

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von  
Epilepsiemodellen:  
Untersuchungen in einem  
chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell bei Ratten**

von

Ines Koska

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

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung  
von Epilepsiemodellen:  
Untersuchungen in einem  
chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell bei Ratten**

von

Ines Koska

aus Bad Friedrichshall

München 2019

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: Univ.-Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion:

27.07.2019

*„Diejenigen, die [...] an Tieren experimentieren  
[...], sollen niemals den inneren Vorwurf beruhigen [...].*

*Sie müssen zuerst,  
in jedem einzelnen Fall, überlegt haben,  
ob eine Notwendigkeit besteht,  
einem Tier das Opfer zuzumuten  
zum Vorteil der Menschheit.  
Und sie müssen die größte Sorge tragen,  
soweit wie möglich  
den zugefügten Schmerz zu mildern.“*

*Albert Schweitzer (1875 – 1965)*

*Für meine Eltern*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Epilepsien .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Definition und Bedeutung .....	2
1.2.	Klassifizierung .....	3
1.3.	Relevanz von Tiermodellen in der Epilepsieforschung.....	4
1.4.	Post-Status-Epilepticus-Modelle .....	6
1.5.	Amygdala-Kindling-Modell .....	9
<b>2.</b>	<b>Belastungseinschätzung in Tierversuchen .....</b>	<b>10</b>
2.1.	Ethik bei Tierversuchen .....	10
2.2.	Stress .....	12
<b>3.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>14</b>
3.1.	Heimkäfigverhalten.....	15
3.2.	Soziale Interaktionen .....	17
3.3.	Wühlverhalten.....	18
3.4.	Open-Field.....	19
3.5.	Black-White-Box .....	20
3.6.	Elevated-Plus-Maze.....	21
3.7.	Saccharin-Präferenz .....	22
3.8.	Grimace-Scale.....	23
3.9.	Irwin-Score .....	24
<b>4.</b>	<b>Biochemische Parameter .....</b>	<b>25</b>
4.1.	Corticosteron und seine Metaboliten.....	25
4.2.	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor .....	27
4.3.	Creatinkinase.....	28
<b>5.</b>	<b>(Patho-)physiologische Parameter .....</b>	<b>28</b>
5.1.	Sexualzyklus.....	28
5.2.	Herzfrequenz und Herzratenvariabilität.....	29
<b>III.</b>	<b>ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>34</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>Elektrodenimplantation.....</b>	<b>36</b>

---

<b>3.</b>	<b>Telemetriemessungen.....</b>	<b>37</b>
3.1.	Transmitterimplantation .....	37
3.2.	Datenaufzeichnung.....	39
3.3.	Datenauswertung .....	39
<b>4.</b>	<b>Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell .....</b>	<b>41</b>
4.1.	Induktion eines Status epilepticus.....	41
4.2.	Video- und EEG-Monitoring.....	44
<b>5.</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen .....</b>	<b>44</b>
5.1.	Heimkäfigverhalten.....	45
5.2.	Soziale Interaktionen .....	46
5.3.	Wühlverhalten.....	47
5.4.	Lokomotion.....	48
5.5.	Angstassoziiertes Verhalten .....	48
5.6.	Anhedonie-ähnliches Verhalten .....	49
<b>6.</b>	<b>Biochemische Parameter.....</b>	<b>50</b>
6.1.	Corticosteron im Haar.....	50
6.2.	Corticosteron im Serum .....	51
6.3.	Corticosteronmetaboliten im Kot.....	53
6.4.	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor im Serum.....	53
6.5.	Creatinkinase im Serum .....	54
6.6.	Vaginalzytologie .....	55
<b>7.</b>	<b>Auswertung und Statistik .....</b>	<b>55</b>
<b>V.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>57</b>
<b>1.</b>	<b>Anfallsfrequenz und -dauer .....</b>	<b>57</b>
1.1.	Post-Insult-Phase und Latenzphase .....	57
1.2.	Chronische Phase .....	57
<b>2.</b>	<b>Verhaltensparameter.....</b>	<b>58</b>
2.1.	Heimkäfigverhalten.....	58
2.2.	Soziale Interaktionen .....	65
2.3.	Wühlverhalten.....	66
2.4.	Lokomotion.....	71
2.5.	Angstassoziiertes Verhalten .....	76
2.6.	Anhedonie-ähnliches Verhalten .....	80
2.7.	Rat-Grimace-Scale und Irwin-Score .....	81
<b>3.</b>	<b>Biochemische Parameter.....</b>	<b>83</b>

---

3.1.	Corticosteron im Haar .....	84
3.2.	Corticosteron im Serum .....	84
3.3.	Corticosteronmetaboliten im Kot .....	85
3.4.	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor .....	87
3.5.	Creatinkinase.....	87
<b>4.</b>	<b>(Patho-)physiologische Parameter.....</b>	<b>88</b>
4.1.	Sexualzyklus.....	88
4.2.	Gewichtsverlauf .....	89
4.3.	Herzfrequenz.....	89
4.4.	Herzratenvariabilität.....	91
<b>5.</b>	<b>Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse .....</b>	<b>96</b>
5.1.	Korrelationsmatrix.....	96
5.2.	Hauptkomponentenanalyse .....	111
<b>VI.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>113</b>
<b>1.</b>	<b>Belastungseinschätzung der experimentellen Prozeduren.....</b>	<b>114</b>
<b>2.</b>	<b>Belastungseinschätzung in der Latenzphase .....</b>	<b>122</b>
<b>3.</b>	<b>Belastungseinschätzung in der chronischen Phase .....</b>	<b>126</b>
<b>4.</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>133</b>
<b>5.</b>	<b>Grenzen der Belastungsbeurteilung und Ausblick.....</b>	<b>134</b>
<b>VII.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>137</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>139</b>
<b>IX.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>141</b>
<b>X.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>175</b>
<b>1.</b>	<b>Geräte.....</b>	<b>175</b>
<b>2.</b>	<b>Software .....</b>	<b>176</b>
<b>3.</b>	<b>Lösungen, Medikamente und Substanzen.....</b>	<b>177</b>
<b>4.</b>	<b>Modifizierter Irwin-Score.....</b>	<b>180</b>
<b>XI.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>184</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>	mg	Milligramm
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	MGS	<i>Mouse-Grimace-Scale</i>
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit- Hyperaktivitäts-Syndrom	ml	Milliliter
AED	<i>Antiepileptic Drugs</i>	ms	Millisekunde
ANOVA	Varianzanalyse	n	Stichprobenumfang
ap	anterior-posterior	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
BDNF	<i>Brain-Derived- Neurotrophic-Factor</i>	nm	Nanometer
BLA	basolaterale Amygdala	nn9	zeitbezogener HRV-Parameter
bpm	<i>Beats per Minute</i> (Schläge pro Minute)	OF	<i>Open-Field</i>
CRH	Corticotropin-Releasing- Hormon	OP	Operation
dv	dorso-ventral	p	Signifikanzniveau
EEG	Elektroenzephalogramm	PCA	<i>Principal-Component- Analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
EKG	Elektrokardiogramm	pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
ELISA	<i>Enzym-linked-Immuno- sorbent-Assay</i>	p.o.	per os
FCM	fäkale Corticosteronmetaboliten	PVN	paraventriculärer Nukleus
GABA	gamma-Aminobuttersäure	RGS	<i>Rat-Grimace-Scale</i>
GR und MR	Gluco-/Mineralcorticoid- Rezeptor	RMSSD	zeitbezogener HRV-Parameter
HF	Herzfrequenz	rpm	Revolutions per Minute (Umdrehungen pro Minute)
HC	Hippocampus	s.c.	subkutan
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse	SD	<i>Standard Deviation</i> (Standardabweichung)
HRV	Herzratenvariabilität	SDNN	zeitbezogener HRV-Parameter
i.p.	Intraperitoneal	SE	Status epilepticus
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie	SUDEP	<i>Sudden unexpected death in epilepsy</i> (Plötzlicher unerwarteter Tod bei Epilepsiepatienten)
kS/s	Abtastrate ( <i>kilo samples per second</i> ) <i>Liquid chromatography</i>	TierSchG	Tierschutzgesetz
LC-MS	<i>tandem mass spectrometry</i>	TierSch- VersV	Tierschutz- Versuchstierverordnung
LF/HF	Frequenzbezogener HRV-Parameter	TLE	Temporallappenepilepsie

## I. EINLEITUNG

In Artikel 20a des Grundgesetzes ist der Tierschutz als Staatsziel festgelegt. Die Umsetzung dieses Staatsziels erfolgt dadurch, dass die Tiere durch besondere Gesetze geschützt werden, wie im Bürgerlichen Gesetzbuch § 90a beschrieben. Dabei kommt dem Tierarzt eine besondere Rolle zu. Er ist laut der Berufsordnung für Tierärzte in Bayern „der berufene Schützer der Tiere“. Ihm wird somit eine besondere Befähigung zugeteilt, Tiere zu schützen. Im Bereich der Versuchstierkunde gibt es Gesetze und Richtlinien, die dem Schutz dieser Tiere dienen. Auf EU-Ebene beinhaltet dies die Richtlinie 2010/63/EU. Darin wird den Versuchstieren ein „möglichst hohes Schutzniveau“ zugesprochen. Wenn es nicht möglich ist, einen Tierversuch durch Alternativmethoden zu ersetzen, so müssen sowohl die Tierart, als auch die verwendeten Methoden so gewählt werden, dass für die Tiere „am wenigsten Schmerzen, Leiden oder Ängste“ entstehen. Im Gegensatz zum Tierschutzgesetz, in dem ein „vernünftiger Grund“ gegeben sein muss, um einem Tier „Schmerzen, Leiden oder Schäden“ zufügen zu dürfen, berücksichtigt die Richtlinie 2010/63/EU zusätzlich auch die Ängste der Tiere. Um gewährleisten zu können, dass in der Umsetzung wirklich ausschließlich Methoden im Tierversuch angewandt werden, die ein Minimum an „Schmerzen, Leiden, Ängsten und dauerhaften Schäden“ induzieren, werden geeignete Parameter benötigt, die für eine Quantifizierung des Schweregrads der Belastung für die Tiere geeignet sind. In der Richtlinie 2010/63/EU ist diese Einstufung des Schweregrades vorgesehen und festgelegt. Dabei wird der Schweregrad in verschiedene Kategorien eingeteilt. Man unterscheidet zwischen „keiner Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“, „mittel“ und „schwer“. Die vorliegende Studie soll dazu dienen, in einem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell geeignete Parameter zu identifizieren und zu validieren, die für eine Belastungseinstufung geeignet sind. Anhand dieser Parameter soll eine wissenschaftlich-basierte Belastungseinstufung in diesem Tiermodell ermöglicht werden, die eine empirische Einschätzung der Belastung ablösen soll. Darüber hinaus soll anhand dieser Studie ermöglicht werden, dieses Post-Status-Epilepticus-Modell mit anderen Epilepsiemodellen zu vergleichen. Anschließend soll eine Priorisierung der verschiedenen Modelle durchgeführt werden. Diese Priorisierung der Modelle soll als Basis dafür dienen, über die Legitimation der Anwendung eines der Modelle, unter Berücksichtigung der zu untersuchenden Fragestellung, zu entscheiden. Darüber hinaus sollen die identifizierten und validierten Parameter dazu dienen, zukünftige *Refinement*-Maßnahmen zu evaluieren. Erst dann kann die Effektivität dieser *Refinement*-Maßnahmen, bezüglich der Steigerung des Tierwohls, bestätigt werden.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Epilepsien

#### 1.1. Definition und Bedeutung

Der Begriff der Epilepsie stammt von dem altgriechischen Begriff „epilepsis“, was „Angriff“, „Überfall“ bedeutet. Es beschreibt somit sehr bildhaft, wie sich die Epilepsie beziehungsweise die damit assoziierten Anfälle darstellen können. Weltweit sind ca. 0,8 % der Bevölkerung vom Krankheitsbild der Epilepsie betroffen (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008), wobei ca. 90 % der Betroffenen in Entwicklungsländern leben. In der Tiermedizin wurde das Krankheitsbild der Epilepsie ebenfalls beschrieben. Mit einer Prävalenz von 0,5 – 0,75 % sind am häufigsten Hunde betroffen sind (KEARSLEY-FLEET et al. 2013; HESKE et al. 2014). Dadurch bedingt ist die steigende Anzahl an Arzneimittelzulassungen für antiepileptische Wirkstoffe für Hunde (BHATTI et al. 2015).

Der epileptische Anfall ist gekennzeichnet durch unphysiologische und exzessive oder synchrone neuronale Entladung im Gehirn (FISHER et al. 2017). Außerdem definiert FISHER et al. (2014) die Epilepsieerkrankung dann als gegeben, wenn

- zwei nicht provozierte Anfälle innerhalb von 24 Stunden auftreten,
- ein nicht provozierter Anfall auftritt und die Wahrscheinlichkeit besteht, dass weitere Anfälle auftreten können,
- die Diagnose gestellt wird, dass ein epileptisches Syndrom vorliegt.

Die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy* (ILAE)) definiert das Vorliegen einer Epilepsie, wenn ein nicht provozierter Anfall auftritt, der mit dem Risiko wiederkehrender Anfälle in einem Zeitraum von zehn Jahren einhergeht (BERETTA et al. 2017). Eine Epilepsie gilt dann als überstanden, wenn der Patient zehn Jahre keine Anfälle zeigt und seit mindestens fünf Jahren keine Antiepileptika einnimmt (FISHER et al. 2014). Bedingt durch den aktuellen Stand der Forschung gibt es diverse Möglichkeiten die Epilepsie zu therapieren. Hierbei ist das Ziel eine Anfallsfreiheit zu erreichen. In der tiermedizinischen Praxis ist dieses Ziel jedoch bislang schwierig bis kaum umsetzbar. Es wird versucht, eine Reduktion in der Anfallsfrequenz, dem Schweregrad und der Dauer der Anfälle zu erzielen (BHATTI et al. 2015). Ausschlaggebend für die Wahl der Therapie ist die klassifizierte Form der Epilepsie (FISHER et al. 2017). Ein Konzept zur Behandlung stellt die Pharmakotherapie dar, bei der direkt im Gehirn die neurotransmitter-ausschüttenden beziehungsweise -aufnehmenden Rezeptoren beeinflusst werden (ROGAWSKI u.

LOSCHER 2004). Diese Methode moduliert direkt die Anfälle in ihrem Schweregrad und in ihrer Frequenz. Eine weitere potenzielle Möglichkeit der Intervention, würde im präventiven Eingriff während der Epileptogenese bestehen (Bhatti 2015). Andere Möglichkeiten stellen die chirurgische Resektion der entsprechenden Gehirnareale (fokale Epilepsie und identifizierbarer Lokus) (CASCINO 2004) und die Vagusnerv-Stimulation dar (PANEBIANCO et al. 2016). Der Grund für die lediglich bedingt erfolgreiche Pharmakotherapie beruht auf der Pharmakoresistenz der Epilepsieerkrankung (DUNCAN et al. 2006). So sprechen nur 60 - 70 % der behandelten Patienten auf die Pharmakotherapie an. Dies kann für die betroffenen Patienten eine große Belastung darstellen. Der Verlust der Kontrolle im Alltag, die schlechte Vorhersehbarkeit der Anfälle, das erhöhte Verletzungsrisiko bedingt durch die Anfälle sowie die Epilepsieerkrankung selbst können zu diversen Komorbiditäten führen (BEGHI 2009). Als Konsequenz daraus wird beschrieben, dass die betroffenen Patienten nicht mehr am sozialen Gemeinschaftsleben partizipieren und eine Angststörung zeigen können. Bei der sozialen Isolation handelt es sich um eine Vermeidungsstrategie, die bei weiterer Progression über die Form der erlernten Hilflosigkeit in einer manifesten Depression resultieren kann (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008). Laut SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN (2008) wurde beschrieben, dass ca. 30 % der Patienten mit einer Epilepsieerkrankung im Rahmen der Depression auch suizidale Gedanken aufweisen. Die Belastung der Patienten und die Reduktion der Lebensqualität basierten allerdings nicht ausschließlich auf der durch das Krankheitsbild bedingten Lebenssituation, sondern auch auf den Nebenwirkungen, die mit der Pharmakotherapie einhergehen können. Die auf das zentrale Nervensystem bezogenen Nebenwirkungen können Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schwindel und Bewusstseinsstrübung umfassen. Für den Wirkstoff spezifische Nebenwirkungen können Osteopenie bei enzym-induzierenden Wirkstoffen oder hormonelle Beeinflussung, wie bei Valproat sein (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008).

Auch in Tiermodellen sind im Zusammenhang mit Epilepsie diverse Verhaltensänderungen ähnlich den Komorbiditäten beschrieben, wie anhedonie-ähnliches Verhalten, Störungen der sozialen Interaktion und Abweichungen im angstassoziierten Verhalten (MÜLLER et al. 2009; KLEIN et al. 2015; SCHNEIDER et al. 2017).

## **1.2. Klassifizierung**

Das Krankheitsbild der Epilepsie ist sehr facettenreich. Um eine angemessene Therapie für die Patienten zu ermöglichen, muss die Erkrankung bei jedem betroffenen Individuum bestmöglich klassifiziert werden. Die ILAE befasst sich seit 1909 mit dieser Klassifizierung von Epilepsieerkrankungen. Bedingt durch den stetig zunehmenden Erkenntnisgewinn in Bezug auf die zugrundeliegenden, pathophysiologischen Veränderungen beim Krankheitsbild der Epilepsie, wurde auch die Klassifizierung von 1985 dementsprechend angepasst. Die

aktualisierte Version umfasst nun zusätzlich zur Beschreibung des klinischen Bildes beispielsweise Aspekte aus bildgebenden Verfahren. Mithilfe dieser bildgebenden Verfahren kann das zentrale Nervensystems dargestellt werden (SCHEFFER et al. 2017). Die Klassifizierung, nach der Empfehlung der ILAE, findet auf verschiedenen Ebenen statt. Zuerst muss abgeklärt werden, ob es sich bei dem Patienten um einen epileptischen Anfall handelt. Mögliche Differentialdiagnosen können beispielsweise Synkopen, Parasomnien, Bewegungsstörungen oder andere dissoziative Anfälle sein (SCHEFFER et al. 2017). Nachfolgend wird der Anfallstyp bestimmt. Dabei muss differenziert werden, ob der Anfall fokal oder generalisiert beginnt oder der primäre Lokus beziehungsweise die primären Loci unbekannt sind (SCHEFFER et al. 2017). Im Anschluss wird der Epilepsietyp bestimmt. Es wird zwischen vier möglichen Formen unterschieden:

- der fokalen,
- der generalisierten,
- der kombinierten fokalen und generalisierten und
- der Epilepsie unbekannter Lokalisierung (SCHEFFER et al. 2017).

Die letzte Ebene der Klassifizierung stellt die Bestimmung des Epilepsiesyndroms dar. Dabei sind die möglichen Ausprägungen die idiopathische, generalisierte und die selbstlimittierende fokale Epilepsie (SCHEFFER et al. 2017). Auf jeder Ebene der Klassifizierung empfiehlt die ILAE die Ätiologie der Epilepsieerkrankung zu berücksichtigen, da sich daraus mögliche Konsequenzen für die Therapie ergeben (SCHEFFER et al. 2017). Die Ätiologie selbst kann in sechs Untergruppen eingeteilt werden, die für die Epilepsieentstehung verantwortlich sein können:

- abnormale Strukturen im Gehirn,
- genetische Disposition (z.B. Mutationen des SCN1A-Gens beim Dravet-Syndrom)
- infektiöse Vorerkrankungen (z.B. Neurozystizerkose, Tuberkulose, Humanes Immundefizienz-Virus)
- metabolische Vorerkrankung (z.B. Porphyrurie, Urämie)
- Autoimmunerkrankungen, die mit einer Entzündung des zentralen Nervensystems einhergehen
- eine bisher unbekannte Ätiologie (SCHEFFER et al. 2017).

### **1.3. Relevanz von Tiermodellen in der Epilepsieforschung**

In der Richtlinie 2010/63/EU wird explizit erwähnt, dass es notwendig ist, Tiermodelle zu verwenden „um die Gesundheit von Mensch und Tier sowie der Umwelt“ zu schützen. Da diese In-vivo-Versuche von so bedeutender Notwendigkeit sind, muss diesen Tieren ein besonderer Schutz zukommen (Richtlinie 2010/63/EU).

Darüber hinaus wird in der Richtlinie aber auch darauf verwiesen, dass es perspektivisch erstrebenswert ist, Tiermodelle zukünftig durch alternative Methoden zu ersetzen. In der Epilepsieforschung ist die Verwendung von Tiermodellen bislang essenziell. Durch tierexperimentelle Forschung konnte das Verständnis über pathophysiologische Mechanismen, die der Epilepsie zugrunde liegen, erweitert werden. Darüber hinaus konnten durch Versuche an Tieren neue, antiepileptische Wirkstoffe entdeckt werden (CHAPMAN et al. 1982; GOWER et al. 1995; LÖSCHER u. BRANDT 2010). Die historische Grundlage der heutigen tierexperimentellen Epilepsieforschung reicht bis in das 19. Jahrhundert zurück, als John Hughlings Jackson Untersuchungen an Hunden mit spontanen Anfällen durchführte (GRONE u. BARABAN 2015). David Ferrier hingegen induzierte durch eine elektrische Stimulation des Kortex gezielt Anfälle. In den 1930er Jahren wurden standardmäßig Tiermodelle mit Katzen verwendet, um potenzielle Antiepileptika zu testen. Hierbei handelte es sich ebenfalls um ein elektrisch induziertes Anfallsmodell (PUTNAM u. MERRITT 1937). Während vor den 1980er Jahren Versuche mit Tiermodellen unter Verwendung verschiedener Spezies durchgeführt wurden, werden heute überwiegend Tiermodelle mit Mäusen und Ratten verwendet. Der Grund für den vermehrten Einsatz von Mäusen und Ratten lässt sich auf diverse Vorteile zurückführen, zum Beispiel die kurzen Reproduktionsintervalle, das einfache *Handling* der Tiere und geringe Raumannsprüche an die Haltung im Vergleich zu anderen Spezies (GRONE u. BARABAN 2015).

Die Ansprüche an ein für die Epilepsieforschung eingesetztes Tiermodell beruhen auf dem Vorhandensein drei wesentlicher Eigenschaften (GRONE u. BARABAN 2015): der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen (*Construct Validity*), der phenotypischen Ausprägung der Erkrankung (*Face Validity*) und der Ansprechbarkeit durch die Behandlung (*Predictive Validity*) in Bezug auf die humane Epilepsieerkrankung. Das ideale Tiermodell würde alle drei Aspekte abdecken. Bislang existiert allerdings kein Modell, das alle Ansprüche in vollem Umfang erfüllt. So ähneln die chronischen Epilepsiemodelle, wie zum Beispiel das Lithium-Pilocarpin-Modell der humanen Temporallappenepilepsie (TLE). Die Vergleichbarkeit des Tiermodells mit der TLE bezieht sich unter anderem auf das Vorhandensein einer Latenzphase nach dem primären Insult. Eigenschaften, die nicht der humanen TLE entsprechen, umfassen hingegen die neuropathologischen Veränderungen. So ist der extrahippokampale Zelltod im Tiermodell deutlich ausgeprägter (GORTER et al. 2015). Je nach Fragestellung einer Studie muss somit abgewogen werden, welches Modell sich im Hinblick auf die *Construct*, *Face* und *Predictive Validity* am besten eignet. Weltweit werden aktuell überwiegend Post-SE-Modelle verwendet (GORTER et al. 2015). Obwohl es Ähnlichkeiten zwischen der humanen TLE und den entsprechenden Tiermodellen gibt, müssen langfristig neue Tiermodelle etabliert werden. Diese Modelle sollten der humanen TLE noch mehr entsprechen, als die herkömmlichen Modelle um weiterhin neue Erkenntnisse auf

dem Forschungsgebiet der Epilepsie zu erlangen (LÖSCHER u. BRANDT 2010). So ist es immer noch nicht möglich, effektiv die Epileptogenese zu beeinflussen (GARCIA 2012). Darüber hinaus ist es nicht ausreichend, neue potenzielle antiepileptische Medikamente (*Antiepileptic Drugs, AEDs*) ausschließlich in-vitro zu testen, da es nicht möglich ist, aufgrund von Bindungsaffinität an diversen Zielstrukturen den antikonvulsiven Effekt vorherzusagen (ROGAWSKI 2006). Außerdem lässt ein In-vitro-Versuch keine Prognose über Nebenwirkungen, die Bioverfügbarkeit, die Passagefähigkeit der Blut-Hirn-Schranke oder über den lokalen Transport zur Zielstruktur zu (ROGAWSKI 2006). Basierend auf dieser Limitation der In-vitro-Versuche und der Notwendigkeit, das Wissen über die Epilepsieerkrankung weiter auszubauen, werden Tiermodelle weiterhin eine wichtige Rolle einnehmen. Darüber hinaus müssen sie für die Entdeckung, Entwicklung und Prüfung von AEDs eingesetzt werden (LÖSCHER 2011). Die tierexperimentelle Forschung dient somit als wichtiges Werkzeug, um die Behandlungsmöglichkeiten von Patienten in Zukunft zu verbessern und mit der Epilepsie assoziierte Einschränkungen der Lebensqualität zu reduzieren.

#### **1.4. Post-Status-Epilepticus-Modelle**

##### **1.4.1. Lithium-Pilocarpin-Modell**

Das Lithium-Pilocarpin-Modell gehört zu den chronischen Epilepsiemodellen (CURIA et al. 2008). Es zeichnet sich durch seinen hohen Grad an Isomorphismus bezüglich der humanen TLE aus. Somit spiegelt es die Funktionsänderung wider, aber nicht die zugrundeliegende Ätiologie (CURIA et al. 2008). Ähnlich, wie bei der TLE beim Menschen zeigen die Tiere, die einen chemisch induzierten Status epilepticus (SE) durch Pilocarpin erfahren, epileptische Foki im limbischen System. Ist der epilepsieauslösende Faktor ein primärer Insult, so folgt ähnlich dem Tiermodell die Epileptogenese während der Latenzphase und mündet danach in der chronischen Phase, die durch spontane wiederkehrende Anfälle geprägt ist (MATHERN et al. 2002; CURIA et al. 2008). Ebenfalls ähnlich der humanen TLE konnten bei den Tieren neuropathologische Veränderungen im Gehirn festgestellt werden (MATHERN et al. 2002; CURIA et al. 2008). Das Pilocarpin-Modell wurde erstmals von TURSKI et al. (1983) bei männlichen Wistar Ratten beschrieben. Das Wirkungsprinzip des Pilocarpin-induzierten SE beruht darauf, dass das Parasympathomimetikum als Agonist an muscarinergen Acetylcholinrezeptoren wirkt und dadurch einen epileptogenen Effekt aufweisen kann, wenn es intrakranial oder systemisch appliziert wird (TURSKI et al. 1983). Nach dem Dosierungsprotokoll, das TURSKI et al. (1983) verwendete, wurde den Tieren 30 min vor der Pilocarpinapplikation (100 – 400 mg/kg) Scopolaminhydrochlorid (20 mg/kg) verabreicht. Das Scopolaminhydrochlorid diente dazu, die periphere muscarinerge Wirkung des Pilocarpins zu reduzieren, sodass nur der Effekt der lokalen Wirkung im Gehirn zu beobachten war. Zusätzlich wurde ebenfalls vor der Pilocarpinapplikation Diazepam (10

mg/kg) verabreicht (TURSKI et al. 1983). Nach Applikation des Parasympathomimetikums zeigten die Tiere sowohl tonisch-klonisch Anfallsaktivität, als auch epileptiforme Entladungsmuster im EEG. Diese Veränderungen im EEG stehen in Korrelation zum klinischen Erscheinungsbild des SE. Zu Beginn des SE weist das EEG im Neokortex und in der Amygdala frequente Amplituden auf, während im Hippocampus ein Theta-Rhythmus vorherrscht (CURIA et al. 2008). Wenn das klinische Erscheinungsbild an Schwere zunimmt, wird dieser Theta-Rhythmus im Hippocampus durch hochfrequente Wellen mit hohen Amplituden ersetzt (FISAHN et al. 1998; VAN DER LINDEN et al. 1999). Diese elektroenzephalographische Aktivität im Hippocampus breitet sich dann über den Neokortex und die Amygdala aus (TURSKI et al. 1983).

Das ursprüngliche Protokoll zur Induktion des SE von TURSKI et al. (1983) mittels Pilocarpin wurde mehrfach überarbeitet (CURIA et al. 2008). Im Folgenden soll auf die Induktion des SE mittels der fraktionierten Lithium-Pilocarpin-Applikation eingegangen werden, welche auch in der vorliegenden Studie verwendet wurde. Hierbei wurde ein Protokoll nach GLIEN et al. (2001) verwendet. GLIEN et al. (2001) beschreibt unter der Verwendung dieses Protokolls im Zusammenhang mit dem initialen SE eine Mortalität von 6,7 %, wobei die Wahrscheinlichkeit, dass die Tiere nach der Latenzphase spontane Anfälle entwickeln bei 85 % liegt, sofern der Abbruch des SE nach 90 min erfolgt. Die Besonderheiten des verwendeten Protokolls liegen darin, dass den Tieren 19 - 24 Stunden vor Beginn der Pilocarpinapplikationen Lithiumchlorid (127 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) appliziert wurde. Das Lithiumchlorid dient dazu die Gesamtdosis des Pilocarpins zu reduzieren und somit auch die Mortalität zu reduzieren. Ein anderer Faktor, welcher die Mortalitätsrate positiv im Sinne einer Reduktion beeinflusst, ist der Abbruch des SE nach 90 min. Erstreckt sich die Dauer des SE auf einen längeren Zeitraum, so steigt die Mortalitätsrate. Darüber hinaus sind die 90 min ausreichend, damit die Tiere nach einer Latenzphase spontane Anfälle zeigen. Wenn die Dauer des initialen SE zu kurz ist, weisen die Tiere nach der Latenzphase keine chronische Manifestation der Epilepsieerkrankung auf (GLIEN et al. 2001; KLITGAARD et al. 2002). Um die Mortalitätsrate zusätzlich positiv beeinflussen zu können und eine individuelle Dosierung des Pilocarpins für jedes Tier zu ermöglichen, verwendete GLIEN et al. (2001) ein Dosierungsschema, welches eine fraktionierte Applikation des Parasympathomimetikums vorsah. Dabei wurden den Tieren wiederholt niedrige Dosen des Pilocarpin (10 mg/kg) in 30 – minütigen Intervallen appliziert, bis sich die Tiere in einem kontinuierlichen, generalisierten Anfall oder in stetig wiederkehrenden Episoden von generalisierten Anfällen, ohne interiktale Erholungsphasen befanden. Um einen SE mit einer standardisierten Länge für alle Tiere zu ermöglichen und die Tiere nicht länger als nötig in diesem Zustand zu belassen, wurde der SE in der vorliegenden Studie nach 90 min beendet. Für die Terminierung des SE wurde ein Protokoll verwendet, das folgende Agentien vorsieht:

Diazepam und Phenobarbital. Nur in der Kombination aus beiden kann der SE beendet werden (BANKSTAHL u. LÖSCHER 2008). Die Zielstruktur des Diazepams ist der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Der Neurotransmitter Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) bindet an diesen Rezeptor, wodurch der Chlorid-Einstrom in die Zelle erhöht wird, was eine Senkung des Aktionspotentials und somit eine inhibitorische Wirkung zur Folge hat (JONES et al. 2002). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist ein Pentomer, der aus Untereinheiten besteht. Das Diazepam bindet spezifisch an die Gamma-Rezeptor-Untereinheit (JONES et al. 2002). Auch Phenobarbital bindet am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und verstärkt somit die inhibitorische Wirkung (JONES et al. 2002; BANKSTAHL u. LÖSCHER 2008). Die reduzierte Wirksamkeit von Diazepam und Phenobarbital in Bezug auf die Länge des SE beruht auf dem Phänomen, dass während eines SE Rezeptoruntereinheiten von der synaptischen Membran in das Zytosol translozieren und nicht mehr als Bindungsstelle zugänglich sind. Diese Translokation von Rezeptoruntereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors nimmt mit der Länge des SE zu. Dadurch sprechen Ratten, die sich in einem SE befindet in der Anfangsphase noch adäquat auf Diazepam an, während diese Sensitivität nach 45 min deutlich reduziert ist (JONES et al. 2002).

Nach der Beendigung des SE folgt die Latenzphase. Sie beschreibt die Phase der Epileptogenese. Während dieser Phase treten noch keine spontanen Anfälle auf. Sie kann im Lithium-Pilocarpin-Modell von wenigen Tagen bis Wochen variieren (BIAGINI et al. 2006; GOFFIN et al. 2007). Dabei scheint ein Zusammenhang sowohl zwischen der Länge des SE, als auch der Art des SE-Abbruchs und der Länge der Latenzphase zu bestehen (BIAGINI et al. 2006; GOFFIN et al. 2007; CURIA et al. 2008). So zeigen Tiere, bei denen der SE ausschließlich mit Diazepam beendet wurde, kürzere Latenzphasen. Eine Reduktion der SE-Länge wirkt sich in einer Verlängerung der Latenzphase aus (GOFFIN et al. 2007), wobei eine Reduktion auf 30 min sogar dazu führt, dass die Tiere keine spontanen Anfälle entwickeln (CAVALHEIRO 1995). Der Beginn der chronischen Phase ist durch das Auftreten von spontanen Anfällen gekennzeichnet (CURIA et al. 2008). Zu Beginn dieser Phase zeigen die Tiere fokale Anfälle, die nach einigen Tagen in sekundär generalisierte Anfälle übergehen (GOFFIN et al. 2007; CURIA et al. 2008). Die spontanen Anfälle können in sogenannten *Clustern* auftreten (ARIDA et al. 1999). Darüber hinaus scheint ein Zusammenhang zwischen der Länge der Latenzphase und der Frequenz spontaner Anfälle zu bestehen. So zeigen Tiere, bei denen die Latenzphase von kurzer Dauer war, mehr spontane Anfälle (ARIDA et al. 1999).

Ein weiterer Faktor, der auf das chemische Post-SE-Modell Einfluss nimmt, ist der eingesetzte Rattenstamm. Neben Mäusen werden häufig Wistar- und Sprague-Dawley-Ratten für das Lithium-Pilocarpin-Modell eingesetzt (CURIA et al. 2008). Diese beiden Rattenstämme zeigen ähnliche verhaltensbiologische und elektroenzephalographische

Auffälligkeiten (HONCHAR et al. 1983; JOPE et al. 1986). Worin sie sich jedoch unterscheiden, ist die niedrige Mortalitätsrate während der Induktion des SE bei Sprague-Dawley-Ratten (CURIA et al. 2008). Anders verhält es sich mit Long-Evans-Ratten. Sie weisen im Lithium-Pilocarpin-Modell eine erhöhte Mortalitätsrate und eine ausgeprägtere Schädigung des Hippocampus auf. Auch die verhaltensbiologischen Veränderungen sind deutlicher ausgeprägt (HORT et al. 2000).

#### **1.4.2. Elektrisches Post-Status-Epilepticus-Modell**

Neben dem chemischen Post-SE-Modell ist auch das elektrische Post-SE-Modell beschrieben. Hierbei wird ebenfalls ein SE induziert. Allerdings wird der primäre Insult nicht mittels einer chemischen Substanz, sondern mittels eines elektrischen Impulses gesetzt (WALKER et al. 2016). Ähnlich dem Kindling-Modell wird hier eine Tiefenstimulationselektrode implantiert (VAN VLIET et al. 2015). Diese Elektrode kann sowohl in die basolaterale Amygdala, als auch in den Hippocampus implantiert werden (LÖSCHER 2017). Nach einer Latenzphase zeigen die Tiere ebenfalls spontane Anfälle (MAZARATI et al. 2002; LÖSCHER 2017). Dieses Post-SE-Modell stellt ein Modell zur Untersuchung der pharmakoresistenten Epilepsie dar. Es kann dazu dienen, die Mechanismen, die auch in der humanen TLE beschrieben sind, zu untersuchen (LÖSCHER 2017). Im Zusammenhang mit diesen Mechanismen stehen unter anderem die hohe Anfallsfrequenz vor dem Beginn der Pharmakotherapie, die Schädigung des Hippocampus, Verhaltensänderungen und die erhöhte Expression des *Multidrug Transporters P-glycoprotein*. Diese Faktoren können ebenso beim Humanpatienten mit einer pharmakoresistenten TLE nachgewiesen werden (LÖSCHER 2011). Bedingt durch den initialen SE ist mit einer erhöhten Mortalitätsrate in diesem Modell zu rechnen, ähnlich dem Pilocarpin-Modell (LIDSTER et al. 2016). Auch wenn mittels des elektrischen Post-SE-Modells diverse Fragestellungen untersucht werden können, so findet es dennoch nicht so häufig Anwendung wie das Pilocarpin-Modell (CURIA et al. 2008; LEVESQUE et al. 2016).

#### **1.5. Amygdala-Kindling-Modell**

Das Kindling-Modell stellt ebenfalls ein Modell der TLE dar (SATO et al. 1990; BERTRAM 2007; KANDRATAVICIUS et al. 2014). Zur Induktion der Anfälle werden die Tiere täglich elektrisch stimuliert. Es existieren verschiedene Möglichkeiten zur elektrischen Stimulation. Eine davon stellt die Stimulation via einer Tiefenelektrode dar. Diese Elektrode kann zum Beispiel in den Hippocampus oder in die basolaterale Amygdala implantiert werden (SATO et al. 1990; BERTRAM 2007). Über diese Elektrode werden die Tiere mittels elektrischer Impulse stimuliert. Es gibt verschiedene Protokolle zur Durchführung dieses Modells. Die Besonderheiten beim Kindling-Modell sind zum einen, dass ausschließlich kontrolliert Anfälle induziert werden können und dass die Tiere, mit Ausnahmen, keine spontanen Anfälle

zeigen (SATO et al. 1990; LÖSCHER 2017). Darüber hinaus kann man beim Kindling-Modell den sogenannten „Kindling-Effekt“ beobachten. Dabei handelt es sich um eine progressive Erhöhung der Erregbarkeit des Gehirns (SATO et al. 1990; LÖSCHER 2017). Dabei zeigen die Tiere bei den ersten Stimulationen meist nur fokale Anfälle. Diese fokalen Anfälle gehen dann nachfolgend in generalisierte über (GODDARD 1983). Zum ersten Mal beschrieben wurde dieses Modell der TLE von GODDARD (1983). Das Amygdala-Kindling-Modell unterliegt allerdings diversen Limitationen als Modell für die humane TLE, da anders als bei der humanen Epilepsieerkrankung keine spontanen Anfälle auftreten (LÖSCHER 2017). Bezüglich der prädiktiven Validität ist das Kindling-Modell allerdings sehr aussagekräftig (KANDRATAVICIUS et al. 2014). Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt darin, dass die progressiven, epileptogenen Schaltkreise, die während des Kindling-Prozesses entstehen, gezielt untersucht werden können (BERTRAM 2007). Darüber hinaus ist die niedrige Mortalitätsrate beim Kindling-Modell gegenüber den Post-SE-Modellen erwähnenswert (LIDSTER et al. 2016).

## 2. Belastungseinschätzung in Tierversuchen

### 2.1. Ethik bei Tierversuchen

Im Jahr 2016 wurden 2 854 586 Tiere für wissenschaftliche Zwecke verwendet. Somit wurden 0,26 % der in Deutschland genutzten Tiere für diesen Zweck eingesetzt. Mit 99,15 % stellt die Nutzung von Tieren zur Ernährung allerdings den größten Anteil dar ([https://www.tierversuche-verstehen.de/wp-content/uploads/2018/01/39\\_forschung-maeuse\\_180102.png](https://www.tierversuche-verstehen.de/wp-content/uploads/2018/01/39_forschung-maeuse_180102.png)). Der Pro-Kopf-Fleischverzehr eines Deutschen liegt bei 60 Kilogramm pro Jahr. Dahingegen werden pro Bundesbürger im Laufe eines Lebens etwa zwei Mäuse in einem Tierversuch verwendet ([https://www.tierversuche-verstehen.de/wp-content/uploads/2018/01/39\\_forschung-maeuse\\_180102.png](https://www.tierversuche-verstehen.de/wp-content/uploads/2018/01/39_forschung-maeuse_180102.png)). Dem ist hinzuzufügen, dass Mäuse prozentual den größten Anteil an Versuchstieren in Deutschland darstellen (<https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/texte/TierschutzTierforschung>). Dadurch, dass der Mensch Tiere gezielt nutzt und für verschiedene Zwecke einsetzt, gibt es Gesetze und Verordnungen, die dazu dienen sollen, diese Tiere besonders zu schützen. Im Falle der Versuchstierkunde umfassen die gesetzlichen Grundlagen vor allem die Richtlinie 2010/63/EU, das Tierschutzgesetz (TierSchG) und die Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV). Als wichtige Voraussetzung, ob ein Tierversuch von der Behörde genehmigt wird, gilt die Rechtfertigung des Versuchsvorhabens in Hinblick auf die „Unerlässlichkeit“ bezüglich des aktuellen Kenntnisstandes (§ 7a Abs. 2 Nr. 1 TierSchG i.V.m. § 31 TierSchVersV). Somit muss für jeden geplanten Versuch individuell abgewogen werden, ob das Versuchsziel den Einsatz von Tieren, der mit „Schmerzen, Leiden oder Schäden“

assoziiert sein kann, rechtfertigt. In § 1 des TierSchG wird der Tierschutz an sich auf die „Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf“ begründet. Basierend auf dieser Pflicht, ist der Mensch dazu beauftragt „Leben und Wohlbefinden [der Tiere] zu schützen“. Des Weiteren heißt es, dass „[n]iemand [...] einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen [darf]“ (§ 1 TierSchG). Der „vernünftige Grund“ lässt jedoch, wie in anderen Teilen des Tierschutzgesetzes deutlich wird, Raum für Interpretation. Bei Tierversuchen muss dieser „vernünftige Grund“ entsprechend belegt werden. In jedem Antrag für die Genehmigung eines Tierversuchs muss deshalb bestätigt werden, dass das Versuchsziel nicht mittels einer Alternativmethode und somit ohne den Einsatz von Tierversuchen, erreicht werden kann. Besteht die Möglichkeit die Fragestellung mithilfe einer Alternativmethode zu beantworten, wird die Genehmigung zur Durchführung des Tierversuchs nicht erteilt. Handelt es sich allerdings um einen unerlässlichen Tierversuch, so muss im Anschluss durch die versuchsplanende Person begründet werden, ob dieser Tierversuch in Bezug auf die „Schmerzen, Leiden und Schäden“, die das Tier erfahren könnte, um den zu erwartenden Erkenntnisgewinnung zu erzielen „ethisch vertretbar“ ist (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG). Die Ethik stellt hierbei ein wichtiges Werkzeug zur Entscheidungsfindung dar. Dabei findet bei der Prüfung der „ethischen Vertretbarkeit“ eine „Güterabwägung“ statt (WOLF 2012). Die eine Seite der Waage wird mit dem Interesse des Menschen, die andere mit dem Interesse der Tiere bestückt und dann ausgelotet, welches Interesse im jeweiligen Einzelfall das gewichtigere ist. Es stellt sich somit bei jedem Tierversuch die Frage, ob das „Wohlbefinden“ der Tiere eingeschränkt werden darf, um beispielsweise neue Erkenntnisse in der Forschung zu erlangen, die der Menschheit, Tieren oder der Umwelt zugutekommen können. In der Tierethik liegen verschiedene Lösungsansätze vor, die sich mit diesem Interessenkonflikt befassen. Dabei gibt es verschiedene Auffassungen ob, beziehungsweise inwiefern das Tier als solches in die Gemeinschaft derer mit einbezogen wird, die moralisch zu berücksichtigen sind. Im Wesentlichen gibt es hierfür drei grundlegende philosophische Ansichten: die anthropozentrische, die pathozentrische und die biozentrische Position. Die anthropozentrische Position sieht den Menschen im Mittelpunkt und nicht-menschliche Geschöpfe als Objekte. Ein wichtiger Vertreter dieser Philosophie ist Immanuel Kant. Obwohl er die Tiere nicht als gleichwertige Mitgeschöpfe des Menschen sieht, so empfiehlt er dennoch Tiere gut zu behandeln, da Zuwiderhandeln in einer „Verrohung“ des Menschen resultieren kann (WOLF 2012). Somit sind für ihn Tiere nicht ihrer selbst willen schützenswert, sondern aus der Konsequenz für den Menschen. In der pathozentrischen Position weiß man um die Leidensfähigkeit der Tiere. Auf dieser Fähigkeit baut die Begründung, Tiere in die moralische Gesellschaft aufzunehmen. Peter Singer und Ursula Wolf sind bekannte Vertreter dieser Position. Die biozentrische Auffassung sieht alle Lebewesen als schützenswert und als Mitglieder der moralischen Gesellschaft. Albert Schweitzer ist ein Vertreter dieser ethischen Auffassung (WOLF 2012).

Die Frage über die Vertretbarkeit eines Tierversuchs wirft also die Frage auf, ob es dem Tier zugemutet werden kann, potenziell Leid zu erfahren, wenn das übergeordnete Ziel ist, anderen Lebewesen zu helfen. Nach WOLF (2012) gibt es eine Verpflichtung des Arztes Kranken zu helfen, sofern das in seinen Möglichkeiten liegt. Es stellt, nach ihrer Auffassung, jedoch keine Verpflichtung des Wissenschaftlers dar „die Gesundheit der Gesellschaft zu fördern“, wenn dies nur aufgrund von Tierleid erfolgen kann (WOLF 2012). Des Weiteren stellt sie die Behauptung auf, dass „Krankheit und die Begrenztheit des Lebens [...] normale Existenzbedingungen“ sind (WOLF 2012). Wäre von Anbeginn des Einsatzes von Tierversuchen basierend auf dieser Grundlage argumentiert worden, wäre der aktuelle Wissensstand in der Medizin nicht an dem Punkt, an dem er heute ist. Allein die Methodenentwicklung zur Durchführung operativer Eingriffe verdankt ihre rasche und qualitativ als positiv zu bewertende Entwicklung dem Einsatz von Tierversuchen. Beispiele für diese positive Entwicklung sind die antibiotische Behandlung, Analgesie und Anästhesie und die Methodik der chirurgischen Eingriffe selbst. Die Frage, die sich hinsichtlich der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen somit auch stellen muss, ist diese: Ist es vertretbar, Tierversuche nicht durchzuführen, wenn sie eine Verbesserung der Lebensqualität für unzählige andere Individuen zur Folge haben kann?

Die Ethik lehrt uns, dass es kein „Richtig oder Falsch“ gibt. Es gibt lediglich die Möglichkeit der Abwägung in Bezug auf die Rechtfertigung. Dieses Dilemma ist alltäglicher Bestandteil in der tierexperimentellen Forschung. Kommt die versuchsdurchführende Person zu dem Entschluss, dass der Versuch „ethisch vertretbar“ ist nach § 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG, steht es in ihrer Pflicht gemäß der „3R“ das Tierleid auf ein Minimum zu reduzieren. Die „3R“ wurden erstmal von RUSSELL et al. (1959) eingeführt. Sie stehen für *Replacement*, *Reduction* und *Refinement*. Bestenfalls ist eine Alternativmethode vorhanden, die den Tierversuch ersetzen kann (*Replacement*). Ist dies nicht der Fall, so müssen die Tierzahlen, die für den Versuch verwendet werden, auf ein Minimum reduziert werden (*Reduction*). Darüber hinaus muss die Durchführung des Tierversuchs so optimiert werden, dass Tierleid weitestgehend minimiert wird (*Refinement*). Diese Verbesserung der Durchführung beinhaltet sowohl angewandte Methoden im Tierversuch, aber auch die Haltungsbedingungen der Tiere. Die „3R“ sind essenziell und müssen somit den täglichen Einsatz im Tierversuch finden. Umso wichtiger ist es also die Methodik in der tierexperimentellen Forschung, aus der Verantwortung des Menschen gegenüber dem Tier heraus, stets kritisch zu überdenken und bessere Verfahren zu identifizieren und zu validieren.

## 2.2. Stress

Die Konfrontation eines Individuums mit einem Stressor bewirkt eine Stressantwort. Diese Reaktion kann sich in Form von Veränderungen in der Physiologie und des Verhaltens der

Tiere darstellen (ARMARIO et al. 2012; BEERY u. KAUFER 2015). Man unterscheidet zwischen emotionalem und physischem Stress. Diese beiden Kategorien der möglichen Stressoren können unterschiedliche Qualitäten aufweisen, welche sich in der Vorhersehbarkeit, der Intensität, der Dauer und der Kontrollierbarkeit unterscheiden (ARMARIO et al. 2012; BEERY u. KAUFER 2015). Diese Fähigkeit auf Stress mit physiologischen und verhaltensbiologischen Anpassungsreaktionen zu reagieren, wird als Allostase bezeichnet (MCEWEN 1998). Die Allostase stellt einen Mechanismus dar, der dazu dient die Homöostase des Körpers, den Ist-Zustand, auch bei äußerer Beeinflussung durch einen Stressor, aufrechtzuerhalten. Dieser Schutzmechanismus der Allostase ist allerdings nicht uneingeschränkt funktionsfähig. Bei einer Überstimulation oder der Unfähigkeit des Organismus selbst, kann der Stressor unter Umständen nicht adäquat verarbeitet werden (MCEWEN 1998). Eine mögliche Konsequenz, die sich aus dieser Unfähigkeit der Anpassung ergeben kann, ist die „erlernte Hilflosigkeit“ (W. R. MILLER et al. 1975; SELIGMAN u. BEAGLEY 1975).

