYASHI, B. KRONER, D. LABINER, K. LIOW, G. LOGROSCINO, M. T. MEDINA, C. R. NEWTON, K. PARKO, A. PASCHAL, P. M. PREUX, J. W. SANDER, A. SELASSIE, W. THEODORE, T. TOMSON u. S. WIEBE (2011): Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. *Epilepsia* 52 Suppl 7, 2-26

TOMSON, T., L. NASHEF u. P. RYVLIN (2008): Sudden unexpected death in epilepsy: current knowledge and future directions. *The Lancet Neurology* 7, 1021-1031

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 (2017): Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala. *Journal of chemical neuroanatomy* 1,

<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.1012.1006>

TUUNANEN, J. u. A. PITKÄNEN (2000): Do seizures cause neuronal damage in rat amygdala kindling? *Epilepsy Res* 39, 171-176

UFAW (1989): Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. Potters Bar: Universities Federation for Animal Welfare., UK

UNTERBERGER, I., D. GABELIA, M. PRIESCHL, K. CHEA, M. HOFER, B. HÖGL, G. LUEF u. B. FRAUSCHER (2015): Sleep disorders and circadian rhythm in epilepsy revisited: a prospective controlled study. *Sleep Medicine* 16, 237-242

URIARTE, A. u. I. MAESTRO SAIZ (2016): Canine versus human epilepsy: are we up to date? *The Journal of small animal practice* 57, 115-121

VALENTE, K. D. u. G. BUSATTO FILHO (2013): Depression and temporal lobe epilepsy represent an epiphenomenon sharing similar neural networks: clinical and brain structural evidences. *Arq Neuropsiquiatr* 71, 183-190

VAN ACKER, S. A., K. KRAMER, E. E. VOEST, J. A. GRIMBERGEN, J. ZHANG, W. J. VAN DER VIJGH u. A. BAST (1996): Doxorubicin-induced cardiotoxicity monitored by ECG in freely moving mice. A new model to test potential protectors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 38, 95-101

VAN LOO, P. L. u. V. BAUMANS (2004): The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Lab Anim* 38, 17-24

VAN MILL, J. G., W. J. HOOGENDIJK, N. VOGELZANGS, R. VAN DYCK u. B. W. PENNINX (2010): Insomnia and sleep duration in a large cohort of patients with major depressive disorder and anxiety disorders. *The Journal of clinical psychiatry* 71, 239-246

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

VERVLIET, B. u. F. RAES (2013): Criteria of validity in experimental psychopathology: application to models of anxiety and depression. *Psychological medicine* 43, 2241-2244

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

WALKER, S. E., O. ZANOLETTI, I. GUILLOT DE SUDUIRAUT u. C. SANDI (2017): Constitutive differences in glucocorticoid responsiveness to stress are related to variation in aggression and anxiety-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology* 84, 1-10

WALL, P. M. u. C. MESSIER (2001): Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 25, 275-286

WALSH, P. T., E. MCCRELESS u. A. B. PEDERSEN (2013): Faecal avoidance and selective foraging: do wild mice have the luxury to avoid faeces? *Animal behaviour* 86, 559-566

WALSH, R. N. u. R. A. CUMMINS (1976): The Open-Field Test: a critical review. *Psychological bulletin* 83, 482-504

WEI, T. u. V. SIMKO (2016): corrplot: Visualization of a Correlation Matrix. R package version 0.77. CRAN, Vienna, Austria

WELLMER, J., F. VON DER GROEBEN, U. KLARMANN, C. WEBER, C. E. ELGER, H. URBACH, H. CLUSMANN u. M. VON LEHE (2012): Risks and benefits of invasive epilepsy surgery workup with implanted subdural and depth electrodes. *Epilepsia* 53, 1322-1332

WICKHAM, H. (2009): *Ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer, UK

WILSON, S. J. u. S. BAXENDALE (2014): The new approach to classification: rethinking cognition and behavior in epilepsy. *Epilepsy Behav* 41, 307-310

WINDLE, R. J., S. A. WOOD, Y. M. KERSHAW, S. L. LIGHTMAN, C. D. INGRAM u. M. S.