Die Anpassungsreaktionen auf physiologischer Ebene sind die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis*, HPA-Achse) und die Aktivierung des autonomen Nervensystems (CANNON 1932; SELYE 1975). Die Aktivierung der HPA-Achse resultiert in der Ausschüttung diverser Hormone, wie Corticosteron, Adrenalin, Adrenocorticotropin (ACTH), luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH), Glucagon und Insulin (VAN HERCK et al. 1994). Die Aktivierung des autonomen Nervensystems beziehungsweise des Sympathikus führt zu einem Körpertemperatur-, Blutdruck-, Herzfrequenz- und Blutglukoseanstieg. Darüber hinaus kann auch eine gesteigerte Defäkation beobachtet werden (VAN HERCK et al. 1994). Verhaltensbiologische Veränderungen, die im Zusammenhang mit Stressoren auftreten können, sind eine reduzierte Nahrungsaufnahme und ein reduziertes Explorations- und Sexualverhalten. Außerdem neigen die Tiere dazu sich vermehrt zurückzuziehen und zu verstecken. Darüber hinaus kann die Berührungsreaktion verstärkt ausfallen (VAN HERCK et al. 1994). Nach SELYE (1975) gibt es eine weitere Einteilungsmöglichkeit von Stress. Er unterscheidet zwischen negativem Stress (Distress) und positiven Stress (Eustress). Eustress stellt eine Voraussetzung dar, die zur Erfüllung und dem Erreichen von Zielen dient, während Distress zu einer frustrierenden Situation des Scheiterns führen kann (SELYE 1975). Mit diesem Wissen über die Stressantwort des Körpers kann abgewogen werden, inwiefern sich die veränderten Parameter zur Belastungseinschätzung im Versuchstier eignen könnten. Somit können beispielsweise Verhaltenstests durchgeführt werden, die zur Beurteilung von angstassoziiertem Verhalten dienen. Darüber hinaus können auch Hormone quantifiziert werden, wie Corticosteron. Dabei gilt zu beachten, dass die entsprechenden Parameter im Kontext bewertet werden müssen, da es nicht möglich ist, beispielsweise aufgrund erhöhter Corticosteronkonzentrationen im Serum zu differenzieren, ob es sich um Distress oder Eustress handelt. Es scheint keinen direkten Zusammenhang zwischen dem

Schweregrad der stressvollen Situation und der Konzentration des Corticosterons zu geben (ARMARIO et al. 2012). Ebenso eignet sich die HPA-Achsen-Aktivierung nicht als sensitiver Parameter, um bei psychischen Stressoren zwischen kontrollierbaren und unvorhersehbaren Stressoren zu differenzieren (ARMARIO et al. 2012). Diese Limitation bezüglich der Aussagekraft der Qualität der zugrundeliegenden Ursache der HPA-Achsen-Aktivierung muss in der Interpretation berücksichtigt werden.

Obwohl die Identifizierung und Validierung von geeigneten Parametern zur Belastungseinstufung in Tiermodellen sich als nicht-triviale Aufgabe darstellt, muss sie wichtiger Bestandteil des tierexperimentellen Arbeitens sein, um so auch im Sinne der „3R“ Tierleid zu reduzieren. Erst wenn validiert und quantifiziert werden kann, wodurch die Belastung in diversen Tiermodellen bedingt ist, können gezielt Verbesserungsmethoden entwickelt werden, die sich gemäß des *Refinements* positiv auf das Tierwohl auswirken.

### 3. Verhaltensuntersuchungen

Im Zusammenhang mit dem Pilocarpin-Modell wurden bereits einige Verhaltenstests durchgeführt, die darauf abzielen, die mit der TLE assoziierten Komorbiditäten zu untersuchen (GRÖTICKE et al. 2007; KLEIN et al. 2015; LOPES et al. 2016). Dabei lassen sich die untersuchten Verhaltensmuster in verschiedenen Kategorien zusammenfassen. Diese umfassen beispielsweise:

- angstassoziiertes Verhalten
- anhedonie-ähnliches Verhalten
- lokomotorische Aktivität
- soziale Interaktionen

Darüber hinaus wurden in Tiermodellen mit Labornagern auch andere Verhaltensparameter untersucht, die einen Einblick in das Wohlbefinden der Tiere geben sollen (JIRKOF 2014). Diese Verhaltensparameter dienen dazu das natürliche Verhalten der Tiere zu untersuchen, das je nach zugrundeliegender Ursache, verändert sein kann. Zeigen die Tiere nicht mehr ihr natürliches Verhalten, kann eine physische oder psychische Einschränkung der Tiere ursächlich dafür sein, die mit einer Reduktion des Wohlbefindens einhergehen kann (JIRKOF 2014; WODARSKI et al. 2016). Mögliche Verhaltensparameter, die laut JIRKOF (2014) zu der Evaluierung des Wohlbefindens der Tiere herangezogen werden können, sind:

- das Nestbauverhalten
- das Wühlverhalten

Die Verhaltenstests stellen einen der drei Bereiche dar, der in die Belastungsbeurteilung

des Pilocarpin-Modells einfließen soll. Andere Teilgebiete, die in die Belastungsbeurteilung miteinbezogen werden, sind biochemische und (patho-)physiologische Parameter. Die Vielzahl der Parameter wurde in Hinblick auf ihre Korrelation untersucht. Dabei sollen die Zusammenhänge komplexer Parameter, wie die biochemischen und (patho-)physiologischen mit weniger komplexen, wie die der Verhaltenstests dargestellt werden. Mit diesen Informationen, können stark korrelierende Parameter identifiziert werden, sodass beispielsweise anstelle von aufwendigen telemetrischen Messungen Parameter herangezogen werden, die einfacher in der Durchführung sind. Außerdem soll mithilfe der Vielzahl an untersuchten Parametern eine bessere Interpretation der einzelnen Parameter ermöglicht werden. Die Verhaltensuntersuchungen unterliegen einer gewissen Limitation in der Durchführung. Alleine durch das erschwerte Handling der chronisch epileptischen Tiere gestaltet sich die standardisierte Durchführung der Verhaltenstests daher zum Teil schwierig.

### 3.1. Heimkäfingverhalten

Das Nestbauverhalten von Säugetieren dient unter anderem dazu, die Nachkommen vor negativer physikalischer Beeinflussung zu schützen. Ein Nest kann vor ungünstigen Witterungsverhältnissen schützen und ist somit auch nützlich für die Thermoregulation. Dies wurde dadurch belegt, dass die Mortalitätsrate bei neugeborenen Ratten von 87,3 % auf 5,7 % sinkt, wenn dem Muttertier Nestbaumaterial zum Konstruieren eines Nestes zur Verfügung gestellt wird (DENENBERG et al. 1969). Über dieses reproduktionsbedingte Nestbauverhalten hinaus zeigen auch nicht reproduktionsaktive weibliche und männliche Mäuse dieses Verhalten. Es dient ebenso als Schutz vor Fressfeinden und zur Unterstützung der eigenen Thermoregulation. Das Problem der konstanten Aufrechterhaltung physiologischer Körpertemperaturen nimmt bei kleinen Nagetieren eine bedeutende Rolle ein. Aufgrund eines ungünstigen Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpergewicht sind die Tiere einem verhältnismäßig hohen Wärmeverlust ausgesetzt (DEACON 2006a). Die Beurteilung von Veränderungen im Nestbauverhalten wird schon seit Jahren als stress- beziehungsweise schmerzbedingte Verhaltensänderungen bei Mäusen untersucht (JIRKOF 2014; HARIKRISHNAN et al. 2018). Dadurch, dass das Nestbauverhalten nicht als essenzielles Verhalten zu bewerten ist, im Gegensatz zur Futter- und Wasseraufnahme, wird es auch als *Luxury Behavior* bezeichnet. Das *Luxury Behavior* beschreibt das Phänomen, bei dem die Tiere über die lebenserhaltenden Verhaltensweisen hinaus zusätzlich noch ein der Spezies entsprechendes Verhalten zeigen. Dieses kann somit als Indikator für Wohlbefinden bei den Tieren verstanden werden, da es in der Regel vor den essenziellen Verhaltensmustern eingestellt wird (JIRKOF 2014). In vorherigen Studien konnte belegt werden, dass Mäuse, die einen operativen Eingriff und keine adäquate Analgesie erhielten ein reduziertes Nestbauverhalten zeigten (JIRKOF et al. 2013a). In einer anderen Studie wurden

verschieden Blutentnahmetechniken unter einer Isoflurannarkose bei Mäusen untersucht und mittels der Nestkomplexität das Wohlbefinden der Tiere evaluiert (HARIKRISHNAN et al. 2018). Wenn das Nestbauverhalten ein Indikator für Wohlbefinden sein kann, so könnte es ebenso zur Überprüfung dienen, ob potenzielle *Refinement*-Maßnahmen tatsächlich einen positiven Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere haben. Das Nestbauverhalten wurde in diversen Tiermodellen untersucht und validiert. So zeigen beispielsweise Mäuse mit Läsionen im Hippocampus oder mit genetischen Veränderungen ebenso ein verändertes Nestbauverhalten (DEACON 2006a). Das Nestbauverhalten kann darüber hinaus positive Auswirkungen auf die Tiere haben. Dieser Effekt wurde bei Ratten untersucht. Dabei wurde den Tieren postoperativ Nestmaterial zur Verfügung gestellt und die Reduktion der Corticosteronausschüttung und der damit verbundenen verbesserten Wundheilung beobachtet (VITALO et al. 2009). Ob und in welcher Qualität Ratten jedoch Nester bauen ist stark abhängig davon, ob sie von Geburt an mit Nestmaterial in Kontakt kamen (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Darüber hinaus hat es einen Einfluss welches Nestmaterial den Tieren zur Verfügung gestellt wurde. Es wurde beschrieben, dass die Tiere Nestmaterial fraßen und, sofern sie überhaupt Nester bauten, nur solche mit reduzierter Komplexität. Dieses Phänomen trat jedoch überwiegend dann auf, wenn sie post partum mit einem anderen Nestmaterial konfrontiert wurden, als nachfolgend angeboten wurde (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Anders als bei Mäusen, bei denen das Nestbauverhalten ein angeborenes Verhalten darstellt, müssen Ratten dieses Verhalten erst vom Muttertier lernen (VAN LOO u. BAUMANS 2004).

Im Rahmen des Heimkäfigverhaltens wurde zusätzlich noch der Verschmutzungsgrad der Käfige, das *Level-of-Soiling*, beurteilt. Hierbei handelt es sich um einen Parameter, der auf dem Bestreben der Tiere beruht, Schlaf- und Fressbereich vom Kotbereich zu trennen (VAN LOO u. BAUMANS 2004). Dieses Verhalten dient dazu, den parasitären Infektionsdruck möglichst gering zu halten (P. T. WALSH et al. 2013). Bei Ratten wurde dieser Effekt bei einer künstlichen Infektion mit Ektoparasiten beobachtet, bei der die Tiere frequenter den Nestbereich wechselten, um den Ektoparasiten zu entgehen (ROPER et al. 2002).

Im Zusammenhang mit Epilepsieerkrankungen bei Kindern können Komorbiditäten, wie das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS), auftreten (TAN u. APPLETON 2005; EKINCI et al. 2017; KALIL NETO u. NUNES 2017). Dies kann zu einer Reduktion der Lebensqualität führen (EKINCI et al. 2017). Schätzungen zufolge leiden mindestens 20 % der Epilepsiepatienten an ADHS. Das Krankheitsbild ist neben dem Aufmerksamkeitsdefizit und der Hyperaktivität auch von einer gesteigerten Impulsivität geprägt (TAN u. APPLETON 2005). Dieser Effekt kann auch bei Ratten, die einen chemisch induzierten SE durch Pilocarpin erfuhren, beobachtet werden (PINEDA et al. 2014; SULEYMANOVA et al. 2016). PINEDA et al. (2014) konnte in einer Studie an männlichen Wistar Ratten feststellen, dass

die Hälfte der Tiere nach der Induktion eines SE durch Pilocarpin ein depressionsähnliches Verhalten zeigten, während die andere Hälfte der Tiere ein ADHS-ähnliches Verhalten zeigte. Dabei konnte bei den Tieren, die vornehmlich das ADHS-ähnliche Verhalten aufwiesen, eine reduzierte noradrenerge Transmission im Locus coeruleus beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Tiere, bei denen ein depressions-ähnliches Verhalten festgestellt werden konnte, eine verminderte serotonerge Ausschüttung in den Raphe-Kernen. SULEYMANOVA et al. (2016) postulierte einen Zusammenhang zwischen der Entstehung der Hyperaktivität im chronischen Pilocarpin-Modell und der Degeneration der Amygdala.

### 3.2. Soziale Interaktionen

In der freien Wildbahn stellt das Zusammenleben von Ratten in sozialen Verbänden einen Vorteil gegenüber dem Leben als Einzelgänger dar. Dabei leben Ratten in Kolonien, wodurch ihnen der gegenseitige Schutz gegenüber Fressfeinden gewährleistet wird (MACDONALD et al. 1999). Es liegt somit in der Natur der Ratte, sich in sozialen Gruppen zusammenzufinden. Im Umkehrschluss bedeutet das aber auch, dass eine Einzelhaltung der Tiere artifizial ist und nicht den natürlichen Bedürfnissen der Ratten entspricht. Vor allem bei weiblichen Tieren kann die soziale Isolation das sogenannte „Isolationssyndrom“ hervorrufen, welches sich in Form von Hyperadrenokortizismus, einer Reduktion des Körpergewichts, einer veränderten Zusammensetzung der Blutbestandteile und einer Schmerzsensibilisierung darstellen kann (HATCH et al. 1965; VALZELLI 1973). Darüber hinaus können auch das Lernverhalten und das Paarungsverhalten negativ beeinflusst sein, während das Aggressionsverhalten eventuell stärker ausgeprägt ist (VALZELLI 1973). Ein weiterer Parameter, der ebenfalls in Zusammenhang mit sozialer Isolation genannt wird, ist die erhöhte Herzfrequenz (SPÄNI et al. 2003; CARNEVALI et al. 2017). Obwohl der soziale Kontakt, wie zuvor erwähnt, diverse Vorteile bringt, kann er ebenso einen potenziellen Stressor darstellen (BEERY u. KAUFER 2015). Wenn der soziale Kontakt im Versuch als stressauslösende Noxe dienen soll, wird jeweils ein weniger dominantes Tiere mit einem aggressiven Tier zusammengeführt (CARNEVALI et al. 2017). Die Untersuchung des Sozialverhaltens von Ratten in Form eines standardisierten Verhaltenstests wurde erstmals von FILE u. HYDE (1978) beschrieben. Dabei platzierten sie paarweise männliche Ratten der Gattung *Rattus norvegicus* in einer Testarena. Dabei veränderten sie die Lichtintensität und konnten beobachten, dass die Tiere bei einer erhöhten Lichtintensität reduzierte, soziale Interaktionen zeigten. Somit korrelierte das Sozialverhalten negativ mit dem Angstverhalten der Tiere. Dass sich die Untersuchung des Sozialverhaltens gut eignet, um angstassoziiertes Verhalten zu untersuchen, wird dadurch belegt, dass in einer anderen Studie eine Korrelation zwischen den sozialen Interaktionen und angstassoziierten Verhaltenstests beobachtet wurde (BERRY et al. 2012). Je nach zugrundeliegendem Stressor kann das

Ergebnis des Soziale-Interaktionen-Tests anders ausfallen. So kann beispielsweise ein sozialer Stressor bei männlichen Ratten zu einer Reduktion im Sozialverhalten führen (MEERLO et al. 1996), während ein nicht-sozialer Stressor zu einem gesteigerten Bedürfnis nach sozialen Kontakten führen kann (BOWEN et al. 2012; BOWEN u. MCGREGOR 2014).

Veränderungen im Sozialverhalten können über angstassoziiertes Verhalten hinaus auch ein Indikator für autismus-ähnliches Verhalten darstellen (MARIN et al. 2008). Autismus kann eine mögliche Komorbidität bei Epilepsieerkrankungen sein (FOMBONNE 2005; CANITANO 2007). Es wird vermutet, dass die Strukturen des Temporallappens, die bei einer chronischen Epilepsieerkrankung verändert sind, die zugrundeliegende Ursache für die Veränderungen im Sozialverhalten sind (MARIN et al. 2008). Im Speziellen bedeutet das, dass Ratten mit spontanen Anfällen reduziertes Sozialverhalten gegenüber Artgenossen zeigen und darüber hinaus nicht in der Lage sind, ihnen bereits bekannte Individuen von ihnen unbekanntem zu unterscheiden (MARIN et al. 2008).

### **3.3. Wühlverhalten**

Eine Vielzahl der tierexperimentell eingesetzten Nagetiere zeigt, wenn sie die Möglichkeit dazu hat, ein ausgeprägtes Wühlverhalten (DEACON 2006b). Durch dieses angeborene Verhalten sind sie in der Lage Höhlen, die ihnen als Schutz vor Fressfeinden, als Futterlager, als Witterungsschutz und als sicherer Ort zum Gebären ihrer Jungen dienen, zu konstruieren (DUDEK et al. 1983). Darüber hinaus kann das Wühlverhalten von diesen Tieren aber auch als defensives Verhalten gezeigt werden. Dabei versucht das wildlebende Beutetier dem Eindringling durch gezielte Wühlbewegungen Bodensubstrat entgegenschleudern (PINEL u. TREIT 1978). Dieser Verhaltensparameter wurde schon in verschiedenen Spezies und Tiermodellen untersucht. DEACON (2009) konnte in einer Studie belegen, dass sowohl Ratten, Mäuse und Hamster, als auch Gerbils dieses Verhalten zeigen. Ein Tiermodell, in dem dieser Verhaltensparameter bereits untersucht wurde, stellt die Prionenkrankheit bei Mäusen dar (DEACON et al. 2001). Darüber hinaus zeigen Mäuse unterschiedlicher Zuchtlinien und Mäuse mit zytotoxisch bedingten Hippocampusläsionen ein dem Modell, beziehungsweise der Linie entsprechendes, Wühlverhalten (DEACON et al. 2001; DEACON 2006b). Es stellt eine Herausforderung dar in kleinen Beutetieren, wie beispielsweise der Maus, geringe bis mäßige Schmerzen erfassen und beurteilen zu können. Deshalb sind sensitive und objektive Parameter dafür erforderlich. Dieses Problem ist dadurch bedingt, dass das Überleben der Tiere in freier Wildbahn durch das Zeigen von Schmerzen negativ beeinflusst sein kann. Sie sind bestrebt, diese Schwäche vor diversen Fressfeinden zu verbergen. Ähnliches Verhalten ist auch in Gefangenschaft gegenüber dem Menschen zu beobachten (STASIAK et al. 2003; PETERSON 2004; JIRKOF et al. 2010). Ähnlich wie das Nestbauverhalten handelt es sich beim Wühlverhalten um ein

*Luxury Behavior*. Deshalb kann es ebenfalls als Parameter eingesetzt werden, um einen Einblick in das Wohlbefinden der Tiere zu erhalten, insbesondere deshalb, weil die Tiere es vermeiden, durch das äußere Erscheinungsbild Unwohlsein zu zeigen (JIRKOF et al. 2010; JIRKOF et al. 2013b). Unter diesem Aspekt der Evaluierung des Wohlbefindens wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls das Wühlverhalten bei Ratten untersucht. Dabei wurde den Tieren eine Plastikröhre, gefüllt mit 2,5 Kilogramm Kies angeboten. Der Test kann bei Ratten aufgrund der großen Testapparatur, anders als bei Mäusen, nicht im Heimkäfig durchgeführt werden. Bei Mäusen werden die besseren Ergebnisse erzielt, wenn die Testapparatur über mehrere Stunden im Heimkäfig belassen wird. Ratten hingegen weisen bereits nach zwei Stunden eine Stagnation des Wühlverhaltens auf (DEACON 2009). DEACON (2009) konnte darüber hinaus feststellen, dass Ratten das natürliche Wühlverhalten besonders gut zeigten, wenn ihnen als Substrat Erde, Sand, Holzchips oder Kies zur Verfügung gestellt wurde. Unabhängig von der Wühlleistung war der Zeitpunkt der Durchführung des Tests. So konnten auch während der Hellphase positive Ergebnisse bei Ratten erzielt werden. DEACON (2009) konnte im Rahmen seiner Studie auch zeigen, dass ein Training der Tiere das Wühlverhalten positiv beeinflussen kann. Im Rahmen des Trainings können sich die Tiere an die Testsituation inklusive der Testapparatur gewöhnen. Das Training führte zu einer Progression der Wühlleistung bezüglich der gegrabenen Menge und zu einer Reduktion der Latenzzeit bis zum Einsetzen des zielgerichteten Wühlverhaltens. Darüber hinaus konnten mithilfe des Trainings interindividuelle Unterschiede reduziert werden, die zu einer homogeneren Gruppe führten.

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

Der Open-Field-Test oder auch der Offenfeld-Test wird seit Jahrzehnten eingesetzt, um angstassoziiertes Verhalten und die Lokomotion von Labornagern zu untersuchen (HALL 1934). Dabei besteht die Testapparatur aus einer Arena, die zu allen Seiten von einer Wand umgeben ist, sodass die Tiere sich nicht aus der Testsituation entziehen können (HALL 1934). Während der Prozedur wird dann beobachtet, wie das Tier mit der Situation umgeht alleine und somit ohne Partnertier in einer ungewohnten Umgebung zu sein und einer im Vergleich zum Heimkäfig großen offenen Fläche ausgesetzt zu sein. Da die Tiere zum einen in sozialen Verbänden leben und zum anderen speziesbedingt eine Agoraphobie zeigen, kann dieser Test durchaus eine angstausslösende Situation darstellen (PRUT u. BELZUNG 2003). Die Parameter, die während des Open-Field-Tests erhoben werden, sind: die Zeit, die die Tiere im Zentrum der Apparatur verbringen, beziehungsweise die Latenzzeit bis zum Eintritt ins Zentrum und die Zeit, die sie im Wandbereich verweilen. Halten sich die Tiere vorwiegend im Wandbereich auf, spricht man vom Phänomen der Thigmotaxis. Die Thigmotaxis beschreibt das Verhalten, bei dem die Tiere den Kontakt zur Wand mit ihren

Vibrissen suchen. Der Wandbereich bietet im Vergleich zu einer offenen Fläche, wie das Zentrum des Open-Fields Schutz vor Beutegreifern. Die Geschwindigkeit und die gesamte Strecke, die die Tiere zurücklegen, beschreibt die horizontale Lokomotion. Zusätzlich wird auch die vertikale Lokomotion beurteilt, was durch das Aufrichten der Tiere definiert wird (PRUT u. BELZUNG 2003). Zeigen die Tiere einen reduzierten Aufenthalt im Wandbereich und vermehrte vertikale Lokomotion, spricht man von einem reduzierten angstassoziierten Verhalten (KATZ et al. 1981; PRUT u. BELZUNG 2003; MÜLLER et al. 2009). Der Open-Field-Test fand bereits in einigen Epilepsiemodellen Anwendung. Die Ergebnisse bezüglich der Aktivität in der Literatur variieren jedoch stark. So wird in manchen Studien sowohl von einer reduzierten (FRANKE u. KITTNER 2001; WULSIN et al. 2018), als auch von einer erhöhten Aktivität (MÜLLER et al. 2009; SULEYMANOVA et al. 2016; DI LIBERTO et al. 2018) berichtet. Bedingt durch die Veränderungen in der Hormonregulation in der HPA-Achse können die Tiere mit Epilepsie ein ausgeprägteres Angstverhalten zeigen (FRANKE u. KITTNER 2001; MÜLLER et al. 2009; WULSIN et al. 2018). Diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf die Tatsache zurückführen, dass die Labornager unterschiedlich auf akuten beziehungsweise auf chronischen Stress reagieren. Erfahren sie vor der Testprozedur akuten Stress, neigen sie dazu während des Open-Field-Tests Hyperaktivität zu zeigen, während sie bei chronischem Stress eher Hypoaktivität aufweisen (KATZ et al. 1981). Es scheinen ebenso direkte Zusammenhänge zwischen den neuronalen, epilepsiebedingten Veränderungen und den Veränderungen im Angstverhalten und der Lokomotion zu bestehen (FRANKE u. KITTNER 2001; SULEYMANOVA et al. 2016).

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

Die Black-White-Box, in der Literatur auch als Light-and-Dark-Box beschrieben, dient dazu das angstassoziierte Verhalten von Mäusen und Ratten zu untersuchen. Dieser Test wurde erstmals von CRAWLEY u. GOODWIN (1980) beschrieben und wird eingesetzt, um den Effekt von Substanzen beziehungsweise Medikamenten auf das Angstverhalten zu untersuchen (CRAWLEY u. GOODWIN 1980; CAMPOS et al. 2013). Die viereckige Testapparatur besteht aus zwei Kompartimenten: einer rechteckigen weißen und einer rechteckigen schwarzen Box. Das schwarze Kompartiment ist mit einem Deckel verschlossen, sodass es eine dunkle Höhle simuliert, während das weiße Kompartiment hell erleuchtet ist. Beide Kompartimente sind über einen Tunnel miteinander verbunden (CRAWLEY u. GOODWIN 1980). Das zugrundeliegende Prinzip des Tests besteht darin, dass kleine Nagetiere eine angeborene Aversion gegen helle Plätze zeigen und sich speziesbedingt prinzipiell bevorzugt in dunkleren und geschützten Höhlen aufhalten (BOURIN u. HASCOET 2003). In dieser Testsituation werden die Mäuse und Ratten einem Konflikt ausgesetzt, der aus dieser

Aversion gegenüber hellen Bereichen und aus dem Bestreben die neue Umgebung zu erkunden, besteht (CRAWLEY u. GOODWIN 1980; FILE et al. 2004). Mit diesem Versuchsaufbau kann die Aktivität in Form der Frequenz der Übertritte vom einen in das andere Kompartiment gemessen werden. Darüber hinaus kann das angstassoziierte Verhalten mittels der Gesamtdauer, die das Tier im hellerleuchteten Bereich verbringt und dem Index aus Übertritten ohne erhöhte Lokomotion bestimmt werden (BOURIN u. HASCOET 2003). CRAWLEY u. GOODWIN (1980) nutzten diese Testapparatur, um die anxiolytische Wirkung von Benzodiazepinen zu untersuchen. Dabei konnten sie feststellen, dass Mäuse, die mit Chlordiazepoxid beziehungsweise Clonazepam vorbehandelt wurden, die Kompartimente frequenter wechselten. In der Epilepsieforschung findet dieser Test ebenfalls Anwendung. Bedingt durch die Angststörungen, die beim Humanpatient mit Epilepsieerkrankungen assoziiert sein können, besteht das Interesse, diese Komorbidität auch im Tiermodell zu untersuchen (GRÖTICKE et al. 2007; MÜLLER et al. 2009). So zeigen beispielsweise Mäuse, bei denen ein SE mittels Pilocarpin induziert wurde, ein ausgeprägteres Angstverhalten, in Analogie zu Humanpatienten. Dieses Verhalten konnte sowohl in der Black-White-Box, als auch im Open-Field beobachtet werden (MÜLLER et al. 2009). In einer anderen Studie mit Mäusen, die einen durch Pilocarpin induzierten SE erfuhren, konnte über das gesteigerte Angstverhalten hinaus noch eine Korrelation mit der Expression von *Brain-Derived-Neurotrophic-Factor* (BDNF) festgestellt werden (OTSUKA et al. 2016). Dabei war das Ausmaß der Angststörung abhängig von der Länge des initialen SE.

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

Das Elevated-Plus-Maze (EPM) gehört wie die Black-White-Box in die Gruppe der Verhaltenstests, mittels derer schwerpunktmäßig das angstassoziierte Verhalten bei Labornagern untersucht werden kann. Das EPM wurde erstmals von HANDLEY u. MITHANI (1984) beschrieben. Dabei wurde der Effekt von Alpha-Adrenozeptor-Agonisten auf das angstassoziierte Verhalten untersucht. Die Testapparatur besteht aus vier im rechten Winkel aufeinandertreffenden Stegen. Dabei sind zwei gegenüberliegende Stege mit einer umgrenzenden Wand versehen („geschlossene Arme“), während die anderen beiden Stege keine seitliche Begrenzung besitzen („offene Arme“). Diese kreuzförmige Grundfläche wird mittels Stelzen erhöht, sodass sie vom Boden abgehoben ist (CAMPOS et al. 2013). Mäuse und Ratten zeigen ein ausgeprägtes Neugierde- und Explorationsverhalten. Das zugrundeliegende Prinzip des EPM beruht auf dem Konflikt dieser Tiere zwischen dem Bestreben der Exploration nachzugehen und der Aversion gegen helle, ungeschützte und offene Flächen (MONTGOMERY u. MONKMAN 1955; FILE et al. 2004; CAMPOS et al. 2013). Der Aufenthalt der Tiere in den offenen Armen stellt eine Stresssituation dar, die mit erhöhtem Kotabsatz einhergehen kann (FILE et al. 2004). Als Index für angstassoziiertes Verhalten gilt die

Zeit, die die Tiere auf den offenen Armen verbringen und die Frequenz der Übertritte von den geschlossenen auf die offenen Arme (DEACON 2013). Der offene Arm wird dabei noch in das äußere Drittel und die an das Zentrum angrenzenden inneren zwei Drittel unterteilt. Dabei stellt das äußere Drittel den am wenigsten geschützten und kritischsten Bereich für vermehrt ängstliche Tiere dar. Die Interpretation des Zentrums, in dem alle vier Arme aufeinandertreffen, ist dagegen umstritten. Sie stellt eine Art Transitzone dar, in der sich das Tier für eine der vier Arme entscheiden muss (DEACON 2013). Bedingt durch das Zentrum wurde eine abgewandelte Form des EPM entwickelt – das *Zero-Maze*. Dabei handelt es sich um einen kreisförmigen, ebenfalls vom Boden angehobenen Steg, der allerdings durch die Kreisform keine sich kreuzenden Arme hat und somit keine zentrale Zone aufweist. Beim *Zero-Maze* geht fortlaufend ein geschlossener Steg in einen offenen Steg über (DEACON 2013). Auch wenn das zugrundeliegende Prinzip des EPM und des *Zero-Maze* das gleiche ist, konnte beispielsweise in einer Studie bei Ratten, das Ergebnis des EPM nicht mittels des *Zero-Maze* validiert werden (DEACON 2013). Im Zusammenhang mit dem Pilocarpin-Modell bei Mäusen und Ratten gibt es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur bezüglich des angstassoziierten Verhaltens. Dabei wird auf der einen Seite ein erhöhtes angstassoziiertes Verhalten (LOPES et al. 2016; WULSIN et al. 2018), auf der anderen Seite aber auch ein reduziertes angstassoziiertes Verhalten (INOSTROZA et al. 2011; VRINDA et al. 2017) beschrieben. In einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass auch Ratten, denen Pilocarpin appliziert wurde, ohne dass sie einen SE entwickelten, nachfolgend ein ausgeprägteres angstassoziiertes Verhalten im EPM zeigten (DUARTE et al. 2013). Dabei scheint die Qualität des angstassoziierten Verhaltens nicht gezwungenermaßen mit der Epilepsie per se in Korrelation zu stehen, sondern mit dem Ausmaß der Läsionen im Gehirn (INOSTROZA et al. 2011). Ein anderer Parameter, der im EPM bestimmt werden kann, ist die Risikoeinschätzung der Tiere. Dabei zeigen sie beispielsweise, ähnlich wie bei der Black-White-Box, *Stretching Postures* von dem geschlossenen in den offenen Arm. Diese Risikoeinschätzung kann sich auch in Form von *Head Dips* darstellen. Dabei lehnen sich die Tiere bei den offenen Armen über die Bodenfläche des Steges hinaus (VRINDA et al. 2017).

### 3.7. Saccharin-Präferenz

Die Depression stellt die häufigste Komorbidität bei Epilepsiepatienten dar (KLEIN et al. 2015). Dabei leiden ca. 50 % der Humanpatienten mit einer TLE an dieser psychischen Erkrankung (KANNER 2003). Gleichermaßen ist jedoch auch das Risiko für Depressionspatienten um das Siebenfache erhöht, an Epilepsie zu erkranken (KANNER 2003). Die Ursache der mit Epilepsie assoziierten Depression ist bislang umstritten. So könnte die Depression durch psychosoziale Aspekte unter denen der Epilepsiepatient leidet, bedingt sein

(KANNER 2003). Eine andere Theorie sucht die Ursache in der Dysregulation von Neurotransmittern bei unter wiederkehrenden Anfällen leidenden Patienten. Die Dysregulation umfasst Transmitter wie GABA, Glutamat, Norepinephrin und Serotonin (JOBE 2003; KANNER 2003). Anhand von klinischen Studien wurde ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen hippocampaler Dysfunktion (GILLIAM et al. 2007) beziehungsweise Neurodegeneration (BRIELLMANN et al. 2007) und der Entstehung von Depressionen hergestellt. Ein Kardinalsymptom der Depression stellt die Anhedonie dar. Sie beschreibt das Phänomen der Unfähigkeit betroffener Individuen, sich an schönen Dingen zu erfreuen (KANNER 2003). Um dieses Symptom auch im Maus- beziehungsweise Rattenmodell untersuchen zu können, kann der Saccharin-Präferenz-Test durchgeführt werden. Das zugrundeliegende Prinzip dieses Tests beruht auf dem Trinkverhalten der Labornager. Sie zeigen eine angeborene Präferenz von süßen gegenüber ungesüßten Lösungen (YOUNG u. RICHEY 1952; STROUTHES 1971). Schon bei chronisch mildem Stress zeigen Ratten ein anhedonie-ähnliches Verhalten, indem sie weniger der gesüßten Lösung konsumieren (PAPP et al. 1991; HATCHER et al. 1997). Wie stark ausgeprägt diese Präferenz der Nagetiere sein muss, zeigte sich in einer Studie von SCHWARTZ et al. (2017), in der Ratten, wenn sie die Option dazu bekamen, Saccharinlösung gegenüber Heroin vorzogen. Auch in der Epilepsieforschung wurde dieser Verhaltenstest bei Ratten (MAZARATI et al. 2008) und Mäusen (KLEIN et al. 2015) validiert. Dabei zeigten die Tiere nach einem mit Pilocarpin induzierten SE ein langanhaltendes anhedonie-ähnliches Verhalten, indem sie eine Reduktion des Saccharinkonsums aufwiesen. In der vorliegenden Studie wurde dieser Verhaltenstest im Heimkäfig durchgeführt. Dadurch kann zusätzlicher Stress für das Tier durch Transport und weniger bekannte Testumgebungen reduziert werden und folglich auch die negative Beeinflussung der Testergebnisse (KLEIN et al. 2015).

### **3.8. Grimace-Scale**

Der Mensch ist in der Lage Emotionen über seine Mimik auszudrücken und damit nonverbal zu kommunizieren. Gleichmaßen besitzen auch nicht-humane Säugetiere diese Fähigkeit der nonverbalen Kommunikation (DARWIN 1872). Die mimische Darstellung von Emotionen kann verschiedene Qualitäten einnehmen – positive und negative Emotionen können über den Gesichtsausdruck demonstriert werden (FINLAYSON et al. 2016). Das mimische Darstellen von Schmerzen kann diverse Vorteile mit sich bringen. So kann das schmerzempfindende Individuum symbolisieren, dass es Hilfe benötigt oder kann andere Tiere dadurch warnen (CRAIG 2009). Diese Fähigkeit der mimischen Expression von Schmerzen machte sich LANGFORD et al. (2010) zu nutzen, um den sogenannten *Mouse-Grimace-Scale* (MGS) zu entwickeln. Dabei handelt es sich um ein Schema mit vier verschiedenen Parametern, die bei vorhandenem Schmerzempfinden vom physiologischen Zustand

abweichen können. Durch die Abstufung in diesem Beurteilungsschema ist es nicht nur möglich zu evaluieren, ob das Tier akut Schmerzen empfindet, sondern es ermöglicht auch eine Quantifizierung der Schmerzhaftigkeit. Nach dem MGS wurde auch das Pendant bei der Ratte entwickelt – der *Rat-Grimace-Scale* (RGS) (SOTOCINAL et al. 2011). Der RGS beruht auf der Beurteilung von vier Parametern:

1. Die Lidöffnung des **Auges**: Bei schmerzhaften Situationen können die Augen fast beziehungsweise komplett geschlossen sein.
2. Die Form der **Nase** und der **Wangen**: Im Normalzustand ist der Nasenrücken der Tiere leicht gewölbt. Wenn das Tier Schmerzen hat, kann diese Wölbung abnehmen. Diese Veränderung der Gesichtsform ist durch die mimische Muskulatur bedingt, die bei schmerzhaften Zuständen einen erhöhten Tonus aufweisen kann.
3. Die Stellung der **Ohren**: Während die Ohren bei einer gesunden und aufmerksamen Ratte aufgestellt und nach vorne gerichtet sind, werden sie bei unter Schmerzen leidenden Tieren abgespreizt und wirken gekräuselt.
4. Die Stellung der **Vibrissen**: Bei Tieren mit präsentem Schmerz können die Vibrissen nach rostral abgestellt werden. Die Stellung der Vibrissen steht ebenfalls in Zusammenhang mit der schmerzbedingten mimischen Muskulatur.

Diese vier Parameter können mit einem Score von null (nicht vorhanden), eins (moderat ausgeprägt) oder zwei (deutlich ausgeprägt) beurteilt werden. Nach der Beurteilung der Einzelparameter ergibt sich dann ein Summenscore. Der RGS wurde im Zusammenhang mit diversen Eingriffen beurteilt. Er konnte bei Schmerzinduktion verschiedener Genese validiert werden: bei viszeralen, inzisionalen, orthopädischen, inflammatorischen und neuropathisch bedingten Schmerzen (SOTOCINAL et al. 2011; LEUNG et al. 2016; AKINTOLA et al. 2017; PHILIPS et al. 2017).

### 3.9. Irwin-Score

IRWIN (1968) entwickelte ein Beurteilungsschema, das dazu dient, in präklinischen Studien die Wirkung von Medikamenten auf das zentrale Nervensystem zu evaluieren. Dieses Beurteilungsschema, der sogenannte Irwin-Score, gehört zu den am häufigsten angewendeten Scoring-Systemen für das ZNS betreffende Wirkungen in der präklinischen Arzneimittelforschung (FONCK et al. 2015). Der Irwin-Score beinhaltet verschiedene Parameter, die nach der Applikation von Medikamenten beurteilt werden (IRWIN 1968; FONCK et al. 2015). Diese Parameter umfassen eine angepasste, klinische Untersuchung, neuronale Abnormalitäten und Verhaltensauffälligkeiten (GRÖTICKE et al. 2007). Die praktische Durchführung der Evaluierung nach Irwin sieht vor, die Parameter unter Berücksichtigung des Grades der Invasivität zu analysieren. Somit beginnt die Beurteilung des Tieres mit der

Adspektion. Daraufgehend wird eine Abfolge von Verhaltenstests durchgeführt (IRWIN 1968; GRÖTICKE et al. 2007). In der vorliegenden Studie wurde ein modifizierter Irwin-Score verwendet. Das herangezogene Beurteilungsschema wurde dahingehend angepasst, dass nur Parameter untersucht wurden, deren Analyse nicht mit Stress für die Tiere assoziiert war. In der vorliegenden Studie diente der Irwin-Score somit nicht zur Evaluierung von Arzneimittelwirkungen auf das ZNS, sondern zur Evaluierung der Auswirkung der Epileptogenese beziehungsweise der Manifestation der Epilepsieerkrankung mit spontanen Anfällen auf das klinische Erscheinungsbild und das Verhalten der Tiere. Dieser modifizierte Irwin-Score befindet sich im Anhang 4.

## 4. Biochemische Parameter

Zusätzlich zu den verhaltensbiologischen und (patho-)physiologischen Parametern wurden in der vorliegenden Studie auch biochemische untersucht. Mithilfe der Quantifizierung der fäkalen Corticosteronmetaboliten (FCM) und des Corticosterons in Haaren und Serum können Rückschlüsse auf die Aktivierung der HPA-Achse gezogen werden. Die Aktivierung der HPA-Achse kann von unterschiedlicher Ursache sein. Andere biochemische Parameter, die im Rahmen der Studie quantifiziert wurden, waren BDNF und Creatinkinase (CK). Beim Studiendesign wurde beachtet, dass alle Proben während den ersten Stunden nach Beginn der Hellphase gesammelt wurden, um tageszeitliche Schwankungen der biochemischen Parameter ausschließen zu können.

### 4.1. Corticosteron und seine Metaboliten

Die HPA-Achse kann durch Stress aktiviert werden. Dabei werden exzitatorische Impulse über den aufsteigenden Hirnstamm oder über das limbische System zum paraventriculären Nucleus (PVN) im Hypothalamus geleitet. Wird der exzitatorische Impuls über den aufsteigenden Hirnstamm zum PVN geleitet, ist die Genese des Impulses physiologisch bedingt, während die Genese eines Impulses des limbischen Systems psychisch bedingt ist (HERMAN u. CULLINAN 1997; FLAK et al. 2014). Dieser Stressimpuls hat zur Folge, dass im Hypothalamus der *Corticotropin Releasing Factor* (CRF) ausgeschüttet wird (GREEN u. MCCORMICK 2016). Der CRF wird dann über das Portalvenensystem zum Hypophysenvorderlappen transportiert, wodurch die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) stimuliert wird (GREEN u. MCCORMICK 2016). Nach Abgabe des ACTH in die Blutbahn wirkt es an der Nebennierenrinde, indem die Synthese und Ausschüttung von Glucocorticoiden stimuliert wird. Die Ausschüttung von Glucocorticoiden wird durch negative Feedback-Mechanismen, die auf allen Ebenen der HPA-Achse wirken können, reguliert. Dieser negative Feedback-Mechanismus dämpft die weitere Aktivierung der HPA-

Achse, wodurch die Glucocorticoid-Werte wieder auf Basalwerte absinken (HERMAN u. CULLINAN 1997). Auch wenn kein Stressor vorhanden ist, werden pulsatil Glucocorticoide von der Nebennierenrinde sezerniert. Dabei variiert die Ausschüttung dem circadianen Rhythmus entsprechend. Somit ist der Basalwert zu Beginn der Aktivphase (Dunkelphase) höher, als zum Ende der Aktivphase (GREEN u. MCCORMICK 2016). Die Wirkung des Glucocorticoids wird durch Mineralcorticoid-Rezeptoren (MR) und Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) vermittelt (FUNDER 1997). Nachdem das Glucocorticoid an den entsprechenden Rezeptor gebunden hat, wandert der Glucocorticoid-Rezeptor-Komplex ab und wird in den Zellkern transportiert, wo er an der transkriptiven Regulation beteiligt ist (RATMAN et al. 2013). Abhängig davon, welcher Rezeptor aktiviert wird, der MR oder GR, finden unterschiedliche Anpassungsreaktionen statt. So induziert die Bindung am MR beispielsweise die Aufrechterhaltung der neuronalen Erregbarkeit und der kardiovaskulären Funktion, während die Aktivierung des GR beispielsweise zur stressbedingten Immunsuppression führt (GUNNAR u. QUEVEDO 2007). Die HPA-Achse unterliegt dabei aber nicht nur Stressimpulsen und negativen Feedback-Mechanismen, sondern wird auch maßgeblich durch Sexualhormone beeinflusst. Somit führen Östrogene zu einer vermehrten und Androgene zu einer reduzierten Antwort der HPA-Achse auf Stressimpulse (GREEN u. MCCORMICK 2016). Ratten sezernieren, anders als der Mensch, Corticosteron aus der Nebennierenrinde (LEPSCHY et al. 2007). Corticosteronkonzentrationen können im Serum und in den Haaren bestimmt werden. Im Kot hingegen können ausschließlich die Corticosteronmetaboliten quantifiziert werden (BAMBERG et al. 2001; LEPSCHY et al. 2007; LEPSCHY et al. 2010; YU et al. 2015). Dabei muss beachtet werden, dass, je nach Probenmaterial, der Peak der maximalen Anreicherung nach entsprechenden Stressimpulsen stark variiert. So erreicht die Corticosteronmetabolitenausscheidung im Kot zehn Stunden nach der Stress-Exposition ein Maximum während der Ruhephase beziehungsweise nach vier Stunden während der Aktivphase (TOUMA et al. 2003). Dieses Phänomen lässt sich auf eine schnellere Darmpassage während der Aktivphase zurückführen (TOUMA et al. 2003). Die Plasmakonzentration erreicht 15 – 30 min nach dem initialen Stressor ein Maximum (BELDA et al. 2015). Die Auswirkung von chronischen Stressoren auf die HPA-Achse kann mithilfe der Corticosteronkonzentration im Haar evaluiert werden (SCORRANO et al. 2015). Bei der Einlagerung von Corticosteron in die Haarmatrix gibt es keinen Sättigungseffekt (SCORRANO et al. 2015). Allerdings muss bei der Haar-Corticosteronbestimmung berücksichtigt werden, dass die Haare bei Ratten nicht gleichmäßig nachwachsen, was impliziert, dass sich diese Methode zur Corticosteronbestimmung nur dann eignet, wenn der Stressimpuls frequent über einen längeren Zeitraum anhält oder kontinuierlich länger andauernd ist (LIU et al. 2008). Sowohl die Kotproben als auch die Haarproben lassen sich nicht-invasiv gewinnen, was einen Vorteil gegenüber den Plasmaproben darstellt (LEPSCHY et al. 2007). Denn das invasive Verfahren der Blutentnahme selbst stellt einen Stress-Stimulus

für die Labornager dar. Bei der Interpretation von erhöhten Corticosteronkonzentrationen muss berücksichtigt werden, dass man allein durch die Bestimmung des Glucocorticoids keine Aussage treffen kann, ob die erhöhte Konzentration auf Distress oder Eustress zurückzuführen ist (NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON u. ALLEVIATION OF DISTRESS IN LABORATORY 2008). Somit müssen die Ergebnisse stets im Zusammenhang mit anderen Parametern evaluiert werden, um aussagekräftige Rückschlüsse über die tatsächliche stressbedingte Belastung der Tiere zu erlangen.

Bei Mäusen, die einen durch Pilocarpin induzierten SE erlitten, konnten erhöhte Corticosteronkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden (WULSIN et al. 2016; WULSIN et al. 2018). Dabei waren die Glucocorticoidkonzentrationen sowohl in der frühen Post-Insult-, in der Latenz- als auch in der chronischen Phase erhöht. Zusätzlich zu diesem chronischen Stress, bedingt durch die Epileptogenese beziehungsweise die spontanen Anfälle, wurden die Tiere einem akuten Stressimpuls, in Form von *Restraint Stress* ausgesetzt, was zu einer vermehrten Corticosteronausschüttung mit einem Höhepunkt 30 min nach Beginn des Impulses, führte (WULSIN et al. 2018). Entsprechend diesen Ergebnissen konnte auch eine Gewichtszunahme der Nebennieren verzeichnet werden.

Auch bei Humanpatienten, die an einer TLE leiden, können chronisch erhöhte Glucocorticoidkonzentrationen gemessen werden (ZOBEL 2004). Das zugrundeliegende Phänomen für diese Hyperaktivierung der HPA-Achse könnte die Reorganisation im limbischen System sein (CURIA et al. 2014). O'TOOLE et al. (2014) konnte einen Zusammenhang zwischen der Anfallsfrequenz und der Aktivierung der HPA-Achse feststellen. Dieses Ergebnis impliziert, dass erhöhte Corticosteronkonzentrationen nicht zwingend durch einen Stressimpuls bedingt sind. Das muss bei der Interpretation der HPA-Achsen-Aktivierung bei epileptischen Tieren berücksichtigt werden.

#### **4.2. Brain-Derived-Neurotrophic-Factor**

Der BDNF ist ein Wachstumsfaktor, der wichtige Funktionen im ZNS besitzt (BJORKHOLM u. MONTEGGIA 2016). BDNF ist an der neuronalen Reifung, der Plastizität und der Formierung der Synapsen beteiligt (PARK u. POO 2013). Er gehört zur Familie der sogenannten Neurotrophine. Die Expression von BDNF wird durch insgesamt neun verschiedene Promotoren reguliert, durch die via Transkription und Translation dasselbe BDNF exprimiert wird (AID et al. 2007; PRUUNSILD et al. 2007). Die Transkription in die mRNA kann durch neuronale Aktivität reguliert werden. Diese neuronale Aktivität ist bedingt durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx,  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable Glutamat-Rezeptoren und spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (ZAFRA et al. 1991; GHOSH et al. 1994). Synthetisiert wird BDNF sowohl in Neuronen, als auch in Gliazellen. Dabei wird das *Pre-Pro-BDNF* synthetisiert, welches durch

Abspaltungsprozesse zum reifen BDNF wird (LEAL et al. 2017). Die Sekretion findet sowohl prä- als auch postsynaptisch statt (MATSUDA et al. 2009). Das BDNF verfügt über die Fähigkeit an diversen Rezeptoren zu binden und Signalkaskaden zu regulieren (SOPPET et al. 1991; MEEKER u. WILLIAMS 2015). Einer der Rezeptoren, an die der Wachstumsfaktor mit hoher Affinität bindet, ist die Tropomyosin-Rezeptor-Kinase B (SOPPET et al. 1991). BDNF kann darüber hinaus die Leitfähigkeit von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptor) (LEVINE et al. 1998), die Translation von  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptor) (CALDEIRA et al. 2007; FORTIN et al. 2012) und die inhibitorische Neurotransmitterausschüttung durch Regulierung der Oberflächenexpression von GABA-Rezeptoren beeinflussen (JOVANOVIC et al. 2004). BDNF ist an der Funktionalität des Gedächtnisses und der Kognition beteiligt (SASI et al. 2017; FALCICCHIA et al. 2018). Darüber hinaus besteht eine negative Korrelation zwischen der BDNF-Ausschüttung und angstassoziiertem Verhalten (CHEN et al. 2006; OTSUKA et al. 2016). In einer Studie von OTSUKA et al. (2016) zeigten Mäuse, die einen mit Pilocarpin-induzierten SE erfuhren, ein gesteigertes Angstverhalten in der Black-White-Box, während die BDNF-Expression reduziert war.

#### **4.3. Creatinkinase**

Die Creatinkinase (CK) ist ein Enzym, das entsprechend seiner Benennung, N-Phosphoryl-Gruppen überträgt. Durch diese enzymatische Aktivität entsteht Adenosintri-phosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP). Das ATP dient der Zelle als Energiequelle. Die CK kann vor allem in Muskelzellen und im Gehirn nachgewiesen werden. Dabei gibt es verschiedene Isoenzyme, die die gleiche Reaktion katalysieren. Die Isoformen sind das Skelettmuskelenzym (CK-MM), das Gehirnenzym (CK-BB) und das Herzmuskelenzym (CK-MB) (DEUFEL 2009). Erhöhte Konzentrationen der CK-MM deuten auf eine Schädigung von Skelettmuskelzellen hin. In der vorliegenden Studie sollte die Quantifizierung der CK dazu dienen einen Hinweis auf anfallsassoziierte Muskelschädigung zu erlangen.

## **5. (Patho-)physiologische Parameter**

### **5.1. Sexualzyklus**

Ratten werden mit 32 - 36 Tagen geschlechtsreif (GOLDMAN et al. 2007). Der Sexualzyklus bei Mäusen und Ratten beträgt vier bis fünf Tage. Aufgrund des Einflusses der Sexualhormone auf die HPA-Achse stellt die Zyklusbestimmung bei Labornagern eine essenzielle Untersuchung dar, um die Aussagekraft der Corticosteronbestimmung validieren zu können (GOLDMAN et al. 2007; CORA et al. 2015). Darüber hinaus wird die Zyklusbestimmung

auch in toxikologischen Studien herangezogen, um den Einfluss diverser Substanzen auf die Fruchtbarkeit zu evaluieren (GOLDMAN et al. 2007). Es kann zwischen vier verschiedenen Zyklusstadien unterschieden werden:

- Proöstrus
- Östrus
- Metöstrus
- Diöstrus

Die Einteilung erfolgt aufgrund der Qualität und der Quantität von Zelltypen, die mittels einer Vaginalzytologie beurteilt werden (CORA et al. 2015). Die Dauer des Proöstrus beträgt bei Ratten im Durchschnitt 14 Stunden (GRASSO et al. 1998). Er ist in der vaginalzytologischen Untersuchung gekennzeichnet durch kleine, runde und zellkernhaltige Epithelzellen, die dazu neigen sich in Zellhaufen anzusammeln. Der Östrus dauert durchschnittlich zwischen 24 und 48 Stunden (GRASSO et al. 1998). Während dieser Zyklusphase sind überwiegend zellkernlose und oberflächliche Epithelzellen in der Vaginalzytologie zu finden. Darüber hinaus können auch zahlreiche Bakterien nachgewiesen werden. Der Metöstrus dauert sechs bis acht Stunden an (CORA et al. 2015). Während dieser Phase sind in der Vaginalzytologie überwiegend keratinisierte Epithelzellen und neutrophile Granulozyten zu finden. Der Diöstrus stellt mit einer Dauer von 48 bis 72 Stunden die längste der vier Phasen dar (CORA et al. 2015). Kennzeichnend für diese Phase ist eine niedrige bis moderate Zellularität. Die wenigen Zellen, die sich in dieser Phase in der Vaginalzytologie darstellen können sind kernhaltige Epithelzellen und neutrophile Granulozyten. Vereinzelt können auch zellkernlose, keratinisierte Epithelzellen vorkommen. Der Sexualzyklus von weiblichen Tieren und die damit verbundene Hormonausschüttung können einen Einfluss auf die Induktion eines mit Pilocarpin induzierten SE bei Ratten haben (BRANDT et al. 2016). Dabei benötigen Tiere, die sich im Östrus beziehungsweise nahe um die Zeit des Östrus befinden tendenziell eine höhere Gesamtdosis an Pilocarpin. In der Humanmedizin wurde eine Korrelation zwischen Östradiolkonzentrationen und der Anfallsaktivität beschrieben. Dieses Phänomen beruht auf strukturellen und funktionalen Veränderungen im Hippocampus (WOOLLEY u. SCHWARTZKROIN 1998; FRYE 2008; HERZOG 2008).

## **5.2. Herzfrequenz und Herzratenvariabilität**

Der Sinusknoten befindet sich im rechten Vorhof und generiert die intrinsische Herzschlagfrequenz. Über das autonome Nervensystem können an dieser Herzfrequenz Anpassungen vorgenommen werden, sodass das Herz-Kreislaufsystem an jede Situation adaptiert werden kann. Das autonome Nervensystem besteht aus zwei Komponenten – dem Sympathikus und dem Parasympathikus. Der sympathische Anteil ist in der Lage, die Herzfrequenz

über Adrenalin und Noradrenalin zu erhöhen. Der Parasympathikus hingegen kann mittels Acetylcholin die Herzschlagfrequenz senken (KLINKE et al. 2009). Bei dieser Anpassungsfähigkeit des Herzens, die HF von Herzschlag zu Herzschlag verändern zu können, spricht man von der Herzratenvariabilität (HRV). Physiologisch sind der Sympathikus und der Parasympathikus im Gleichgewicht. Beim Ruhetonus überwiegt der Einfluss des Parasympathikus. Ist die HRV verändert, liegt das primär an einem reduzierten Vagustonus, wodurch der Sympathikustonius in diesen Fällen überwiegt (THAYER u. STERNBERG 2006).

Die HF unterliegt einer circadianen Rhythmik. Somit ist sie beispielsweise bei Mäusen während der Aktivphase höher, als während der Ruhephase. Dabei kann während der Aktivphase ein biphasischer Anstieg der HF beobachtet werden, während die niedrigsten Werte während der Ruhephase erreicht werden (LI et al. 1999; STEIN et al. 2006). Die circadiane Rhythmik der HF kann durch Störfaktoren beeinträchtigt sein. So kann lang andauernder Stress zu einer Anpassung der HF während der Aktiv- und Ruhephase führen, sodass die Varianz in der circadianen Rhythmik verstreicht (SGOIFO et al. 2002).

Bei Humanpatienten, die an einer Epilepsieerkrankung leiden, können Veränderungen im autonomen Nervensystem und am Herzen selbst festgestellt werden, die sich in Form von Herzrhythmusstörungen oder in Form von reduzierter HRV manifestieren (SEVCENCU u. STRUIJK 2010). Diese epilepsiebedingten Veränderungen, die sich auf die Leistung und Funktion des Herzens auswirken, können die Ursache für *Sudden unexpected Death in Epilepsy* (SUDEP) darstellen (SEVCENCU u. STRUIJK 2010; BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Diese Arrhythmien können auf Veränderungen der Reizleitung zurückgeführt werden. So konnte in einem chemischen Post-SE-Modell bei Ratten nachgewiesen werden, dass bei den betroffenen Tieren eine Reduktion der spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen vorhanden war. Diese Kanäle sind beim Nagetier für die frühe Repolarisation notwendig. Außerdem konnte eine Erhöhung der  $\beta_1$ - und eine Reduktion der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren nachgewiesen werden, die maßgeblich an der Veränderung des Sympathikustonius beteiligt sind (LAI et al. 2018). Eine andere Ebene der Regulation der HF stellt die des ZNS dar. Dabei ist der paraventriculäre Nucleus, als Teil des Hypothalamus ein wichtiger Knotenpunkt für die Regulierung des Einflusses von Sympathikus und Parasympathikus (DENG et al. 2015). Zusätzlich zu den Veränderungen der HRV und der auftretenden Herzrhythmusstörungen, wurde beim Humanpatienten festgestellt, dass sie keine circadiane Rhythmik der HRV aufweisen (RONKAINEN et al. 2005).

Eine reduzierte HRV ist jedoch nicht spezifisch für Individuen, die unter Epilepsie leiden. Sie wird auch als Parameter in der Untersuchung von Schmerzmodellen oder als Parameter zur Belastungsbeurteilung bei Labornagern herangezogen (ARRAS et al. 2007). In Korrelation zu einer reduzierten HRV konnten erhöhte Cortisol-Werte in Speichel und Urin nachgewiesen werden (THAYER u. STERNBERG 2006; LIEW et al. 2016). Es muss allerdings

die Anpassungsfähigkeit des autonomen Nervensystems auf wiederkehrende Stressoren beachtet werden. So kann die autonome Antwort auf einen wiederkehrenden Stressor adaptiv und somit reduziert sein (SGOIFO et al. 2002). Dabei hängt die Adaption von der Qualität des Stressors ab. Kann das betroffene Individuum den Stressor nicht selbst kontrollieren und kehrt er somit unkontrolliert wieder, wird die Stressantwort wahrscheinlich konstant ausgeprägt ausfallen.

Die Bestimmung der HRV setzt die Aufzeichnung eines EKGs voraus. Dabei stellt das EKG graphisch den Summenvektor der Herzerregung im zeitlichen Verlauf dar (KLINKE et al. 2009). Das EKG umfasst folgende Abschnitte:

- die **P-Welle**: Depolarisation der Vorhöfe
- den **QRS-Komplex**: Depolarisation der Ventrikel
- die **T-Welle**: Repolarisation

Jeder Herzschlag wird im EKG als R-Zacke dargestellt und alle Herzschläge über einen Zeitraum von einer Minute mit der Einheit *Beats per Minute* (bpm) angegeben. Die Intervalle zwischen zwei R-Zacken werden als Schlag-zu-Schlag-Intervall (RR-I, NN-I) bezeichnet und in der Einheit ms angegeben (ARRAS et al. 2007). Die Parameter der HRV sind weiter unterteilt in zeitdomänenbasierte und frequenzdomänenbasierte Parameter. Zu den zeitdomänenbasierten Parametern gehören:

- **SDNN**: Standardabweichung der RR-I
- **RMSSD**: die Quadratwurzel des Mittelwerts über alle Quadrate der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle
- **NN9**: alle Paare aufeinanderfolgender RR-I, die einen längeren Abstand, als 9 ms aufweisen
- **pNN9**: prozentualer Anteil der aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, deren Intervall sich um mehr als 9ms unterscheidet; dieser Parameter korreliert stark mit RMSSD und dient als Maß für parasympathische Aktivität

Sowohl RMSSD, als auch NN9 dienen als Parameter für die kurzfristige Anpassung der parasympathischen Aktivität (FORCE 1996).

Zu den frequenzdomänenbasierten Parametern gehört das Verhältnis aus *Low Frequency* und *High Frequency* (LF/HF).

Die *High Frequency* spiegelt die parasympathische Aktivität wider. Das Verhältnis von LF/HF gibt einen Einblick in die Gesamtvariabilität, lässt sich aber nicht klar der Aktivität des Sympathikus oder des Parasympathikus zuordnen.

### III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Tiermodelle nehmen nach wie vor eine wichtige Rolle in der Epilepsieforschung ein (LÖSCHER u. BRANDT 2010). Anhand der Post-SE-Modelle können die Mechanismen der Pharmakoresistenz von Epilepsien untersucht werden (STABLES et al. 2003). Darüber hinaus können sie dazu nützlich sein, neue AED zu identifizieren (ROGAWSKI 2006; LÖSCHER u. BRANDT 2010). Des Weiteren sollen im Tiermodell Zielstrukturen entdeckt werden, die sich für antiepileptogene Behandlungen eignen, sodass die chronische Phase mit der Manifestation der Epilepsieerkrankung vermieden werden kann (LÖSCHER u. BRANDT 2010). Aufgrund der Notwendigkeit in der Epilepsieforschung auf Tiermodelle zurückzugreifen, ist es essenziell die potenzielle Belastung, die im Epilepsiemodell auftreten könnte, adäquat einzuschätzen. Bei einer Belastungseinstufung von Epilepsiemodellen müssen zusätzlich zur Krankheitsentstehung und Manifestation auch die experimentellen Prozeduren berücksichtigt werden, die an den Tieren durchgeführt werden (LIDSTER et al. 2016). Da Ratten, ähnlich wie Mäuse, Beutetiere sind, sind sie bestrebt, Schmerzen und Leiden zu verbergen (ARRAS et al. 2007; JIRKOF et al. 2010). Aufgrund dieser Eigenschaft der Beutetiere ist die Belastungseinschätzung deshalb erschwert und setzt die Identifizierung von Parametern voraus, die robust, objektiv und sensitiv sind und sich für dieses Vorhaben eignen. Mithilfe dieser Parameter soll die Grundlage einer wissenschaftlich-basierten Beurteilung der Belastung geschaffen werden. Dieses Ziel setzt allerdings voraus, dass eine umfangreiche Auswahl potenziell geeigneter Parameter in der zugrundeliegenden Studie untersucht wurden. Die untersuchten Parameter umfassen verhaltensbiologische, biochemische und (patho-)physiologische. Anhand der generierten Datensets soll es dann möglich sein die Ergebnisse einzelner Parameter im Zusammenhang zu beurteilen und zu interpretieren. Die Zeitpunkte der Untersuchungen spiegeln verschiedene Phasen der Krankheitsentstehung beziehungsweise der Krankheitsmanifestation wider. Somit kann die Belastung phasenspezifisch und daher differenziell untersucht und beurteilt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei weitere Epilepsiemodelle bei Ratten untersucht. Die Ergebnisse aus allen drei Studien sollen dann zukünftig dazu dienen eine Priorisierung der Modelle bezüglich des Tierwohls zu ermöglichen. Unter Berücksichtigung des zugrundeliegenden Studienziels soll diese Empfehlung zur Entscheidungsfindung nützen, das Modell mit der geringsten Belastung, zu wählen. Natürlich muss gewährleistet werden, dass das verwendete Modell bezüglich der wissenschaftlichen Fragestellung geeignet ist. Das Modell mit der geringsten Belastung zu wählen, obwohl es sich aus wissenschaftlicher Sicht nicht zum Erreichen des Studienziels eignet, kann ebenso wenig im Sinne der 3R sein, da es nicht mit dem Grundsatz der *Reduction* konform ist, da es zu unnötig hohen Tierzahlen führen würde. Die Limitationen müssen bei der Wahl des Epilepsiemodells berücksichtigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie sollen nicht nur der versuchsplanenden Person,

sondern auch den Veterinärbehörden dienen, Tierversuchsanträge und die darin geschilderte Schwere der Belastung besser bewerten zu können. Aber erst durch eine adäquate Belastungseinstufung mittels geeigneter Parameter ist es möglich Aussagen über mögliche Einschränkungen des Wohlbefindens dieser Tiere treffen zu können. Des Weiteren können anschließend *Refinement*-Maßnahmen identifiziert und angewendet werden, welche wiederum durch die definierten Parameter in Hinblick auf die tatsächliche Belastungsreduktion für die Tiere beurteilt werden können (LIDSTER et al. 2016). Eine Steigerung des Tierwohls ist nicht nur in ethischer Hinsicht erstrebenswert, sondern kann sich auch positiv auf die präklinische Datenqualität auswirken.

In der vorliegenden Studie wurden erstmals in dieser umfassenden Form biochemische, verhaltensbiologische und (patho-)physiologische Parameter in den verschiedenen Phasen der Epileptogenese und der chronischen Phase der Krankheitsmanifestation untersucht (frühe Post-Insult-Phase, Latenzphase, chronische Phase). Somit kann eine phasenspezifische Beurteilung der Belastung gewährleistet werden.

In der vorliegenden Studie sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Inwiefern werden in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase biochemische, verhaltensbiologische und physiologische Parameter beeinflusst?
- Welchen Einfluss haben die Phase der Krankheitsmanifestation und spontane, wiederkehrende Anfälle auf die biochemischen, verhaltensbiologischen und (patho-)physiologischen Parameter?
- Welche dieser Parameter eignen sich für eine Einschätzung der Belastung im Pilocarpin-Modell?
- Welchen Einfluss hat die Elektrodenimplantation in den Hippocampus auf biochemischen und verhaltensbiologischen Parameter?

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Für die beiden Versuchsreihen der Studie wurden insgesamt 62 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Envigo, Horst, Niederlande) verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug bei Ankunft 200 bis 224 g. Die Versuchstiere wurden ab dem Tag der Ankunft einzeln in Typ III Makrolon Käfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Die Käfige wurden mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) eingestreut. Außerdem wurde den Tieren 14 g Nestmaterial (Enviro Dri<sup>®</sup>, Claus GmbH, Limburgerhof, Deutschland) angeboten. Futter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser standen den Ratten ad libitum zur Verfügung. Einmal wöchentlich wurden die Tiere in frische Käfige umgesetzt und das Wasser erneuert. Bei Bedarf wurde die Futterraufe aufgefüllt. Um einen Tag- und Nachtrhythmus zu simulieren, wurden die Tierräume während der Hellphase für zwölf Stunden täglich mit Deckenleuchten (20 Lux) beleuchtet. Die Hellphase ging dann in eine zwölfstündige Dunkelphase über (Licht an 6:00; Licht aus 18:00 MESZ beziehungsweise Licht an 5:00; Licht aus 17:00 MEZ). Mithilfe eines Belüftungssystems wurde eine Raumtemperatur von 20 – 24 °C und eine Luftfeuchtigkeit von 45 – 60 % aufrechterhalten. Nach der Ankunft der Versuchstiere hatten sie Zeit sich an die neuen Haltungsbedingungen zu habituieren. Ab dem Folgetag wurden sie regelmäßig aus den Käfigen genommen, um eine routinebedingte Reduktion von Stress, die mit dem *Handling* einhergehen kann, zu erzielen. Hierbei bekamen sie die Möglichkeit, sich an die versuchsdurchführenden Personen und an die für die Pflege der Tiere zuständigen Tierpfleger zu gewöhnen. Auch während des Versuches wurden sie weiterhin regelmäßig, wie beschrieben, behandelt, um den mit dem *Handling* assoziierten Stress dauerhaft möglichst gering zu halten. Die Untersuchungen wurden durch die Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2532-105-16) genehmigt. Sie wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz, der Richtlinie 2010/63/EU und der Tierschutzversuchstierverordnung durchgeführt. Die ARRIVE-Guidelines wurden bei der Durchführung des Versuchs und bei der Publikation der Ergebnisse eingehalten (KILKENNY et al. 2010). Um den Allgemeinzustand der Tiere beurteilen zu können, wurden sie täglich kontrolliert und mit einem, durch die Regierung von Oberbayern geprüften Score-Sheet bewertet. Darüber hinaus wurden der RGS und der modifizierte Irwin-Score (siehe Anhang 4) dokumentiert. Um mögliche Gewichtsverluste vor einer Veränderung im *Body-Condition-Score* zu erkennen, wurden die Tiere wöchentlich gewogen. In der Phase nach der Operation und nach dem SE wurde das Gewicht täglich ermittelt. Die Einteilung in die jeweilige Gruppe erfolgte randomisiert ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)),

ebenso wie die Reihenfolge in den einzelnen Versuchen. Es gab insgesamt fünf Versuchsgruppen:

- Drei Gruppen für die Versuchsreihe 1: Eine elektrodenimplantierte Sham-Gruppe (n = 12), eine elektrodenimplantierte Gruppe, bei der ein SE induziert wurde (n = 20) und eine naive Gruppe (n = 12).
- Zwei Gruppen für die Versuchsreihe 2: Eine elektroden- und transmitterimplantierte Sham-Gruppe (n = 6) und eine elektroden- und transmitterimplantierte Gruppe, bei der ein SE induziert wurde (n=12).

Nach der Operation und vor der SE-Induktion gab es nur eine Einteilung in elektrodenbeziehungsweise elektroden- und transmitterimplantiert und naiv. Die naive Gruppe wurde weder implantiert noch nach dem Protokoll zur SE-Induktion behandelt. Die Sham-Gruppe wurde ausschließlich mit Lithiumchlorid (127 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) injiziert. Im ersten Teilprojekt sind zwei Tiere während des operativen Eingriffs verstorben. Im Rahmen des SE sind in der Versuchsreihe 2 ein Tier und in Versuchsreihe 1 drei Tiere verstorben. In der chronischen Phase ist pro Versuchsreihe ein Tier an einem Exitus verstorben. Ein Tier in Versuchsreihe 2 musste aufgrund von einem erhöhten klinischen Score euthanasiert werden. In Versuchsreihe 1 wurde ein Tier von der Datenauswertung exkludiert, da es weder *handling*-assoziiert noch im Video- und EEG-Monitoring Anfälle zeigte.

Nach Abschluss der Versuche erhielten die Tiere mit 0,2-prozentiger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin  $\geq$  98%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verdünntes Metamizol p.o. (50 mg/kg peroral, Vetalgin<sup>®</sup>, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland). Im Anschluss wurde die Narkose mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml/kg 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung i.p., B. Braun, Berlin) eingeleitet. Im Anschluss wurden sie mit Pentobarbital (600 mg/kg i.p., Narcoren<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) euthanasiert. Nach der Feststellung des Todes wurden die Nebennieren entnommen und mit einer Feinwaage gewogen. Nach der Punktion des Herzens wurde das Gefäßsystem der Tiere mit phosphatgepufferter 0,9-prozentiger Kochsalzlösung und anschließend mit einer 4-prozentigen Paraformaldehydlösung gespült. Nach der Perfusion wurden die fixierten Gehirne entnommen und in einer 4-prozentigen Paraformaldehydlösung für 24 Stunden aufbewahrt. Im Anschluss wurden sie in eine 30-prozentige Saccharose-Lösung überführt. Um die Gehirne haltbar zu machen, wurden sie mittels 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) eingebettet. Im Anschluss wurden sie bei -80°C aufbewahrt.

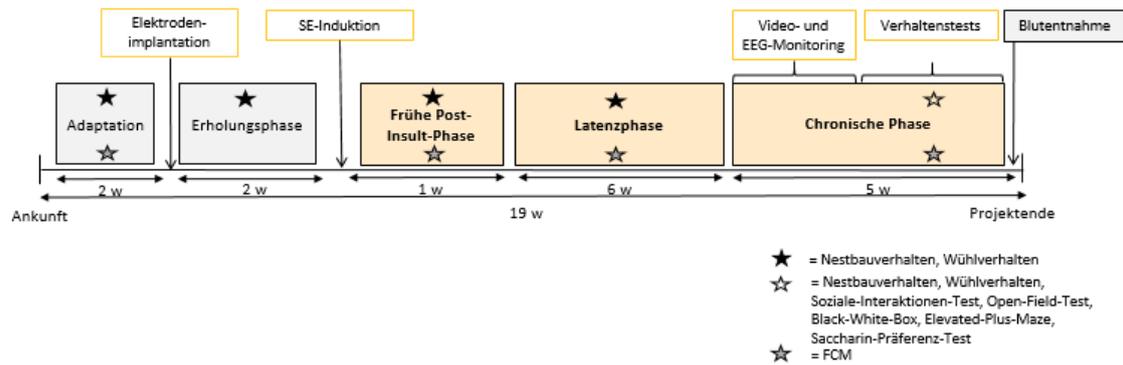


Abbildung 1: Studiendesign der Versuchsreihe 1

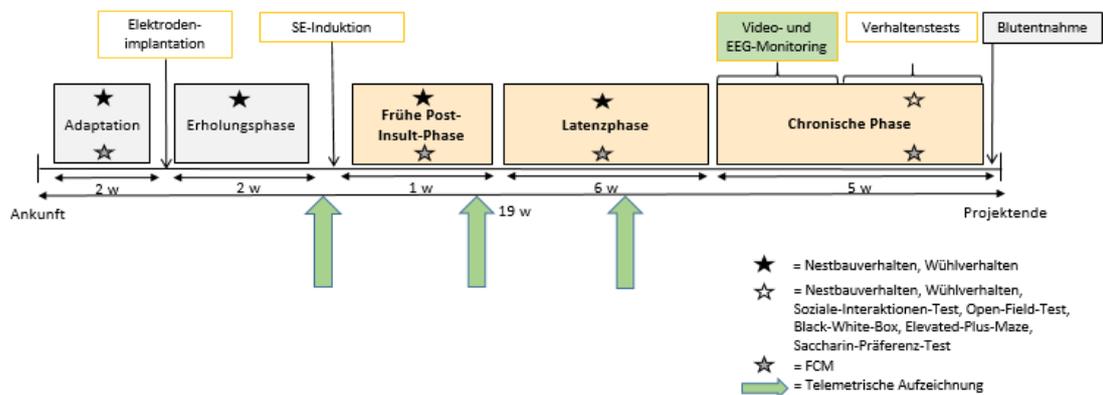


Abbildung 2: Studiendesign der Versuchsreihe 2

## 2. Elektrodenimplantation

Um den SE nicht nur klinisch, sondern auch elektroenzephalographisch bestätigen zu können, wurde den Tieren in den rechten Gyrus dentatus (GD) des Hippocampus eine Ableitungselektrode implantiert. Die bipolare Elektrode bestand aus rostfreiem Stahl, der von Teflon umhüllt war. Die Tiere wurden für die Operation mittels eines Narkotikums in eine Narkosetiefe versetzt, die einen operativen Eingriff erlaubte. Als Analgetikum wurde der Wirkstoff Meloxicam (Metacam® 5 mg/kg, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) 30 min vor Einleitung der Narkose s.c. appliziert. Im Anschluss wurde die Narkose mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml/kg 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, B. Braun, Berlin) i.p. eingeleitet. Zu Beginn der Narkose und während der Operation wurde in regelmäßigen Abständen die Narkosetiefe mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Solange dieser Reflex erloschen und die Atmung regelmäßig und nicht forciert war, wurde von einer ausreichenden Narkosetiefe ausgegangen. Nachdem festgestellt wurde, dass

sich die Tiere in dem Narkosestadium der chirurgischen Toleranz befanden, wurden sie im Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) fixiert, das OP-Feld vorbereitet und Bepanthen-Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) auf die Augen aufgetragen, um diese vor Austrocknung zu schützen. Bei der stereotaktischen Implantation ist es notwendig, dass der Kopf des Tieres fest fixiert wird und die beiden Kreuzungspunkte der Knochennähte (rostral Bregma; kaudal Lambda) in einer Ebene liegen. Dies wird erreicht, wenn die Halterung des Oberkiefers auf -3,5 mm ventral der Interaurallinie eingestellt wird. Zehn Minuten bevor der Hautschnitt erfolgte, wurde 1 ml Bupivacain (Bupivacain 0,5 % JENAPHARM mit Epinephrin®, Mibe GmbH, Brehna, Deutschland) s.c. appliziert. Im Anschluss wurden die Strukturen der dorsalen Schädeldecke freigelegt und die Knochennähte, insbesondere Bregma, dargestellt. Um die Elektrode genau in den Gyrus dentatus platzieren zu können, wurde die genauen Koordinaten in Bezug auf Bregma ermittelt. Sie betragen anteriorposterior - 3,9 mm, lateral + 1,7 mm und dorsoventral + 4,1 mm. Nachdem die Lokalisation der Elektrode bestimmt worden war, wurden insgesamt vier Löcher in die Schädeldecke gebohrt, um die Elektrode zu versenken und um drei Fixationsschrauben zu befestigen. Jeweils eine der Schrauben wurde kaudal, lateral und kranial der Elektrode angebracht. Daraufhin wurde die Konstruktion mithilfe des selbsthärtenden Kunststoffes Paladur (Paladur®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) fixiert. Dabei wurde der Kunststoff in zwei Schichten aufgetragen. Der ersten Schicht wurde 2,1-prozentiges Gentamicinsulfat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt, um Infektionen des Knochens vorzubeugen. Der zweiten Schicht des selbsthärtenden Kunststoffes wurde kein Antibiotikum zugesetzt. Im Anschluss wurden die Wundränder aufgefrischt, adaptiert und mithilfe von Knopfheften verschlossen. Hierfür wurde nicht-resorbierbares monofiles Nahtmaterial verwendet (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien). Um die Tiere auch postoperativ ausreichend analgetisch zu versorgen, erfolgte jeweils 24 Stunden nach der ersten Applikation eine weitere Meloxicamapplikation. Zur antibiotischen Versorgung wurde Marbofloxacin (1mg/kg, Marbocyl® FD 1 %, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland) zweimal täglich mit einem Abstand von neun Stunden s.c. appliziert. Nach zehn Tagen wurden die Nähte entfernt und die Tiere hatten eine Erholungsphase von ca. zwei Wochen bis zur Induktion des SE.

### **3. Telemetriemessungen**

#### **3.1. Transmitterimplantation**

Für die Aufzeichnung des Elektrokardiogramms (EKG) und der EEG-Ableitung wurde den Tieren der Versuchsreihe 2 zusätzlich zur Elektrode ein Telemetrietransmitter (HD-X02,

DSI, USA) implantiert (siehe Abbildung 3). Dafür erhielten die Tiere die gleiche perioperative Analgesie, Narkose und Antibiose. Nachdem die Narkose eingeleitet wurde und eine ausreichender Narkosetiefe erreicht war, wurden die Hautareale lokal mit ca. 2 ml Bupivacain s.c. anästhesiert (Bupivacain 0,5 % JENAPHARM ohne Epinephrin®, Mibe GmbH, Brehna, Deutschland). Bei dieser Operation wurde zum Schutz vor Austrocknung ebenfalls Bepanthen Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) auf die Augen aufgetragen. Zehn Minuten nach der Injektion des Lokalanästhetikums wurde die Haut kaudal der Skapula und im 90°-Winkel zur Wirbelsäule mit einem ca. 2 cm großen Hautschnitt eröffnet. Im Anschluss wurde mit einer Schere mit abgerundeten Scherenblättern ein subkutaner Hohlraum präpariert. Dieser verlief parallel zur Wirbelsäule. Danach wurde diese subkutane Tasche mit 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung (B. Braun, Berlin) gespült, um ein leichtes Einführen des Transmitters zu gewährleisten. Nachdem der Transmitter in die subkutan präformierte Tasche eingebracht wurde, erfolgte die Platzierung der EKG-Kabel. Mithilfe eines Trokars (Surgery Kit, DSI, USA) wurden subkutan zwei Kanäle präpariert. Das negative Ableitkabel wurde ventral der rechten Schulter an der Pektoralismuskulatur und das positive Ableitkabel wurde ca. 1 cm links des Xyphoids ebenfalls intramuskulär an der rippengestützten Brustwand fixiert. An diesen Stellen wurde die Haut eröffnet und die Ableitkabel mittels einer Pinzette durch die subkutanen Kanäle geführt. Um eine Translokation der Kabel während der Studie zu vermeiden, wurden sie außerdem in der darunterliegenden Muskelschicht fixiert. Dazu wurden sie mit einer Kanüle (20Gx1 HS-Einmal Injektionskanülen, Henry Schein®, Melville, USA) intramuskulär platziert und mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial fixiert (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI Ag, St. Vith, Belgien). Die Hautschnitte wurden im Anschluss mit dem gleichen Nahtmaterial verschlossen. Anschließend wurden die Kabel für die EEG-Aufzeichnung platziert. Dabei wurde am Hautschnitt kaudal der Schulter mit dem Trokar eingegangen und ein subkutaner Kanal parallel der Wirbelsäule nach kranial angelegt. In der Medianen, am kaudalen Rand des Ohrengrunds, wurde die Haut eröffnet und die Kabel mittels Pinzette durch die Eröffnung geführt. Im Anschluss erfolgte die Elektrodenimplantation, wie in Abschnitt IV.2 beschrieben. Zusätzlich wurde das positive Ableitkabel an der Tiefenelektrode und das negative Ableitkabel an der kaudalen Fixationsschraube befestigt. Die kaudale Fixationsschraube diente während der EEG-Aufzeichnung als Referenz. Deshalb wurde sie kaudal von Lambda über dem Zerebellum platziert, um die Referenz über einem Gehirnareal zu platzieren, in dem während eines generalisierten Anfalls wenig elektroenzephalographische Aktivität zu erwarten ist.

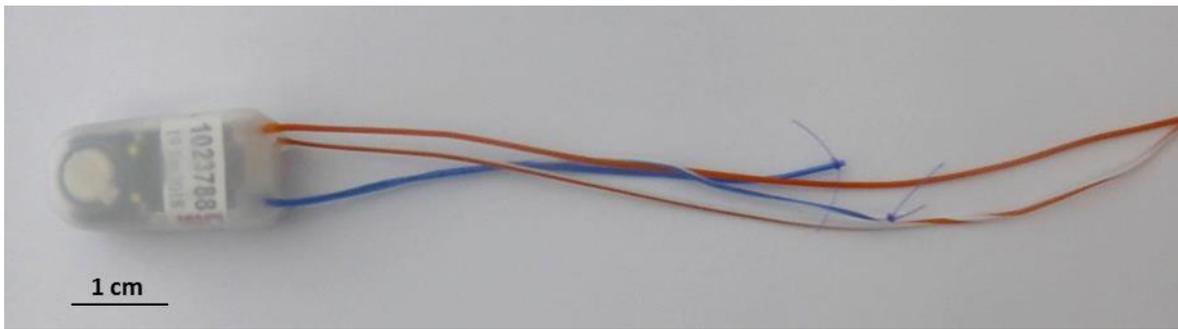


Abbildung 3: Telemetriesender HD-X02 der Firma DSI (Data Sciences International)

### 3.2. Datenaufzeichnung

Mittels der telemetrischen Aufzeichnung wurden das EKG, das EEG und die Aktivität der Tiere ermittelt. Da die Aufzeichnung der Tiere mit dem kabellosen Telemetriesystem erfolgte, konnten sie währenddessen weiterhin in ihren Heimkäfigen gehalten werden und mussten nicht, wie bei der Kabelableitung für das EEG, in eigens dafür gebaute Aquarien verbracht werden. Die Aufzeichnungsplatten (RPC-1, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA) wurden so auf einem Metallregal platziert, dass sie ca. 30 - 40 cm Abstand zueinander hatten, um so gegenseitige Störsignale bei der Aufzeichnung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Telemetrietransmitter mithilfe des Magneten aktiviert. Das erfolgreiche Aktivieren der Transmitter konnte mithilfe eines Radios überprüft werden. Die Tiere wurden danach samt Heimkäfig auf die Aufzeichnungsplatten verbracht. Im Anschluss konnte eine Übertragung der Signale via Radiowellen auf die Aufzeichnungsplatten erfolgen. Dieses Signal wurde anschließend durch die Aufzeichnungsplatte in ein digitales Signal umgewandelt, welches an die Matrix weitergeleitet wurde (MX 2.0, Data Science International, St.Paul, MN, USA). Durch die Matrix wurde das Signal gefiltert und weiterverarbeitet und über einen Switch (Cisco Small Business Switch, Data Science International, St.Paul, MN, USA) an den Aufzeichnungscomputer weitergeleitet. Der Computer war mit der Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA) ausgestattet. Sie diente dazu, die Signale aufzuzeichnen und temporär zu speichern. Zusätzlich zur EKG- und EEG-Aufzeichnung wurde noch eine Videoaufzeichnung (Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) durchgeführt. Diese Aufzeichnung diente dazu, die elektroenzephalographische Anfallsaktivität klinisch zu bestätigen.

### 3.3. Datenauswertung

Die Auswertung des EKGs erfolgte mit der Analysesoftware Ponemah® (Ponemah post system 6.41, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA). Dabei wurden die R-Zacken mittels des Analysemoduls automatisiert erkannt. Da sich bei jedem Tier die Amplitude der

R-Zacken etwas unterschied, wurde die Voreinstellung (siehe Abbildung 4) des Moduls dahingehend angepasst. Im Rahmen der automatisierten Erkennung, wurde das EKG mit Markierungen für die R-Zacken versehen. Bei Artefakten und dem damit einhergehenden Ausfall der R-Zackenerkennung wurden die entsprechenden Sequenzen mit einer Markierung (*Bad Data Mark*) versehen, sodass das Programm diese Bereiche nicht mit in die Analyse einbezog. Diese automatisierte R-Zackenerkennung war nur bedingt zuverlässig, wodurch es nötig war, die R-Zackenmarkierungen manuell zu überprüfen und gegebenenfalls die Einstellungen des Moduls dementsprechend anzupassen. Anschließend wurde das Zeitintervall (*Logging-Rate* = 5 min) bestimmt, für den die nachfolgend beschriebenen Parameter ermittelt wurden. Somit ergaben sich für alle Parameter Durchschnittswerte über 5-Minuten-Zeitintervalle. Parameter, die basierend auf dem EKG bestimmt wurden, waren:

- die Herzschlagfrequenz (**HF**) in *Beats per Minute* (bpm)
- die Standardabweichung der RR-I in ms (**SDNN**); sie dient dazu die Gesamtvariabilität des autonomen Nervensystems zu evaluieren

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

- die Quadratwurzel der quadrierten Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle (*Root Mean Square of successive Differences*, **RMSSD**) in ms; sie dient als Maß für die parasympathische Aktivität der Herzratenvariabilität im autonomen Nervensystem

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

- Prozentangabe aller aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die mehr als 9 ms voneinander abweichen (**pNN9**). pNN9 steht im Zusammenhang mit RMSSD und gibt ebenfalls die parasympathische Aktivität des autonomen Nervensystems wieder

Darüber hinaus wurde die Aktivität (**ATA2**) im Heimkäfig telemetrisch ermittelt. Die Aktivität in *Counts per Minute* (cpm) beschreibt, wie der Transmitter seine Position zur Aufzeichnungsplatte verändert. Dabei ist die Detektorplatte mit Antennen versehen, die die Positionswechsel des Transmitters aufzeichnen. Somit wird nicht nur die Distanz in horizontaler Bewegung, sondern jeder Positionswechsel des Transmitters zur Platte erfasst. Die Daten wurden extrahiert und in Form von Excel-Tabellen exportiert.

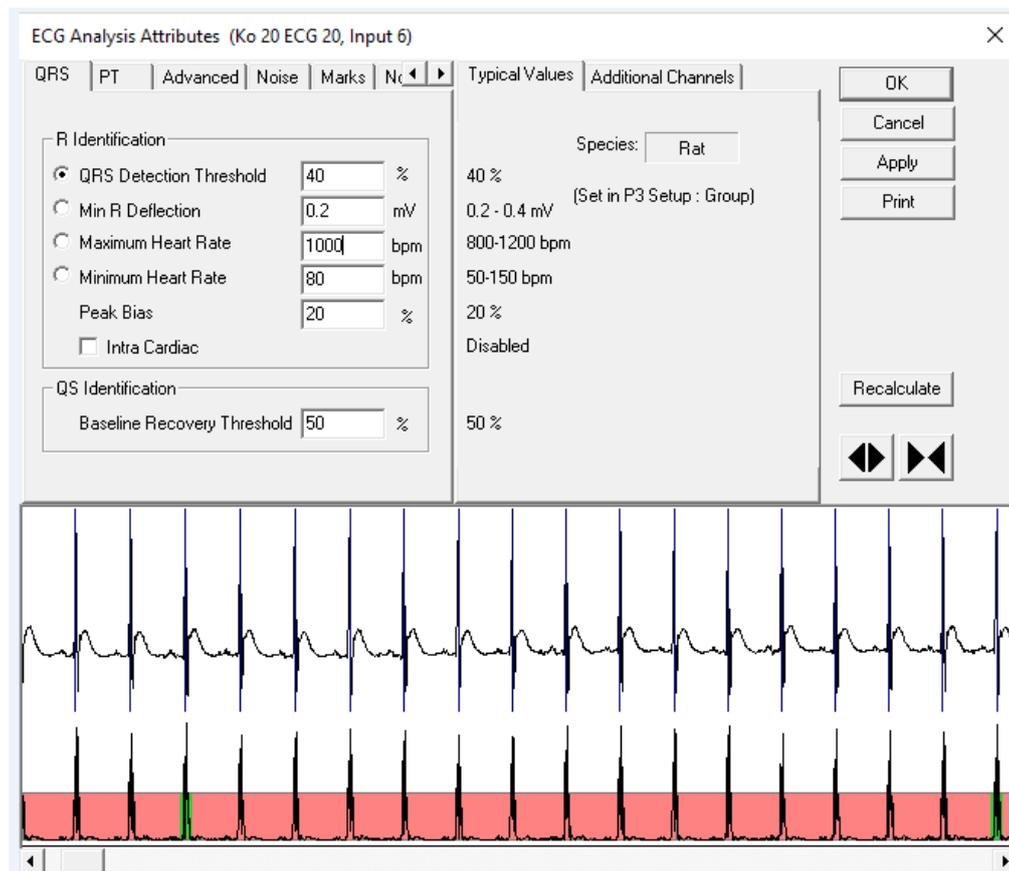


Abbildung 4: Voreinstellung des Moduls zur automatisierten R-Zacken-Erkennung von Ponemah post system 6.41®

Die Auswertung des telemetrisch aufgezeichneten EEGs erfolgte mittels NeuroScore® Software 3.0 (Data Sciences International, USA). Dabei wurde mittels eines automatisierten Analysemoduls (*Spike Train Detector*) Anfallsaktivität im EEG erkannt. Das Modul war in der Lage frequente Ausschläge im EEG darzustellen und zu erkennen und darauf basierend die Anfallsdauer und -frequenz zu berechnen. Bestätigt wurde die elektroenzephalographische Anfallsaktivität anhand der Videoaufzeichnungen.

## 4. Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell

### 4.1. Induktion eines Status epilepticus

Die Induktion des SE mittels einer fraktionierten Pilocarpinapplikation wurde nach einem Protokoll von GLIEN et al. (2001) durchgeführt. Dazu wurde den Tieren ca. 17 Stunden vor der ersten Pilocarpininjektion einmalig Lithiumchlorid (127 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gelöst in 0,9-prozentiger Natriumchloridlösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung, B. Braun, Berlin) i.p. appliziert. Am Folgetag wurde dann zwischen 8:00 und 13:00 Uhr der SE induziert. Dazu wurde 30 min vor der ersten Pilocarpin-Injektion Methylscopolamin (1 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen,

Deutschland) i.p. injiziert. Während diesen 30 min wurde das Basal-EEG abgeleitet. In Versuchsreihe 1 fand die EEG-Aufzeichnung mittels einer Kabelableitung statt. Die Elektrode war so aufgebaut, dass sie mit einem Steckeraufsatz verbunden war, worüber man das abgeschirmte, 3-adrige Kabel des Ein-Kanal-Verstärkers (BioAmp, ADInstruments LTD., Hastings, UK) anbringen konnte. Dieser Ein-Kanal-Verstärker war mit einem Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30, ADInstruments Ltd., Hastings, UK) verbunden. Der Verstärker diente dazu das EEG-Signal um ein 100-faches zu verstärken. Zusätzlich zur Signalverstärkung wurden Störfrequenzen unter Einstellung von Filtern eliminiert ( $> 5$  kHz und  $< 3$  Hz, 50 Hz). Die elektroenzephalographische Aktivität wurde mit einer Abtastfrequenz von 1 kS/s gemessen und mittels der Software Labchart 7 (ADInstruments LTD., Hastings, UK) dargestellt. Im Rahmen der Induktion des SE wurden die Tiere in beiden Teilprojekten in Glasaquarien verbracht, um die tonisch-klonischen Anfälle deutlicher sehen und dadurch besser beurteilen zu können.

In Versuchsreihe 2 wurde das EEG mittels der Telemetriesender (HD-X02, Data Sciences International) und Aufzeichnungsplatten (RPC-1, Data Sciences International, St.Paul, MN, USA) generiert. Dabei wurden die Aufzeichnungsplatten unter den Aquarien platziert und die Transmitter mittels des Magneten aktiviert. Im Anschluss wurde in 30-minütigen Abständen Pilocarpin (10 mg/kg i.p., Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) appliziert, bis die Tiere einen generalisierten Anfall entwickelten. Schloss sich innerhalb der nächsten 30 min ein zweiter generalisierter Anfall an, wurde ab diesem Zeitpunkt der Beginn des SE festgelegt. Der SE stellte sich in Form von aufeinanderfolgenden Episoden von generalisierten Anfällen ohne interiktale Erholung beziehungsweise als andauernder generalisierter Anfall dar. Um den klinisch sichtbaren SE zu bestätigen, wurde nochmals ein EEG abgeleitet. Bei der telemetrischen Aufzeichnung wurde kontinuierlich das EEG aufgezeichnet. Die Anfallsschwere wurde mittels eines modifizierten Scores nach RACINE (1972) beurteilt (siehe Tabelle 1).

<b>Krampfschwere</b>	<b>Anfallscharakteristika</b>	
Stadium I	Immobilität, schwacher Fazialklonus (Schließen eines oder beider Augen, Zittern der Tasthaare, stereotypes Schnüffeln)	<b>Fokale Anfälle</b>
Stadium II	Starker Fazialklonus (Kopfnicken, Kaubewegungen)	
Stadium III	Unilateraler Vorderextremitätenklonus	
Stadium (IV)	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten um weniger als 45°	<b>Generalisierte Anfälle</b>
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)	

Tabelle 1: Übersicht der einzelnen Krampfstadien nach Racine (1972).

Nach 90 min wurde der SE abgebrochen. Um den SE zu beenden wurde sowohl Pheno-barbital (25 mg/kg i.p.) als auch Diazepam (dreimal 10 mg/kg im Abstand von 15 min, i.p. Ratiopharm; Ulm, Deutschland) appliziert. Nach der Applikation von Phenobarbital und Diazepam zeigten die Tiere klinisch keine Anfallsaktivität mehr. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Körpertemperatur der Tiere mittels Heizmatten und warmwasser-befüllten Latexhandschuhen reguliert. Das Ende des SE wurde mittels des EEGs bestätigt. Ca. sechs Stunden nach der ersten Pilocarpin-Injektion wurde den Tieren zur Flüssigkeitssubstitution 2,5 ml Ringer-Lactat-Lösung s.c. appliziert. Sobald die Tiere wieder Spontanaktivität zeigten, wurden sie mit Babybrei gefüttert. In den Tagen nach dem SE ist eine intensive Pflege und Überwachung der Tiere notwendig. Deshalb wurden sie an den Tagen danach dreimal täglich von Hand gefüttert und erhielten 2,5 ml Ringer-Lactat-Lösung s.c. Die Tiere wurden solange zugefüttert, bis eine selbstständige Futteraufnahme beobachtet werden konnte.

#### **4.2. Video- und EEG-Monitoring**

Zur Überprüfung, ob die Tiere im Anschluss an die Latenzphase spontane Anfälle zeigten, wurden sie nach sieben Wochen für 14 Tage mittels einer kontinuierlichen Video- und EEG-Aufzeichnung überwacht. Dabei wurden die Anfallsfrequenz und die Anfallsdauer bestimmt. Hierfür wurden die Tiere in die gleichen Glasaquarien verbracht, wie sie für die Induktion des SE verwendet wurden. Die Abmessung der Aquarien betrug 40 cm x 40 cm x 35 cm. Diese Glasaquarien waren mit einer Aussparung für die Wasserflaschen versehen. Eingestreut wurden sie mit einem Einstreu-Granulat (Rehofix, Ssniff GmbH, Soest, Deutschland). Mit dieser Einstreu konnte ein kontrastreicheres Bild bei der Videoaufzeichnung gewährleistet werden. Das Futter wurde auf der Einstreu platziert. Das Wohlergehen der Tiere, so wie Futter und Wasser wurden zweimal täglich kontrolliert. Zur EEG-Aufzeichnung wurden die Tiere ähnlich, wie bei der Kabelableitung bei der Induktion des SE, über ein zweiadriges, ummanteltes Kabel mit dem Analog-Digitalwandler (PowerLab/800s, ADInstruments Ltd, Hastings, UK) verbunden. Um eine Verstärkung des Signals zu gewährleisten, wurde dieses über den Kanal-Verstärker (ADInstruments Ltd, Hastings, UK) an den Computer weitergeleitet, der über die Auswertungssoftware für das EEG verfügte (Labchart 7, ADInstruments LTD., Hastings, UK). Um ein freies Bewegen der Tiere zu ermöglichen und sicherzustellen, dass sich die Ableitkabel nicht verdrehen würden, wurde ein Telefonkabelentwirrer eingebaut. Die Abtastrate betrug auch hier 1 kS/s. Um Störfrequenzen herauszufiltern, wurde ein Filter angewendet (high pass-Filter > 3 Hz, low pass-Filter < 60 Hz, Notch-Filter 50 Hz). Zur Verifizierung und Klassifizierung der Anfälle wurde zusätzlich noch eine Videoüberwachung durchgeführt. Dabei wurden CCD-Kameras (Conrad Electronic GmbH, München, Deutschland) verwendet, die zusätzlich über Infrarotlicht verfügten, um somit auch eine Aufzeichnung während der Dunkelphase zu ermöglichen. Die Aufzeichnungen waren schwarz-weiß und wurden auf einem internen RAID (Redundant Array of Independent Discs) gespeichert. Mittels der Software Digi-Protect Searcher 6.275 beta (ABUS Security-Tech, Affing, Deutschland) konnten sie abgespielt und mit dem EEG abgeglichen werden. Dadurch konnte sowohl die Anfallsdauer aller Anfälle, als auch die Anfallsfrequenz während der 14 Tage bestimmt werden.

#### **5. Verhaltensuntersuchungen**

Die Verhaltensuntersuchungen wurden immer im gleichen Zeitraum von 7:00 bis 13:00 Uhr durchgeführt. Dazu wurden die Tiere 30 min vor Versuchsbeginn in den entsprechenden Raum verbracht, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. Dieser Raum war speziell für diese Verhaltensuntersuchungen ausgelegt und wurde schallgedämmt. Er war so aufgebaut, dass die Installationen für die Verhaltensversuche im Rauminnen angebracht wurden. Mit schwarzen Vorhängen wurden sie von der Umgebung abgeschirmt. Um

standardisierte Lichtverhältnisse zu ermöglichen, wurde eine Deckenbeleuchtung angebracht (Spot Light Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande). Diese Lichtverhältnisse ließen sich mit einem Luxmeter (Voltcraft® MS 1300, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland) überprüfen. Die Aufzeichnungen und die Auswertung der Verhaltensuntersuchungen, bis auf die Untersuchung des Wühlverhaltens, wurden mithilfe einer Videoaufzeichnung und einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) durchgeführt. Die Beurteilung des Heimkäfigverhaltens und die Durchführung des Saccharin-Präferenz-Tests erfolgten im Tierhaltungsraum. Für die Untersuchung des Wühlverhaltens in Versuchsreihe 2 wurden die Tiere in einen anderen Raum verbracht. Auch in diesem Raum wurden die Lichtverhältnisse entsprechend angepasst. Die Versuchsaapparaturen wurden nach jedem Durchgang mit 0,1-prozentiger Essigsäure gereinigt, um so eine geruchsbedingte Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

### 5.1. Heimkäfigverhalten

Die Komplexität der Nester wurde morgens zwischen 7:00 und 9:00 Uhr beurteilt. Dazu wurden jeweils zwei Bilder vom Nest angefertigt: eines aus einem 90° Winkel und eines aus einem 0° Winkel. Es wurde zudem darauf geachtet, dass die Bilder vor jeder möglichen Störung der Tiere angefertigt wurden. Dadurch sollte das Zerstören der Nester, bedingt durch die Bewegung der Tiere, vermieden werden. Das Scoring wurde von einer verblindeten Person anhand der Bilder durchgeführt. Das Zeitfenster von 7:00 bis 9:00 Uhr wurde im Rahmen einer anderen Studien festgelegt (CHRISTINA MÖLLER 2018). Dabei wurde anhand einer 24-stündigen Videoaufnahme beobachtet, dass die Komplexität der Nester zwischen 7:00 und 9:00 Uhr ein Maximum erreichte.