HARBUZ (2001): Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. *J Neuroendocrinol* 13, 905-911

WINDLE, R. J., S. A. WOOD, N. SHANKS, S. L. LIGHTMAN u. C. D. INGRAM (1998): Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139, 443-450

WOLFENSOHN, S., P. HAWKINS, E. LILLEY, D. ANTHONY, C. CHAMBERS, S. LANE, M. LAWTON, S. ROBINSON, H. M. VOIPIO u. G. WOODHALL (2013): Reducing suffering in animal models and procedures involving seizures, convulsions and epilepsy. *Journal of pharmacological and toxicological methods* 67, 9-15

YOSHIDA, M., Y. TAKAYANAGI u. T. ONAKA (2014): The medial amygdala-medullary PrRP-synthesizing neuron pathway mediates neuroendocrine responses to contextual conditioned fear in male rodents. *Endocrinology* 155, 2996-3004

YU, T., H. XU, W. WANG, S. LI, Z. CHEN u. H. DENG (2015): Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1002, 267-276

ZIMMERMANN, R., V. HULSMEYER, C. SAUTER-LOUIS u. A. FISCHER (2009): Status epilepticus and epileptic seizures in dogs. *Journal of veterinary internal medicine* 23, 970-976



## IX. ANHANG

### 1. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Cisco Small Business Switch	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Cobas Integra® 400 plus System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
EEG-Ableitungs- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München, 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® RC-M150GX“	Sorvall Products L.P., Newton, Connecticut, USA
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 (Light meter, MS 1300, Voltcraft®)	Conrad Electronic SE, Hirschau
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	VWR, Advanced
Matrix 2.0	Data Science 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, Deutschland
Personal Computer	Diverse
RapidVap	LABCONCO, Kansas City, MO, USA
Receiver-Platten RPC-1	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
REGLO Quick, Schlauchpumpe mit variabler Drehzahl	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
Thermo Savant SC110A mit SpeedVac System	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland
Thermo Savant SC210A Plus mit SpeedVac System	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland
Tierkäfige und Wasserflaschen	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Transmitter ETA-F10	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Stimulatoreinheit (HSE Type 215E12 SV1)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Switchbox (HSE Type 215E12)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Tischzentrifuge „Rotina 35R “	Fa. Hettlich, Tuttlingen, Deutschland
Unimax 1010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

## 2. Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
EEG Software (Labchart 7)	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
Ponemah® 5.20 und 6.30, Electrocardiogram Analysis Software Module v5.30	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  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (wasserfrei)
- 12,48 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 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
Diff-Quick® Schnellfärbeset	Medion Diagnostics, Düringen, Schweiz
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakura 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®)	Heraeus Kulzer, Hanau

### **ELISA-Kits**

Oxytocin ELISA kit, ADI-900-153A	Enzo Life Sciences, Lausen, Schweiz
Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922	Demeditec, Kiel, Deutschland,

## 4. Modifizierter Irwin Score

### Parameter des modifizierten Irwin Score

Nummer	Parameter	Score/ Beurteilung
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 +2 Angriffsverhalten

---

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 (=repetitive Verhaltensmuster)	0 keine Stereotypien +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. R-Skripte

### 5.1. Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse

```
# set seed for randomized data
```

```
set.seed(2)
```

```
# required packages, install missing ones when necessary
```

```
library("ggplot2")
```

```
library("corrplot")
```

```
library("caret")
```

```
library("made4") #installation instructions: http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/made4.html
```

```
## create dummy data set to use in the script
```

```
d <- data.frame(replicate(15, morm(15)) )
```

```
# add dummy variable names
```

```
names(d) <- LETTERS[1:15]

## create dummy groups

groups <- as.factor(rep(c("a", "b", "c"), each=5))

##### correlation matrix heatmap

# missing data was handled by using pairwise complete observation.

cormat <- round(cor(as.matrix(d), method="spearman", use="pairwise.complete.obs"), 2)

min(apply(d, 2, function(x){length(x[!is.na(x)])})) # minimum number of animals per correlation
max(apply(d, 2, function(x){length(x[!is.na(x)])})) # maximum number of animals per correlation

# plot of the correlation matrix

corrplot(cormat, type="upper", method="color", tl.col="black", tl.cex=0.8)

##### PCA

##### missing data in the PCA were replaced by the mean of the variable

for(i in 1:ncol(d)){
  d[is.na(d[,i]), i] <- mean(d[,i], na.rm = TRUE)
}

# data was preprocessed so that each variable is centered and scaled.

pre.proc <- preProcess(d, method=c("center", "scale"))

d <- predict(pre.proc, d)

# create PCA

d.ord <- ord(t(d), type="pca")

# plot the different PCA graphs

plot(d.ord, classvec=groups, axis1=1, axis2=2)

plotarrays(d.ord$dord$co, classvec=groups, axis1=1, axis2=2, ellipse=1)

## show a sorted list of variables contributing most to PC1
```

```
temp <- sqrt((d.ord$ord$1[,1:2])^2)
temp[order(temp[,1], decreasing = T),]

## test for significant differences between the groups
# along PC1:
temp <- cbind(d.ord$ord$c1, group=groups)
m1 <- aov(CS1~group, data=temp)
summary(m1)
TukeyHSD(m1)
# along PC2:
temp <- cbind(d.ord$ord$c1, group=groups)
m2 <- aov(CS2~group, data=temp)
summary(m2)
TukeyHSD(m2)

## look at relative variance explained by each principal component
cumsum(d.ord$ord$eig * 100/sum(d.ord$ord$eig))
d.ord$ord$eig * 100/sum(d.ord$ord$eig)
```