Das Scoring der Nestkomplexität wurde unter Berücksichtigung eines Beurteilungsschemas von VAN LOO u. BAUMANS (2004) durchgeführt. Dabei wurde zwischen vier möglichen Stufen von 0 bis 3 unterschieden (siehe Abbildung 5).

- Score 0 = das Nestmaterial ist im ganzen Käfig verteilt
- Score 1 = das Nestmaterial befindet sich in einem abgegrenzten Areal des Käfigs und ist dabei zu einem flachen Nest geformt
- Score 2 = das gebaute Nest weist eine Diskusform auf
- Score 3 = das gebaute Nest weist eine tiefere Diskusform auf, sodass der Randbereich deutlich erhöht ist



Abbildung 5: Darstellung der Nestkomplexität. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Christina Möller.

Die Nester wurden während der Studie zu verschiedenen Zeitpunkten beurteilt. In der Woche nach der Ankunft, zwei Wochen nach der Operation, zehn Tage nach SE-Induktion und in der chronischen Phase während der Verhaltensuntersuchungen wurde das Nest täglich bewertet. In den anderen Wochen wurde das Nest immer am Tag fünf nach dem Umsetzen in frische Käfige beurteilt. In vorherigen Projekten wurde der Tag fünf festgelegt, da sich herausstellte, dass im Verlauf der sieben Tage zwischen zwei Käfigwechseln an Tag fünf die Nester mit der höchsten Nestkomplexität zu erwarten waren (CHRISTINA MÖLLER 2018). Darüber hinaus sollten die erhobenen Daten mit anderen Studien, die in der Einrichtung durchgeführt wurden, vergleichbar sein. Außer dem Nestbauverhalten wurde noch der Verschmutzungsgrad der Käfige (*Level-of-Soiling*) beurteilt. Hierbei wurde die Sauberkeit des Nestbereichs beziehungsweise das Verteilungsmuster von Kot und Urin im Käfig, beurteilt. War der Nestbereich frei von Urin und Kot, wurde der Verschmutzungsgrad mit 1 bewertet. Eine leichte Verunreinigung wurde mit 2, eine ausgeprägte mit 3 bewertet. Das *Level-of-Soiling* wurde während der gesamten Versuchsdauer einmal wöchentlich am Tag des Umsetzens beurteilt.

## 5.2. Soziale Interaktionen

Der Soziale-Interaktionen-Test wurde nach einem Protokoll von HÖLTER et al. (2015) durchgeführt. Für diesen Test ist es notwendig, die Tiere mindestens zwei Wochen vor Versuchsbeginn einzeln zu halten, um die sozialen Interaktionen zu verstärken. Vor dem Zusammenführen der Testpaare erfolgte eine zweitägige Adaption an die Versuchsumgebung. Durch die vorangegangene Eingewöhnungsphase konnten sie sich somit intensiver auf das Partnertier fokussieren. Zur Eingewöhnung wurden sie eine halbe Stunde in den Raum für die Verhaltensuntersuchungen verbracht und die gleichen Lichtverhältnisse (20 Lux), wie im Tierhaltungsraum wurden hergestellt. Im Anschluss wurden sie in einen leeren Käfig (Makrolon Typ IV, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland), in dem auch die Exposition zum Sozialpartner stattfinden sollte, verbracht und für zehn Minuten darin belassen. Im Anschluss wurden sie zurück in den Heimkäfig und in den Tierhaltungsraum gebracht. Für den Versuch wurden die Paare vorher randomisiert zusammengestellt, wobei

berücksichtigt wurde, dass beide Tiere aus der gleichen Gruppe stammten (Naiv-Naiv, Sham-Sham, Epilepsie-Epilepsie) und circa das gleiche Körpergewicht aufwiesen.

Am Tag des Verhaltensversuchs wurden die Tiere wieder eine halbe Stunde vor Beginn des Versuchs in den Versuchsraum verbracht. Beim Versuch wurden die Tiere dann in Paaren in den entsprechenden Käfig gesetzt. Um gleiche Voraussetzungen für beide Tiere in der Testsituation zu schaffen, wurden sie gleichzeitig in den Käfig überführt. In den darauffolgenden zehn Minuten wurden die Tiere beobachtet und die Zeit erfasst, in der sich die Tiere in aktiver beziehungsweise passiver sozialer Interaktion befanden. Als Formen der aktiven sozialen Interaktionen galten gegenseitiges Beschnupern, Putzen und Spielen. Die passiven Interaktionen waren gekennzeichnet durch Nebeneinandersitzen und -liegen eventuell mit Putzverhalten. Sofern die Tiere aggressives Verhalten zeigten, wurde dieses ebenfalls dokumentiert. Für jedes Testpaar ergab sich ein Wert für die genannten Parameter.

### **5.3. Wühlverhalten**

In diesem Test wurde das Wühlverhalten der Tiere untersucht. Die Durchführung erfolgte unter der Verwendung eines Protokolls nach DEACON (2009). Im Rahmen einer Trainingsphase wurde den Tieren die Adaptation an die Testapparatur ermöglicht. Darüber hinaus diente das Training dazu das Wühlverhalten der Tiere zu steigern. Für das Training wurden sie am ersten Tag im Versuchsraum eine Stunde in einen leeren Käfig (Makrolon Typ IV, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gesetzt, der mit Zellstoff, dem Standardfutter und einer Wasserflasche ausgestattet war. Nach einer Stunde wurde dann für eine weitere Stunde die Testapparatur mit in den Käfig gegeben. Bei dieser Testapparatur handelte es sich um Plastikröhren (32 cm lang x 10 cm Ø, an der offenen Seite um 6 cm erhöht). An den vier darauffolgenden Tagen wurden diese Röhren mit 2,5 kg Kies (Quartz hell, Körnung 2 – 4 mm, ORBIT GmbH, Usingen, Deutschland) befüllt. An Tag zwei bis fünf wurde die Zeit vom Einsetzen der Röhren bis zum Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens dokumentiert. Darüber hinaus wurde nach einer Stunde das Gewicht des in der Röhre verbliebenen Kieses gewogen. Die Zeit bis zum Einsetzen des gerichteten Wühlverhaltens und das Gewicht des aus der Röhre beförderten Kieses an Tag fünf galten als Basalwert (Abbildung 6).

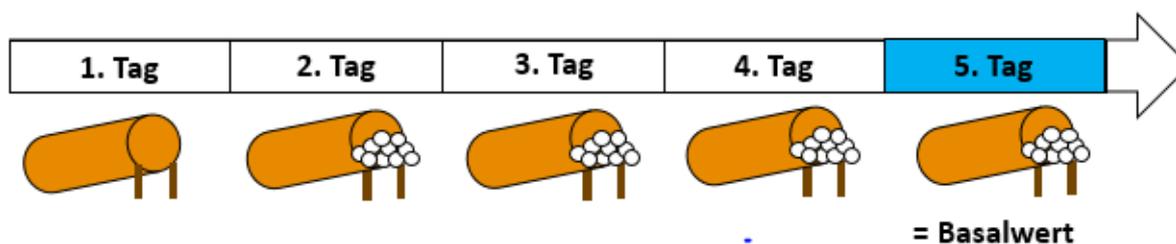


Abbildung 6: Untersuchung des Wühlverhaltens: Schematische Darstellung der Trainingsphase

#### 5.4. Lokomotion

Mithilfe des Open-Field-Tests wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere ermittelt. Das Open-Field ist ein schwarzer Kunststoffzylinder ( $\varnothing$  85 cm). Für den Verhaltensversuch standen zwei Testapparaturen zur Verfügung. Sie wurden gleichmäßig mit einer Lichtintensität von 10 - 20 Lux ausgeleuchtet. Diese niedrige Lichtintensität wurde gewählt, damit primär die lokomotorische Aktivität und nicht das angstassoziierte Verhalten untersucht werden konnte. Zu Beginn des Versuchs wurden die Tiere mit Blickrichtung zur Wand in die Testapparatur eingesetzt. Dabei wurde ein Abstand von 10 cm zur Wand eingehalten. Ein Versuchsdurchgang betrug zehn Minuten. Mithilfe einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) wurden verschiedene Parameter, die die Lokomotion beschreiben, ermittelt. Diese Parameter beinhalteten die Geschwindigkeit, die gelaufene Strecke, die Zeit und Frequenz, die die Tiere in Immobilität verbrachten und die Zeit im Zentrum und im Wandbereich. Zusätzlich wurde manuell die Frequenz ermittelt, wie oft die Tiere sich um mehr als  $45^\circ$  aufrichteten (*Rearing*).

#### 5.5. Angstassoziiertes Verhalten

##### 5.5.1. Black-White-Box

Die Untersuchung des Verhaltens in der Black-White-Box dient dazu, das angstassoziierte Verhalten zu beurteilen. Da Ratten dämmerungs- und nachtaktiv sind, bevorzugen sie dunkle Aufenthaltsbereiche gegenüber hellen. Unter Berücksichtigung dieser Gegebenheit wurde die Black-White-Box folgendermaßen konzipiert: sie bestand aus einem weißen (39 x 39 x 39 cm) und einem schwarzen (39 x 20 x 39 cm) Bereich, die über einen Tunnel (10 x 9,8 x 39 cm) miteinander verbunden waren. Während die schwarze Box mit einem Deckel verschlossen war, wurde die weiße Box zusätzlich mit einer Lichtintensität von 50 Lux ausgeleuchtet, um den Gradienten zwischen aversiven und nicht-aversiven Bereich zu verstärken. Beim Einsetzen der Tiere wurde darauf geachtet, dass sie alle in der gleichen Position eingesetzt wurden: in die Mitte der weißen Box mit Blick auf den Durchgang zur schwarzen Box. Ein Versuchsdurchlauf betrug fünf Minuten. Dabei wurde die Latenzzeit gemessen,

bis sie das erste Mal die schwarze Box betraten, die Frequenz wie oft sie die Kompartimente wechselten und die Aufenthaltsdauer in der schwarzen und in der weißen Box. Darüber hinaus wurde noch die Frequenz der *Stretching Postures* bestimmt. Bei den *Stretching Postures* handelte es sich um einen Parameter zur Bewertung der Risikobereitschaft. Dabei blieben die Tiere mit den Hinterläufen im Tunnel stehen und wagten sich maximal mit den vorderen beiden Körperdritteln in die weiße Box. Mithilfe der Trackingsoftware wurde der Versuch überwacht und die erwähnten Parameter konnten manuell gescored werden, sodass die Anwesenheit der versuchsdurchführenden Person nicht notwendig war und die Tiere während des Tests alleine und ungestört waren.

### 5.5.2. Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze dient ebenfalls als Test, um angstassoziiertes Verhalten zu bewerten. Es hat die Form eines „+“, wobei zwei gegenüberliegende Arme mit hohen Wänden ausgestattet waren, während die anderen beiden gegenüberliegenden Arme ohne seitliche Begrenzung waren. Die vier Arme trafen in der Mitte zusammen und umgaben eine zentrale Plattform (14 x 14 cm). Ein geschlossener Arm maß 15 x 14 x 29 cm, während beide offenen Arm 50 x 14 cm maßen. Die Lichtverhältnisse wurden wie folgt angepasst: die offenen Arme wurden mit 20 Lux und die geschlossenen Arme wurden mit zehn Lux ausgeleuchtet. Dies sollte ähnlich wie bei der Black-White-Box den Gradienten zwischen aversiven und nicht-aversiven Bereich verstärken. Die gesamte, kreuzförmige Plattform war auf Stelzen angebracht, sodass diese 82 cm über den Boden angehoben wurde. Mithilfe der Tracking-Software EthoVision (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) wurde gemessen, wie lange die Tiere jeweils in den geschlossenen beziehungsweise in den offenen Armen und im Zentrum verbrachten. Dabei waren die offenen Arme nochmals unterteilt in das äußere Drittel und die zum Zentrum führenden inneren Zweidrittel. Weitere Parameter, die mittels der Tracking-Software erfasst wurden, waren die Geschwindigkeit und die gelaufene Strecke. Darüber hinaus wurde auch hier, wie in der Black-White-Box das Verhalten in Bezug auf die Risikoeinschätzung bewertet: die *Stretching Postures* aus den geschlossenen in die offenen Armen und *Head Dips* von den offenen Armen. Die *Head Dips* wurden als ein Herunterschauen der Tiere von den offenen Armen definiert, wobei die Tiere sich deutlich über den Steg hinauslehnten.

### 5.6. Anhedonie-ähnliches Verhalten

Zur Untersuchung des anhedonie-ähnlichen Verhaltens wurde der Saccharin-Präferenz-Test durchgeführt. Die Durchführung beruht auf einem Protokoll nach KLEIN et al. (2015). Dabei wurde der Saccharinkonsum (Aldrich Saccharin  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) der Tiere ermittelt. Mithilfe dieses Tests konnte beurteilt werden, ob sie 0,1-prozentige Saccharinlösung gegenüber dem herkömmlichen

Leitungswasser präferierten. Die Versuchsdauer erstreckte sich über fünf Tage. Während des Versuchs wurden den Tieren zwei Trinkflaschen (700 ml, 70 x 70 mm eckig, Ehret Labor- und Pharmatechnik, Deutschland) angeboten, die mit einem Tränkenippel versehen waren. Der Durchmesser des Tränkenippels betrug einen Millimeter. An den Tagen eins und drei wurden beide Flaschen mit jeweils 500 g Leitungswasser befüllt. An den Tagen zwei und vier hingegen wurde jeweils eine Flasche mit 500 g Leitungswasser und die andere Flasche mit 500 g der Saccharinlösung befüllt. Dabei war es wichtig, dass die Flasche mit der Saccharinlösung an Tag zwei auf der linken und an Tag vier auf der rechten Seite der Futterraufe angebracht wurde. Somit konnte der Einfluss einer Seitenpräferenz in Bezug auf die Trinkflaschen ausgeschlossen werden. Vierundzwanzig Stunden nach Einsetzen der Flaschen wurden diese entfernt und die getrunkene Menge durch Wiegen ermittelt.

## 6. Biochemische Parameter

Zusätzlich zu den Verhaltensparametern und den telemetrisch-ermittelten Parametern, wurden biochemische Parameter untersucht. Die biochemischen Parameter umfassten:

- Corticosteron in Haaren und Serum
- Corticosteronmetaboliten im Kot
- BDNF in Serum
- Creatinkinase im Serum

Zusätzlich wurde am Ende des Versuchs eine vaginalzytologische Untersuchung durchgeführt, um den Zyklusstand der Tiere bestimmen zu können.

### 6.1. Corticosteron im Haar

Der Zeitpunkt, an dem die Haarproben zur Analyse des Corticosterons entnommen wurden, war der Tag der Perfusion. Um ausschließlich den Corticosterongehalt ab dem Zeitpunkt der Operation und somit während des Versuchs bestimmen zu können, wurden die Tiere am Tag der Operation im Nacken rasiert. Dabei wurde eine ca. 4 x 4 cm große Fläche ausrasiert und die Haare aufgefangen. Diese Fläche wurde am Versuchsende noch einmal an der gleichen Stelle ausrasiert. Analysiert wurden ausschließlich die Haare, die am Versuchsende von den naiven und den epileptischen Tieren gesammelt wurden. Die Haare der Sham-Gruppe wurden nicht analysiert. Die Proben wurden lichtgeschützt und bei Raumtemperatur gelagert. Die Analyse wurde extern durchgeführt (Clemens Kirschbaum, Dresden LABservice GmbH, Dresden, Deutschland). Für die Analyse mittels einer Flüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde ein Protokoll von GAO et al. (2013) verwendet. Dabei wurden die Haare zuerst mit Isopropanol gewaschen und im

Anschluss getrocknet. Im nächsten Schritt wurde eine definierte Haarmenge mit Methanol angereichert und in einem Trockenschrank getrocknet (18 Stunden, 45 °C). Danach wurde der Alkohol durch einen Stickstoffkondensator verdampft (65°C) und die Proben mit destilliertem Wasser versetzt. Nach dieser Aufbereitung wurden die Konzentration des Corticosterons mittels der LC-MS/MS bestimmt.

## **6.2. Corticosteron im Serum**

Die Serumproben, die für die Corticosteronbestimmung notwendig waren, wurden einen Tag vor der Perfusion mittels einer retrobulbären Blutentnahme gewonnen. Im Studienverlauf wurde nur einmalig ein Zeitpunkt für die Blutentnahme bestimmt. Dies sollte gewährleisten, dass die Tiere keiner zusätzlichen Belastung ausgesetzt waren, die mit der Blutentnahme beziehungsweise der damit verbundenen Anästhesie einhergehen kann (MAHL et al. 2000; HOHLBAUM et al. 2017). Unter Berücksichtigung der tageszeitlichen Schwankungen des Corticosterongehalts im Serum wurde die Blutentnahme zwischen 8:30 und 10:30 Uhr durchgeführt. Dazu wurden die Tiere in eine kurze Isoflurannarkose (Isofluran CP®, cpharma, Burgdorf, Deutschland) versetzt. Diese Inhalationsnarkose ohne Kombination mit Analgetika eignet sich für kurze, nicht schmerzhaft Eingriffe. Dadurch, dass das Isofluran-Sauerstoff-Gemisch schnell an- und abflutet, zeigen die Tiere keine lange Nachschlafzeit und sind rasch wieder in der Lage, die Körpertemperatur autonom zu regulieren und selbstständig Futter und Wasser aufzunehmen. Die Tiere wurden am Tag vor der Perfusion 30 min vor der Blutabnahme in das entsprechende Labor verbracht und daraufhin in eine Plastikröhre (Durchmesser 7 cm, Länge 22 cm) platziert. Diese Plastikröhre, deren Enden mit abnehmbaren Plastikdeckeln versehen war, war in das Narkosesystem integriert, sodass sich ein geschlossenes System ergab. Dieser Aufbau diente dazu, die Narkose einzuleiten. Zur Einleitung wurde eine Isoflurankonzentration von 2 – 3 Prozent im Präzisionsverdampfer (Drägerwerk AG Lübeck, Deutschland) eingestellt. Die Narkosetiefe wurde überprüft, indem man die Plastikröhre wenige Zentimeter rotierte, bis das Tier sich in der Seitenlage befand. Wurde diese Position nicht wieder eigenständig vom Tier korrigiert, war der Stellreflex erloschen. Im Anschluss wurde das Tier aus der Röhre auf eine Wärmematte transferiert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgte die Versorgung mit der Inhalationsnarkose über eine Kopfkammer, die aus einer 5-Milliliter-Spritze bestand und über einen Verlängerungsschlauch mit dem Narkosegerät verbunden war. Bevor mit der Blutentnahme begonnen wurde, wurde der Zwischenzehenreflex der Tiere an den Hintergliedmaßen überprüft. War auch dieser negativ wurde mittels einer Glaskapillare (Innendurchmesser 1,1 – 1,2 mm) am nasalen Augenwinkel der retrobulbäre Venenwinkel punktiert. Das Blut wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 30 µl Antiprotease (Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) aufgefangen. Dabei wurde maximal eine Blutmenge von 10

% des gesamten Blutvolumens entnommen, wie von der GV-SOLAS empfohlen wird. Nach der Blutentnahme und einer 30-minütigen Koagulationszeit wurde das Blut bei 1500 x g zentrifugiert und der Überstand wurde abpipettiert. Bis zur Durchführung des antikörperbasierten Nachweisverfahrens (Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)) wurden die Proben bei – 80 °C gelagert.

Zum Nachweis der Corticosteronkonzentration wurde ein kommerzieller ELISA (Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922, Demeditec, Kiel, Deutschland) verwendet. Dabei wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers verfahren. Die Proben wurden zusammen mit den Standardlösungen und den Kontrollen als Duplikate in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Mulden waren mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-Corticosteron-Antikörper versehen. Zusätzlich wurde in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte Inkubationspuffer und Enzymkonjugat (Corticosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert) zugefügt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte für zwei Stunden auf einen Plattformschüttler (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Deutschland) platziert und bei Raumtemperatur und 600 rpm geschüttelt. Danach wurden die Mulden mithilfe von vier Waschschritten von nicht gebundenem Corticosteron und den Resten des Inkubationspuffers und des Enzymkonjugats befreit. Im Anschluss wurde eine Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) dazugegeben und wieder, diesmal lichtgeschützt, für 30 min bei Raumtemperatur, inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde eine Stopplösung (Salzsäure 2N) dazugegeben. Die Extinktion wurde mittels eines ELISA-Messgeräts und der entsprechenden Software (Gen 5 microplate reader, Biotek; Gen 5 Imager Software, Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Dabei wurde der Mittelwert der Extinktion der Duplikate ermittelt. Die Werte der Standards wurden als sigmoidale Kurve dargestellt. Darauf basierend wurde die Konzentration des Corticosterons ermittelt und in ng/ml angegeben. Der Hersteller gibt Werte des Corticosterons bei weiblichen Ratten an, die morgens in einem Bereich von 53,9 – 332,1 ng/ml und nachmittags bei 292,5 – 819,0 ng/ml liegen. Dadurch, dass Corticosteron im Serum eine Halbwertszeit von 10 - 30 min hat, gibt es einen Einblick in die akute Antwort auf mögliche Stressoren, die auf die Tiere einwirkten.

### 6.3. Corticosteronmetaboliten im Kot

Die Kotproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt:

- vor der OP
- zwei Tage nach dem SE
- sieben Tage nach dem SE
- vier Wochen nach dem SE
- am Versuchsende

Dazu wurde morgens zwischen 7:00 Uhr und 9:00 Uhr frischer Kot aus dem Heimkäfig entnommen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dadurch, dass die Kotprobengewinnung nicht invasiv erfolgte und somit nicht mit zusätzlichem Stress verbunden war, wurden die Proben zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt. Bevor die FCM-Konzentration bestimmt werden konnte, musste eine Extraktion der FCM durchgeführt werden. Dabei wurden die Proben mit einem Spatel zerstoßen und in einem Trockenschrank bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet, bis ein feines Pulver entstand. Im Anschluss wurde jeweils 0,1 Gramm von jeder Probe in ein Eppendorf-Gefäß eingewogen und mit zwei Millilitern 80-prozentigem Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt. Danach wurden die Proben 30 min auf einem Multi-Vortex (RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach diesem Vorgang wurden die Proben mit 3500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für zehn weitere Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Im Anschluss an diesen Prozess wurden sie vor dem Versand an den Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme (Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie des Departments für Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, Österreich) bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Beim Kooperationspartner wurden die Proben weiterverarbeitet. Dazu wurden fünf Mikroliter des Überstandes mit 459 Mikrolitern Essigsäure versetzt. Die Analyse selbst erfolgte mittels eines Enzymimmunassay (EIA), der von TOUMA et al. (2004) und LEPSCHY et al. (2010) beschrieben wurde. Dieser  $5\alpha$ -Pregnan- $3\beta$ , $11\beta$ , $21$ -Triol-20-one EIA wurde für die Bestimmung von FCM bei Mäusen und Ratten entwickelt.

### 6.4. Brain-Derived-Neurotrophic-Factor im Serum

Die BDNF-Bestimmung wurde ebenfalls mithilfe eines ELISA (Promega Inc., Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Der ELISA wurde von einem der Kooperationspartner, Prof. Rainer Hellweg (Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde mit den Proben bis zur Lagerung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gleich verfahren, wie mit den Serumproben zur Corticosteronbestimmung. Die Analyse der Proben basierte auf einem Protokoll, das von HELLWEG et al. (2003) beschrieben wurde. Dabei wurden die Proben mit Probenpuffer verdünnt (im Verhältnis 1:20). Währenddessen

wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit primären monoklonalen Anti-BDNF-Antikörper beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Mikrotiterplatte viermal gewaschen. Der Überstand der verdünnten Proben nach Zentrifugation wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,1-prozentigem NP-40 gemischt und in Duplikaten auf die Mikrotiterplatte gegeben. Zusätzlich wurden die Standardlösungen und die Kontrollen, ebenfalls in Duplikaten, auf die Mikrotiterplatte pipettiert. Im Anschluss wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgten vier Waschschriffe, wonach ein sekundärer, polyklonaler Anti-BDNF-Antikörper hinzugegeben wurde. Anschließend wurde wieder inkubiert, diesmal für zwei Stunden und bei Raumtemperatur. Nachdem erneut viermal gewaschen wurde, wurde ein Anti-Huhn IgY-alkalische-Phosphatase-Konjugat dazugegeben. Die nachfolgende Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug 90 min. Es folgten vier weitere Waschschriffe, bevor ein Enzymreagenz (1 mM AttoPhos substrate, Promega Inc., Mannheim, Deutschland) dazugegeben wurde. Um die Extinktion zu bestimmen, wurde die Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplatten-Fluorometer (Labsystems Fluoroskan II, GMI USA) platziert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen. Nach SARTORIUS et al. (2009) liegt die Konzentration von BDNF im Serum von Ratten bei ca. 1100 pg/ml. Die Untergrenze der nachweisbaren Konzentration lag bei 1 pg/ml.

### **6.5. Creatinkinase im Serum**

Als weiterer biochemischer Parameter wurde die katalytische Aktivität der CK bestimmt. Hier handelte es sich ebenfalls um Serumproben, die im Rahmen der Blutentnahme einen Tag vor der Perfusion gewonnen wurden. Sie wurden in gleicher Weise behandelt, wie die zuvor erwähnten Serumproben und bis zur Analyse bei – 80 °C aufbewahrt. Die Analyse der Serumproben wurde von der Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Dabei wurde ein Hochdurchsatzgerät (Cobas Integra® 400 plus System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet, das auch routinemäßig bei der Analyse von Patientenproben eingesetzt wird.

Das zugrundeliegende Prinzip, auf dem das Analyseverfahren beruht, ist die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-Phosphat. Dies ist ein Teil des Pentosephosphatweges im Organismus. Dabei entsteht Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH + H). Für diesen Prozess wird der Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) in der Zelle benötigt. Das Adenosintriphosphat entsteht dabei aus der Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP). Dieser Vorgang wird durch die enzymatische Aktivität der CK bestimmt. Somit ist die Aktivität der CK und die Entstehung des NADPH + H<sup>+</sup> proportional. Deshalb wird, um die Aktivität der CK zu bestimmen, die Entstehung des NADPH + H<sup>+</sup> mittels einer Messung der Extinktionszunahme verwendet. Dabei wird eine Wellenlänge von 340 nm

herangezogen. Das Analysegerät (Cobas Integra® 400 plus System, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) führt dabei eine automatisierte Messung durch. Die Werte werden dabei mithilfe eines Umrechnungsfaktor von  $U/L \times 0,0167 = \mu\text{kat/L}$  bestimmt. Bei dieser Messmethode kann ein nachweisbarer Bereich von 7 – 2000 U/L (ROCHE 2008) erfasst werden. Wurden höhere Konzentrationen in einer Probe festgestellt, wurde sie im Verhältnis 1:10 verdünnt und nochmals analysiert.

### **6.6. Vaginalzytologie**

Am Tag der Euthanasie wurde mithilfe eines in Natriumchlorid-Lösung (0,9 prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland) getränkten Vaginaltupfers eine Probe der Vaginalschleimhaut entnommen. Diese Probenentnahme fand während einer Allgemeinanästhesie mit Chloralhydrat (360 mg/kg in 20 ml 0,9 prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung, E. Merck AG, Darmstadt, Deutschland) statt. Unmittelbar nach der Probenentnahme wurden die Tiere euthanasiert (600 mg/kg i.p., Narcoren®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland). Im Anschluss wurden die Vaginaltupfer auf einem Objektträger ausgerollt. Nachdem die Abstriche getrocknet waren, wurden sie mithilfe einer Diff-Quick-Färbung (Diff-Quick® Schnellfärbeset, Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz) angefärbt und von Frau Dr. Otzdorff in der chirurgischen und gynäkologischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München beurteilt. Mithilfe der Vaginalzytologie war es möglich, einen Einblick in den aktuellen Zyklusstand der Tiere zu bekommen. Darüber hinaus konnten zyklusabhängige Schwankungen der biochemischen Parameter berücksichtigt werden.

## **7. Auswertung und Statistik**

Zur statistischen Auswertung der ermittelten Daten wurde die Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) verwendet. Dabei wurde für den Vergleich von zwei Gruppen ein ungepaarter t-Test für parametrische Datensätze und ein Mann-Whitney-U-Test für nichtparametrische Datensätze herangezogen. Für den Vergleich von drei Gruppen und parametrische Daten wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Handelte es sich beim Vergleich von drei Gruppen um nichtparametrische Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um drei Gruppen über einige aufeinanderfolgende Tage vergleichen zu können, wurde eine wiederholte, zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) herangezogen. Handelte es sich um parametrische Daten, diente die Bonferroni-Korrektur als Post-hoc-Test. Bei nichtparametrischen Daten, wurde ein Dunn's Test verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, sich fälschlicherweise für die Alternativhypothese zu entscheiden wurde mit dem p-Wert  $< 0,05$  festgelegt. In den Graphen sind

die Mittelwerte mit der Standardabweichung (*Standard Deviation*, SD) dargestellt. Werte, die sich als Ausreißer herausstellten, wurden nach der 3- $\sigma$ -Regel entfernt. Dabei wurden die Daten, sofern in einem Test mehrere Parameter beurteilt wurden, auch für die anderen Parameter entfernt, wenn es sich um Ausreißer handelte.

Für die Graphen, die auf den Daten der telemetrischen Messung basierten, sowie die Korrelationsmatrix nach Spearman, wurde die Software R in Version 3.3.2. (R-CORE-TEAM 2016) verwendet. Die Graphen wurden unter Verwendung eines R-Skripts nach MÖLLER et al. (2019) dargestellt. Dabei wurde für die graphische Darstellung der telemetrisch-ermittelten Daten das R-Paket „ggplot“ (WICKHAM u. WICKHAM 2007) verwendet. Zur Glättung der Diagramme wurde die LOESS-Regression mit einem Bereich von 0,15 verwendet. Außerdem wurden die Datensätze als Kastengraphen (*Boxplots*) dargestellt. Dabei betrug die Länge der *Whisker* ein Maximum des 1,5-Fachen des Interquartilabstands (IQR). Diese Form der *Boxplots* wird auch als *Turkey-Boxplot* bezeichnet. Um die Korrelationsmatrix graphisch darstellen zu können, wurde das R-Paket „corrplot“ (WEI et al. 2017) verwendet. War der Datensatz für ein Tier in einem Parameter nicht vollständig, so wurde das jeweilige Tiere für diesen Parameter von der Korrelation exkludiert. Um multiple Testprobleme zu verhindern, wurde die Falscherkennungsrate nach Benjamini und Hochberg bei der statistischen Auswertung der telemetrischen Daten berücksichtigt. Zur Erstellung der Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) wurde das R-Paket „made4“ (CULHANE et al. 2005) herangezogen. Aufgrund der Zentrierung und Skalierung der Daten hat jede Variable in der PCA einen Mittelwert, der Null entspricht und eine Standardabweichung, die eins beträgt.

## V. ERGEBNISSE

### 1. Anfallsfrequenz und -dauer

Die Auswertung des Video- und EEG-Monitorings ergaben, dass 96,2 % der Tiere, die den SE überlebten, epileptische Anfälle entwickelten. Die Anfallsfrequenz variierte dabei interindividuell.

#### 1.1. Post-Insult-Phase und Latenzphase

In Versuchsreihe 2 wurde eine Woche nach dem SE eine telemetrische Aufzeichnung durchgeführt. Diese beinhaltete neben dem EKG auch eine EEG-Aufzeichnung. Dabei konnten während der Post-Insult-Phase keine Anfälle beobachtet werden. In der späten Latenzphase hingegen, zeigten vier von elf Tieren bereits spontane epileptische Anfälle (Abbildung 7).

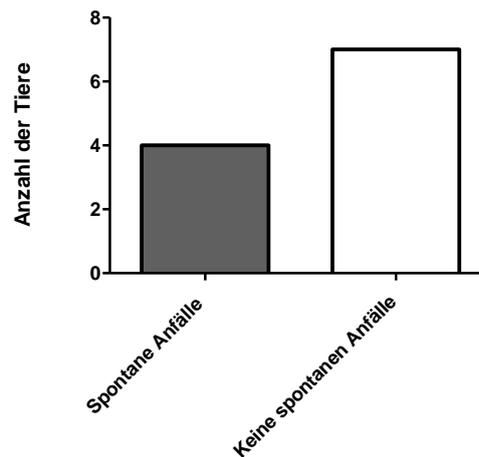


Abbildung 7: Spontane Anfälle vier Wochen nach der SE-Induktion. Dargestellt ist die Anzahl der Tiere, die bereits nach vier Wochen spontane Anfälle zeigten beziehungsweise die Anzahl der Tiere, die zu diesem Zeitpunkt noch keine Anfälle zeigten.

#### 1.2. Chronische Phase

Während des zweiwöchigen Video- und EEG-Monitorings zeigten 25 von 26 Tieren spontane Anfälle.

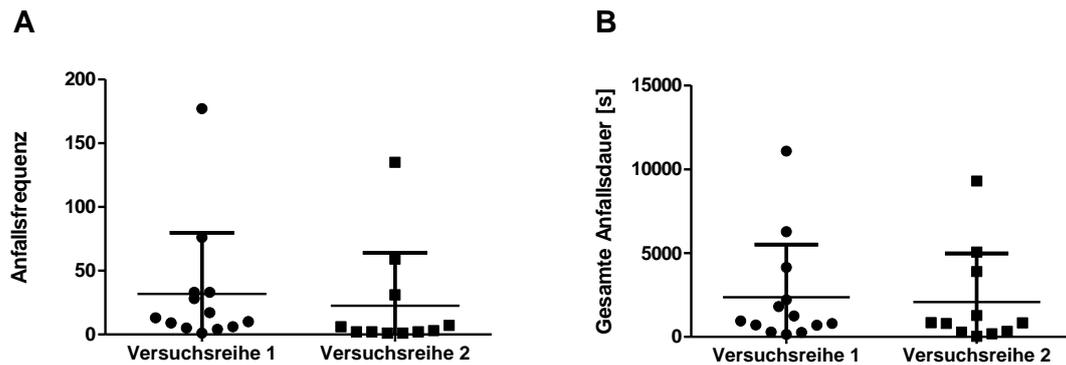


Abbildung 8: Anfallsfrequenz und Anfallsdauer während des Video- und EEG-Monitorings. Dargestellt ist die Anfallsfrequenz während der zweiwöchigen Phase des Monitorings von Versuchsreihe 1 (A, kabelgebundene EEG-Aufzeichnung,  $n = 13$ ) und Versuchsreihe 2 (telemetrische EEG-Aufzeichnung,  $n = 11$ ). Die gesamte Anfallsdauer aller, während des Monitorings aufgezeichneten Anfälle, ist in B dargestellt. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD.

## 2. Verhaltensparameter

Das Heimkäfiverhalten wurde vor und nach der Elektrodenimplantation, in der frühen Post-Insult-Phase, in der Latenzphase und in der chronischen Phase untersucht. Es umfasst das Nestbauverhalten und das *Level-of-Soiling*. Dabei wurde das Nestbauverhalten in den akuten Phasen nach dem operativen Eingriff, nach der SE-Induktion und in der chronischen Phase nach dem Video- und EEG-Monitoring täglich beurteilt. Im Anschluss fand die Beurteilung des Nestes einmal wöchentlich statt. Dafür wurde der fünfte Tag nach dem Umsetzen in frische Käfige ausgewählt. An diesem Tag wurde den Tieren zusätzlich zum neuen Käfig, der mit frischer Einstreu ausgestattet war, auch neues Nestmaterial angeboten. Die Nestkomplexität wurde zwischen 7:00 Uhr und 9:00 Uhr bewertet. Das *Level-of-Soiling* wurde wöchentlich bis zum Versuchsende beurteilt. Dabei wurde am Tag des Umsetzens der Verschmutzungsgrad des Nestes und die Kotverteilung im Käfig bewertet.

### 2.1. Heimkäfiverhalten

#### 2.1.1. Nestbauverhalten

##### 2.1.1.1. Basalwerte

Zwei Wochen vor der Elektrodenimplantation wurde das Nestbauverhalten für den Zeitraum von einer Woche täglich beurteilt. Zu diesem Zeitpunkt sind somit alle Tiere naiv. Dabei konnte gezeigt werden, dass, wie bei CHRISTINA MÖLLER (2018) festgestellt wurde, die Nestkomplexität nach der Zugabe des neuen Nestmaterials anstieg. In der vorliegenden Studie bauten die Tiere der Versuchsreihe 1 an Tag vier nach dem Käfigwechsel Nester

mit der höchsten Nestkomplexität. Nach dem Höhepunkt am vierten Tag nahm die Nestkomplexität bis zum nächsten Umsetzen wieder ab (Abbildung 9A). In Versuchsreihe 2 hingegen konstruierten die Tiere ab Tag zwei nach dem Käfigwechsel Nester mit einer hohen Nestkomplexität (Abbildung 9B). Im Gegensatz zum Nestbauverhalten der Versuchsreihe 1 bleibt die Nestkomplexität bis zum Käfigwechsel hoch. Nichtsdestotrotz eignet sich Tag fünf auch in dieser Studie, um das Nestbauverhalten zu beobachten und zu vergleichen. Zu diesem Zeitpunkt ist in beiden Versuchsreihen mit Nestern, die eine hohe Nestkomplexität aufweisen, zu rechnen.

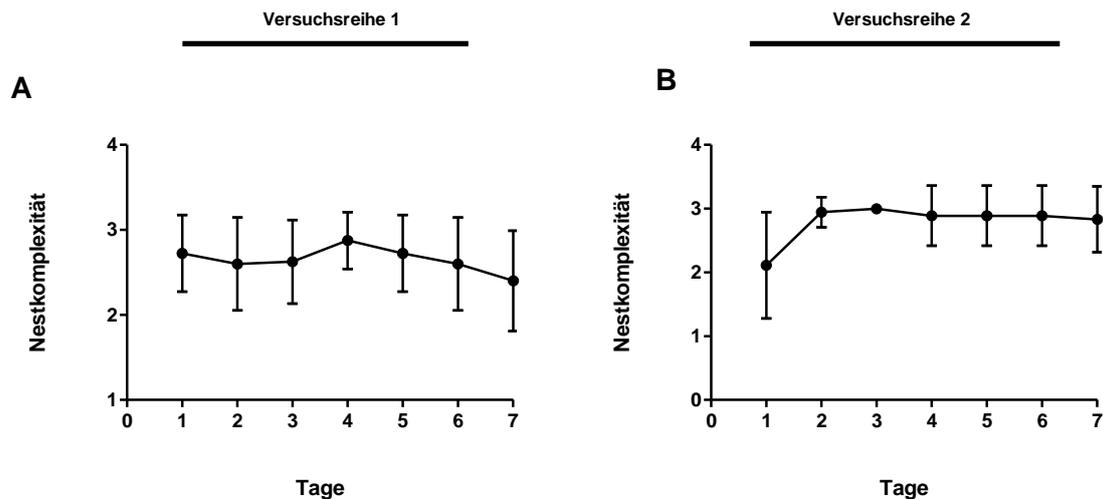


Abbildung 9: Basalwerte der Nestkomplexität. In beiden Abbildungen wird die Nestkomplexität über eine Woche dargestellt. Die Untersuchung der Basalwerte fand in der Woche nach der Ankunft der Tiere statt. An Tag 0 wurde den Tieren ein Käfig mit neuer Einstreu und neuem Nestbaumaterial zur Verfügung gestellt. Abbildung A stellt die Nestkomplexität der Nester aus Versuchsreihe 1 ( $n = 44$ ) und Abbildung B aus Versuchsreihe 2 ( $n = 18$ ) dar. Die Graphen zeigen den Mittelwert und die SD.

### 2.1.1.2. Elektrodenimplantation

Nach der Elektrodenimplantation wurde das Nestbauverhalten für zwei Wochen täglich beurteilt. Dabei wurde den operierten und den naiven Tieren am Tag der Operation (Tag 0) ein frischer Käfig angeboten. Der nächste Käfigwechsel fand an Tag sieben statt, wie in den Graphen dargestellt. Die Operation hatte keine Auswirkung auf das Nestbauverhalten der Tiere. Anhand der Nestkomplexität konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. In Versuchsreihe 2 gab es ausschließlich elektroden- und transmitterimplantierte Tiere. Somit konnte nur der Verlauf der Nestkomplexität dargestellt werden ohne den Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Abbildung 10).

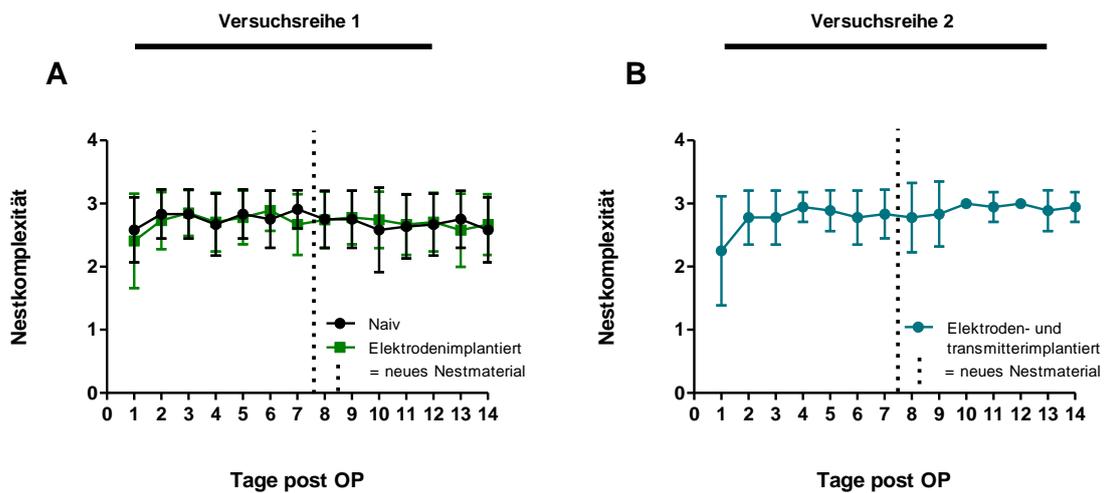


Abbildung 10: Die Nestkomplexität nach der Operation. In Versuchsreihe 1 (A) konnte kein signifikanter Unterschied zur naiven Gruppe festgestellt werden. Da während der OP zwei Tiere verstarben, sind die Gruppengröße für die naive Gruppe  $n = 12$  und für die elektrodenimplantierte Gruppe  $n = 30$ . In Versuchsreihe 2 (B) existierte ausschließlich die elektroden- und transmitterimplantierte Gruppe ( $n = 18$ ). Im Graphen abgebildet sind der Mittelwert und die SD.

### 2.1.1.3. Frühe Post-Insult-Phase

Die frühe Post-Insult-Phase spiegelt die akute Phase nach dem initialen Insult wider. In der vorliegenden Studie wurde das Nestbauverhalten der Tiere täglich für zehn Tage nach Induktion des SE beurteilt. In der Versuchsreihe 1 (Abbildung 11A) konstruierten die Tiere an den Tagen zwei, drei, sechs und sieben Nester mit einer signifikant reduzierten Komplexität im Vergleich zu den naiven und elektrodenimplantierten Tieren. Einen und zehn Tage nach der SE-Induktion konnte eine signifikante Reduktion des Nestbauverhaltens im Vergleich zur Sham-Gruppe festgestellt werden. Auch in der Versuchsreihe 2 (Abbildung 11B) zeigten die Tiere ausschließlich zwei Tage nach der SE-Induktion ein signifikant reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Nestbauverhalten in Versuchsreihe 2 konnte erst ab dem zweiten Tag beurteilt werden. Das Nestbauverhalten unterschied sich somit in den beiden Versuchsreihen.

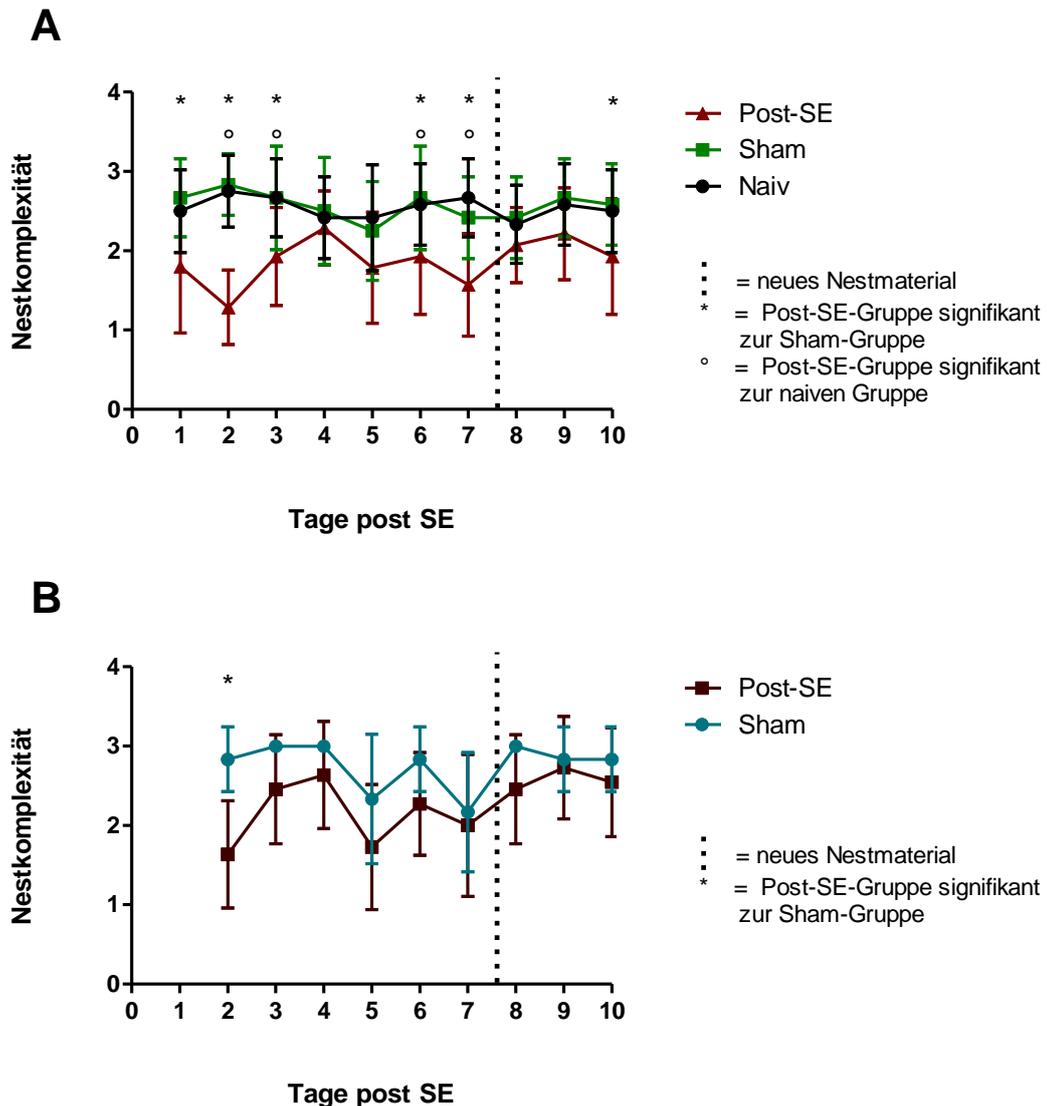


Abbildung 11: Nestkomplexität in den ersten zehn Tagen nach der SE-Induktion. In Versuchsreihe 1 (A) konnte an den Tagen zwei, drei, sechs und sieben nach dem SE eine signifikante Reduktion des Nestbauverhaltens im Vergleich zur naiven und zur elektrodenimplantierten Gruppe festgestellt werden. Zusätzlich wiesen die Tiere ein und zehn Tage nachdem sie einen SE erfuhren, ein signifikant reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zur Sham-Gruppe auf. In Versuchsreihe 2 (B) konnte ausschließlich zwei Tage nach der SE-Induktion eine signifikante Reduktion des Nestbauverhaltens im Vergleich zu den Sham-Tieren beobachtet werden. Die Gruppengrößen in der Versuchsreihe 1 waren  $n = 12$  für die naiven Tiere,  $n = 12$  für die Sham-Gruppe und  $n = 14$  für die Post-SE-Gruppe. Im Graphen abgebildet sind der Mittelwert und die SD. \* und ° =  $p < 0,05$

#### 2.1.1.4. Latenzphase

Die Latenzphase beschreibt die Zeit der Epileptogenese und endet mit dem Beginn der chronischen Phase. Sie erstreckte sich in der vorliegenden Studie auf einen Zeitraum von sieben Wochen. Hier wurde das Nestbauverhalten in jeder Woche der Latenzphase an Tag fünf beurteilt. In Versuchsreihe 1 (Abbildung 12A) konnte anhand dieses Parameters während der Latenzphase kein Unterschied zwischen den Gruppen, mit Ausnahme der zweiten Woche nach SE-Induktion, festgestellt werden. In dieser Woche bauten die Tiere, die einen

SE erfuhren signifikant schlechtere Nester, im Vergleich zur elektrodenimplantierten Gruppe. In der Versuchsreihe 2 (Abbildung 12B) zeigten die Tiere, bei denen ein SE induziert wurde, in den Wochen zwei und sechs der Latenzphase ein signifikant reduziertes Nestbauverhalten.

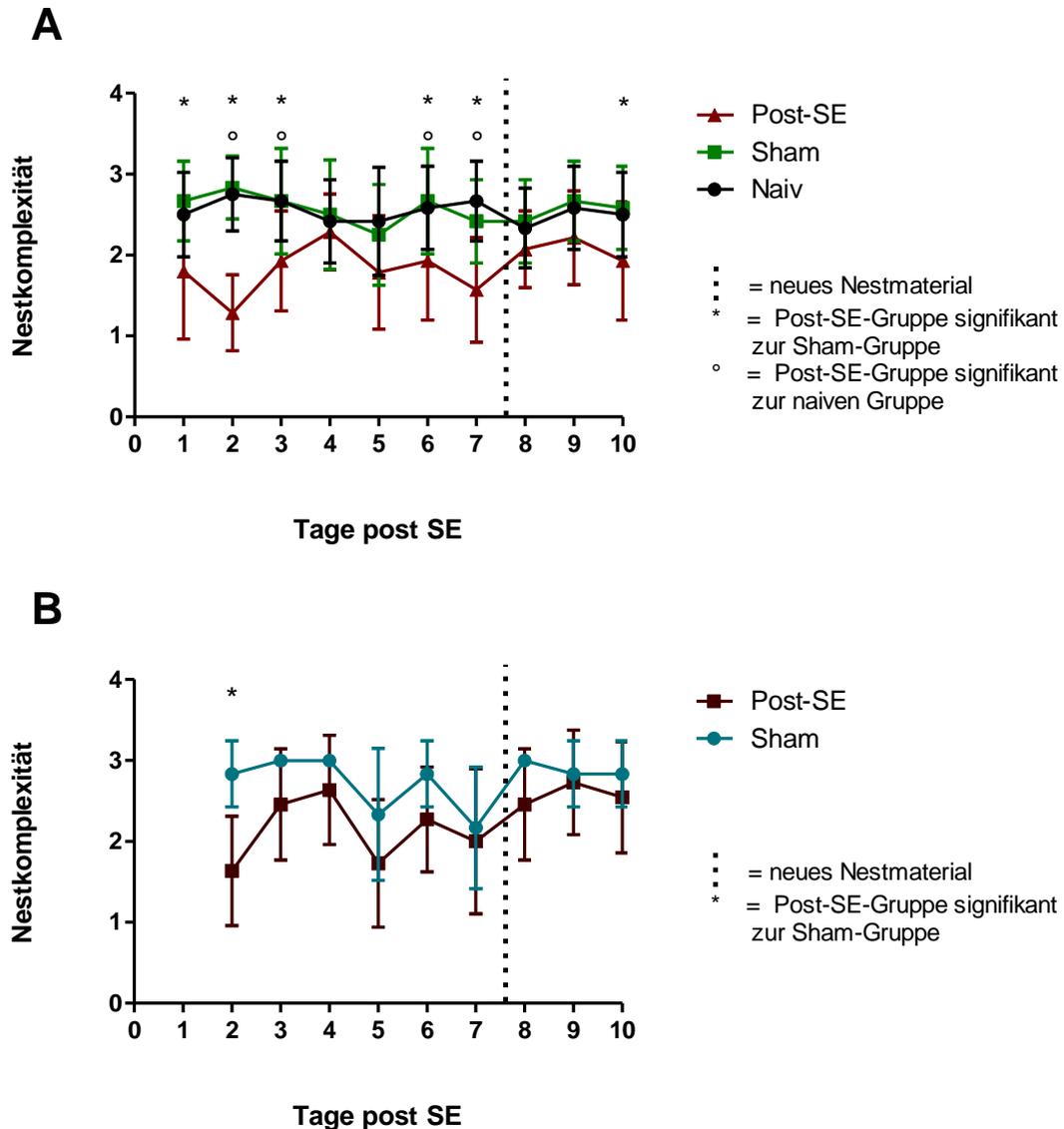


Abbildung 12: Nestbauverhalten während der Latenzphase. Die Auswertung erfolgte wöchentlich an Tag fünf nach dem Käfigwechsel. In Versuchsreihe 1 (A) konnte ein signifikanter Unterschied in der zweiten Latenzwoche festgestellt werden (Naiv:  $n = 12$ , Sham:  $n = 12$ , Post-SE:  $n = 14$ ). In Versuchsreihe 2 (B) wurde zwei und sechs Wochen nach der SE-Induktion eine Reduktion der Nestkomplexität festgestellt (Sham:  $n = 6$ , Post-SE:  $n = 11$ ). Im Graphen abgebildet sind der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$

### 2.1.1.5. Chronische Phase

In der Versuchsreihe 1 (Abbildung 13A) beziehen sich die erhobenen Daten auf den Zeitraum von der zehnten bis zur zwölften Woche nach der SE-Induktion und somit auf den Zeitraum nach dem EEG-Monitoring. In dieser Phase wurde das Nestbauverhalten täglich

beurteilt. Dabei konnte an fünf, sechs, sieben, zwölf, dreizehn, vierzehn, fünfzehn und neunzehn Tagen nach dem EEG-Monitoring ein reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden. In Versuchsreihe 2 (Abbildung 13B) hingegen, konnte ausschließlich an Tag vier ein reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

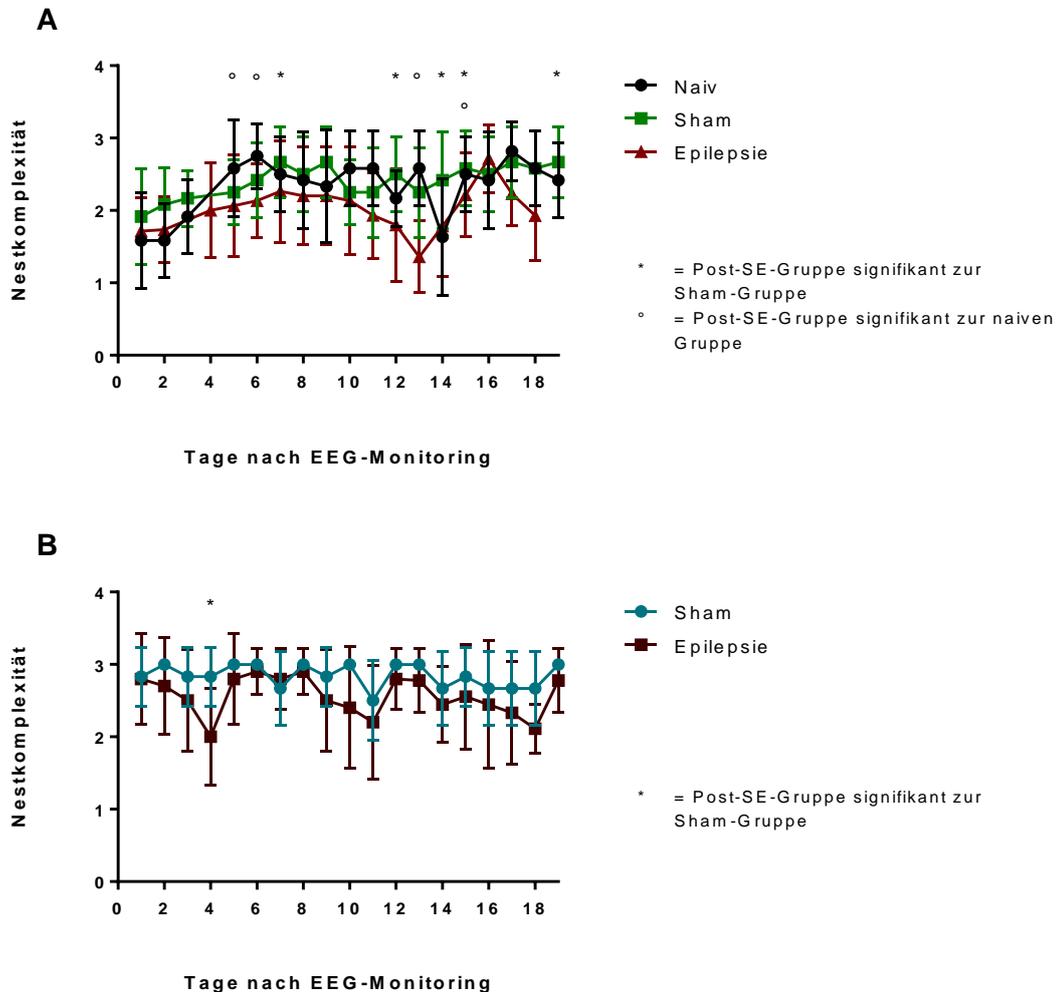


Abbildung 13: Nestbauverhalten in der chronischen Phase. Nach dem EEG-Monitoring wurde das Nestbauverhalten der Tiere täglich beurteilt. In Versuchsreihe 1 (A) konnte zu multiplen Zeitpunkten eine Reduktion des Nestbauverhaltens beobachtet werden (Naiv:  $n = 12$ , Sham:  $n = 12$ , Epilepsie:  $n = 13 - 14$ ). In Versuchsreihe 2 (B) konnte ausschließlich an Tag vier eine Reduktion der Nestkomplexität festgestellt werden (Sham:  $n = 6$ , Epilepsie:  $n = 10 - 11$ ). Im Graphen abgebildet sind der Mittelwert und die SD. \* und # =  $p < 0,05$

### 2.1.2. Level-of-Soiling

Bei der Beurteilung der Verteilung der fäkalen Verunreinigungen im Käfig zeigten die Tiere in Versuchsreihe 1 nach der Elektrodenimplantation kein reduziertes Bestreben den Kotbereich von Nestbereich zu separieren (Abbildung 14A). Nach der SE-Induktion konnte in den Latenzwochen drei, fünf und sieben ein signifikant erhöhter Verschmutzungsgrad im Nestbereich im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. In der Versuchsreihe 2

konnte kein direkter Vergleich zur Kontrollgruppe nach der Operation erfolgen, da alle Tiere mit Elektroden und Transmittern implantiert wurden und somit keine naive Gruppe existierte. Deshalb wurden ausschließlich die Wochen nach der SE-Induktion untersucht (Abbildung 14B). Im Gegensatz zur Versuchsreihe 1 fand das Video- und EEG-Monitoring in den Heimkäfigen statt, wodurch auch Daten während dieser Zeit erhoben werden konnten. Daher existieren für Versuchsreihe 2 ab der SE-Induktion wöchentlich bis zum Versuchsende Ergebnisse. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Tiere sowohl in den Latenzwochen drei und sieben, als auch in einer Woche der chronischen Phase ein erhöhtes Level-of-Soiling. Somit unterschied sich das *Level-of-Soiling* zwischen den Versuchsreihen.

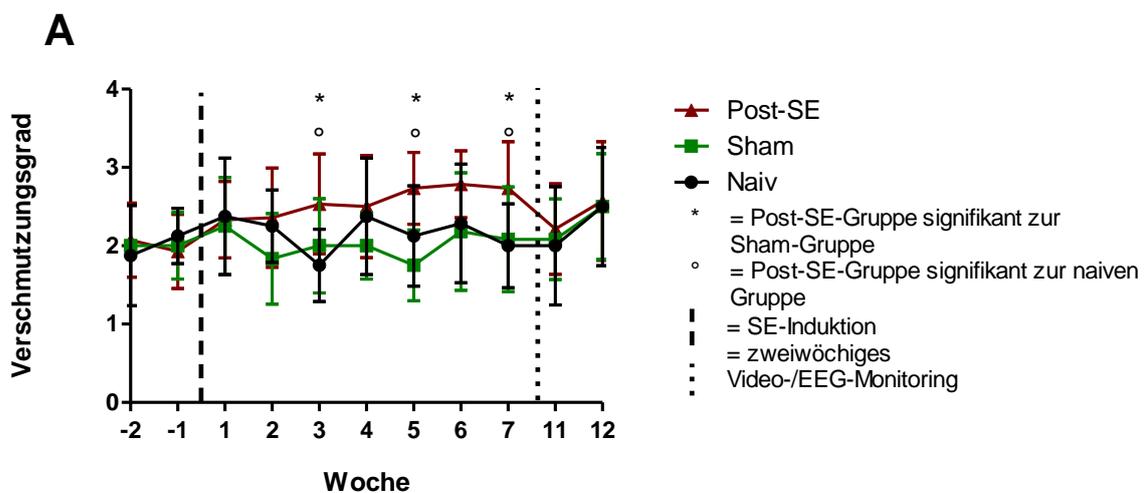


Abbildung 14A: *Level-of-Soiling*: Dargestellt ist der Verlauf des *Level-of-Soiling* der Versuchsreihe 1 postoperativ und nach der SE-Induktion. Zu Beginn der chronischen Phase liegen keine Daten des Verschmutzungsgrades der Käfige vor, da die Tiere sich in dieser Zeit in den Glasaquarien für das Video- und EEG-Monitoring befanden. Drei, fünf und sieben Wochen nach dem SE zeigten die Tiere, die einen SE erfuhren ein signifikant reduziertes Bestreben den Nestbereich vom Kotbereich zu separieren. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich sowohl im Vergleich zur naiven, als auch im Vergleich zur Sham-Gruppe. \* und ◦ =  $p < 0,05$

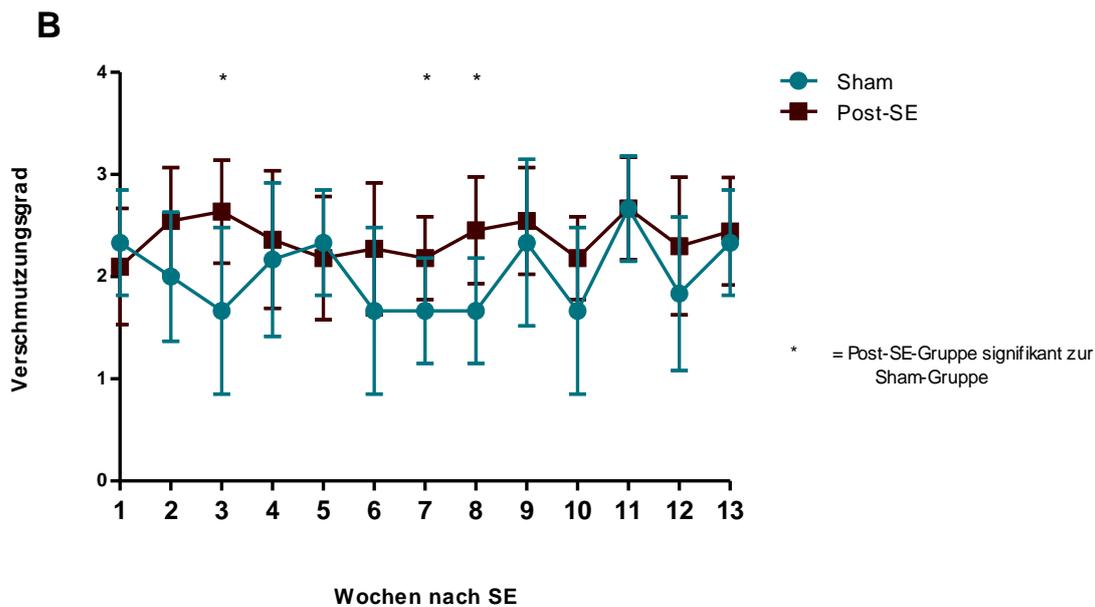


Abbildung 14B: *Level-of-Soiling*. Dargestellt ist der Verlauf des *Level-of-Soiling* der Versuchsreihe 2. In Versuchsreihe 2 fand eine kontinuierliche Beurteilung des Verschmutzungsgrades des Nestbereichs nach der SE-Induktion statt. Dabei konnte in der dritten, siebten und achten Woche nach dem SE ein erhöhter Verschmutzungsgrad festgestellt werden. Im Graphen abgebildet sind der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$

## 2.2. Soziale Interaktionen

Dieser Test wurde ausschließlich in der chronischen Phase durchgeführt. Dabei wurde pro Paar, das getestet wurde, ein Wert generiert. Dieser Wert spiegelt die Zeit wider, während der sich die Tiere in aktiver sozialer Interaktion befanden. Die aktive soziale Interaktion kennzeichnet sich durch gegenseitiges Putzverhalten und gemeinsames Spielverhalten. Zusätzlich wurde die Zeit erfasst, in der sich die Tiere in passiver sozialer Interaktion befanden. Die passive soziale Interaktion wird als Aufenthalt im gleichen Bereich der Testarena definiert. Dabei zeigen die Tiere beispielsweise gleichzeitig Putzverhalten ohne aktiv zu interagieren. Bei den Tieren mit spontanen wiederkehrenden Anfällen konnten zusätzlich vereinzelt aggressive Interaktionen beobachtet werden. Da dies nur im Einzelfall vorkam, wurde es hier nicht graphisch dargestellt. Ebenso wurde die passive Interaktion nicht dargestellt, da sich die Tiere, wenn sie interagierten, überwiegend in einer aktiven sozialen Interaktion befanden. In der Versuchsreihe 1 (Abbildung 15A) zeigten die epileptischen Tiere eine signifikant reduzierte Interaktion miteinander, im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Auch die Tiere aus der Versuchsreihe 2 (Abbildung 15B) zeigten in der chronischen Phase signifikant reduzierte aktive soziale Interaktionen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

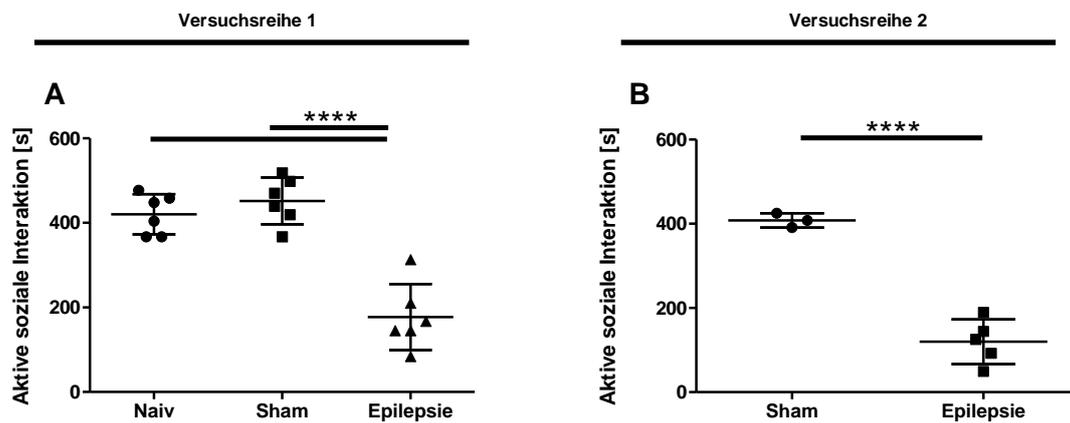


Abbildung 15: Aktive soziale Interaktionen. Dargestellt ist die Zeit in Sekunden, in der sich die Tiere während des fünfminütigen Tests in aktiver sozialer Interaktion befanden. Sowohl in Versuchsreihe 1 (A), als auch in Versuchsreihe 2 (B) konnte ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen beziehungsweise zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Graphen dargestellt sind der Mittelwert und die SD. In Versuchsreihe 1 wurden für die naive Gruppe  $n = 6$  Paare, für die Sham-Gruppe  $n = 6$  Paare und für die epileptische Gruppe  $n = 6$  Paare untersucht. In Versuchsreihe 2 bestand die Sham-Gruppe aus  $n = 3$  Paaren und die Epilepsie-Gruppe aus  $n = 5$  Paaren. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

### 2.3. Wühlverhalten

In der Woche vor der Elektrodenimplantation wurde den Tieren die Möglichkeit gegeben sich an die Testapparatur und die Testsituation zu adaptieren. Dieses Training führt zu einer Steigerung des Wühlverhaltens. Dabei dienten die Daten, die sich basierend auf dem letzten Tag des Trainings ergaben, als Basalwerte. Es wurde sichergestellt, dass die Tiere am letzten Tag des Trainings mindestens 500 g Kies aus der Röhre beförderten, andernfalls wurden die Ergebnisse dieser Tiere bei der Auswertung des Wühlverhaltens während der gesamten Studie nicht berücksichtigt. In beiden Versuchsreihen beförderten die Tiere allerdings am Ende des Trainings mehr als 500 g Kies aus der Röhre. Um den Einfluss der Elektrodenimplantation zu beurteilen, wurde der Test eine Woche nach der Operation wiederholt. Darüber hinaus wurde dieser Test in der frühen Post-Insult-Phase, der Latenzphase und der chronischen Phase durchgeführt. Dabei wurde zum einen beurteilt, wieviel Kies die Tiere innerhalb einer Stunde durch gezielte Wühlbewegungen aus der Testapparatur beförderten und zum anderen die Zeit bis zum Einsetzen der gezielten Wühlbewegungen.

#### 2.3.1. Basalwerte

In Versuchsreihe 1 (Abbildung 16A) konnte eine kontinuierliche Steigerung des Wühlverhaltens in der Trainingsphase festgestellt werden. Zusätzlich nahm die SD über den viertägigen Verlauf hin ab. Folglich reduzierte sich die Varianz und somit die interindividuellen Unterschiede in der Gesamtgruppe der Tiere in Bezug auf die Leistung im Wühlverhalten.

Bei der Messung der Latenzzeit konnte ebenfalls eine Verbesserung im Verlauf der Trainingsphase beobachtet werden (Abbildung 16B). Die Zeit bis zum Einsetzen des zielgerichteten Wühlverhaltens reduzierte sich während der Trainingsphase. Darüber hinaus konnte auch bei der Latenzzeit eine Reduktion der Varianz beziehungsweise der SD festgestellt werden. Die an Tag fünf erzielten Werte sind die Basalwerte beziehungsweise Referenzwerte für Ergebnisse zu weiteren Messzeitpunkten.

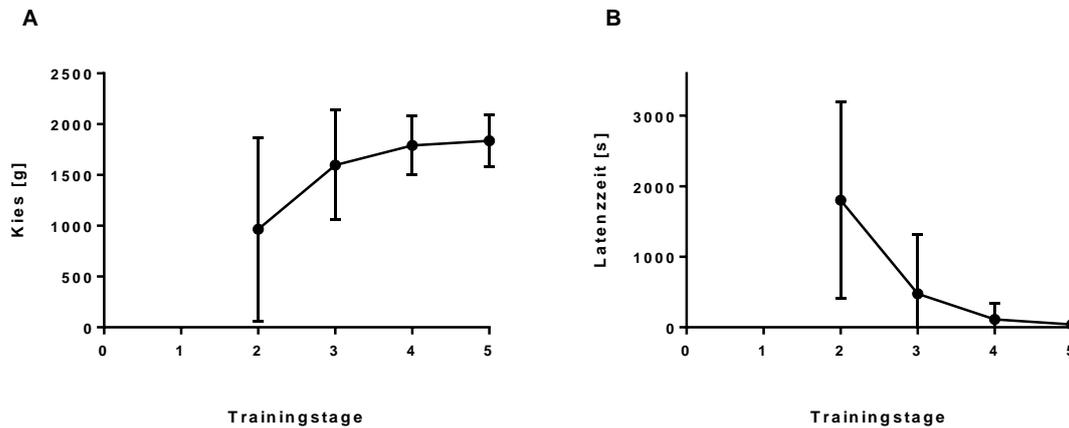


Abbildung 16: Training des Wühlverhaltens von Versuchsreihe 1 (n = 44). (A) Dargestellt ist die Gesamtmenge des Substrats, das aus der Testapparatur befördert wurde und die Latenzzeit (B), bis zum Einsetzen des zielgerichteten Wühlverhaltens. An Tag eins wurde den Tieren ausschließlich eine leere Röhre angeboten, sodass die Tiere sich an die Apparatur gewöhnen konnten. Dargestellt ist der Mittelwert und die SD.

In Versuchsreihe 2 konnte ebenfalls eine Steigerung des Wühlverhaltens bezüglich des Kieses, der aus der Röhre befördert wurde, beobachtet werden (Abbildung 17A). Im Gegensatz zu Versuchsreihe 1 war Tag fünf des Trainings nicht der Tag der höchsten Leistung. Stattdessen fällt die Leistung nach dem dritten Trainingstag ab. Die Latenzzeit verkürzt sich analog zu Versuchsreihe 1 (Abbildung 17B). Die Varianz und somit die SD reduziert sich im Verlauf des Trainings.

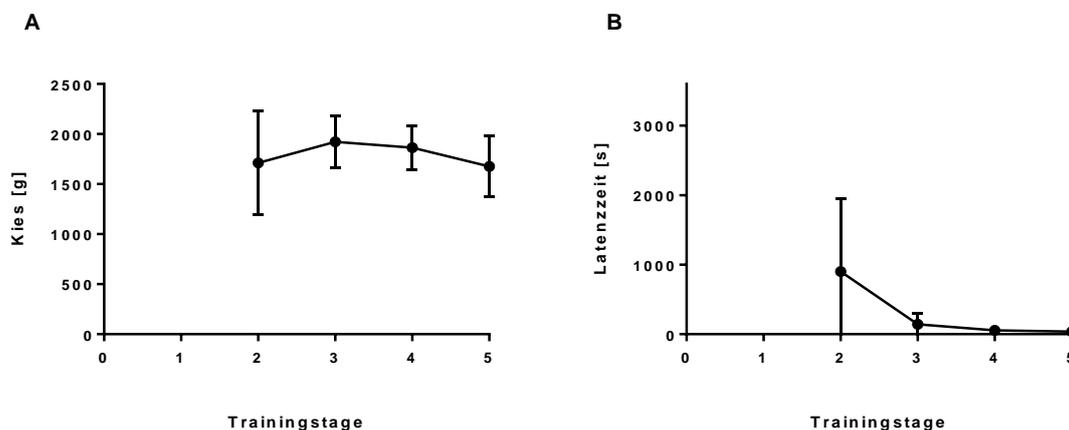


Abbildung 17: Training des Wühlverhaltens von Versuchsreihe 2 (n = 18). (A) Dargestellt ist die Gesamtmenge des Substrats, das aus der Testapparatur befördert wurde und die Latenzzeit, bis zum Einsetzen des zielgerichteten Wühlverhaltens (B). An Tag eins wurde den Tieren ausschließlich eine leere Röhre angeboten, sodass die Tiere sich an die Apparatur gewöhnen konnten. Dargestellt ist der Mittelwert und die SD.

### 2.3.2. Elektrodenimplantation

Die Elektrodenimplantation hatte keinen Einfluss auf das Wühlverhalten der Tiere. Dabei konnte weder bei der Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens (Abbildung 18B) noch bei der Menge an gewühltem Kies (Abbildung 18A) ein signifikanter Unterschied zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt waren in Versuchsreihe 1 eine naive und eine elektrodenimplantierte Gruppe vorhanden. In Versuchsreihe 2 war keine Kontrollgruppe vorhanden, da alle Tiere mit Elektroden und Transmittern implantiert wurden. Deshalb sind die Daten der Versuchsreihe 2 nicht dargestellt.

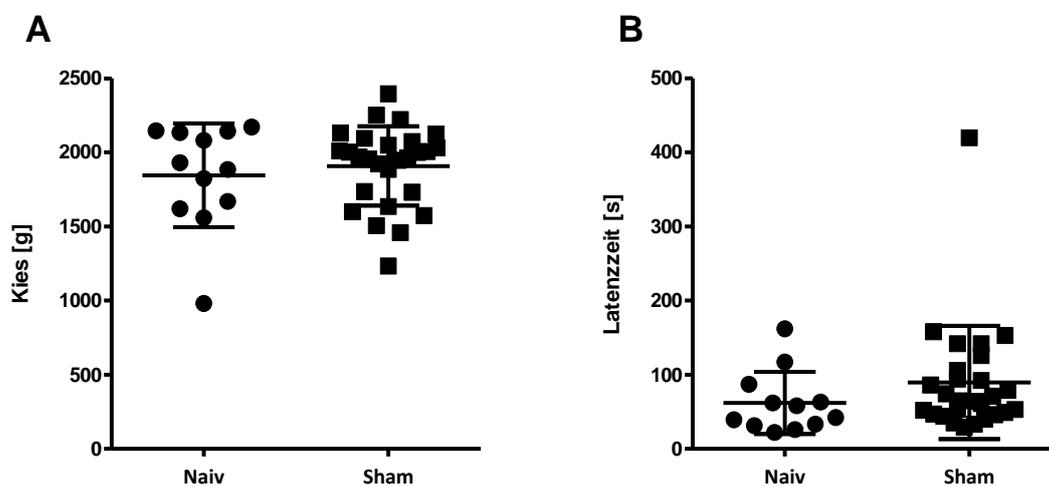


Abbildung 18: Wühlverhalten eine Woche nach der Elektrodenimplantation. Im Rahmen des operativen Eingriffs sind zwei Tiere verstorben. Die Gruppengröße betrug deshalb für die naiven Tiere n = 12 und für die elektrodenimplantierten Tiere n = 30. Weder beim Kies, der aus der Röhre befördert wurde (A), noch bei der Latenzzeit (B) konnte ein signifikanter Unterschied zur naiven Gruppe festgestellt werden. In den Graphen dargestellt sind die Daten der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD.

### 2.3.3. Frühe Post-Insult-Phase

Eine Woche nach dem SE wurde das Wühlverhalten erneut untersucht. In der Versuchsreihe 1 zeigten die Tiere, die einen SE erfuhren ein reduziertes Wühlverhalten (Abbildung 19A, C). Dabei waren beide Messgrößen verändert. Auch in Versuchsreihe 2 zeigten die Tiere nach dem SE eine signifikante Reduktion des Wühlverhaltens. Allerdings war lediglich die Menge des Kieses, der aus der Röhre befördert wurde, reduziert (Abbildung 19B), wohingegen die Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht reduziert war (Abbildung 19D).

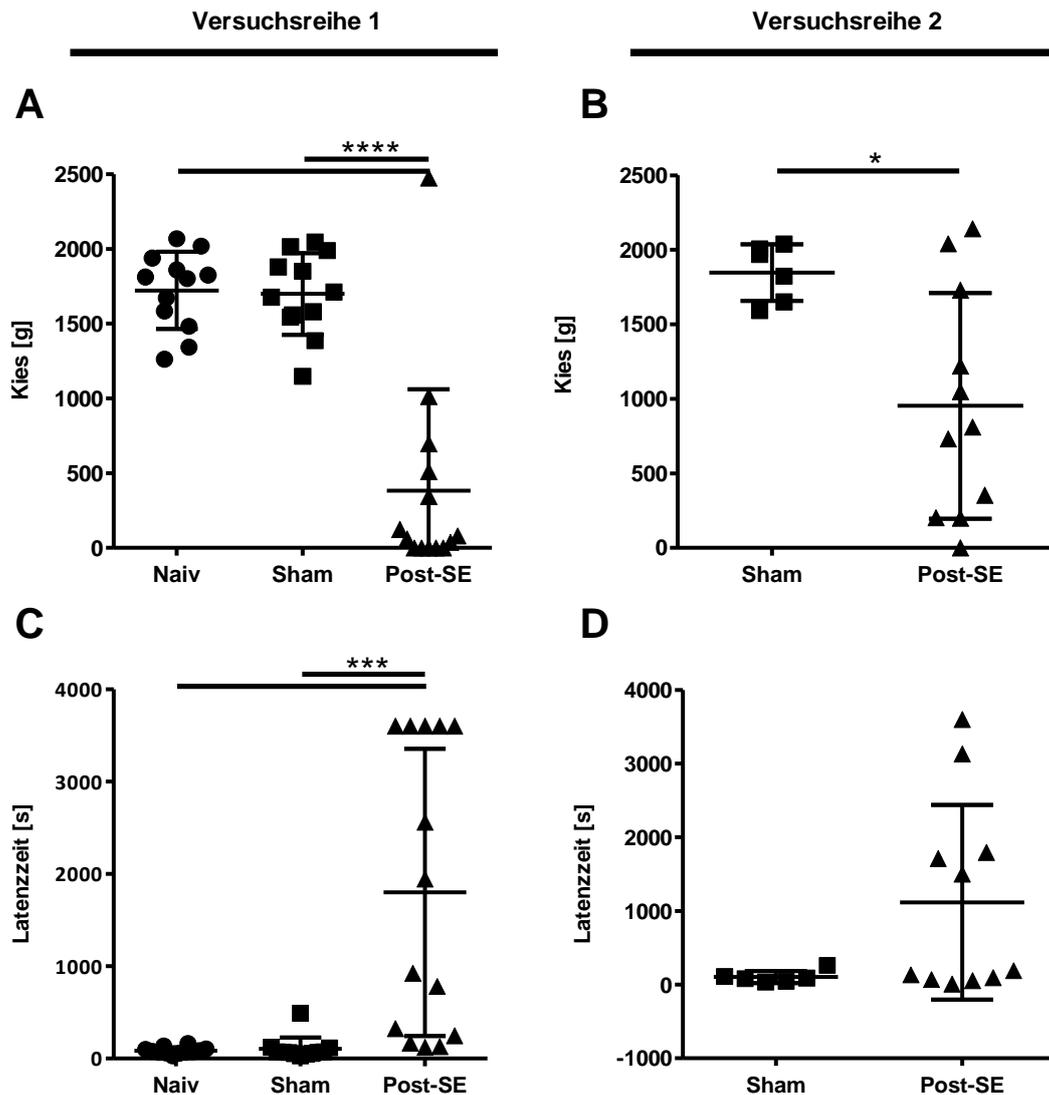


Abbildung 19: Wühlverhalten eine Woche nach der Induktion des SE. Während der frühen Post-Insult-Phase zeigten beide Post-SE-Gruppen eine signifikante Reduktion des Wühlverhaltens bezüglich des aus der Röhre beförderten Kieses (A, B). Das Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens war allerdings ausschließlich in Versuchsreihe 1 reduziert (C). Die Gruppengröße in Versuchsreihe 1 war wie folgt: Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 12$ , Post-SE  $n = 14$ . In Versuchsreihe 2 war die Gruppengröße für die Sham-Gruppe  $n = 6$  und für die Post-SE-Gruppe  $n = 11$ . Diese Gruppengrößen waren in der Latenzphase und in der chronischen Phase für diesen Verhaltenstest konstant. In den Graphen dargestellt sind die Daten der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

#### 2.3.4. Latenzphase

Vier Wochen nach der chemischen Induktion des SE konnte eine signifikante Reduktion des Wühlverhaltens bei Versuchsreihe 1 bezüglich des gewühlten Kieses festgestellt werden (Abbildung 20A). Auch in der Versuchsreihe 2 konnte dieser Effekt beobachtet werden (Abbildung 20B). Das Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens war ausschließlich in Versuchsreihe 1 signifikant erhöht (Abbildung 20C).

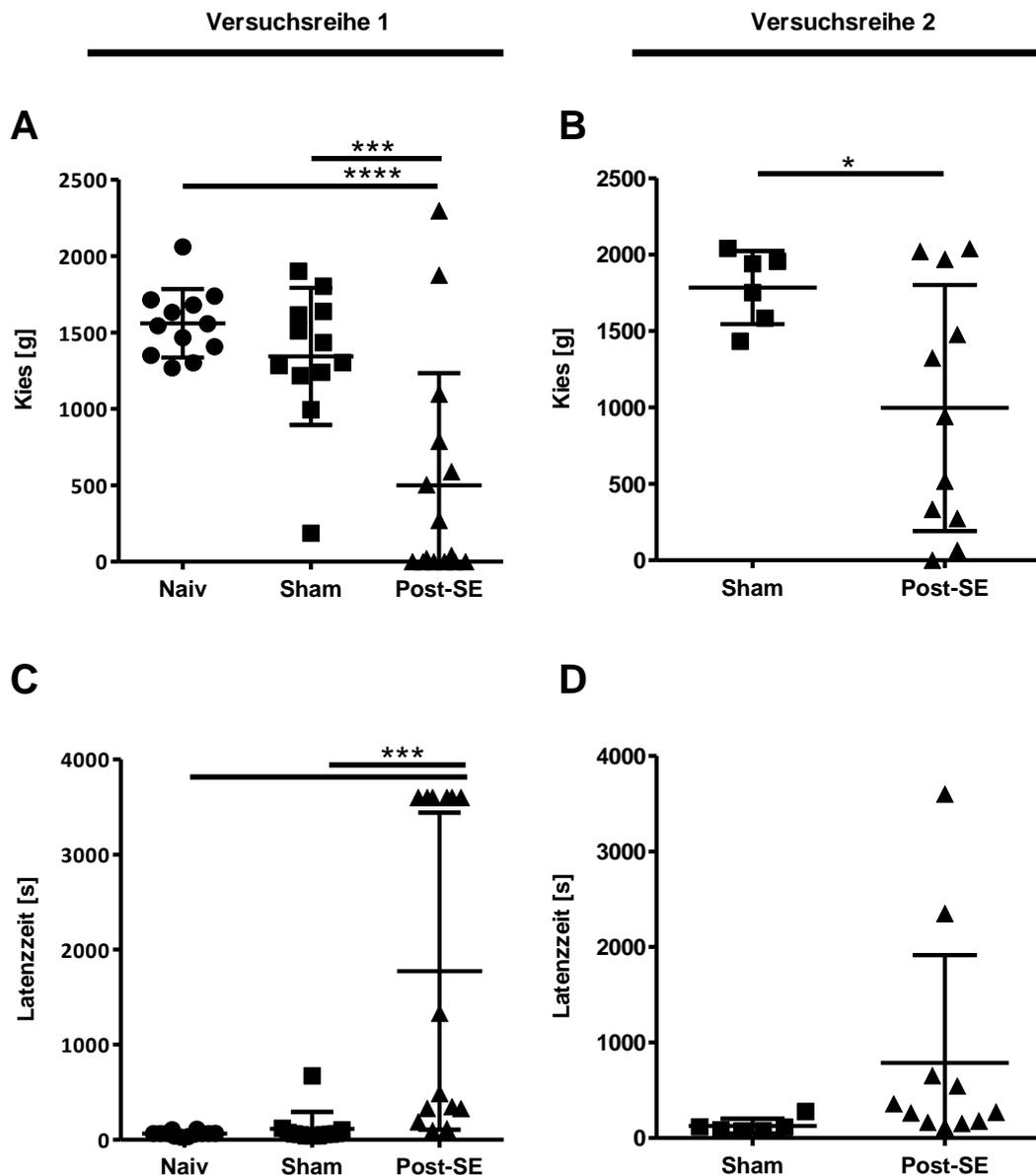


Abbildung 20: Wühlverhalten vier Wochen nach der Induktion des SE. Während der Latenzphase zeigten die Post-SE Gruppen beider Versuchsreihen eine signifikante Reduktion im Wühlverhalten bezüglich des Kiesel, der aus der Röhre befördert wurde (A, B). Das Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens war allerdings ausschließlich in Versuchsreihe 1 erhöht. Die Gruppengröße in Versuchsreihe 1 war wie folgt: Naiv  $n=12$ , Sham  $n=12$ , Post-SE  $n=14$ . In Versuchsreihe 2 war die Gruppengröße für die Sham-Gruppe  $n=6$  und für die Post-SE-Gruppe  $n=11$ . Diese Gruppengrößen waren in der Latenzphase und in der chronischen Phase für diesen Verhaltenstest konstant. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

### 2.3.5. Chronische Phase

Das Wühlverhalten war nicht nur während der Epileptogenese, sondern auch während der chronischen Phase reduziert. Die Tiere aus beiden Versuchsreihen, die einen SE erfuhren, beförderten signifikant weniger Kies aus der Röhre, im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abbildung 21A, B). Bei der Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens konnte, anders als

während der Latenzphase, kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 21C, D). Dieses Ergebnis konnte sowohl in Versuchsreihe 1, als auch in Versuchsreihe 2 festgestellt werden. In dieser Phase konnten somit bei beiden Versuchsreihen das gleiche Ergebnis erzielt werden.

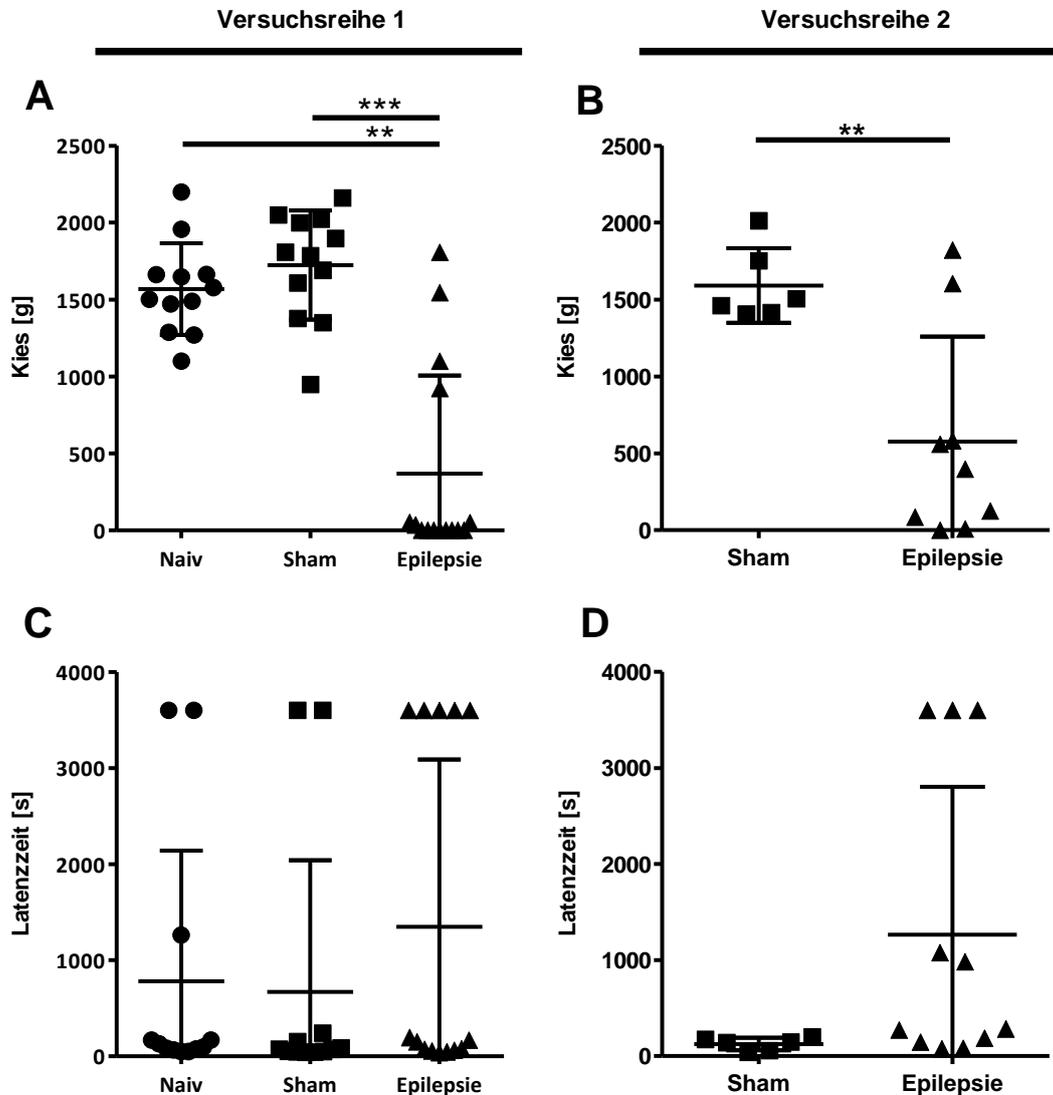


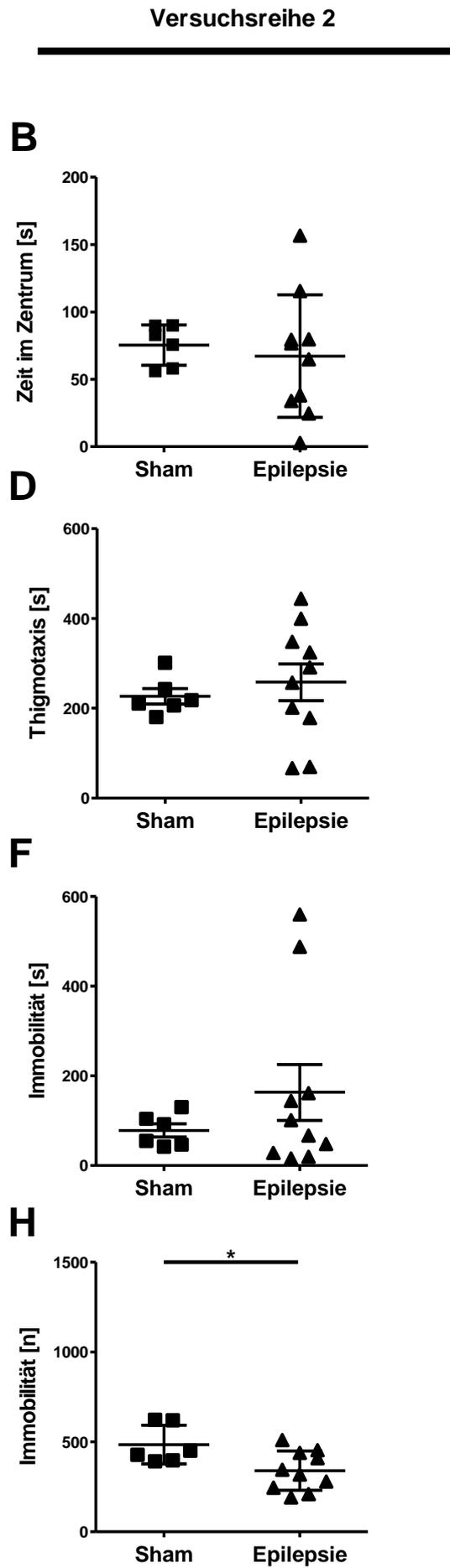
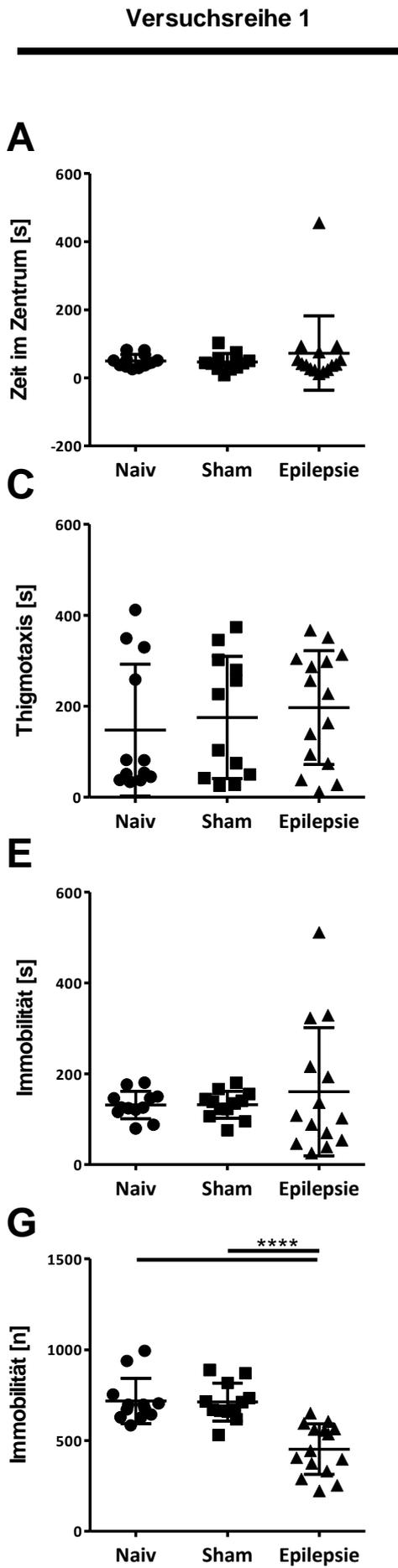
Abbildung 21: Wühlverhalten elf Wochen nach der Induktion des SE. Während dieser Phase konnte bei beiden Epilepsie-Gruppen eine signifikante Reduktion beim Kies, der aus der Röhre befördert wurde, festgestellt werden (A, B). Das Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens war allerdings in beiden Versuchsreihen unverändert im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

## 2.4. Lokomotion

Die Durchführung des Open-Field-Tests diente dazu, die Lokomotion der Tiere untersuchen zu können. Der Test wurde einmalig, in der chronischen Phase, durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter untersucht: die durchschnittliche Geschwindigkeit, die gelaufene

---

Strecke, die Frequenz des *Rearings*, die Immobilität und die Zeit in den verschiedenen Zonen des Open-Fields (Zentrum, Wandbereich). Dabei konnte in beiden Versuchsreihen ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des Verharrens in Immobilität beobachtet werden (Abbildung 22G, H). Die epileptischen Tiere waren weniger immobil, im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis konnte auch in der Versuchsreihe 2 festgestellt werden. Bei den anderen untersuchten Parametern konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen beobachtet werden. Die Dauer eines Testdurchlaufs betrug zehn Minuten.