## 5.2. Aktivitäts- und Echokardiogrammanalyse

```
# load the needed packages used in the script
# packages need to be installed first, e.g.: install.packages("ggplot2")
library("ggplot2")
library("gridExtra")
library("reshape2")

#####

# a custom theme for the graphs made using ggplot2
# it changes the lines, background and the margin sizes
# not necessary for running the script
```

```
theme_new <- function(){
  theme_bw() %+replace%
  theme(axis.line = element_line(colour = "black"),
        panel.grid.major = element_blank(),
        panel.grid.minor = element_blank(),
        legend.key = element_blank(),
        strip.background = element_blank(),
        strip.text.x = element_blank(),
        plot.margin=margin(10,10,10,50))
}

#####
#####
##### line graph

# create dummy data to use in the script
d <- data.frame(Naiv=rnorm(800, mean=15, sd=3),Sham=rnorm(800, mean=15, sd=3),Kindling=rnorm(800, mean=20, sd=3))

# create two temporary data frames which are used to add
# the appropriate number of rows which correspond to the
# time period of kindling, each row represent 5 minutes

temp <- data.frame(matrix(ncol = 3, nrow = 24)) # 24 rows = 2 hours
names(temp) <- names(d)

temp2 <- data.frame(matrix(ncol = 3, nrow = 22))
names(temp2) <- names(d)

# combine the empty kindling periods to the data
# at the correct time periods
d <- rbind(d[1:267,],
          temp,
```

```

d[268:530,],

temp2,

d[531:NROW(d,)]

# add a column which counts the number of 5 minute blocks

# (used later in the graphs as the x-axis)

d$min_5 <- as.numeric(1:NROW(d))

# "melt" the data so the data frame is transformed from a

# wide shape to a long shape

d <- melt(d, measure.vars=c("Naiv", "Sham", "Kindling"), variable.name = "group", value.name = "activity")

# run the plot and store as "p1"

p1 <- ggplot(d, aes(x=min_5, y=activity, colour=group))+

  geom_rect(aes(xmin = 34, xmax = 178, ymin = -Inf, ymax = Inf), # create three grey rectangles to indicate the night periods

    fill = "grey", colour="grey", alpha = 0.01)+

  geom_rect(aes(xmin = 324, xmax = 468, ymin = -Inf, ymax = Inf),

    fill = "grey", colour="grey", alpha = 0.01)+

  geom_rect(aes(xmin = 614, xmax = 758, ymin = -Inf, ymax = Inf),

    fill = "grey", colour="grey", alpha = 0.01)+

  geom_smooth(alpha=0.25, span = 0.15, method="loess")+ # create the LOESS regression lines

  scale_x_continuous(breaks = c(34,178,324,468,614,758), label =

c("6:00pm", "6:00am", "6:00pm", "6:00am", "6:00pm", "6:00am"))+ # add x axis labels at the appropriate times

  geom_rect(aes(xmin = 268, xmax = 292, ymin = -Inf, ymax = Inf), # create two rectangles to indicate the time of kindling

    fill = "white", colour="grey")+

  geom_rect(aes(xmin = 552, xmax = 574, ymin = -Inf, ymax = Inf),

    fill = "white", colour="grey")+

  annotate(geom = "text", x = 280, y = median(d$activity, na.rm=T), label = "Kindling", color = "black", # add lables to the

  kindling rectangles

    angle = 90, size=6.5)+

  annotate(geom = "text", x = 563, y = median(d$activity, na.rm=T), label = "Kindling", color = "black",

    angle = 90, size=6.5)+

  scale_color_manual(values=c('red', 'blue', 'black'))+ # change colours of the lines

  theme_new()+ # apply the custom theme