Versuchsreihe 1

Versuchsreihe 2

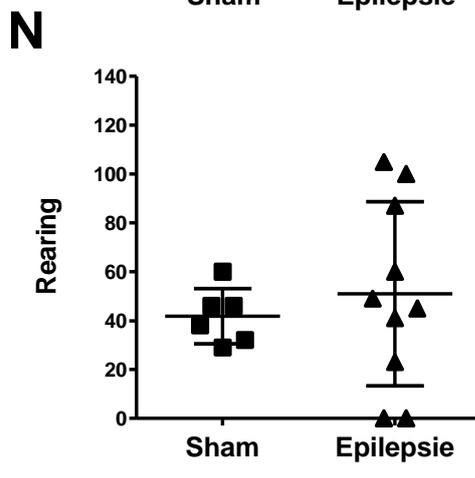
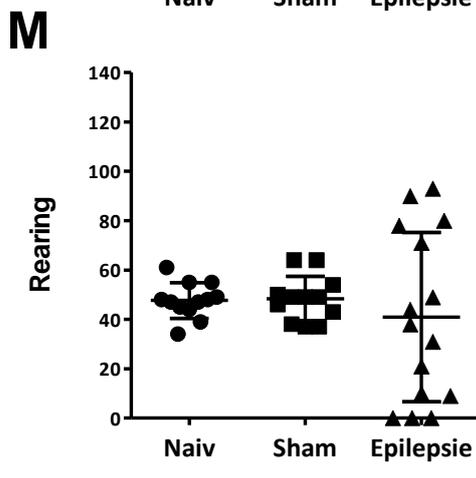
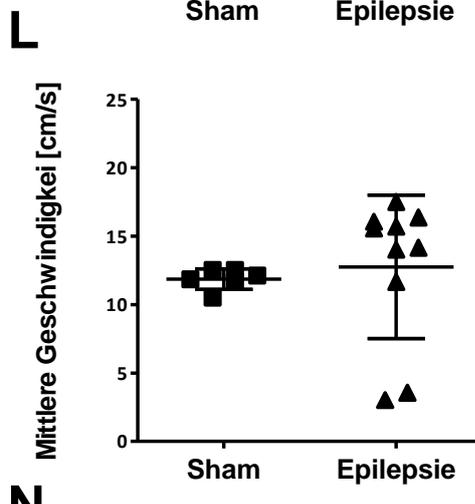
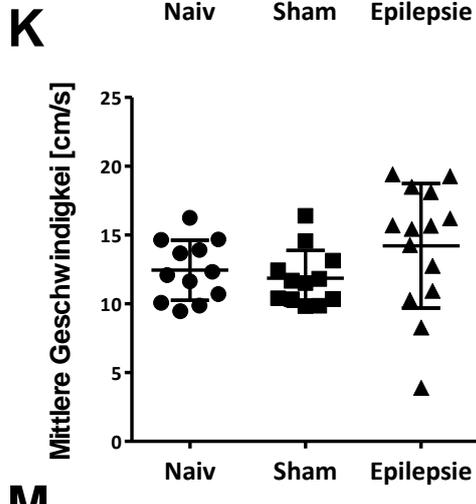
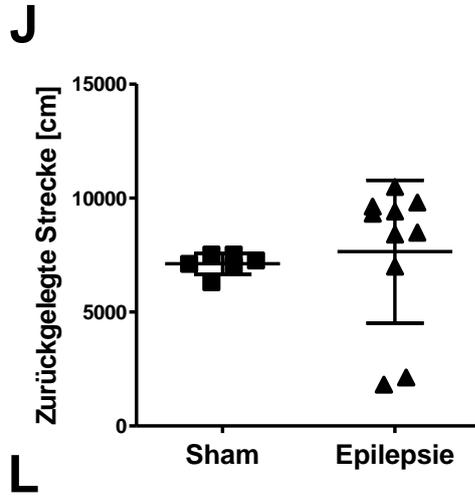
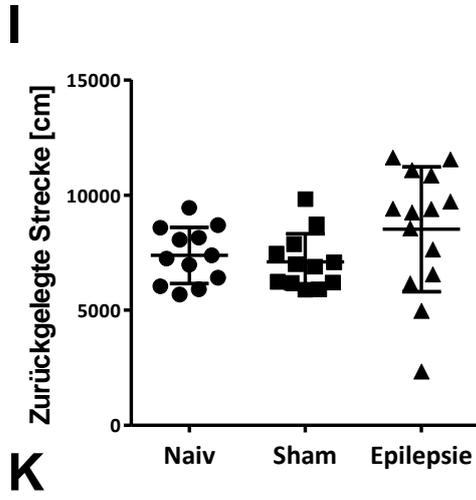


Abbildung 22: Lokomotorische Aktivität während der chronischen Phase im Open-Field. Sowohl die Tiere der Versuchsreihe 1, als auch die Tiere der Versuchsreihe 2 zeigten ausschließlich in der Häufigkeit der immobilen Sequenzen eine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollgruppen (G, H). Die Tiere mit spontanen Anfällen zeigten eine Reduktion dieser immobilen Episoden. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

Die lokomotorische Aktivität im Heimkäfig wurde mittels der telemetrischen Aufzeichnung ermittelt (Abbildung 23). Somit existieren für diesen Parameter ausschließlich für die Versuchsreihe 2 die entsprechenden Daten. Es wurden insgesamt vier telemetrische Messungen im Heimkäfig durchgeführt. Die Zeitpunkte umfassten eine Baseline, die frühe Post-Insult-Phase, die Latenzphase und die chronische Phase. Dabei zeigten die Tiere während allen Phasen eine erhöhte Aktivität während der Dunkelphase. In der Latenzphase hingegen konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden.

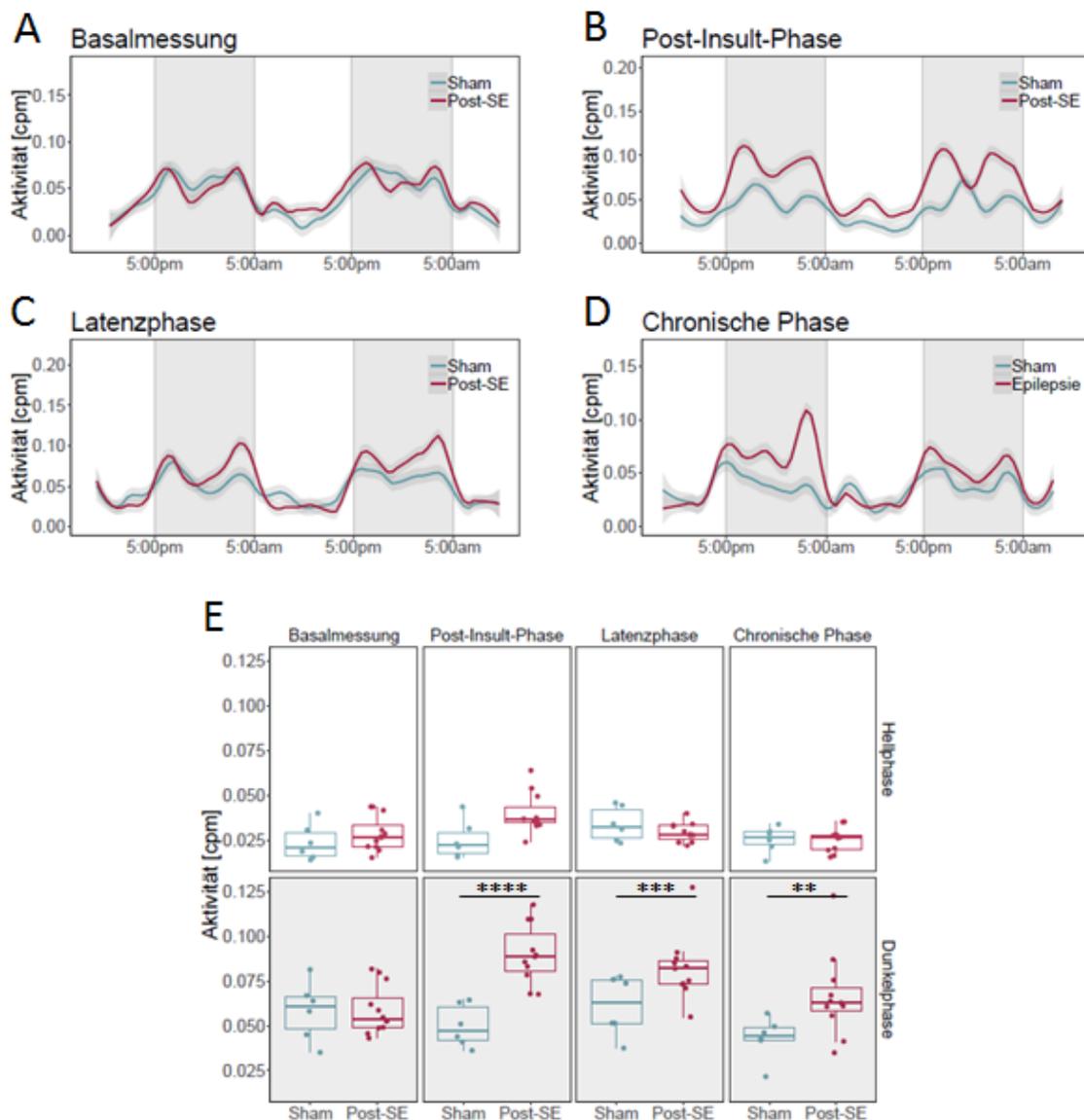


Abbildung 23: Aktivität im Heimkäfig. Die Untersuchung fand vor der Induktion des SE (A, Baseline), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), in der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE) statt. Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LO-ESS-Regression. Die grau-unterlegten Flächen stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge 1,5 x IQR. (A-D) Im Graphen dargestellt ist die telemetrisch ermittelte Aktivität der Tiere im Heimkäfig während drei aufeinanderfolgender Hell- und zwei Dunkelphasen. Sowohl in der frühen Post-Insult-Phase (B), als auch in der Latenzphase (C) und der chronischen Phase (D) konnte eine erhöhte Aktivität während des zwölfstündigen Dunkelzyklus im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Die Gruppengröße betrug  $n = 6$  für die Sham-Gruppe und  $n = 11 - 12$  für die Post-SE- beziehungsweise für die Epilepsie-Gruppe. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

## 2.5. Angstassoziiertes Verhalten

Das angstassoziierte Verhalten wurde mittels des Elevated-Plus-Maze und der Black-White-Box untersucht. Im Elevated-Plus-Maze wurden Daten zu folgenden Parametern erhoben: die zurückgelegte Strecke, die Zeit in den verschiedenen Zonen (geschlossener Arm, offener Arm), die *Head Dips* und die *Stretching Postures*. Im Vergleich zu der naiven Gruppe zeigte die epileptische Gruppe signifikant weniger *Headdips* (Abbildung 24A). Dieser Effekt konnte allerdings ausschließlich in Versuchsreihe 1 beobachtet werden. Abgesehen von diesem Parameter konnten keine weiteren Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. In der Black-White-Box konnte eine signifikante Reduktion der *Stretching Postures* bei den epileptischen Tieren beobachtet werden. In Versuchsreihe 1 konnte dieser Unterschied gegenüber der naiven und elektrodenimplantierten Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 25C). Die epileptischen Tiere in der Versuchsreihe 2 zeigten ebenfalls eine Reduktion in den *Stretching Postures* im Vergleich zur Sham-Gruppe (Abbildung 25D).

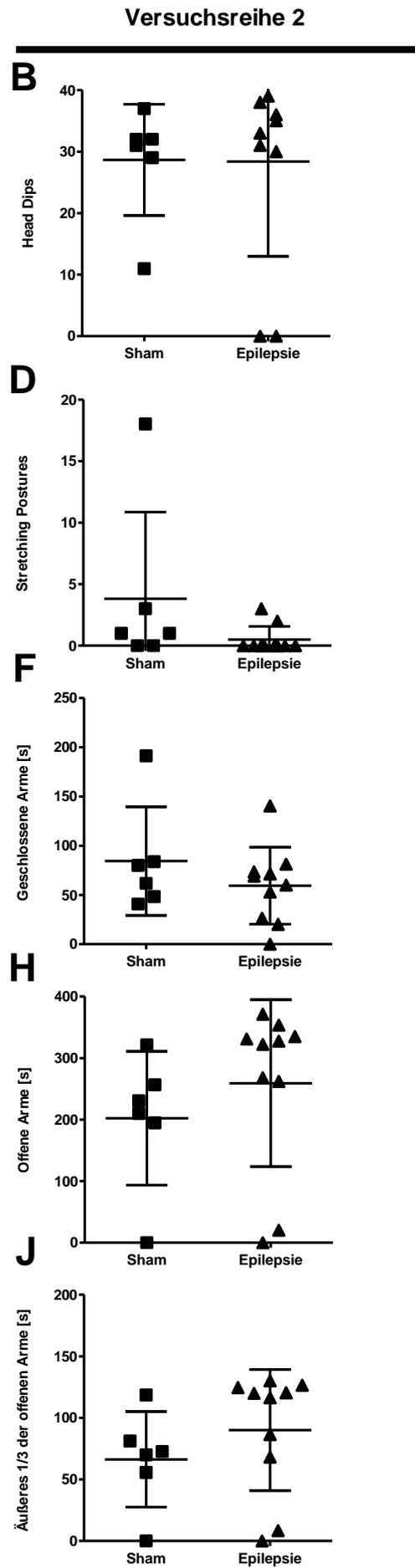
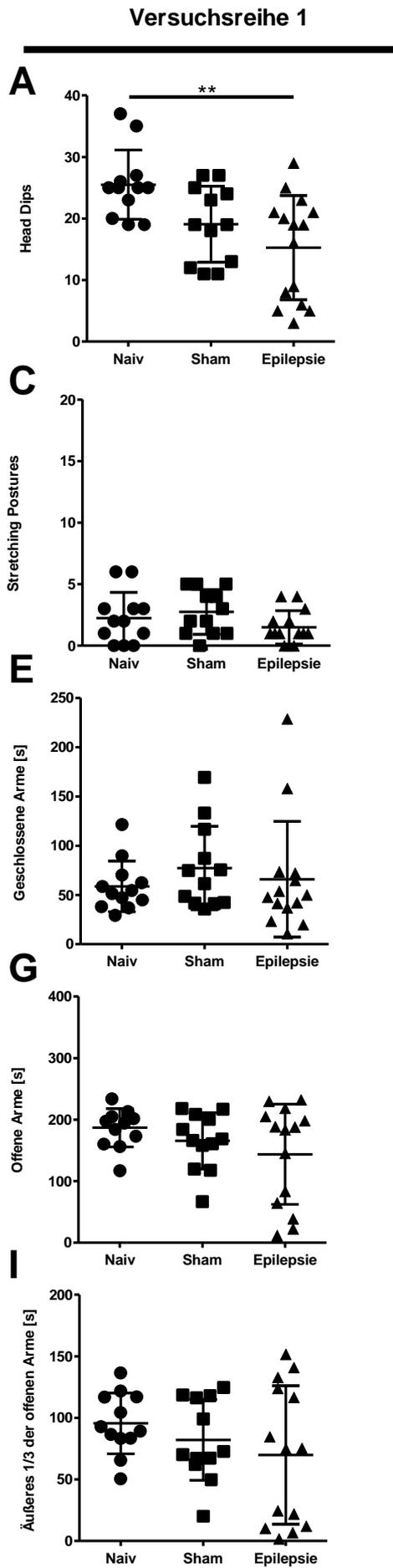
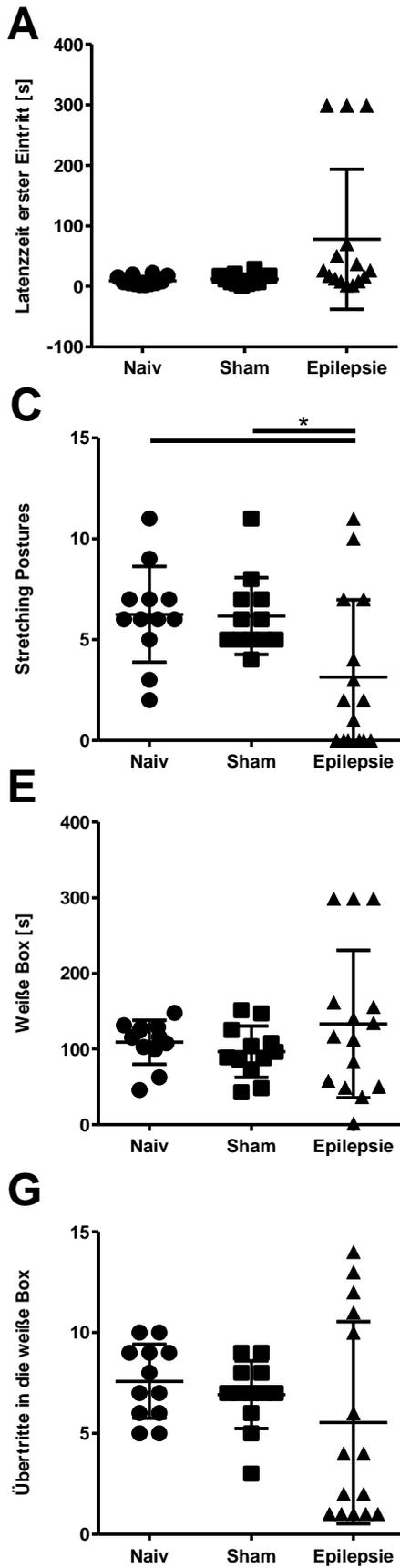


Abbildung 24: Angstassoziiertes Verhalten im Elevated-Plus-Maze. Bei den epileptischen Tieren aus Versuchsreihe 1 konnte eine signifikante Reduktion der *Head Dips* im Elevated-Plus-Maze festgestellt werden (A). In den anderen untersuchten Parametern konnte keine Abweichung des Verhaltens der epileptischen Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet werden (B-J). In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

Versuchsreihe 1



Versuchsreihe 2

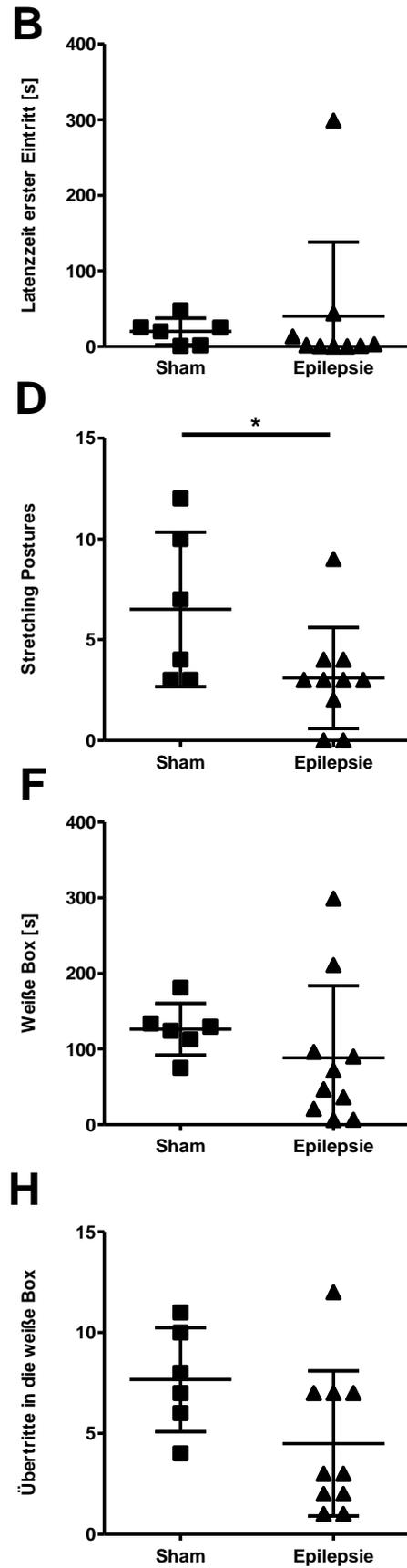


Abbildung 25: Angstassoziiertes Verhalten in der Black-White-Box. Zusätzlich zum Elevated-Plus-Maze wurde das angstassoziierte Verhalten mittels der Black-White-Box untersucht. Dabei zeigten die Tiere der Versuchsreihe 1, die einen SE erfuhren eine signifikante Reduktion des *Stretching*-Verhaltens im Vergleich zu den naiven Tieren und der Sham-Gruppe (C). In Versuchsreihe 2 konnte in diesem Parameter ebenfalls eine Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (D). Die Daten zu den anderen ermittelten Parametern ergaben keine signifikanten Veränderungen (A, B, E-H). In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

## 2.6. Anhedonie-ähnliches Verhalten

Das anhedonie-ähnliche Verhalten wurde mittels des Saccharin-Präferenz-Tests untersucht. Dieser Tests wurde ausschließlich in der chronischen Phase durchgeführt. Dieser Test war der letzte durchgeführten Verhaltenstest vor dem Projektende. Im Rahmen der Untersuchung hatten die Tiere die Option zu entscheiden, ob sie die Saccharinlösung gegenüber dem herkömmlichen Leitungswasser vorziehen. Um den Einfluss der Seitenpräferenz der genutzten Trinkflasche auszuschließen, wurde am zweiten Tag die Saccharinlösung links und am vierten Tag rechts in der Futterraufe angebracht. Die Tiere aus Versuchsreihe 1 (kabelgebundene EEG-Aufzeichnung), die spontane Anfälle zeigten, konsumierten signifikant weniger gesüßte Lösung, im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 26A). Dieses Ergebnis konnte allerdings in der Versuchsreihe 2 (telemetrische EEG-Aufzeichnung) nicht reproduziert werden (Abbildung 26B).

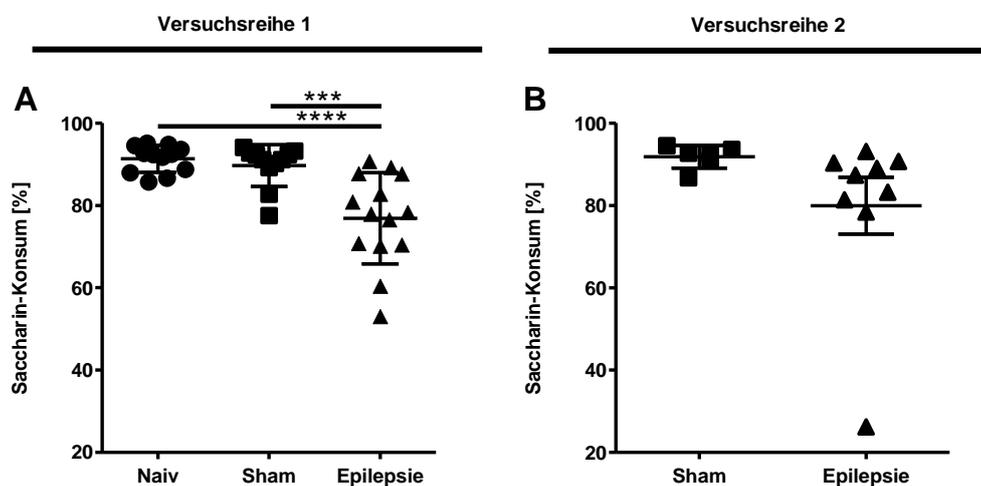


Abbildung 26: Saccharin-Präferenz-Test. Das anhedonie-ähnliche Verhalten wurde mittels des Saccharin-Präferenz-Tests untersucht. Dabei konnten die Tiere entscheiden, ob sie das herkömmliche Leitungswasser oder die Saccharinlösung bevorzugen. Dargestellt ist der prozentuale Saccharinkonsum in Bezug auf die gesamte Flüssigkeitsaufnahme am zweiten und vierten Tag des Tests. In Versuchsreihe 1 konnte eine signifikante Reduktion des Saccharinkonsums im Vergleich zu den naiven Tieren und zur Sham-Gruppe beobachtet werden (A). Dieser Effekt konnte in Versuchsreihe 2 nicht reproduziert werden. In Versuchsreihe 1 bestand die naive Gruppe aus  $n = 12$ , die Sham-Gruppe aus  $n = 12$  und die Epilepsie-Gruppe aus  $n = 14$  Tieren. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

## 2.7. Rat-Grimace-Scale und Irwin-Score

Der RGS dient dazu, akute Schmerzen erkennen zu können. Dabei wurde er intensiv in den Tagen nach der Operation und nach dem SE beurteilt. Der modifizierte Irwin-Score wurde in der Phase nach dem SE täglich angewendet. Im weiteren Verlauf der Studie wurde das Scoring einmal wöchentlich durchgeführt.

### 2.7.1. Elektrodenimplantation

In der postoperativen Phase zeigten sowohl die Tiere der Versuchsreihe 1 (Abbildung 27A), als auch die Tiere der Versuchsreihe 2 (Abbildung 27B) einen erhöhten Summenscore für den RGS. Dadurch, dass aufgrund der Elektrodenimplantation kein verblindetes Scoring durchgeführt werden konnte, wurde ein Basalwert des RGS aus der Literatur verwendet (SOTOCINAL et al. 2011). Die Tiere aus der Versuchsreihe 1 zeigten nach vier Tagen wieder einen RGS, der dem des basalen Wertes gleich (Abbildung 27A). In Versuchsreihe 2 erreichten der RGS erst nach sechs Tagen wieder einen Summenscore, der dem des Basalwertes gleich (Abbildung 27B).

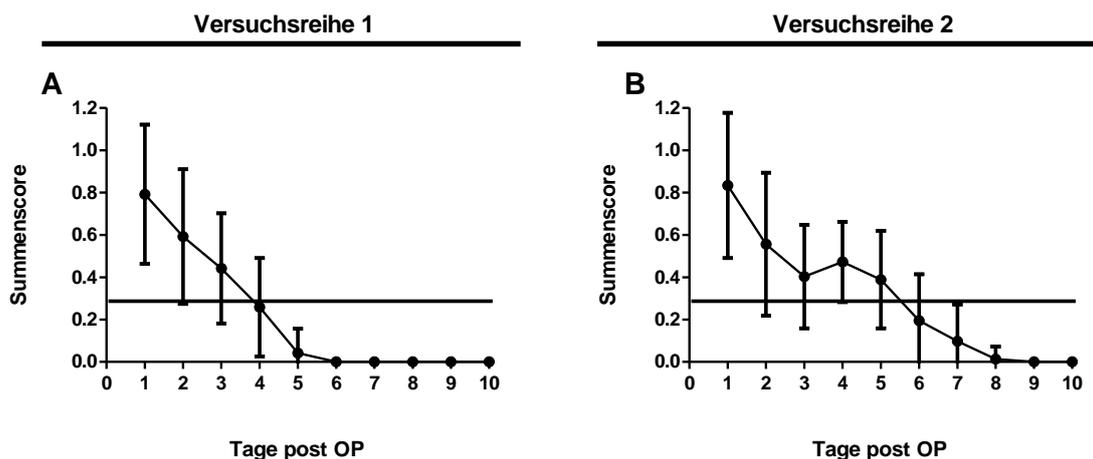


Abbildung 27: Postoperativer RGS. Dargestellt ist der postoperative Summenscore der implantierten Tiere bis zehn Tage post OP. Der Summenscore wurde anhand der Mimik der Tiere ermittelt. Er beinhaltet die Stellung der Ohren, die Augenöffnung, die Stellung der Tasthaare und die Nasenrücken- beziehungsweise Wangenform. Dabei wurde zwischen nicht vorhanden (Summenscore 0), moderat vorhanden (Summenscore 0,25) und deutlich vorhanden (Summenscore 0,5) differenziert. Während die Tiere der Versuchsreihe 1 nach vier Tagen wieder Basalwerte erreichten (A), konnten erst nach sechs Tagen bei Versuchsreihe 2 wieder Basalwerte beobachtet werden. In Versuchsreihe 1 bestand die elektrodenimplantierte Gruppe aus  $n = 30$ . In Versuchsreihe 2 war die Gruppengröße  $n = 18$  für die implantierte Gruppe. In den Graphen dargestellt sind die einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. Außerdem ist der Basalwert in Analogie zur Studie von SOTOCINAL et al. (2011) mit einem Wert von 0,288 dargestellt.

### 2.7.2. Frühe Post-Insult-Phase und chronische Phase

In der frühen Post-Insult-Phase konnte in Versuchsreihe 1 eine Erhöhung des RGS über die Basalwerte von bis zu drei Tagen nach dem initialen SE beobachtet werden (Abbildung

28A). In Versuchsreihe 2 dauerte dieser Effekt hingegen nur bis zu zwei Tage nach dem SE an (Abbildung 28B). Vereinzelt konnte in der chronischen Phase ein Summenwert für den RGS erzielt werden. Die Werte des Irwin-Scores waren ebenfalls initial nach dem SE in beiden Versuchsreihen erhöht. Nach einigen Tagen reduzierte sich der Summenscore und blieb bis zum Versuchsende mit einem Mittelwert von ca. zwei bis vier erhalten. Die Parameter, die zu einer Erhöhung des Irwin-Scores führten waren folgende: lokomotorische Aktivität, Berührungsreaktion, Schwanzhöhe, Schreckhaftigkeit und der Körpertonus.

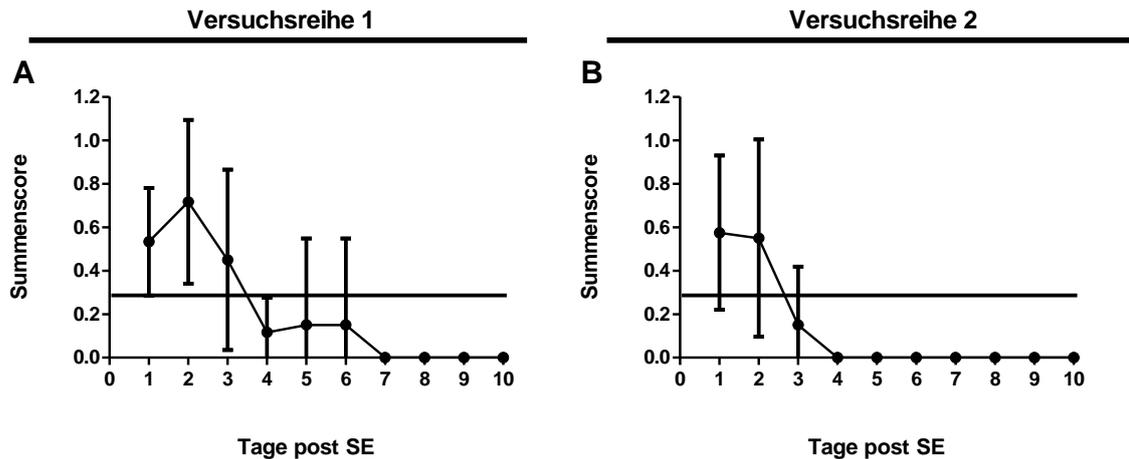


Abbildung 28: RGS über zehn Tage nach der SE-Induktion. Sowohl bei den Tieren der Versuchsreihe 1 (A, n = 14), als auch bei den Tieren der Versuchsreihe 2 (B, n = 11) konnte ein erhöhter Summenscore für den RGS nach der SE-Induktion festgestellt werden. Bei den transmitterimplantierten Tieren erreichte der Summenscore am dritten Tag nach dem SE wieder Basalwerte (B), während bei den ausschließlich elektrodenimplantierten Tieren am vierten Tag wieder Basalwerte erreicht wurden (A). In den Graphen dargestellt sind der Mittelwert und die SD. Außerdem ist der Basalwert (0,288) dargestellt.

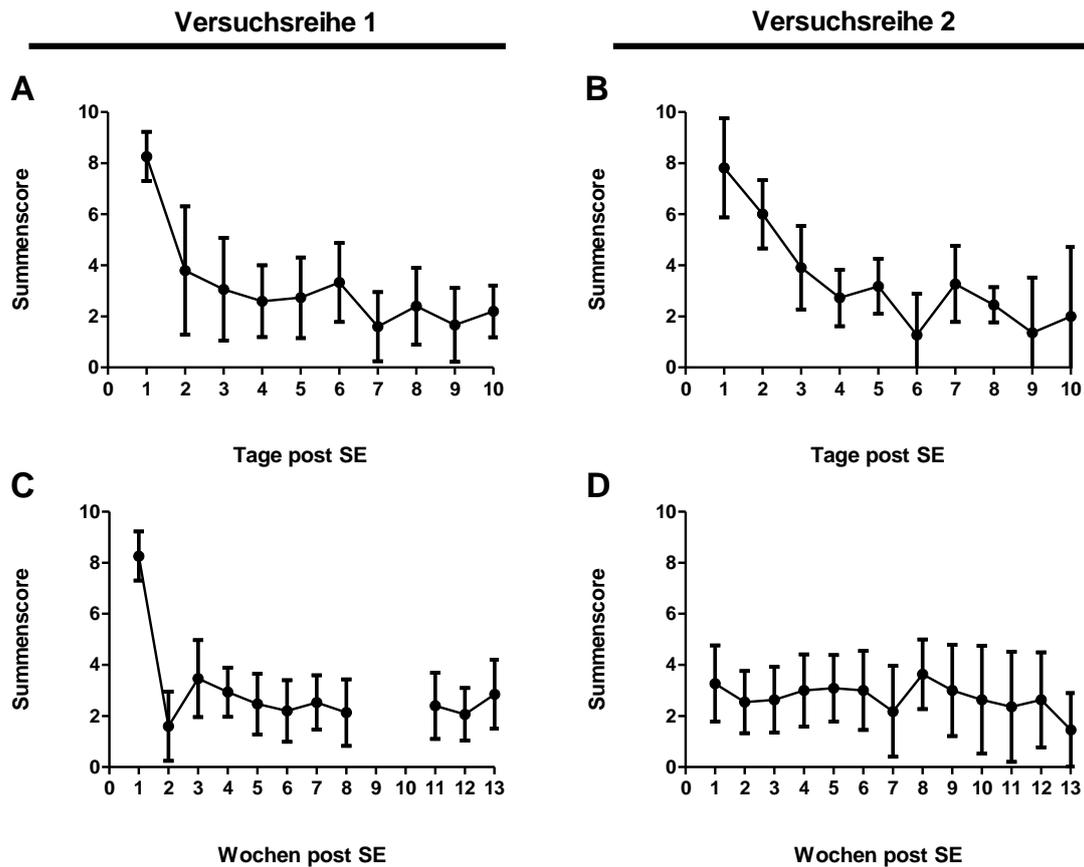


Abbildung 29: Irwin-Score. Der Irwin-Score wurde in den ersten zehn Tagen nach dem SE täglich beurteilt (A, B). Im Anschluss erfolgte die Beurteilung einmal wöchentlich bis zum Versuchsende (C, D). Dabei konnte bei den Tieren während der Kabelableitung keine Beurteilung des Irwin-Score durchgeführt werden (C). Dies ist im Graphen der Versuchsreihe 1 durch eine entsprechende zweiwöchige Lücke gekennzeichnet. Der Summenscore war initial nach dem SE erhöht (A, B). In den Tagen (A, B) und Wochen (C, D) nach dem SE erreichte er relativ konstante Werte, die bis zum Versuchsende anhielten. Die Gruppengröße für Versuchsreihe 1 betrug  $n = 14$  und für Versuchsreihe 2  $n = 11$ . In den Graphen dargestellt sind der Mittelwert und die SD.

### 3. Biochemische Parameter

Die biochemischen Parameter, die in dieser Studie untersucht wurden, waren BDNF, CK und Corticosteron beziehungsweise dessen Metaboliten. Die Serumproben, die das Probenmedium zur Bestimmung des BDNF, der CK und des Corticosterons waren, wurden am Tag vor der Perfusion mittels einer retrobulbären Blutentnahme entnommen. Corticosteron beziehungsweise dessen Metaboliten wurde in drei verschiedenen Probenmedien bestimmt: im Serum, im Kot (FCM) und in den Haaren. Die Serumproben wurden gemeinsam mit den Proben für die BDNF- und CK-Bestimmung entnommen. Die Haarproben wurden am Tag der Perfusion entnommen. Die Kotproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt: vor der Operation, zwei Tage, sieben Tage, vier Wochen und dreizehn Wochen nach dem SE. Die Proben wurden zwischen 8:00 und 12:00 Uhr gesammelt, um tageszeitliche Schwankungen vor allem in den Serumproben zu vermeiden.

### 3.1. Corticosteron im Haar

Die Analyse der Haare erfolgte ausschließlich bei der naiven und epileptischen Gruppe der Versuchsreihe 1 (kabelgebundene EEG-Ableitung). Erst beim Erreichen eines signifikanten Unterschieds zwischen den Werten dieser beiden Gruppen, wäre eine Analyse der elektroimplantierten Gruppe und der Versuchsreihe 2 indiziert gewesen. Da zwischen den naiven und epileptischen Tieren allerdings kein signifikanter Unterschied in der Corticosteronkonzentration im Haar nachweisbar war (Abbildung 30), wurde die weitere Analyse eingestellt.

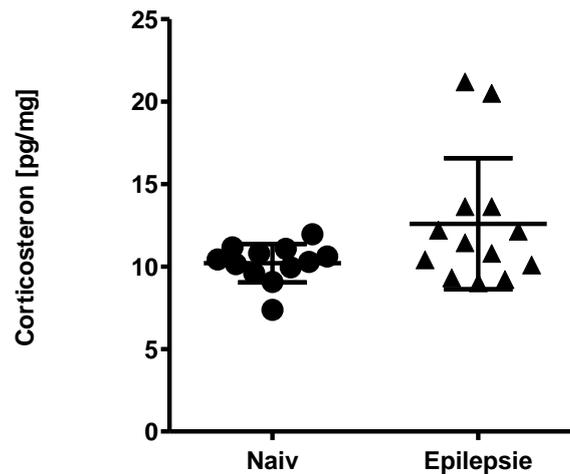


Abbildung 30: Corticosteronkonzentration im Haar. Am Tag der Euthanasie wurden Haarproben gesammelt, um die Corticosteronkonzentration bestimmen zu können. Dabei wurde das Haar gesammelt, das nach der Operation nachgewachsen war. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur naiven Gruppe festgestellt werden. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Naiv  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 13$ . Im Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD.

### 3.2. Corticosteron im Serum

In Versuchsreihe 1 (kabelgebundene Ableitung) konnte eine signifikante Reduktion des Corticosterongehalts im Serum im Vergleich zur naiven Gruppe festgestellt werden (Abbildung 31A). In Versuchsreihe 2 konnte dieser Effekt allerdings nicht beobachtet werden (Abbildung 31B).

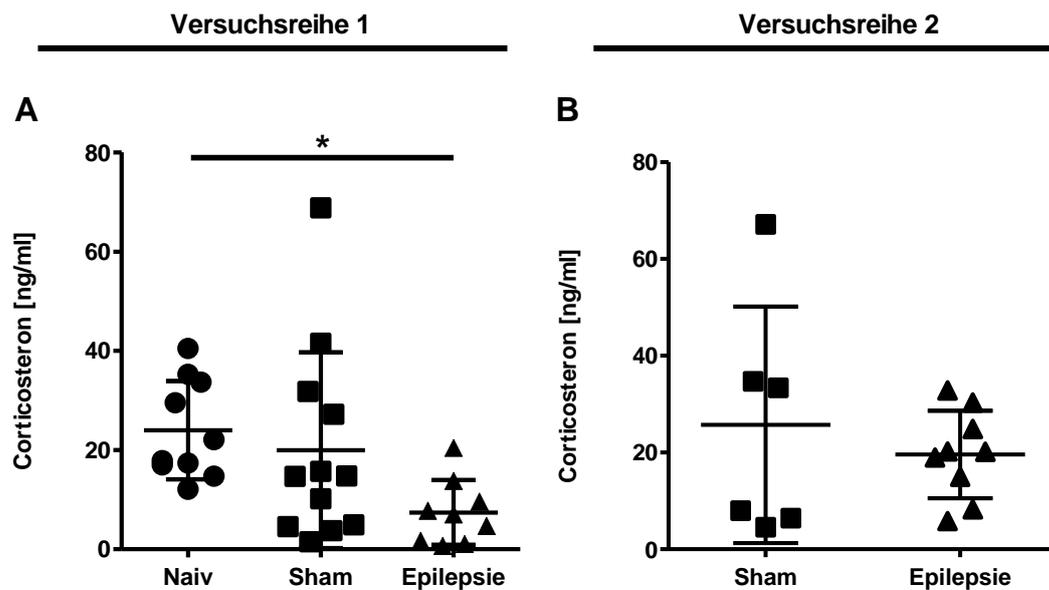


Abbildung 31: Corticosteronkonzentration im Serum. Am Tag vor der Euthanasie wurden Serumproben gesammelt, um biochemische Parameter bestimmen zu können. Dabei konnte eine signifikante Erhöhung der Corticosteron-Konzentration im Serum der naiven Tiere im Vergleich zur Epilepsie-Gruppe festgestellt werden (A). Dieser Effekt konnte in der Versuchsreihe 2 nicht beobachtet werden (B). Die Gruppengrößen der Versuchsreihe 1 waren wie folgt: Naiv  $n = 9$ , Sham  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 9$ . Für Versuchsreihe 2 betragen die Gruppengrößen für die Sham-Gruppe  $n = 6$  und für die Epilepsie-Gruppe  $n = 9$ . Im Rahmen der Corticosteronbestimmung lagen vor allem Tiere der Epilepsie-Gruppe unter der Nachweisgrenze. Diese Tiere wurden in der Analyse nicht berücksichtigt. Da im Serum der Tiere mit spontanen Anfällen allerdings eine signifikante Reduktion bezüglich des Corticosterongehaltes nachgewiesen werden konnte, würde auch unter Berücksichtigung der exkludierten Tiere das Ergebnis vergleichbar ausfallen. In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

### 3.3. Corticosteronmetaboliten im Kot

In Versuchsreihe 1 konnte zwei Tage nach dem SE und am Versuchsende eine signifikante Erhöhung der FCM im Vergleich zur naiven und elektrodenimplantierten Gruppe festgestellt werden (Abbildung 32A, G). In Versuchsreihe 2 hingegen konnte ausschließlich sieben Tage nach der Statusinduktion eine signifikante Erhöhung des FCM im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 32D). Somit wichen die Zeitpunkte der erhöhten FCM-Konzentration zwischen beiden Versuchsreihen voneinander ab.

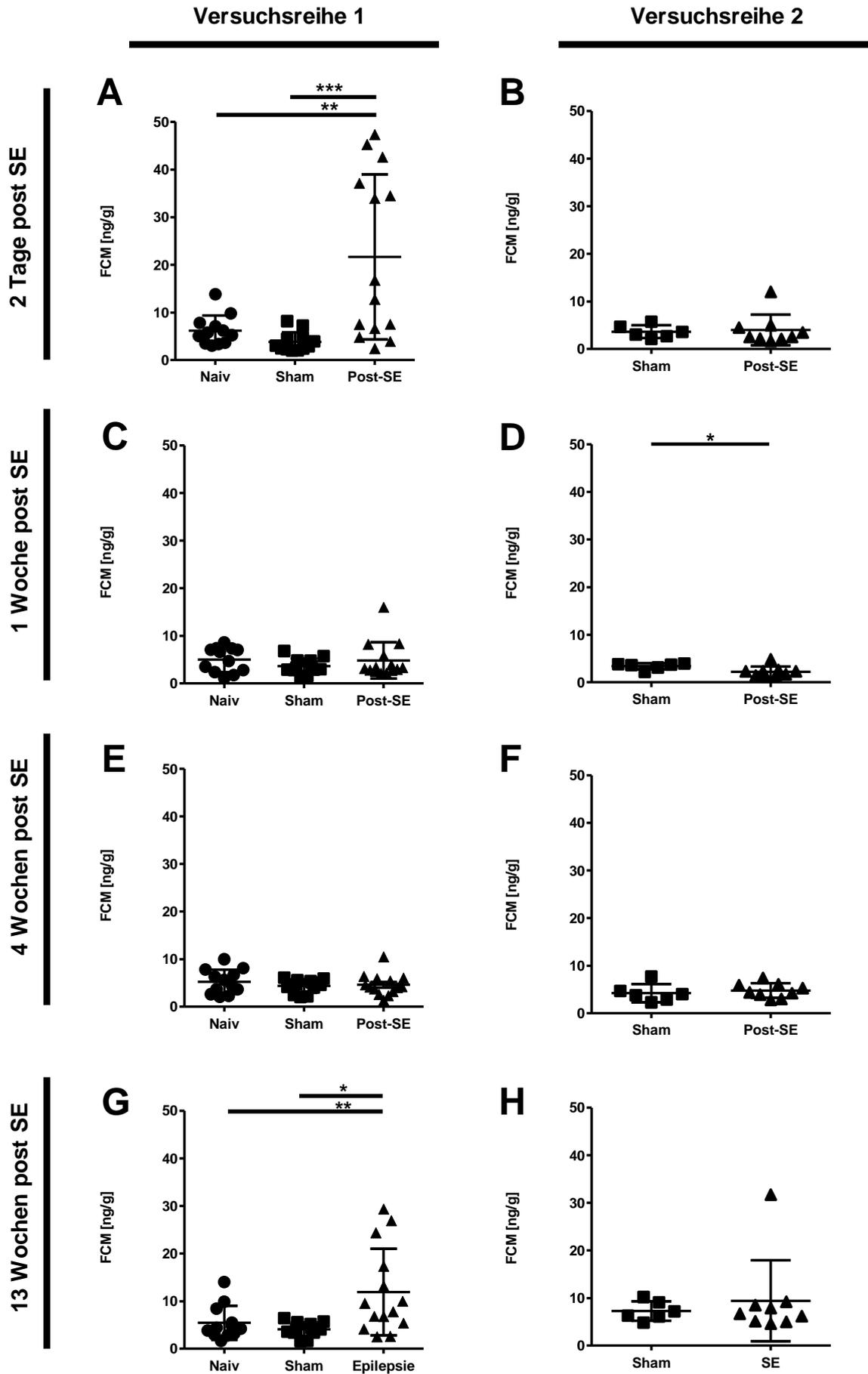


Abbildung 32: FCM. Dargestellt ist die Konzentration der FCM zwei Tage, eine, vier und dreizehn Wochen nach dem initialen SE in Versuchsreihe 1 (A, C, E, G) und in Versuchsreihe 2 (B, D, F, H). In Versuchsreihe 1 konnte sowohl zwei Tage (A), als auch 13 Wochen (G) nach der SE-Induktion eine signifikante Erhöhung der FCM-Konzentration festgestellt werden. In Versuchsreihe 2 konnte ausschließlich eine Woche nach dem SE eine signifikante Erhöhung der FCM im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden (D). Die Gruppengrößen der Versuchsreihe 1 waren wie folgt: Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 13-14$ . Für Versuchsreihe 2 betragen die Gruppengrößen für die Sham-Gruppe  $n = 6$  und für die Epilepsie-Gruppe  $n = 9-11$ . In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

### 3.4. Brain-Derived-Neurotrophic-Factor

Die Auswertung der BDNF-Konzentration im Serum ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Dieses Ergebnis konnte sowohl in Versuchsreihe 1 (kabelgebundene EEG-Aufzeichnung, Abbildung 33A) als auch in Versuchsreihe 2 (telemetrische EEG-Aufzeichnung, Abbildung 33B) beobachtet werden.

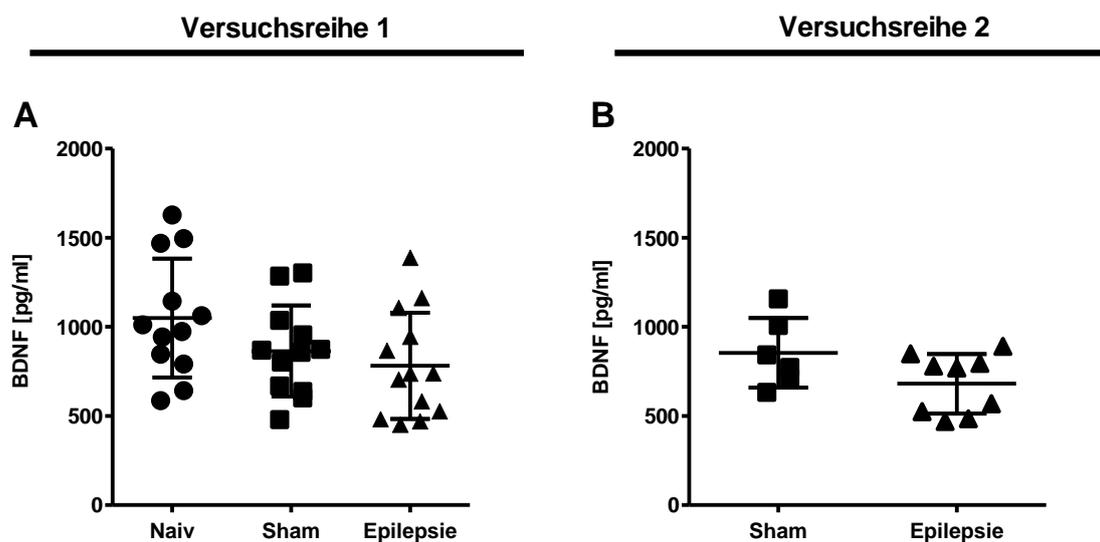


Abbildung 33: BDNF-Konzentration im Serum. Die Analyse hat keinen signifikanten Unterschied der BDNF-Serumkonzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergeben. Die Gruppengrößen der Versuchsreihe 1 waren wie folgt: Naiv  $n = 12$ , Sham  $n = 12$  und Epilepsie  $n = 13$ . Für Versuchsreihe 2 betragen die Gruppengrößen für die Sham-Gruppe  $n = 6$  und für die Epilepsie-Gruppe  $n = 9$ . In den Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD.

### 3.5. Creatinkinase

Die CK wurde ähnlich dem Corticosteron im Haar ausschließlich in der Versuchsreihe 1 untersucht. Allerdings wurde die Analyse bei diesem Parameter für die Proben von allen drei Gruppen eingeleitet. Erst beim Erreichen des Signifikanzniveaus wäre die Analyse auch für die Proben der Versuchsreihe 2 angezeigt gewesen. Da in Versuchsreihe 1 allerdings kein signifikanter Unterschied der CK-Konzentration zwischen den Gruppen

festgestellt werden konnte (Abbildung 34), wurde die weitere Analyse nicht durchgeführt.

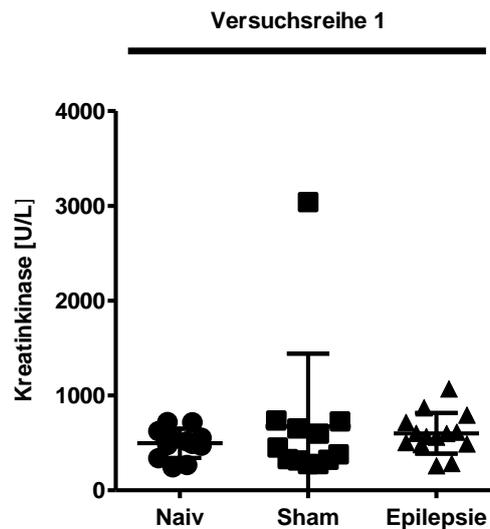


Abbildung 34: CK-Konzentration im Serum. Die entsprechenden Serumproben wurden mittels der retrobulbären Blutentnahme am Tag vor der Perfusion gesammelt. Die Ergebnisse der Analyse zeigen keinen signifikanten Unterschied der CK-Konzentration zwischen den Gruppen. Die Gruppengrößen der Versuchsreihe 1 waren wie folgt: Naiv n = 12, Sham n = 12 und Epilepsie n = 13. Im Graphen dargestellt sind die Werte der einzelnen Tiere, der Mittelwert und die SD.