```

```
labs(x="", y="dummy variable")+ # add labels

theme(legend.position="none") # remove the legend

#####

#####

##### boxplot graphs

# the boxplots are made using seperate data

# here the mean is calculated for specific periods of interest

d2 <- data.frame(group=rep(c("Kindling","Naive","Sham"), each=6),
  night1=rnorm(18, mean=10, sd=3),
  day1=rnorm(18, mean=15, sd=3),
  night2=rnorm(18, mean=10, sd=3),
  day2=rnorm(18, mean=15, sd=3),
  night3=rnorm(18, mean=10, sd=3))

# melt data from wide to long form

d2 <- melt(d2, value.name = "value", variable.name = "time")

#relabel the night and day periods

levels(d2$time) <- c("Night 1","Day 1","Night 2","Day 2","Night 3")

d2[d2[, "time"] %in% c("Night 1","Night 2","Night 3"),"grey"] <- TRUE
d2[d2[, "time"] %in% c("Day 1","Day 2"),"grey"] <- FALSE

d2$group <- factor(d2$group, levels = c("Naive","Sham","Kindling"))

p2 <- ggplot(d2, aes(x=time, y=value, colour=group))+
  geom_boxplot()+
  facet_wrap(~time, scales="free_x", ncol=5)+
```

```
theme_new()+

geom_rect(data = d2, aes(fill = grey), xmin = -Inf, xmax = Inf, ymin = -Inf, ymax = Inf, alpha = 0.01, colour="grey", show.legend
= F)+

scale_fill_manual(values=c("white", "grey"))+

scale_color_manual(values=c('red', 'blue', 'black'))+

labs(x="", y="dummy variable")

#####

#####

##### combine graphs

grid.arrange(p1,p2,ncol=2)
```

## X. DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Bereitstellung dieses äußerst wichtigen und spannenden Themas. Durch ihre fachliche Kompetenz und das in mich gesetzte Vertrauen konnte ich dieses Projekt erfolgreich umsetzen. Die wissenschaftlichen Diskussionen haben sowohl zu meiner fachlichen, wie auch zu meiner persönlichen Entwicklung maßgeblich beigetragen.

Der DFG-Forschergruppe FOR 2591 danke ich für die spannenden Diskussionen und Anregungen zum Thema Belastungseinstufung auf den Gruppentreffen. Weiterhin danke ich der DFG für die finanzielle Unterstützung. Meinen Kooperationspartnern Prof. Palme (Vetmed Uni Wien), Prof. Gass (ZI Mannheim), Prof. Hellweg (Charité Berlin) und Prof. Kirschbaum (Dresden LabService) danke ich für die Übernahme einiger Probenanalysen.

Dem gesamten Team der Pharmakologie möchte ich für die spannende Zeit und die gute Gemeinschaft danken. Dr. Vera Bierling danke ich für Einarbeitung in den Themenbereich, ihre Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und ihr offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Meinen Mitdoktoranden Dr. Michael Keck und Dr. Fabio Wolf danke ich dafür, dass sie mir bei der Durchführung meiner Versuche und in jeder Lebenslage zur Seite standen, mich aufbauten und dafür sorgten, dass mir meine Doktorandenzeit in guter Erinnerung bleiben wird. Dr. Vera Bierling und Dr. Michael Keck danke ich insbesondere für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Dr. Valentina di Liberto, Dr. Maarten van Dijk, Dr. Eva-Lotta von Rüden, Dr. Josephine Salvamoser, Nina Milianovic, Isabel Seiffert und Ines Koska danke ich für die fachliche und menschliche Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit in verschiedenen Projekten. Meiner Studentin Katharina Schönhoff danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Datenauswertung und die zahlreichen persönlichen Ratschläge. An dieser Stelle möchte ich mich weiterhin ganz herzlich bei Sarah Driebusch, Sieglinde Fischlein, Claudia Siegl, Grazyna Langer, Tamara Lindemann, Carmen Meyer, Regina Rentsch, Sabine Sass, Isabella Waclawczyk und Manfred und Andreas Kutschka für die großartige technische Unterstützung bedanken, ohne die die Durchführung dieses Projekts nicht möglich gewesen wäre. Für die Betreuung meiner Tiere möchte ich Sabine Vican, Katharina Gabriel und Uwe Birett danken.

Zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie, die mich stets aus vollem Herzen unterstützt. Meine Eltern und meine Schwester geben mir Rückhalt, Vertrauen und Sicherheit. Danke, dass ich immer auf euch zählen kann. Till und Titi danke ich für ihre Geduld und fortwährende Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit. Danke, dass ich euch an meiner Seite habe.

Meinen Versuchstieren.