## 4. (Patho-)physiologische Parameter

### 4.1. Sexualzyklus

Der Zyklusstand der Tiere wurde am Versuchsende mittels einer Vaginalzytologie bestimmt. Die Anzahl der Tiere, die sich im Östrus beziehungsweise nicht im Östrus befanden, sind in Abbildung 35A für Versuchsreihe 1 (kabelgebundene EEG-Aufzeichnung) und in Abbildung 35B für Versuchsreihe 2 (telemetrische EEG-Aufzeichnung) dargestellt. Während sich in Versuchsreihe 2 keines der epileptischen Tiere im Östrus befand, war die Verteilung in Versuchsreihe 1 homogener. Es befanden sich sieben von zwölf Tieren aus der Epilepsie-Gruppe im Östrus. In der naiven Gruppe konnte bei acht Tieren von zwölf ein Östrus festgestellt werden. In der elektrodenimplantierten Gruppe befanden sich sechs von zwölf Tieren im Östrus.

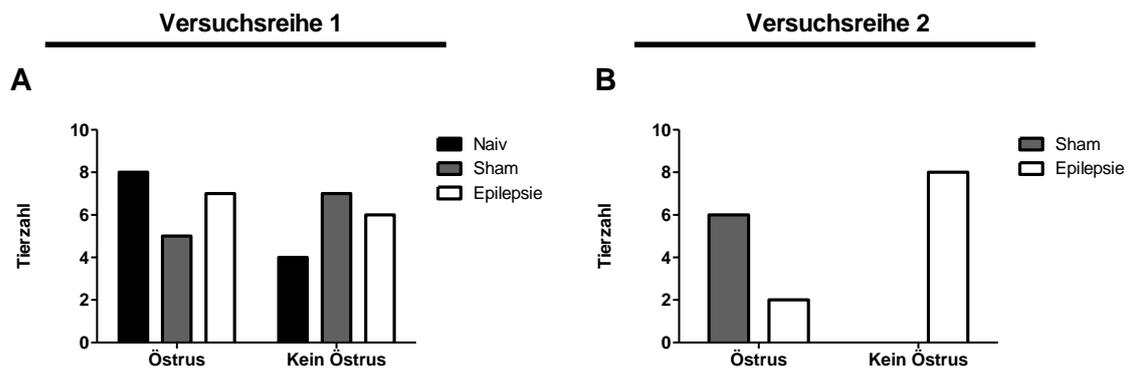


Abbildung 35: Zyklusstand der Tiere am Versuchsende.

#### 4.2. Gewichtsverlauf

Nach der SE-Induktion wurden die Tiere täglich gewogen. Bedingt durch die reduzierte Fut-  
teraufnahme in den Tagen nach dem SE, verlieren die Tiere anfänglich an Gewicht. Einen  
Tag nach dem SE konnte eine signifikante Reduktion des Körpergewichts im Vergleich zu  
den Kontrollgruppen festgestellt werden (Abbildung 36). Ab Tag 2 befanden sich die Tiere  
wieder in der gleichen Gewichtsspanne, wie die Kontrolltiere.

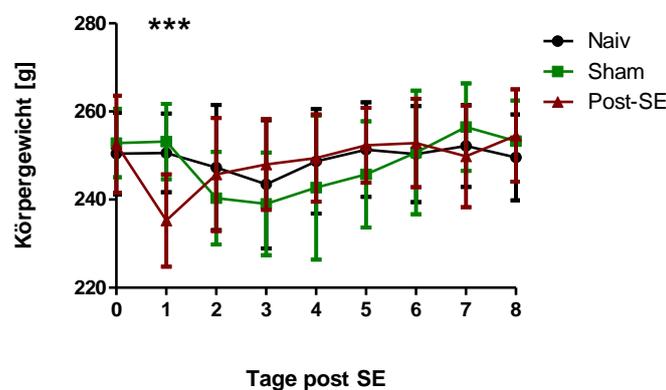


Abbildung 36: Gewichtsverlauf der Versuchsreihe 1 nach der SE-Induktion. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Körpergewichts konnte ausschließlich ein Tag nach dem SE festgestellt werden. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

#### 4.3. Herzfrequenz

Die telemetrischen Aufzeichnungen wurden unmittelbar vor der Induktion des SE, eine, vier und neun Wochen nach dem SE durchgeführt. Anhand der Datenanalyse konnte festgestellt werden, dass die HF in allen drei Phasen nach dem SE sowohl in der Aktiv-, als auch in der Ruhephase signifikant erhöht war (Abbildung 37). Während der Aktivphase war die HF sowohl in der Sham-Gruppe, als auch in der Post-SE-Gruppe höher, als in der Ruhephase. Darüber hinaus konnte in beiden Gruppen eine biphasische Erhöhung der HF in der

Wachphase festgestellt werden. In der Ruhephase war eine monophasische Erhöhung der HF erkennbar. Für alle telemetrisch gemessenen Parameter bestand die Sham-Gruppe aus sechs und die Post-SE beziehungsweise Epilepsie-Gruppe aus 11 – 12 Tieren.

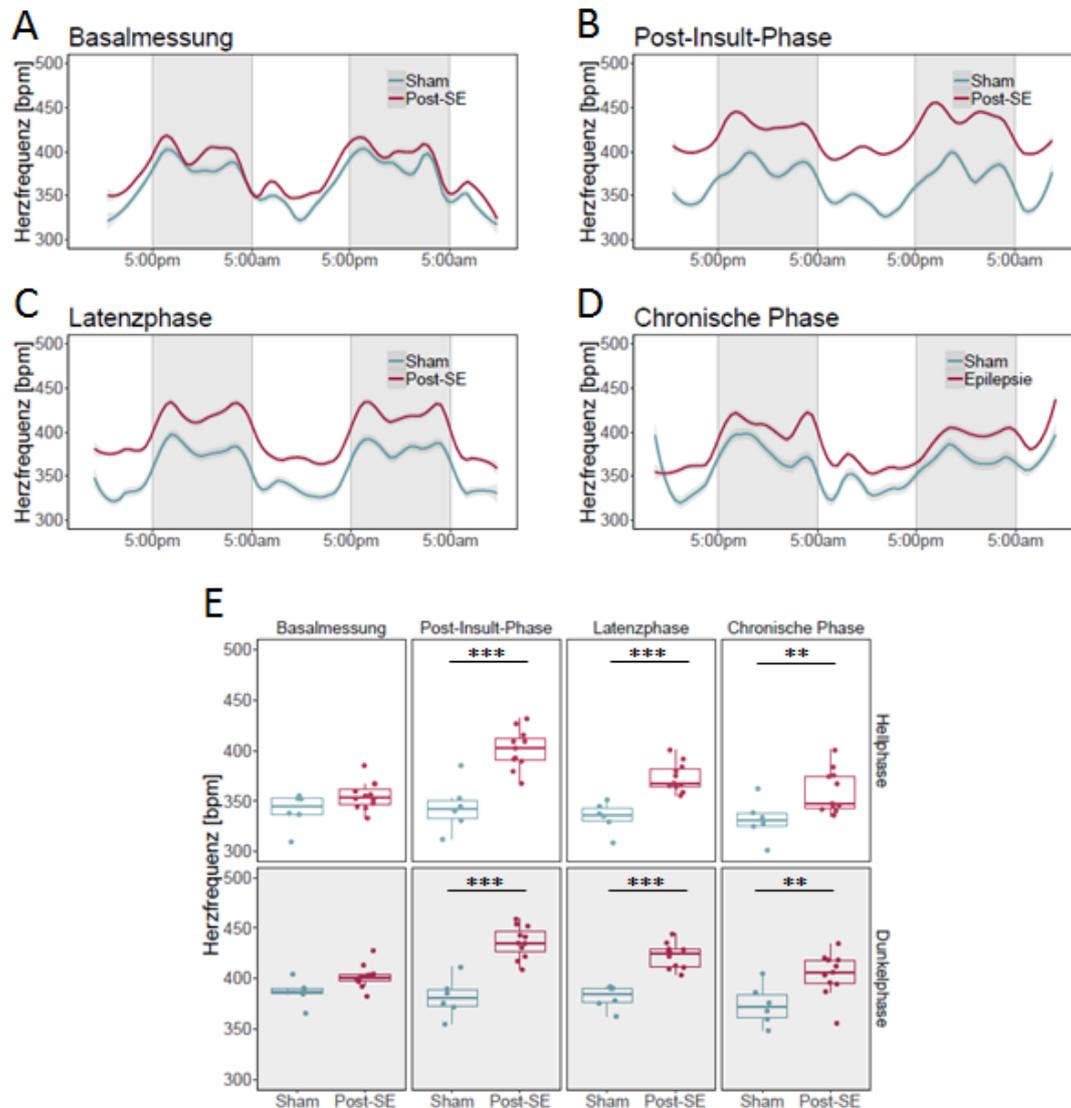


Abbildung 37: HF. Dargestellt ist die HF vor der SE-Induktion (A, Basalmessung), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE). Während allen Phasen nach dem SE konnte eine signifikante Erhöhung der HF im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (E). Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LOESS-Regression. Die graue unterlegte Fläche stellen das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge 1,5 x IQR. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

#### **4.4. Herzratenvariabilität**

Die untersuchten Parameter der HRV umfassten den zeitbezogenen und den frequenzbezogenen Bereich. Die Grundlage für die Messung der HRV sind die QRS-Komplexe. Nachdem die R-Zacken mittels der automatisierten Erkennungssoftware identifiziert und manuell überprüft wurden, wurden software-basiert daraus die verschiedenen Parameter abgeleitet. Mittels der exportierten Excel-Tabellen konnte anschließend über die entsprechenden R-Skripte eine graphische Darstellung des tageszeitlichen Verlaufs dieser Parameter erfolgen. Untersucht und dargestellt wurden folgende Parameter: SDNN, RMSSD, nn9 und pNN9. Bei RMSSD, nn9 und pNN9 konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 39 – 41). Wohingegen bei SDNN eine signifikante Reduktion der HRV in der frühen Post-Insult- und Latenzphase während der Aktiv- und Ruhephase festgestellt werden konnte (Abbildung 39). In der chronischen Phase beschränkte sich diese Reduktion ausschließlich auf die Ruhephase. Die Ergebnisse der frequenzbezogenen Analyse zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 42).

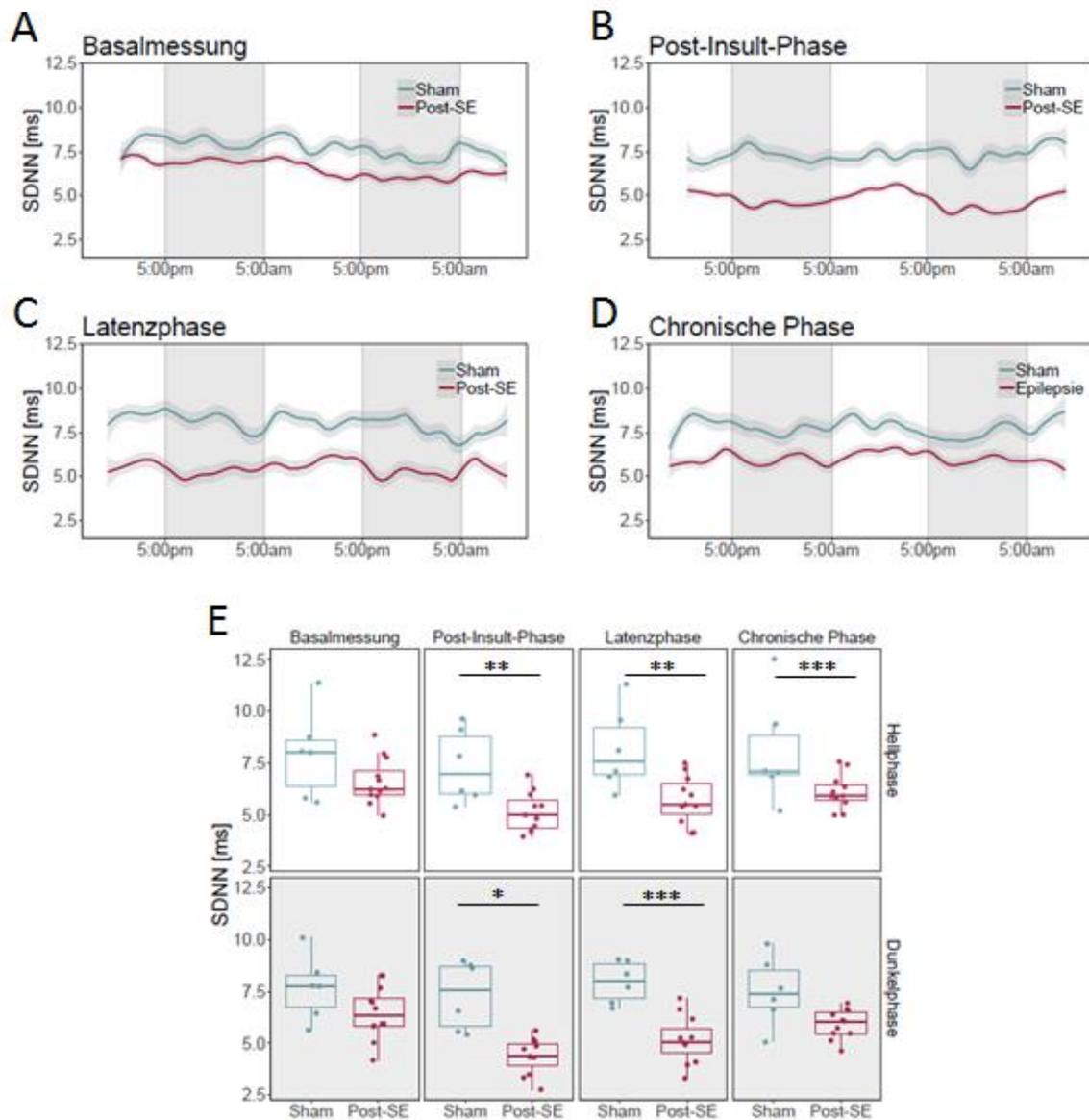


Abbildung 38: SDNN. Herzratenvariabilitätsparameter (A), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE). Während der frühen Post-Insult-Phase (B) und der Latenzphase (C) ist die HRV in Form der SDNN signifikant reduziert. Während der chronischen Phase ist ausschließlich die Hellphase von dieser Reduktion betroffen (D). Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LOESS-Regression. Die grau-unterlegte Fläche stellt das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ . Dabei sind alle Hell- und alle Dunkelphasen während eines Zeitpunkts zusammengefasst. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Sham  $n = 6$  und Post-SE/Epilapsie  $n = 11 - 12$ . \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

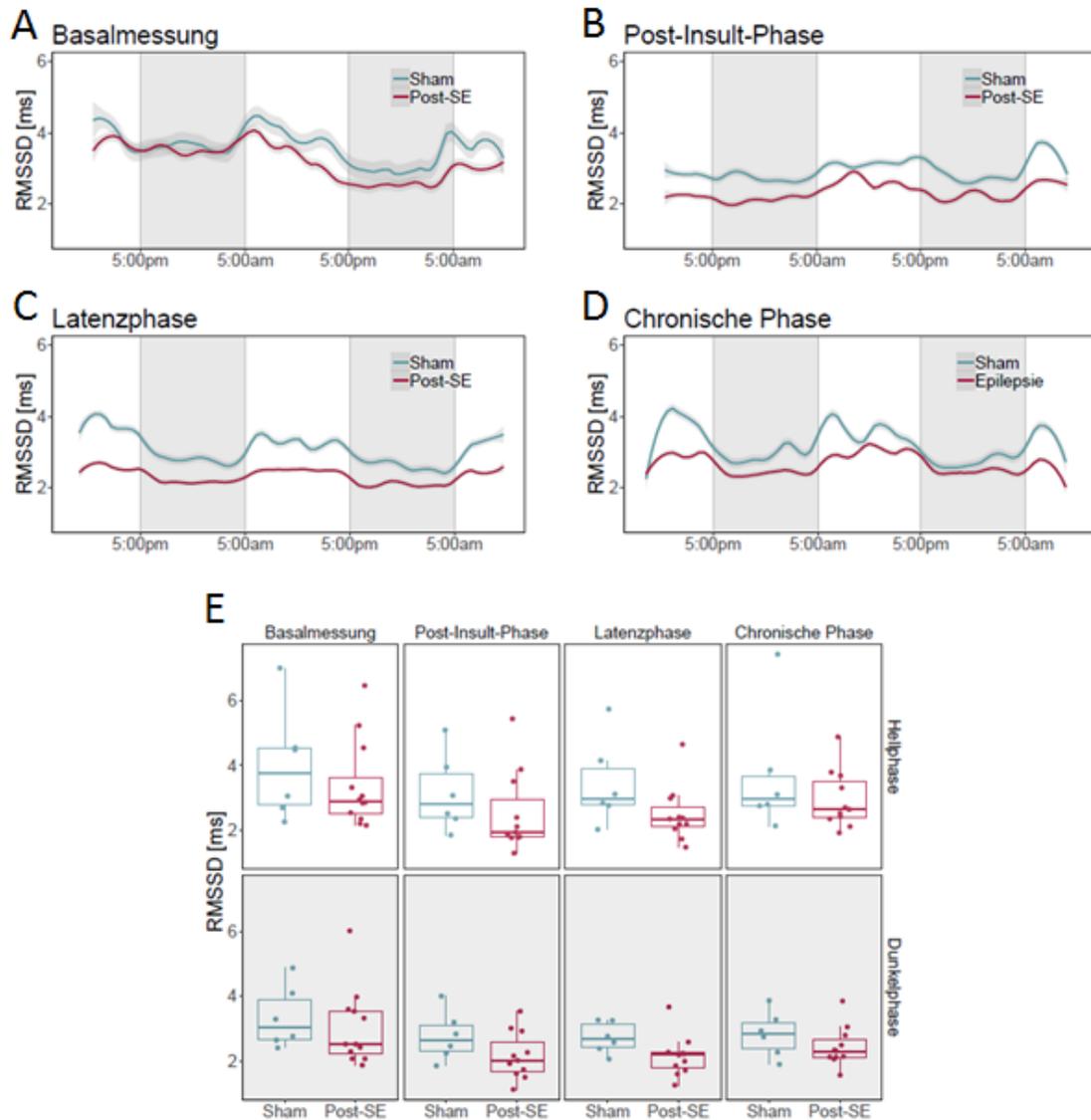


Abbildung 39: RMSSD: Herzratenvariabilitätsparameter (A), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE). Während keiner der verschiedenen Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LOESS-Regression. Die grau-unterlegte Fläche stellt das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge 1,5 x IQR. Dabei sind alle Hell- und alle Dunkelphasen während eines Zeitpunkts zusammengefasst. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Sham  $n = 6$  und Post-SE/Epilepsie  $n = 11 - 12$ .

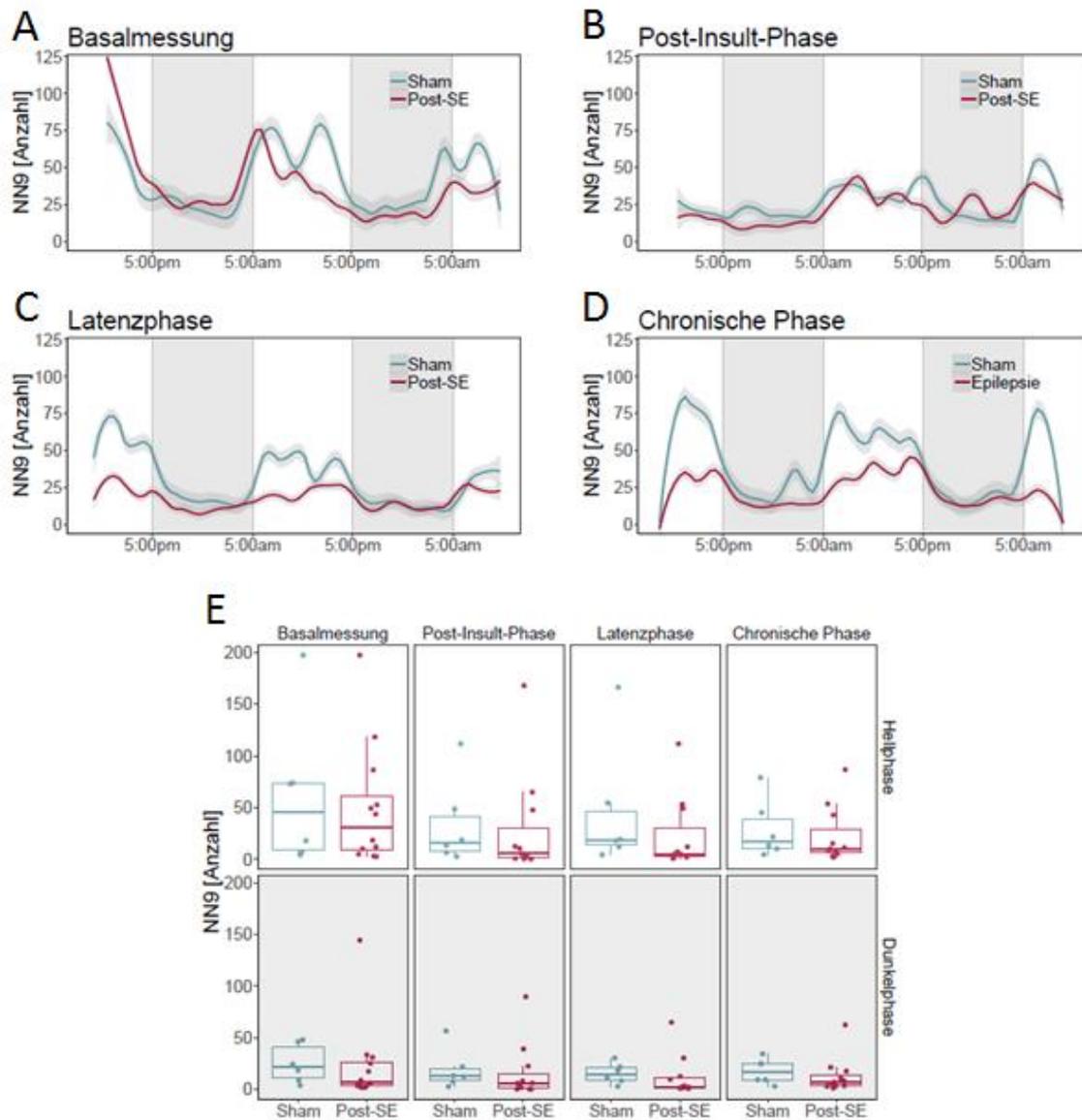


Abbildung 40: NN9: Herzratenvariabilitätsparameter (A), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE). Während der frühen Post-Insult-Phase (B) und der Latenzphase (C) ist die HRV in Form der NN9 signifikant reduziert. Während keiner der untersuchten Phasen konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (A-E). Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LOESS-Regression. Die grau-unterlegte Fläche stellt das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge  $1,5 \times \text{IQR}$ . Dabei sind alle Hell- und alle Dunkelphasen während eines Zeitpunkts zusammengefasst. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Sham  $n = 6$  und Post-SE/Epilepsie  $n = 11 - 12$ . \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

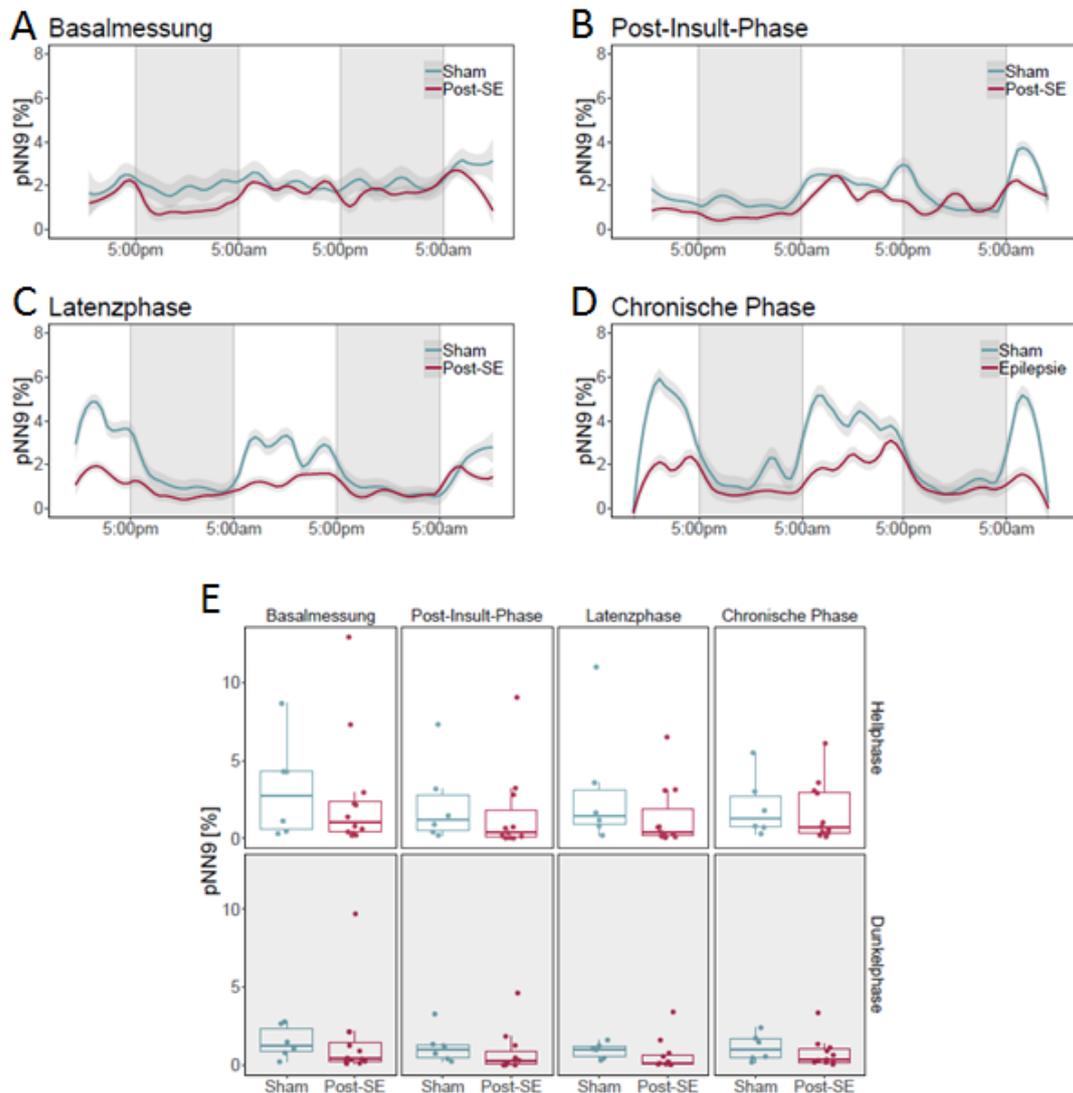


Abbildung 41: pNN9: Herzratenvariabilitätsparameter (A), in der frühen Post-Insult-Phase (B, eine Woche post SE), der Latenzphase (C, vier Wochen post SE) und während der chronischen Phase (D, neun Wochen post SE). Während der frühen Post-Insult-Phase (B) und der Latenzphase (C) ist dieser HRV-Parameter nicht verändert. Während keiner der untersuchten Phasen konnte ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (A-E). Die Linien in den Diagrammen (A-D) zeigen die LOESS-Regression. Die grau-unterlegte Fläche stellt das 95 % Konfidenzintervall dar. Die Boxplots in Diagramm (E) zeigen den Median mit Whisker der Länge 1,5 x IQR. Dabei sind alle Hell- und alle Dunkelphasen während eines Zeitpunkts zusammengefasst. Durch einen Stern werden die signifikanten Unterschiede dargestellt. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Sham  $n = 6$  und Post-SE/Epilepsie  $n = 11 - 12$ . \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

Bei der frequenzbezogenen Messung wurde das Verhältnis zwischen *Low-Frequency* (LF) und *High-Frequency* (HF) bestimmt. Dabei konnte in keiner Phase nach dem SE ein signifikanter Unterschied zur Sham-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 42).

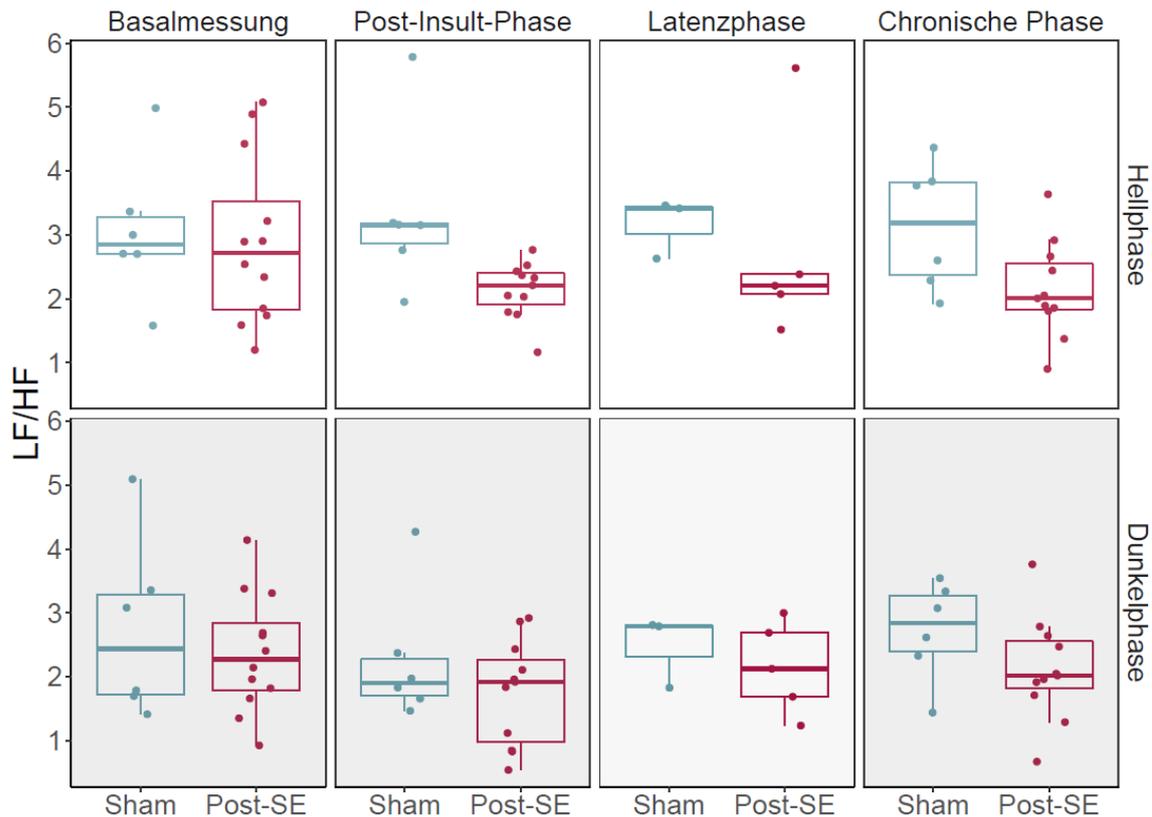


Abbildung 42: LF/HF. Die Boxplots zeigen den Median mit Whisker der Länge 1,5 x IQR. Dabei sind alle Hell- und alle Dunkelphasen während eines Zeitpunkts zusammengefasst. Die Gruppengrößen waren wie folgt: Sham  $n = 6$  und Post-SE/Epilepsie  $n = 11 - 12$ . \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* =  $p < 0,0001$

## 5. Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse

### 5.1. Korrelationsmatrix

Die untersuchten Parameter wurden in einer Korrelationsmatrix nach Spearman erfasst und graphisch dargestellt. Durch den Korrelationskoeffizienten wird der lineare Zusammenhang zwischen zwei Parametern angegeben. Er kann Werte zwischen plus eins und minus eins annehmen. Dabei stellt ein positiver Korrelationskoeffizient eine positive Korrelation zwischen zwei Parametern dar. Ein negativer Korrelationskoeffizient spiegelt eine negative Korrelation wider. Liegt der Wert null vor, existiert kein linearer Zusammenhang zwischen den Parametern. Die Korrelationsmatrix wurde sowohl für Versuchsreihe 1 (Abbildung 43), als auch für die Versuchsreihe 2 (Abbildung 44) erstellt. Das Verzeichnis für die verwendeten Abkürzungen ist in Tabelle 2 zu finden. Die Ergebnisse für Versuchsreihe 1 sind in Tabelle 3 und die Ergebnisse für Versuchsreihe 2 sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 2: Abkürzungen der Korrelationsmatrix.

<b>Parameter</b>	<b>Einheit</b>	<b>Test</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>Weight_gain</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewichtszunahme von Ankunft bis zum Versuchsende
<b>Food_intake_Lat_1-3</b>	Gramm	Futteraufnahme	Durchschnittliche Futteraufnahme während Latenzwoche 1-3
<b>Food_intake_Lat_4-6</b>	Gramm	Futteraufnahme	Durchschnittliche Futteraufnahme während Latenzwoche 4-6
<b>Food_intake_Behav_1-3</b>	Gramm	Futteraufnahme	Durchschnittliche Futteraufnahme während chronischer Phase nach EEG-Monitoring
<b>soiling_1w</b>	Score 1-3	Level-of-soiling	Nestverschmutzung eine Woche nach dem SE
<b>soiling_2w</b>	Score 1-3	Level-of-soiling	Nestverschmutzung zwei Wochen nach dem SE
<b>soiling_4w</b>	Score 1-3	Level-of-soiling	Nestverschmutzung vier Wochen nach dem SE
<b>soiling_11w</b>	Score 1-3	Level-of-soiling	Nestverschmutzung elf Wochen nach dem SE
<b>NB_1w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten eine Woche nach dem SE
<b>NB_2w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten zwei Wochen nach dem SE
<b>NB_4w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten vier Wochen nach dem SE
<b>BUR_Baseline_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	Aus der Röhre gewählter Kies während des Trainings
<b>BUR_Baseline_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens
<b>BUR_1wOP_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	Aus der Röhre gewählter Kies eine Woche nach dem operativen Eingriff
<b>BUR_1wOP_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des gezielten Wühlverhaltens nach dem operativen Eingriff
<b>BUR_1w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	Aus der Röhre gewählter Kies eine Woche nach dem SE
<b>BUR_1w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens eine Woche nach dem SE

<b>BUR_4w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	Aus der Röhre gewühlter Kies vier Wochen nach dem SE
<b>BUR_4w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 4 Wochen nach dem SE
<b>BUR_11w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	Aus der Röhre gewühlter Kies elf Wochen nach dem SE
<b>BUR_11w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 11 Wochen nach dem SE
<b>SI_active</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit, während der sich die Tiere in einer aktiven sozialen Interaktion befanden
<b>SI_passive</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit, während der sich die Tiere in einer passiven sozialen Interaktion befanden
<b>SI_aggressive</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit, während der sich die Tiere in einer aggressiven sozialen Interaktion befanden
<b>SP_percentage</b>	Prozent	Saccharin-Präferenz	Saccharinkonsum anteilig vom gesamten Flüssigkeitskonsum
<b>OF_distance_moved</b>	Sekunden	Open-Field	Zurückgelegte Strecke
<b>OF_rearing_frequency</b>	Sekunden	Open-Field	Anzahl des Aufrichtens um mehr als 45°
<b>OF_immobile_duration</b>	Sekunden	Open-Field	Dauer der Immobilität
<b>OF_center</b>	Sekunden	Open-field	Dauer des Aufenthalts im Zentrum
<b>BWB_WB</b>	Sekunden	Black-White-Box	Dauer des Aufenthalts im weißen Kompartiment
<b>BWB_entries_in_BB</b>	Anzahl	Black-White-Box	Anzahl der Übertritte in das schwarze Kompartiment
<b>BWB_stretching</b>	Anzahl	Black-White-Box	Anzahl des Stretchings
<b>EPM_head_dip</b>	Anzahl	Elevated-Plus-Maze	Anzahl der Head Dips
<b>EPM_closed_arms_duration</b>	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Dauer des Aufenthalts in den geschlossenen Armen
<b>EPM_open-arms-duration</b>	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Dauer des Aufenthalts in den offenen Armen
<b>EPM_open1_3</b>	Sekunden	Elevated-Plus-	Dauer des Aufenthalts im äußeren

		Maze	Drittel der offenen Arme
<b>Adrenal_glands</b>	Gramm	Nebennieren	Gewicht der Nebennieren
<b>Creatinkinase</b>	U/L	Creatinkinase	Konzentration der CK im Serum
<b>Cort_hair</b>	pg/mg	Haare	Corticosteronkonzentration in den Haaren am Versuchsende
<b>Cort_feces_PräOP</b>	ng/g	FCM	Konzentration der FCM vor dem operativen Eingriff
<b>Cort_fececs_2d</b>	ng/g	FCM	Konzentration der FCM zwei Tage nach dem SE
<b>Cort_feces_7d</b>	ng/g	FCM	Konzentration der FCM sieben Tage nach dem SE
<b>Cort_feces_4w</b>	ng/g	FCM	Konzentration der FCM vier Wochen nach dem SE
<b>Cort_feces_13w</b>	ng/g	FCM	Konzentration der FCM dreizehn Wochen nach dem SE
<b>Cort_serum</b>	ng/ml	Corticosteron	Serumkonzentration von Corticosteron am Versuchsende
<b>BDNF</b>	pg/ml	BDNF	Serumkonzentration des BDNF am Versuchsende
<b>Irwin_early_1w</b>	Summenscore	Irwin-Score	Irwin-Score eine Woche nach dem SE
<b>Irwin_latency</b>	Summenscore	Irwin-Score	Irwin-Score vier Wochen nach dem SE
<b>Irwin_chronic</b>	Summenscore	Irwin-Score	Irwin-Score elf Wochen nach dem SE
<b>RGS_2d</b>	Summenscore	RGS	Beurteilung der schmerzbedingten Veränderung der Mimik zwei Tage nach dem SE
<b>RGS_chronic</b>	Summenscore	RGS	Beurteilung der Mimik zwei Tage nach dem SE
<b>Seizures_n</b>	Anzahl	Anfallsfrequenz	Anzahl der Anfälle während Video- und EEG-Monitoring
<b>Seizures_duration</b>	Sekunden	Anfallsdauer	Dauer aller Anfälle während des Video- und EEG-Monitorings
<b>HR</b>	Beats per minute (bpm)	Herzschlagfrequenz	Durchschnittliche Anzahl der Herzschläge pro Minute während der verschiedenen Phasen jeweils für die

			Tag (d)- und Nachtphase (n)
<b>NN-I</b>	ms	NN-Intervall	Durchschnittliche Länge zwischen zwei R-Zacken während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
<b>NN9</b>	Anzahl	HRV	Anzahl der aufeinanderfolgenden R-Zacken, die um mehr als 9ms voneinander abweichen; dargestellt sind die Werte der verschiedenen Phasen für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
<b>pNN9</b>	Prozent	HRV	Prozentuale Darstellung aller aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die mehr als 9 ms voneinander abweichen; dargestellt sind die Werte der verschiedenen Phasen für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
<b>RMSSD</b>	ms	HRV	RMSSD während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
<b>SDNN</b>	ms	HRV	SDNN während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d) - und Nachtphase (n)
<b>Act</b>	Counts	Heimkäfigaktivität	Aktivität während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)

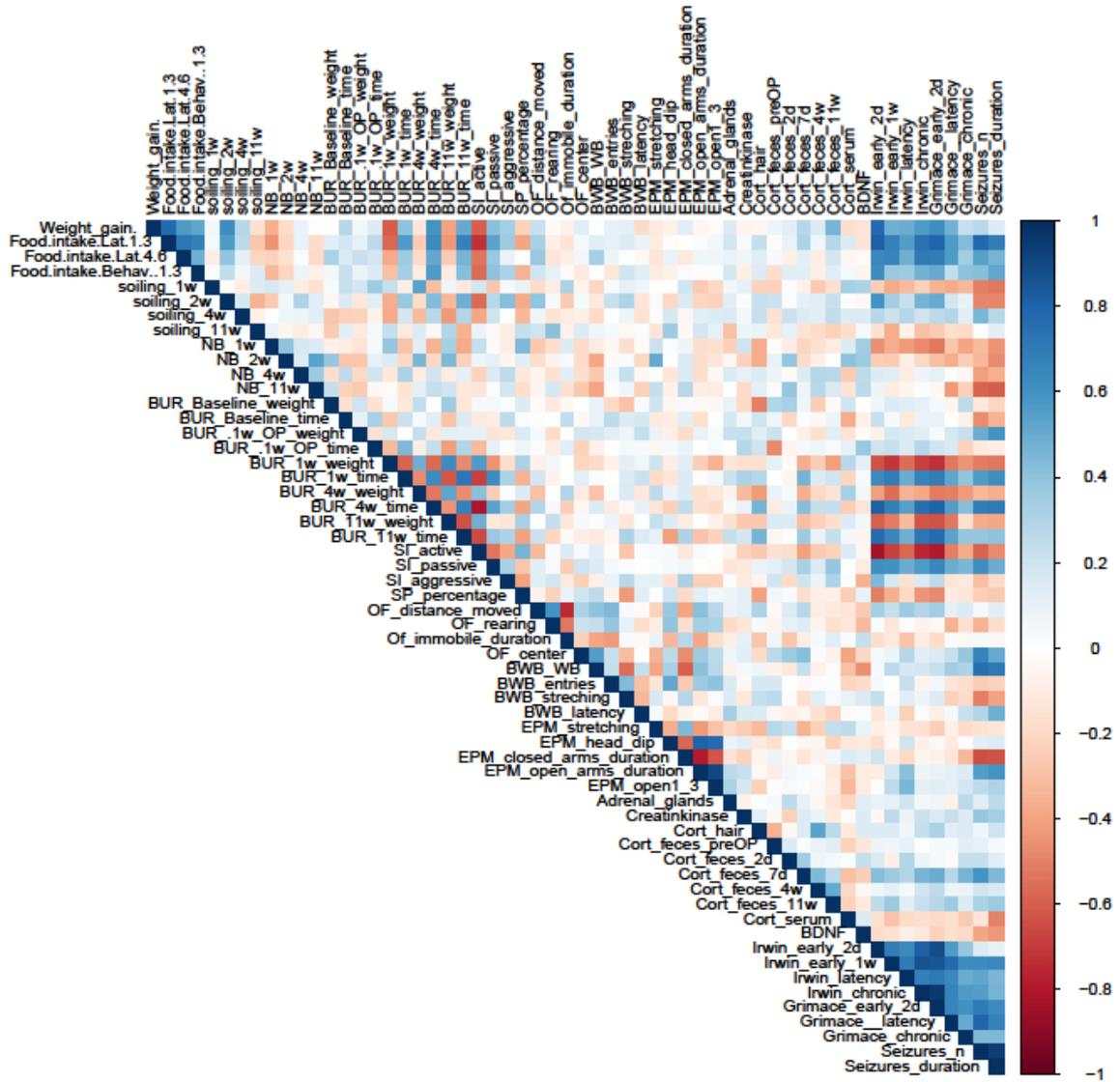


Abbildung 43: Korrelationsmatrix der Versuchsreihe 1

Tabelle 3: Korrelationskoeffizienten der Versuchsreihe 1

<i>Parameter 1</i>	<i>Parameter 2</i>	<i>Korrelationskoeffizient</i>
<i>NB_1w</i>	Irwin_early_2d	- 0,53
<i>NB_2w</i>	BUR_1w_time	- 0,52
	Irwin_early_1w	- 0,50
	Grimace_early_2d	- 0,57
	Seizures_duration	+ 0,50
<i>NB_11w</i>	EPM_open_arms_duration	+ 0,52
	Seizures_n	- 0,50
<i>BUR_1w_OP</i>	Seizures_n	+ 0,54
<i>BUR_1w_weight</i>	Weight_gain	- 0,50
	BUR_1w_time	- 0,62
	BUR_4w_weight	+ 0,52
	BUR_4w_time	- 0,68
	BUR_11w_weight	+ 0,70
	BUR_11w_time	- 0,62
	SI_active	+ 0,67
	SP_percentage	+ 0,52
	Irwin_early_2d	- 0,62
	Irwin_early_1w	- 0,72
	Irwin_latency	- 0,69
	Irwin_chronic	- 0,68
	Grimace_early_2d	- 0,67
<i>BUR_1w_time</i>	Weight_gain	+ 0,71
	BUR_4w_time	+ 0,66
	BUR_11w_weight	- 0,59
	SI_active	- 0,64
	SP_percentage	- 0,54
	Cort_feces_2d	+ 0,51
	Irwin_early_2d	+ 0,67
	Irwin_early_1w	+ 0,66
	Irwin_latency	+ 0,73
	Irwin_chronic	+ 0,74
	Grimace_early_2d	+ 0,76
<i>BUR_4w_weight</i>	BUR_1w_weight	+ 0,52
	BUR_4w_time	- 0,76
	BUR_11w_weight	+ 0,54
	BUR_11w_time	- 0,59
	SI_active	+ 0,59
	Irwin_early_2d	- 0,56
	Irwin_early_1w	- 0,60
	Irwin_latency	- 0,66
	Irwin_chronic	- 0,64
	Grimace_early_2d	- 0,51
<i>BUR_4w_time</i>	Weight_gain	+ 0,51
	BUR_1w_weight	- 0,68
	BUR_1w_time	+ 0,66
	BUR_4w_weight	- 0,76
	BUR_11w_weight	- 0,73
	BUR_11w_time	+ 0,75
	SI_active	- 0,65
	SP_percentage	- 0,54
	Irwin_early_2d	+ 0,71
	Irwin_early_1w	+ 0,69
	Irwin_latency	+ 0,78
	Irwin_chronic	+ 0,78

	Grimace_early_2d	+ 0,69
<i>BUR_11w_weight</i>	BUR_1w_weight	+ 0,70
	BUR_1w_time	- 0,59
	BUR_4w_weight	+ 0,54
	BUR_4w_time	- 0,73
	BUR_11w_time	- 0,76
	SI_active	+ 0,69
	SP_percentage	+ 0,61
	Irwin_early_2d	- 0,64
	Irwin_early_1w	- 0,64
	Irwin_latency	- 0,77
	Irwin_chronic	- 0,79
	Grimace_early_2d	- 0,72
	Seizures_n	- 0,58
	Seizures_duration	- 0,64
<i>BUR_11w_time</i>	Weight_gain	+ 0,60
	BUR_1w_weight	- 0,62
	BUR_1w_time	+ 0,61
	BUR_4w_weight	- 0,59
	BUR_4w_time	+ 0,75
	BUR_11w_weight	- 0,76
	SI_active	- 0,61
	SP_percentage	- 0,57
	Irwin_early_2d	+ 0,61
	Irwin_early_1w	+ 0,63
	Irwin_latency	+ 0,71
	Irwin_chronic	+ 0,77
	Grimace_early_2d	+ 0,70
<i>SI_active</i>	Weight_gain	- 0,66
	BUR_1w_weight	+ 0,67
	BUR_1w_time	- 0,64
	BUR_4w_weight	+ 0,59
	BUR_4w_time	- 0,65
	BUR_11w_weight	+ 0,69
	BUR_11w_time	- 0,61
	Cort_hair	- 0,52
	Irwin_early_2d	- 0,78
	Irwin_early_1w	- 0,71
	Irwin_latency	- 0,80
	Irwin_chronic	- 0,81
	Grimace_early_2d	- 0,74
<i>SI_aggressive</i>	Irwin_early_2d	+ 0,52
	Irwin_early_1w	+ 0,60
	Seizures_duration	- 0,53
<i>SP_percentage</i>	Weight_gain	- 0,63
	BUR_1w_weight	+ 0,52
	BUR_1w_time	- 0,54
	BUR_4w_time	- 0,54
	BUR_11w_weight	+ 0,61
	BUR_11w_time	- 0,57
	EPM_head_dip	+ 0,51
	Irwin_early_2d	- 0,57
	Irwin_early_1w	- 0,52
	Irwin_latency	- 0,67
	Irwin_chronic	- 0,71
	Grimace_early_2d	- 0,68
	Seizures_n	- 0,67
	Seizures_duration	- 0,62
<i>OF_distance</i>	Seizures_n	- 0,83
	Seizures_duration	- 0,79
<i>OF_rearing</i>	Cort_serum	- 0,53
	Grimace_chronic	- 0,51
	Seizures_n	- 0,78

	Seizures_duration	- 0,70
<i>BWB_entries</i>	Grimace_chronic	- 0,52
	Seizures_n	- 0,59
	Seizures_duration	- 0,50
<i>BWB_latency</i>	Grimace_chronic	+ 0,52
	Seizures_duration	+ 0,50
<i>EPM_stretching</i>	Seizures_n	- 0,71
	Seizures_duration	- 0,68
<i>EPM_head_dips</i>	SP_percentage	+ 0,51
	Grimace_chronic	- 0,53
	Seizures_n	- 0,69
	Seizures_duration	- 0,62
<i>EPM_open_arms_duration</i>	Grimace_chronic	- 0,51
	Seizures_n	- 0,65
	Seizures_duration	- 0,61
<i>Adrenal_glands</i>	Irwin_latency	+ 0,53
	Irwin_chronic	+ 0,51
<i>Weight_gain</i>	BUR_1w_weight	- 0,50
	BUR_1w_time	+ 0,71
	BUR_4w_time	+ 0,51
	BUR_11w_time	+ 0,60
	SI_active	- 0,66
	SP_percentage	- 0,63
	Irwin_early_2d	+ 0,60
	Irwin_early_1w	+ 0,62
	Irwin_latency	+ 0,74
	Irwin_chronic	+ 0,76
	Grimace_early_2d	+ 0,70
<i>Cort_hair</i>	SI_active	- 0,52
	BWB_stretching	- 0,54
	EPM_open1_3	- 0,58
	BDNF	- 0,52
	Seizures_n	+ 0,52
<i>Cort_feces_2d</i>	BUR_1w_time	+ 0,51
	Irwin_early_1w	+ 0,58
	Irwin_latency	+ 0,52
	Grimace_early_2d	+ 0,50
<i>Cort_feces_7d</i>	Seizure_n	- 0,76
	Seizures_duration	- 0,71
<i>Cort_serum</i>	Irwin_early_2d	- 0,58
	Irwin_chronic	- 0,51
<i>BDNF</i>	BWB_stretching	+ 0,52
	Cort_hair	- 0,52
	Seizures_n	- 0,52
<i>Irwin_early_2d</i>	Weight_gain	+ 0,60
	NB_1w	- 0,53
	BUR_1w_weight	- 0,62
	BUR_1w_time	+ 0,67
	BUR_4w_weight	- 0,56
	BUR_4w_time	+ 0,71
	BUR_11w_weight	- 0,64
	BUR_11w_time	+ 0,61
	SI_active	- 0,78
	SI_aggressive	+ 0,52
	SP_percentage	- 0,57
	BWB_stretching	- 0,50
	Cort_serum	- 0,58
	Irwin_early_1w	+ 0,71
	Irwin_latency	+ 0,83
	Irwin_chronic	+ 0,85
	Grimace_early_2d	+ 0,78
<i>Irwin_early_1w</i>	Weight_gain	+ 0,62

	NB_2w	- 0,50
	BUR_1w_weight	- 0,72
	BUR_1w_time	+ 0,66
	BUR_4w_weight	- 0,60
	BUR_4w_time	+ 0,69
	BUR_11w_weight	- 0,64
	BUR_11w_time	+ 0,63
	SI_active	- 0,71
	SI_aggressive	+ 0,60
	SP_percentage	- 0,52
	Cort_feces_2d	+ 0,58
	Irwin_early_2d	+ 0,71
	Irwin_latency	+ 0,87
	Irwin_chronic	+ 0,86
	Grimace_early_2d	+ 0,84
<i>Irwin_latency</i>	Weight_gain	+ 0,74
	BUR_1w_weight	- 0,69
	BUR_1w_time	+ 0,73
	BUR_4w_weight	- 0,66
	BUR_4w_time	+ 0,78
	BUR_11w_weight	- 0,77
	BUR_11w_time	+ 0,71
	SI_active	- 0,80
	SP_percentage	- 0,67
	Adrenal_glands	+ 0,53
	Cort_feces_2d	+ 0,52
	Irwin_early_2d	+ 0,83
	Irwin_early_1w	+ 0,87
	Irwin_chronic	+ 0,98
	Grimace_early_2d	+ 0,92
<i>Irwin_chronic</i>	Weight_gain	+ 0,76
	BUR_1w_weight	- 0,68
	BUR_1w_time	+ 0,74
	BUR_4w_weight	- 0,64
	BUR_4w_time	+ 0,78
	BUR_11w_weight	- 0,79
	BUR_11w_time	+ 0,77
	SI_active	- 0,81
	SP_percentage	- 0,71
	BWB_stretching	- 0,52
	Adrenal_glands	+ 0,51
	Cort_serum	- 0,51
	Irwin_early_2d	+ 0,84
	Irwin_early_1w	+ 0,86
	Irwin_latency	+ 0,98
	Grimace_early_2d	+ 0,92
<i>Grimace_early_2d</i>	Weight_gain	+ 0,70
	NB_2w	- 0,57
	BUR_1w_weight	- 0,67
	BUR_1w_time	+ 0,76
	BUR_4w_weight	- 0,51
	BUR_4w_time	+ 0,69
	BUR_11w_weight	- 0,72
	BUR_11w_time	+ 0,70
	SI_active	- 0,74
	SP_percentage	- 0,68
	Cort_feces_2d	+ 0,50
	Irwin_early_2d	+ 0,78
	Irwin_early_1w	+ 0,84
	Irwin_latency	+ 0,92
	Irwin_chronic	+ 0,92
<i>Grimace_chronic</i>	OF_rearing_frequency	- 0,51
	BWB_entries_in_BB	- 0,52

	BWB_stretching	- 0,50
	BWB_latency	+ 0,52
	EPM_head_dip	- 0,53
	EPM_open_arms_duration	- 0,51
	Seizures_n	+ 0,57
	Seizures_duration	+ 0,51
<i>Seizures_n</i>	NB_11w	- 0,50
	BUR_1w_OP_weight	+ 0,54
	BUR_11w_weight	- 0,58
	SP_percentage	- 0,67
	OF_distance_moved	- 0,83
	OF_rearing_frequency	- 0,78
	OF_immobile_duration	+ 0,90
	BWB_entries_in_BB	- 0,59
	BWB_stretching	- 0,70
	EPM_stretching	- 0,71
	EPM_head_dip	- 0,69
	EPM_open_arms_duration	- 0,65
	EPM_opem1_3	- 0,63
	Creatinkinase	- 0,59
	Cort_hair	+ 0,52
	Cort_feces_7d	- 0,76
	BDNF	- 0,52
	Grimace_chronic	+ 0,57
	Seizures_duration	+ 0,97
<i>Seizures_duration</i>	NB_2w	+ 0,50
	BUR_11w_weight	- 0,64
	SI_aggressive	- 0,53
	SP_percentage	- 0,62
	OF_distance_moved	- 0,79
	OF_rearing_frequency	- 0,70
	OF_immobile_duration	+ 0,83
	BWB_entries_in_BB	- 0,50
	BWB_stretching	- 0,60
	BWB_latency	+ 0,50
	EPM_stretching	- 0,68
	EPM_head_dip	- 0,62
	EPM_open_arms	- 0,61
	EPM_open1_3	- 0,57
	Creatinkinase	- 0,54
	Cort_feces_7d	- 0,71
	Grimace_chronic	+ 0,51
	Seizures_n	+ 0,97

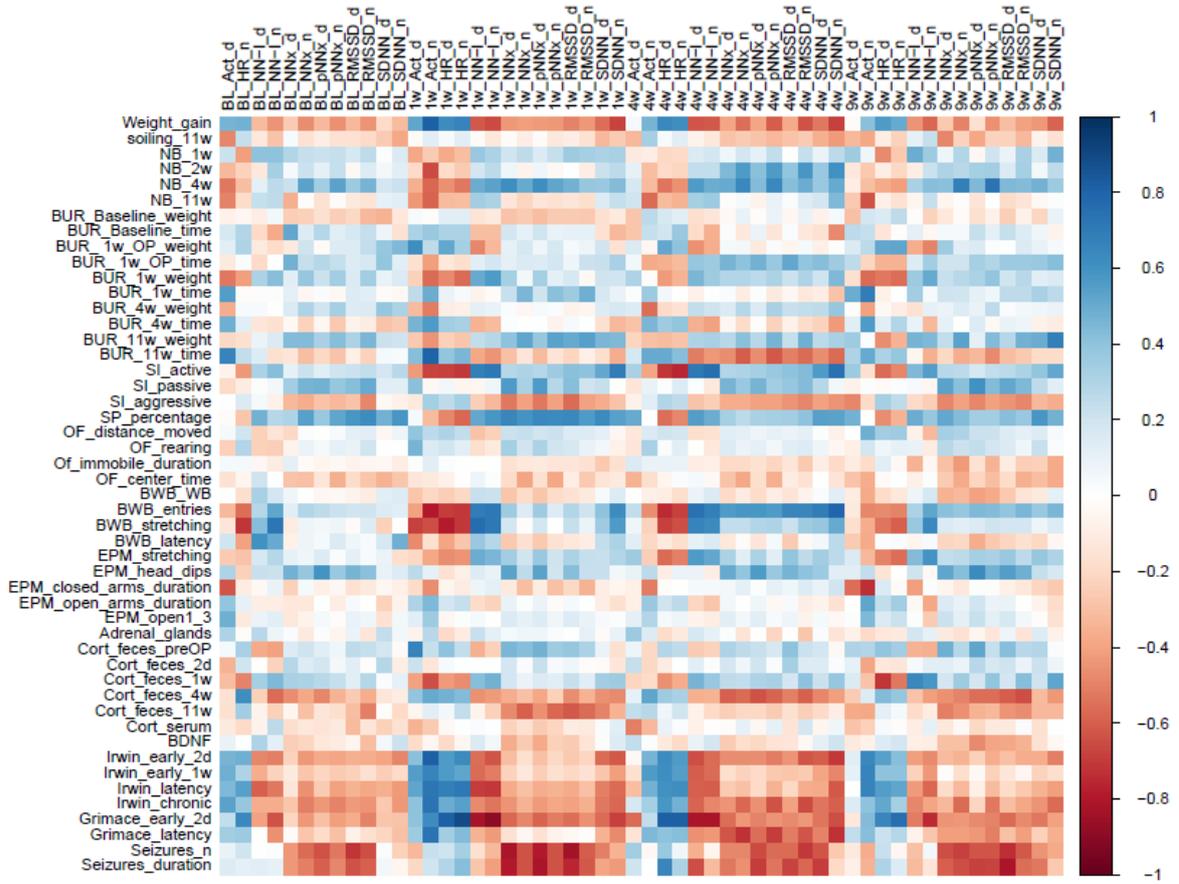


Abbildung 44: Korrelationsmatrix der Versuchsreihe 2

Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten der Versuchsreihe 2

<i>Parameter 1</i>	<i>Parameter 2</i>	<i>Korrelationskoeffizient</i>
<i>1w_Act_d</i>	Weight_gain%	+ 0,53
	soiling_2w	+ 0,55
	BUR_1wOP_weight	+ 0,61
	BWB_stretching	- 0,68
	Cort_feces_preOP	+ 0,66
	Irwin_early_2d	+ 0,55
	Irwin_latency	+ 0,52
<i>1w_Act_n</i>	Weight_gain%	+ 0,83
	NB_2w	- 0,66
	NB_4w	- 0,58
	NB_11w	- 0,59
	BUR_1w_weight	- 0,57
	BUR_4w_weight	- 0,52
	BUR_4w_time	+ 0,57
	BUR_11w_time	- 0,80
	SI_active	+ 0,67
	BWB_entries_in_BB	- 0,79
	BWB_stretching	- 0,65
	Cort_feces_1w	- 0,65
	Cort_feces_4w	+ 0,50
	Irwin_early_2d	+ 0,82
	Irwin_1w	+ 0,66
	Irwin_latency	+ 0,72
Irwin_chronic	+ 0,73	
Grimace_early_2d	+ 0,62	
Grimace_latency	+ 0,73	
<i>1w_HR_d</i>	Weight_gain%	+ 0,67
	soiling_2w	+ 0,59
	BUR_1wOP_weight	+ 0,51
	SI_active	- 0,69
	BWB_entries_in_BB	- 0,70
	BWB_stretching	- 0,78
	Irwin_early_2d	+ 0,56
	Irwin_1w	+ 0,56
	Irwin_latency	+ 0,68
	Grimace_early_2d	+ 0,81
<i>1w_HR_n</i>	Weight_gain%	+ 0,75
	soiling_2w	+ 0,61
	NB_4w	- 0,53
	BUR_1w_weight	- 0,56
	SI_active	- 0,71
	BWB_entries_in_BB	- 0,58
	BWB_stretching	- 0,71
	Irwin_early_2d	- 0,71
	Irwin_1w	+ 0,63
	Irwin_latency	+ 0,52
	Irwin_chronic	+ 0,71
	Grimace_early_2d	+ 0,54
Grimace_latency	+ 0,89	
<i>1w_SDNN_d</i>	Weight_gain%	- 0,59
	SI_active	+ 0,51
	SP_percentage	+ 0,63
	Cort_feces_11w	- 0,50
	Irwin_early_2d	- 0,56

	Irwin_latency	- 0,51
	Irwin_chronic	- 0,53
	Grimace_early_2d	- 0,57
<i>1w_SDNN_n</i>	Weight_gain%	- 0,66
	SI_active	+ 0,69
	SP_percentage	+ 0,54
	BWB_entries_in_BB	+ 0,62
	BWB_stretching	+ 0,57
	Irwin_early_2d	- 0,62
	Irwin_latency	- 0,56
	Irwin_chronic	- 0,58
	Grimace_early_2d	- 0,68
<i>4w_Act_d</i>	SP_percentage	+ 0,50
	Cort_serum	- 0,51
	Grimace_early_2d	- 0,56
<i>4w_Act_n</i>	NB_11w	- 0,56
	BUR_4w_weight	- 0,55
	BUR_11w_time	+ 0,5
	EPM_closed_arms_duration	- 0,52
	Cort_feces_4w	+ 0,52
	Irwin_early_1w	+ 0,57
<i>4w_HR_d</i>	Weight_gain%	+ 0,66
	soiling_2w	+ 0,61
	NB_4w	- 0,54
	BUR_1wOP_weight	+ 0,51
	BUR_11w_time	+ 0,50
	SI_active	- 0,72
	SP_percentage	- 0,55
	BWB_entries_in_BB	- 0,75
	BWB_stretching	- 0,68
	EPM_stretching	- 0,56
	Irwin_early_2d	+ 0,62
	Irwin_early_1w	+ 0,61
	Irwin_latency	+ 0,60
	Irwin_chronic	+ 0,58
	Grimace_early_2d	+ 0,81
<i>4w_HR_n</i>	Weight_gain%	+ 0,61
	soiling_2w	+ 0,55
	SI_active	- 0,76
	BWB_entries_in_BB	- 0,69
	BWB_stretching	- 0,65
	EPM_stretching	- 0,51
	Irwin_early_2d	+ 0,56
	Irwin_early_1w	+ 0,55
	Irwin_latency	+ 0,61
	Grimace_early_2d	+ 0,81
<i>4w_SDNN_d</i>	Weight_gain%	- 0,50
	soiling_1w	+ 0,65
	SI_active	+ 0,56
	SP_percentage	+ 0,54
	BWB_entries_in_BB	+ 0,69
	Irwin_early_2d	- 0,61
	Irwin_chronic	- 0,54
	Grimace_early_2d	- 0,54
	Grimace_latency	- 0,50
<i>4w_SDNN_n</i>	Weight_gain%	-- 0,70
	soiling_1w	+ 0,57
	NB_2w	+ 0,60
	NB_4w	+ 0,50

	BUR_11w_time	- 0,57
	SI_active	+ 0,74
	SP_percentage	+ 0,53
	BWB_entries_in_BB	+ 0,79
	BWB_stretching	+ 0,50
	Irwin_early_2d	- 0,71
	Irwin_latency	- 0,62
	Irwin_chronic	- 0,60
	Grimace_early_2d	- 0,65
	Grimace_latency	- 0,73
<i>9w_Act_d</i>	EPM_closed_arms_duration	- 0,55
<i>9w_Act_n</i>	NB_11w	- 0,64
	BUR_1w_weight	- 0,56
	BUR_1w_time	+ 0,69
	BUR_4w_time	+ 0,56
	BUR_11w_time	+ 0,50
	EPM_closed_arms_duration	- 0,74
	EPM_open_arms_duration	+ 0,52
	Irwin_early_2d	+ 0,64
	Irwin_early_1w	+ 0,66
	Irwin_latency	+ 0,66
<i>9w_HR_d</i>	Weight_gain%	+ 0,62
	soiling_2w	+ 0,87
	BUR_1wOP_weight	+ 0,51
	BUR_1w_weight	- 0,53
	SI_active	- 0,56
	BWB_stretching	- 0,54
	EPM_stretching	- 0,50
	Cort_feces_1w	- 0,72
	Irwin_early_2d	+ 0,54
	Irwin_latency	+ 0,55
	Irwin_chronic	+ 0,51
	Grimace_early_2d	+ 0,65
<i>9w_HR_n</i>	Weight_gain%	+ 0,53
	soiling_2w	+ 0,82
	BUR_1wOP_weight	+ 0,52
	BUR_1w_weight	- 0,55
	BWB_entries_in_BB	- 0,50
	BWB_stretching	- 0,60
	EPM_stretching	- 0,55
	Cort_feces_1w	- 0,53
	Irwin_latency	+ 0,52
	Grimace_early_2d	+ 0,75
<i>9w_SDNN_d</i>	SP_percentage	+ 0,58
	Grimace_early_2d	- 0,53
<i>9w_SDNN_n</i>	Weight_gain%	- 0,52
	BUR_11w_weight	+ 0,68
	SI_active	+ 0,51
	Cort_feces_1w	+ 0,52
	Irwin_early_2d	- 0,51
	Irwin_chronic	- 0,57
<i>Seizures_n</i>	Weight_gain%	+ 0,73
	BUR_11w_weight	- 0,50
	BUR_11w_time	+ 0,56
	SI_passive	- 0,72
	SI_aggressive	+ 0,62
	SP_percentage	- 0,72
	OF_rearing_frequency	- 0,63
	BWB_stretching	+ 0,57
	EPM_head_dips	+ 0,75
	Cort_feces_4w	+ 0,58
	Cort_feces_11w	+ 0,72
	Irwin_chronic	- 0,64

	1w_NN9_d	- 0,81
	1w_NN9_n	- 0,64
	1w_pNN9_d	- 0,79
	1w_pNN9_n	- 0,64
	1w_RMSSD_d	- 0,84
	1w_RMSSD_n	- 0,61
	1w_SDNN_d	- 0,51
	4w_pNN9_d	- 0,66
	4w_pNN9_n	- 0,57
	4w_RMSSD_d	- 0,56
	4w_RMSSD_n	- 0,71
	4w_SDNN_d	- 0,63
	9w_NN9_d	- 0,65
	9w_NN9_n	- 0,69
	9w_pNN9_d	- 0,63
	9w_pNN9_n	- 0,63
	9w_RMSSD_d	- 0,74
	9w_RMSSD_n	- 0,53
<i>Seizures_duration</i>	Weight_gain%	+ 0,50
	NB_4w	- 0,51
	BUR_11w_time	+ 0,58
	SI_passive	- 0,66
	OF_rearing_frequency	- 0,63
	BWB_WB	+ 0,55
	BWB_LT	+ 0,59
	EPM_head_dips	- 0,68
	Cort_feces_13w	+ 0,50
	Irwin_chronic	+ 0,52
	1w_NN9_d	- 0,79
	1w_NN9_n	- 0,64
	1w_pNN9_d	- 0,82
	1w_pNN9_n	- 0,64
	1w_RMSSD_d	- 0,76
	1w_RMSSD_n	- 0,62
	4w_HR_d	+ 0,65
	4w_NN9_d	- 0,53
	4w_pNN9_d	- 0,70
	4w_pNN9_n	- 0,54
	4w_RMSSD_d	- 0,67
	4w_RMSSD_n	- 0,58
	4w_SDNN_d	- 0,70
	9w_NN9_d	- 0,60
	9w_NN9_n	- 0,65
	9w_pNN9_d	- 0,68
	9w_pNN9_n	- 0,67
	9w_RMSSD_d	- 0,81
	9w_RMSSD_n	- 0,55
	9w_SDNN_d	- 0,53

## 5.2. Hauptkomponentenanalyse

Für die Erstellung der PCA wurden die Daten verwendet, die nach dem Video- und EEG-Monitoring erhoben wurden. Dabei wurden nur die Daten von den epileptischen Tieren verwendet. Die telemetrisch ermittelten Daten wurden exkludiert, da sie nur für die Versuchsreihe 2 vorlagen. Die PCA sollte dazu dienen, den Einfluss der Kabelableitung in Hinblick auf die biochemischen und verhaltensbiologischen Parameter zu untersuchen. Insgesamt fassen die PC 1 und PC 2 41 % der Varianz im Datensatz zusammen (PC1 = 29 %, PC 2

= 12 %). Die beiden Gruppen unterscheiden sich signifikant an der PC 2 ( $F(1,24) = 26.08$ ,  $P < 0.001$ ). Die Parameter, die zu diesem Unterschied zwischen den Gruppen führen, deuten nicht auf einen einzigen Phänotyp hin, als dass sie vielmehr eine Mischung aus den verschiedenen Experimenten darstellen. Die fünf Parameter, die überwiegend für die Separierung der Gruppen verantwortlich sind, sind das Nestbauverhalten, die Zeit in passiver Interaktion, das *Level-of-Soiling*, die BDNF-Konzentration und die Corticosteronkonzentration im Serum.

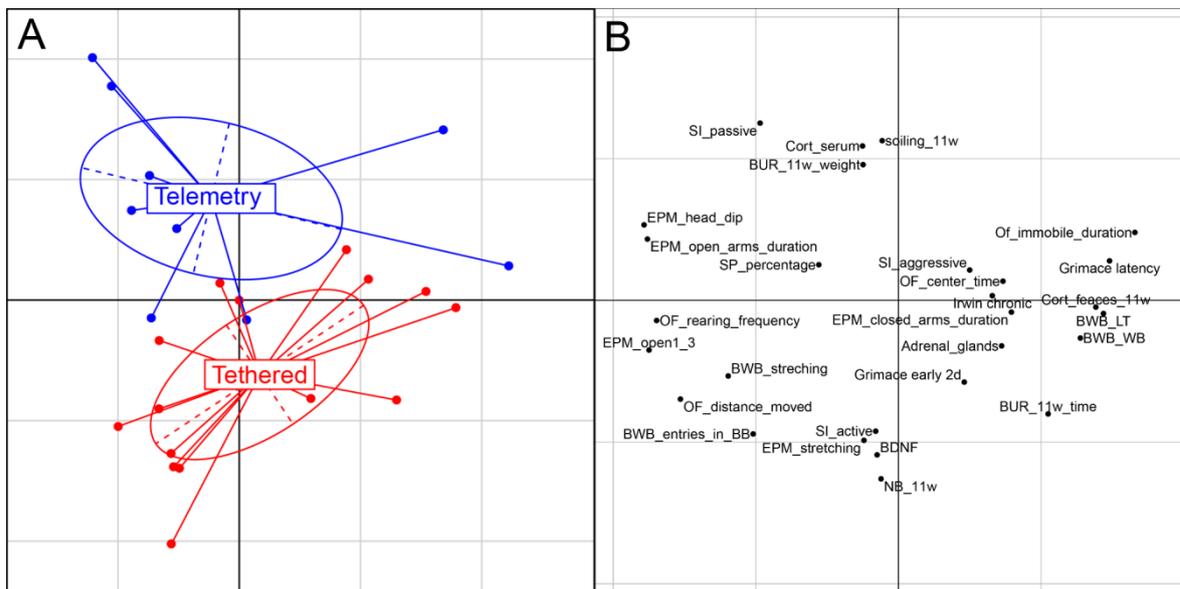


Abbildung 45: PCA. (A) Dargestellt sind die Epilepsie-Gruppen aus Versuchsreihe 1 (*Tethered*) und aus Versuchsreihe 2 (*Telemetry*). Jeder Punkt im Graphen stellt die Werte eines Tieres dar. Zu sehen ist die vertikale Separierung beider Gruppen entlang der PC 2. In Abbildung 45B sind die Parameter abgebildet, die zu einer Separierung der Gruppen führten. Die Gruppengröße sind für die *Tethered*-Gruppe  $n = 13-14$  und für die *Telemetry*-Gruppe  $n = 10-11$

## VI. DISKUSSION

Nach wie vor ist es noch nicht möglich alle Epilepsiepatienten adäquat medikamentös zu therapieren, sodass eine Anfallsfreiheit erreicht werden könnte. Unter diesem Problem leiden ca. ein Drittel der Humanpatienten (DUNCAN et al. 2006). Bei Hunden ist der Anteil der pharmakoresistenten Epilepsieerkrankungen mit 20 – 30 % ähnlich dem bei Humanpatienten (THOMOVSKY et al. 2019). Zusätzlich zur schlechten Therapierbarkeit nach der Krankheitsmanifestation gibt es momentan auch lediglich limitierte Möglichkeiten die Epileptogenese zu beeinflussen, wobei sich das sowohl auf das Unterdrücken des Ausbruchs und auf die Progression der Erkrankung bezieht (LÖSCHER u. BRANDT 2010; PITKANEN et al. 2015). Assoziiert mit der Epilepsie können Komorbiditäten auftreten (SCHULZEBONHAGE u. KÜHN 2008; MÜLLER et al. 2009; LÖSCHER 2015). Diese Komorbiditäten stellen einen weiteren Aspekt für die Notwendigkeit dar, Epilepsieerkrankung zu therapieren. Aufgrund der limitierten Möglichkeiten, die verschiedenen Stadien der Epilepsie und die Begleiterkrankungen zu behandeln, besteht nach wie vor ein hoher Bedarf an Tiermodellen. Sie dienen dazu zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen der Epilepsie besser verstehen zu können und nachfolgend neue AED entwickeln zu können (ROGAWSKI 2006; LÖSCHER 2017).

Bei Humanpatienten weiß man um die Belastung, die mit der Epilepsie, den wiederkehrenden Anfällen und den damit assoziierten Begleiterkrankungen einhergeht (SCHULZEBONHAGE u. KÜHN 2008). Während der Humanpatient die Möglichkeit hat durch direkte verbale Kommunikation seine Emotionen und Empfindungen beschreiben zu können, macht man sich bei Labornagern das Verhalten, biochemische und (patho-) physiologische Parameter zunutze. Abweichungen in diesen Parametern können Indikatoren für eine Reduktion des Wohlbefindens darstellen (JIRKOF et al. 2013b; JIRKOF 2014; WODARSKI et al. 2016). Bei Laborratten wurde der Einfluss der epilepsie-assoziierten Verhaltensänderungen auf das Wohlbefinden bislang nur bedingt untersucht. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits eine Studie durchgeführt, anhand der die Belastungseinstufung im Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten erfolgte (MÖLLER et al. 2018; MÖLLER et al. 2019). In dieser Studie wurde der Einfluss in den Phasen der fokalen beziehungsweise der generalisierten Anfälle auf das Wohlbefinden der Tiere evaluiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Belastung differenziell in verschiedenen Phasen der Epileptogenese beziehungsweise der Krankheitsmanifestation im Pilocarpin-Modell beurteilt. Abgesehen von der potenziell durch die Epilepsie bedingte Einschränkung im Wohlbefinden der Tiere müssen ebenso die experimentellen Bedingungen berücksichtigt werden. Diese beinhalten beispielsweise das *Handling*, die Haltung und operative Eingriffe. Das Pilocarpin-Modell wurde zuerst von TURSKI et al. (1983) beschrieben. Es gehört zu den am häufigsten verwendeten Epilepsiemodellen (CURIA et al. 2008; LIDSTER et al. 2016). Das ursprüngliche Protokoll

zur Induktion des SE unterlag nachfolgend einigen Überarbeitungen (GLIEN et al. 2001; LONGO et al. 2003; CURIA et al. 2008). Diese Änderungen des Versuchsprotokolls zielten jedoch vornehmlich darauf ab, die Mortalitätsraten zu senken und nicht speziell darauf das Wohlbefinden der Tiere zu verbessern (LIDSTER et al. 2016). Wie essenziell eine adäquate Belastungseinstufung wiederkehrender Anfälle bei Labornagern ist, wird auch durch das Auftreten von epileptischen Anfällen außerhalb von Epilepsiemodellen deutlich. So konnten beispielsweise in Toxikologiestudien, in der Tierzucht genetisch veränderter Tiere, in Schlaganfall-Modellen und im Rahmen operativer Eingriffe im Bereich der Neurochirurgie epileptische Anfälle beobachtet werden (WOLFENSOHN et al. 2013). Somit stellt die Belastungsbeurteilung bei Tieren mit wiederkehrenden Anfällen eine wichtige Grundlage dar, um das Wohlbefinden der Tiere evaluieren zu können. Erst nach einer wissenschaftlich-basierten Belastungseinstufung können daraufhin gezielt neue *Refinement*-Maßnahmen entwickelt und validiert werden, die zur Optimierung des Tierwohls beitragen. Diese Maßnahmen können dann im Sinne der 3R bezüglich der Effektivität das Wohlbefinden der Tiere zu steigern evaluiert werden.

## 1. Belastungseinschätzung der experimentellen Prozeduren

Im chemischen Post-SE-Modell soll das Krankheitsbild der Epilepsie dem der Epilepsie des Humanpatienten bestmöglich entsprechen (CAMPOS et al. 2013; VERVLIIET u. RAES 2013; GRONE u. BARABAN 2015). Bei der Durchführung dieses Post-SE-Modells ist es notwendig, dass die Laborratten diversen experimentellen Prozeduren unterzogen werden. Diese Prozeduren umfassen die Elektrodenimplantation, die die Ableitung des EEGs ermöglicht, um epileptische Anfälle nicht nur klinisch, sondern auch elektroenzephalographisch validieren zu können. Außerdem wird initial die Induktion eines SE durchgeführt, um die Entstehung neuronaler, epileptogener Netzwerkstrukturen auszulösen. Die Bestätigung, dass die Tiere nachfolgend wiederkehrende Anfälle entwickeln, erfolgt mittels des Video- und EEG-Monitorings. Diese Überwachung der spontanen Anfälle kann in Glasaquarien mittels einer kabelgebundenen Ableitung oder über eine kabellose Ableitung mittels der Telemetrie erfolgen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde den Tieren am Tag vor der Euthanasie retrobulbär Blut entnommen, um biochemische Parameter im Serum bestimmen zu können. All diese experimentellen Prozeduren müssen mit in der Belastungseinschätzung berücksichtigt werden, auch wenn sie per se nicht mit dem Krankheitsbild der Epilepsie assoziiert sind.

- Elektrodenimplantation

Um den postoperativen Einfluss der Elektrodenimplantation auf das Wohlbefinden der Tiere beurteilen zu können, wurde sieben Tage nach der Elektrodenimplantation das

Wühlverhalten untersucht. Dabei konnte in der Versuchsreihe 1 kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden. In dieser Versuchsreihe wurden naive Tiere mit elektrodenimplantierten Tieren verglichen. Da das Wühlverhalten aufgrund akuter Schmerzzustände reduziert sein kann (JIRKOF et al. 2010; WODARSKI et al. 2016), ist davon auszugehen, dass sich die Tiere sieben Tage nach dem operativen Eingriff soweit erholt hatten, dass sie zum einen keinen akuten Schmerz empfanden und zum anderen keine anhaltende Auswirkung der Prozeduren, die mit der Operation einhergingen, vorhanden waren. So wurde den Tieren perioperativ zweimal täglich eine Antibiose s.c. appliziert. Die Applikation selbst und das dadurch bedingte *Handling* schienen keinen Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere zu haben. Diese Annahme spiegelte sich auch im Nestbauverhalten wider, denn auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zur naiven Gruppe festgestellt werden. Zusätzlich zu diesen Verhaltenstests wurde noch der RGS beurteilt. Dabei zeigten sowohl die Tiere aus Versuchsreihe 1, als auch aus Versuchsreihe 2 postoperativ einen erhöhten Summenwert für den RGS. In Versuchsreihe 1 sank der Summenwert für den RGS bei den ausschließlich elektrodenimplantierten Tieren am vierten Tag nach der Operation wieder auf Basalwerte, während der Summenscore in Versuchsreihe 2 erst nach sechs Tagen wieder Basalwerte erreichte. Somit stellte der operative Eingriff durchaus einen transient schmerzhaften Eingriff dar. Darüber hinaus scheint die Implantation einer Elektrode zusammen mit einem Transmitter, den RGS betreffend, einen schwereren Eingriff darzustellen, als eine reine Elektrodenimplantation. Dieser Aspekt muss in die Abwägung miteinbezogen werden, inwiefern die Telemetrie eine *Refinement*-Maßnahme gegenüber der konventionellen Kabelableitung darstellen kann. Der RGS ist ein geeigneter Parameter, um akute Schmerzzustände beurteilen zu können (SOTOCINAL et al. 2011; LEUNG et al. 2016; AKINTOLA et al. 2017). Nachdem der Summenscore des RGS sich wieder auf die Basalwerte normalisierte, zeigten die Tiere keine Unterschiede mehr in den untersuchten Verhaltensparametern im Vergleich zur naiven Gruppe. In der vorliegenden Studie wurde der RGS einmal täglich durch eine Person beurteilt, die den Tieren vertraut war. Somit wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die Tiere mimisch den Schmerz zeigen würden, den sie empfanden (STASIAK et al. 2003). Obwohl alle Auswertungen in dieser Studie verblindet durchgeführt wurden, war die Verblindung speziell beim RGS durch das Implantat nur bedingt möglich. Für zukünftige Studien würde sich eine partiell automatisierte Form zur Auswertung des RGS empfehlen, wie sie beispielsweise von SOTOCINAL et al. (2011) durchgeführt wird. Um den Langzeiteinfluss der Elektrodenimplantation beurteilen zu können, wurden die Verhaltensparameter und die biochemischen Parameter berücksichtigt. Die Verhaltensparameter wurden dreizehn bis fünfzehn Wochen nach der Elektrodenimplantation erhoben, während die Proben zur Untersuchung der biochemischen Parameter in der dritten, siebten und sechzehnten Woche nach der Elektrodenimplantation gesammelt wurden. Obwohl in der vorliegenden Studie kein Langzeiteinfluss, bedingt durch die

Elektrodenimplantation auf das Verhalten beobachtet werden konnte, konnte im Kindling-Modell ein Langzeiteffekt der Implantation auf das angstassoziierte Verhalten nachgewiesen werden (MÖLLER et al. 2018). Bei den elektrodenimplantierten Tieren wurde ein reduziertes angstassoziiertes Verhalten im Elevated-Plus-Maze festgestellt. Sie hielten sich signifikant länger in den äußeren Dritteln der offenen Arme auf, im Vergleich zur naiven Gruppe. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei MÖLLER et al. (2018) die Elektrode in eine andere Hirnregion, die der basolateralen Amygdala, implantiert wurde. In der vorliegenden Studie war die Elektrode im Gyrus dentatus des Hippocampus lokalisiert. Die Amygdala wurde bereits in anderen Studien in Bezug auf ihre Schlüsselfunktion im Zusammenhang mit dem Angstverhalten untersucht (BASHIRI et al. 2016; SORREGOTTI et al. 2018). Durch die unterschiedliche Lokalisation der Elektroden lässt sich auch der unterschiedliche Langzeiteffekt der Elektrodenimplantation erklären. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass die Zeitpunkte der Untersuchungen in den beiden Studien voneinander abwichen. Im Kindling-Modell wurden die Untersuchung des angstassoziierten Verhaltens im Elevated-Plus-Maze fünf Wochen nach der Elektrodenimplantation, im chemischen Post-SE-Modell hingegen elf Wochen nach der Elektrodenimplantation durchgeführt. Die biochemischen Parameter ergaben keinen Hinweis auf eine erhöhte Belastung nach der Elektrodenimplantation.

- Induktion des Status epilepticus

Eine weitere versuchsbedingte Intervention, die zu einer Belastung der Tiere führen kann, ist die Induktion des SE. Das ursprüngliche Protokoll von TURSKI et al. (1983) unterlag zahlreichen Überarbeitungen, die allerdings vornehmlich auf die Reduktion der Mortalitätsrate abzielten und nicht zwangsläufig auf tierwohlsteigernde *Refinement*-Maßnahmen (LIDSTER et al. 2016). Deshalb war es essenziell diese Phase bezüglich der Belastung zu evaluieren. Dabei müssen im Rahmen der SE-Induktion einige Faktoren berücksichtigt werden. Diese Faktoren umfassen die Applikation des Lithiumchlorids (1), die Applikation des Methylscopolamins (2), die fraktionierte Pilocarpinapplikation (3), das Verbringen der Tiere in die Glasaquarien (4), die EEG-Ableitung (5), den 90 – minütigen SE (6), die Phase einer tiefen Sedation nach dem SE (7) und die mehrtägige Erholungsphase (8). Jede Applikation setzt das *Handling* der Tiere mit zusätzlichem Fixationsgriff voraus. Das Lithiumchlorid (1) wurde sowohl den elektrodenimplantierten (Versuchsreihe 1), als auch den elektroden- und transmitterimplantierten Sham-Tieren (Versuchsreihe 2) appliziert. Lithiumchlorid stellt eine reizende Substanz dar. Die Tiere zeigten nach Applikation ein ausgeprägtes Schmerzverhalten in Form von Lautäußerungen, Fluchtverhalten und einer autoauskultatorischen Haltung. Zudem konnte bei den Tieren ein schmerzbedingtes Pressen des Bauches auf den Käfigboden beobachtet werden. Trotz dieser starken Schmerzreaktion konnte am dritten Tag nach der Lithiumchloridapplikation keine Erhöhung der FCM im Kot der Sham-Gruppe

in beiden Versuchsreihen beobachtet werden. Somit scheint der akute Schmerz sich nicht auf die Aktivität der HPA-Achse auszuwirken. Ein weiterer Faktor, dem die elektroden-, bzw. elektroden- und transmitterimplantierten Tiere ausgesetzt waren, war der Aufenthalt über mehrere Stunden in den Glasaquarien (4). Die Tiere in der Gruppe der zukünftigen epileptischen Tiere erfuhren einen SE, der mit 90-minütigen Episoden von tonisch-klonischen Krämpfen einherging (6). Durch die langandauernde Krampfaktivität der Muskulatur, stellt der SE eine physisch belastende Situation dar (YOKOYAMA et al. 2016). Nach dem Abbruch des SE folgt die Phase einer tiefen Sedation (7). Hierbei müssen die Tiere intensiv überwacht und warmgehalten werden, um einer Hypothermie entgegenzuwirken. Währenddessen (6, 7) können die Tiere weder Futter noch Wasser selbstständig aufnehmen. Auch die Tage nach der Induktion des SE (8) gehen mit einer intensiven Überwachung und Pflege der Tiere einher; da sie auch dann nur bedingt in der Lage sind selbstständig Nahrung aufzunehmen. In der vorliegenden Studie konnten zwei Tage nach dem SE erhöhte FCM-Konzentrationen nachgewiesen werden. Diese Aktivierung der HPA-Achse kann unterschiedlicher Genese sein. Zum einen kann die Aktivierung durch einen akuten Stressor (BERRY et al. 2012; CARNEVALI et al. 2017), in diesem Fall der SE, erfolgen, zum anderen wurde bereits von O'TOOLE et al. (2014) eine anfallsbedingte Aktivierung der HPA-Achse beschrieben. Eine anfallsbedingte Dysregulation in der HPA-Achse kann eine unphysiologisch hohe Ausschüttung von Corticosteron zur Folge haben. Unter Berücksichtigung dieser pathologischen Dysregulation muss der FCM-Gehalt zwei Tage nach dem SE vorsichtig interpretiert werden, da die zugrundeliegende Ursache nicht klar differenziert werden kann. Es kann nicht klar unterschieden werden, inwiefern es sich tatsächlich um eine Stressantwort im Sinne einer erhöhten Belastung handelt. Der Aufenthalt in den Aquarien und der limitierte Zugang zu Futter und Wasser während des Versuchs bei den elektrodenimplantierten Tieren haben keine Aktivierung der HPA-Achse zwei Tage nach der experimentellen Prozedur zur Folge. Somit scheinen diese lediglich mildere Stressoren darzustellen und fallen bei der Belastungsbeurteilung nicht ins Gewicht. Der SE selbst (6) und die darauffolgenden Phasen der tiefen Sedation (7) stellen jedoch, wie bereits erwähnt, eine transientbelastende Situation für die Tiere dar. Obwohl die FCM im Kot zwei Tage nach der Induktion des SE erhöht sind, hält diese Aktivierung der HPA-Achse nicht länger an. So ist der FCM-Gehalt sieben Tage nach der Induktion des SE in Versuchsreihe 1 (elektrodenimplantiert, ohne Telemetriesender) bereits wieder normalisiert. Dieser Abfall der FCM-Konzentration sieben Tage nach dem SE könnte auch für die These sprechen, dass die erhöhte FCM-Ausscheidung mit der Anfallsaktivität einhergeht, denn eine Woche nach der Induktion des SE konnten keine Anfälle bei den Tieren beobachtet werden. Unmittelbar nachdem die Kotproben zur Untersuchung gesammelt wurden, wurde eine Woche nach der Induktion des SE auch das Wühlverhalten untersucht. Die Untersuchung des Wühlverhaltens wurde in der Literatur als Methode beschrieben, um schmerzhafte Zustände beurteilen zu können

(WODARSKI et al. 2016). In der vorliegenden Studie wurde das Wühlverhalten auch in Phasen untersucht, in denen die Tiere keinen Schmerzzuständen ausgesetzt waren. Zeigten die Tiere in diesen Phasen ein reduziertes Bestreben, dieses angeborene Verhalten auszuüben, mussten deshalb andere zugrunde liegenden Ursachen in Betracht gezogen werden. Somit diene diese Untersuchung nicht nur der Evaluierung von Schmerzen, sondern auch für andere Aspekte, die zu einem reduzierten Wühlverhalten führen können. Ein reduziertes Wühlverhalten wurde schon in Studien mit Depressionsmodellen untersucht (LUEDTKE et al. 2014). In der Studie von LUEDTKE et al. (2014) wurde der Parameter zur Untersuchung von Ermüdung und Ermattung herangezogen. Diese Symptome können Begleiterscheinungen darstellen, wie sie in Depressionspatienten beobachtet werden (LUEDTKE et al. 2014). In der vorliegenden Studie zeigten die Tiere eine Woche nach der Induktion des SE ein reduziertes Wühlverhalten. Dieser Effekt konnte auch in Versuchsreihe 2 bestätigt werden. Folglich geht die frühe Post-Insult-Phase mit einem reduzierten Bestreben der Tiere einher, dieses speziesspezifische Verhalten auszuüben. Die Untersuchung des Wühlverhaltens konnte in der frühen Post-Insult-Phase als sensitiver Parameter identifiziert werden. JIRKOF (2014) zieht einen Zusammenhang zwischen einem reduzierten Wühlverhalten und einer Reduktion des Wohlbefindens von Mäusen. Ein weiterer Parameter, der in der vorliegenden Studie untersucht wurde, war die Gewichtsentwicklung nach der Induktion des SE. Dadurch, dass die Tiere in den ersten Tagen nach der Induktion des SE nicht selbstständig Nahrung aufnahmen, wurden sie mit Babybrei gefüttert. Dennoch verloren sie in dieser Phase an Körpergewicht. In den projektspezifischen Beurteilungsbögen, die von der Regierung von Oberbayern im Rahmen der Genehmigung des Tierversuchsantrags verwendet werden, impliziert ein Gewichtsverlust von 20 % die Euthanasie der Tiere. Im Rahmen dieser Studie erreichte kein Tier in den Tagen nach dem SE die kritische 20 %-Grenze. Darüber hinaus legten die Tiere in der Versuchsreihe 1 (elektrodenimplantiert, kein Telemetriesender) nach zwei Tagen wieder Gewicht zu, sodass kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen mehr beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zu Versuchsreihe 2 (elektroden- und transmitterimplantiert), in der die Tiere erst nach zwei Wochen wieder ein vergleichbares Körpergewicht im Vergleich zur Sham-Gruppe erreichten. Möglicherweise stellt dies eine Auswirkung der aufwendigen Operation dar, deren Durchführung doppelt so lang andauerte, wie die reine Elektrodenimplantation bei Versuchsreihe 1. Für eine nachfolgende Studie wäre es deshalb von Interesse eine längere Erholungsphase nach der Operation einzuhalten, um überprüfen zu können, ob dies die Erholungsphase nach dem SE, zumindest in Hinblick auf den lang andauernden Gewichtsverlust, positiv beeinflussen kann. In der Versuchsreihe 2 wurden zusätzlich eine Woche nach der Induktion eines SE telemetrische Aufzeichnungen durchgeführt. Dabei konnte eine reduzierte HRV und eine erhöhte HF während der Aktiv- und Ruhephase beobachtet werden. Darüber hinaus waren die Tiere, die eine 90 – minütige tonisch-klonische

Krampfaktivität erfuhren, während der Ruhephase im Vergleich zur Kontrollgruppe hyperaktiv. Die Reduktion in der HRV und die Erhöhung der HF können molekulare Veränderungen am Myokard widerspiegeln, die im Zusammenhang mit dem SE stehen und weiter bis in die chronische Phase andauern (BREWSTER et al. 2016; LAI et al. 2018). Diese Änderungen auf molekularer Ebene sind auf die extrazelluläre, signalregulierte Kinase, die Proteinkinase A und die Kalzium<sup>2+</sup>/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II zurückzuführen. Beim Humanpatient mit Epilepsie kann häufig eine reduzierte HRV beobachtet werden (BAYSAL-KIRAC et al. 2017). Darüber hinaus wurde die Messung der HRV als Methode zur Evaluierung von Distress beschrieben (CAESAROVIC et al. 2011, LIPINSKI et al. 2017). Somit kann nicht klar differenziert werden, ob es sich bei der vorliegenden Studie um distressbedingte Abweichungen in der HRV oder um den direkten Einfluss der Umbauprozesse am Myokard durch die Epileptogenese handelt (LAI et al. 2018). Ein anderer Faktor, der in die Belastungsbeurteilung im Zusammenhang mit dem SE und der frühen Post-Insult-Phase berücksichtigt werden muss, ist die Mortalitätsrate. In der vorliegenden Studie betrug diese in beiden Versuchsreihen zusammengefasst 12,5 %. Die Höhe der Sterblichkeitsrate im Zusammenhang mit einem SE kann stark variieren. Diese Varianz ist abhängig von verschiedenen Faktoren, wie beispielsweise dem Protokoll zur Induktion des SE, dem verwendeten Rattenstamm und der Länge des SE (CURIA et al. 2008; LIDSTER et al. 2016). In der vorliegenden Studie verstarben die Tiere im Anschluss an den SE, nach der Applikation des Phenobarbitals und des Diazepam. Sie waren somit im Stadium einer tiefen Sedation, bedingt durch den Einfluss des Benzodiazepins und nahmen dadurch den Eintritt des Todes nicht bewusst wahr. In der Einstufung des Schweregrads nach der Richtlinie 2010/63/EU stellt ein Versuch mit der Eigenschaft „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ einen Eingriff dar, mit dem die niedrigste Belastungsschwere einhergeht. Unter Berücksichtigung dieser Einstufung und unter der Annahme, dass der Tod nicht das größte Übel für ein Individuum darstellt, ist der Tod im Rahmen des SE mit einer sehr geringen Belastung einzustufen. Nichtsdestotrotz muss die Mortalitätsrate bei der Abwägung, welches Post-SE-Modell für eine Studie verwendet wird, berücksichtigt werden. Im Sinne der 3R soll die Tierzahl, die für einen Tierversuch eingesetzt wird, so gering, wie nötig gehalten werden (*Reduction*). Mit erhöhten Mortalitätsraten und infolgedessen eingesetzten Reservetieren ist dies unter Umständen nur bedingt möglich.

- Video- und EEG-Monitoring

Eine weitere versuchsbedingte Prozedur stellt das Video- und EEG-Monitoring dar. Dieses Verfahren dient zur Validierung, ob die Tiere nach der Latenzphase spontane, wiederkehrende Anfälle zeigen. Dabei ist es essenziell die Anfälle sowohl durch die entsprechenden Verhaltensmuster, als auch im EEG zu bestätigen. Auch wenn die Erfolgsquote chronisch epileptische Tiere mittels des Pilocarpin-Modells zu generieren relativ hoch ist, muss es

dennoch mittels des Monitorings bestätigt werden (CURIA et al. 2008). Das Video- und EEG-Monitoring wurde in der vorliegenden Studie in Versuchsreihe 1 mit einer kabelgebundenen Ableitung durchgeführt. Dafür wurden die Tiere zwei Wochen in Glasaquarien gehalten und die Elektrode über eine Kabelverbindung mit einem Aufzeichnungsgerät verbunden, sodass eine kontinuierliche Überwachung des EEGs und des Videos möglich waren. Während dieser Aufzeichnung wurden die Tiere einer neuen Umgebung ausgesetzt, die folgende potenzielle Stressfaktoren umfasste: eine neue Einstreu für ein kontrastreicheres Bild (1), die Haltung in Glasaquarien, die von den Maßen der Heimkäfige abwichen (2), das Futter musste direkt am Boden der Glasaquarien angeboten werden, da keine Futterraufe angebracht werden konnte. Somit war eine Verunreinigung des Futters aufgrund von Exkrementen potenziell möglich (3), die Elektrode der Tiere wurde über ein Kabel verbunden (4), aufgrund der Videoaufzeichnung konnte den Tieren kein Nestmaterial angeboten werden (5). All diese Faktoren könnten tendenziell zu einer Belastungserhöhung der Tiere führen. Die neue und ungewohnte Haltung kann per se eine Stressreaktion induzieren (R. N. WALSH u. CUMMINS 1976). Obwohl die Kabelverbindung über eine freidrehende Einrichtung einen großen Bewegungsspielraum für die Tiere bot, so muss das zusätzliche Gewicht und die obwohl vorhandene, dennoch eingeschränkte Bewegungsfreiheit in diesem Zusammenhang berücksichtigt werden (LIDSTER et al. 2016). Anders verhielt es sich in der Versuchsreihe 2. Hier fand die Video- und EEG-Aufzeichnung in den Heimkäfigen statt, sodass die Faktoren (1) – (5) in diesem Versuchsaufbau nicht existierten. Der einzige zusätzliche potenzielle Stressfaktor, der aber als minimal zu bewerten ist, ist das An- und Ausschalten der Transmitter. Hierbei ist es aber nicht nötig die Tiere zu manipulieren, zumal der Magnet so stark ist, dass der Transmitter und somit das Tier nicht in direktem Kontakt zum Magneten kommen musste. Es war bereits möglich, die Telemetriesender aus einer Entfernung von einigen Zentimetern an- beziehungsweise auszuschalten. In Versuchsreihe 1 mussten die Tiere hingegen mehrfach manipuliert werden, da es wiederholt vorkam, dass die Tiere die Kabel durchgebissen hatten. Bei den chronisch epileptischen Tieren stellte die Manipulation im Zusammenhang mit der Fixation ein erhebliches Problem dar, da manche Tiere ein gesteigertes Aggressionsverhalten und eine gesteigerte Berührungsreaktion zeigten. Ein gesteigertes Aggressionsverhalten bei mit Pilocarpin behandelten Tieren wurde bereits von GRÖTICKE et al. (2007) beschrieben. Diese Faktoren fand sich auch in den Auswertungen des Irwin-Scores wieder. Um den Einfluss der Kabelableitung auf das Ausmaß der Belastung beurteilen zu können, wurden die verhaltensbiologischen und biochemischen Parameter in der chronischen Phase herangezogen. Diese Phase schloss sich nach der Video- und EEG-Aufzeichnung an. In der Interpretation wurde die naive Gruppe mit der elektrodenimplantierten Gruppe verglichen. Mittels der Ergebnisse der naiven Gruppe kann der Einfluss der Haltungsbedingung beurteilt werden. Die elektrodenimplantierte Gruppe dient dazu, den Einfluss der experimentellen Prozeduren zu beurteilen, inklusive der

Kabelableitung in den Glasaquarien. Exkludiert sind dabei die Induktion des SE und die Phasen der Epileptogenese und der wiederkehrenden Anfälle. Somit kann ein signifikanter Unterschied der untersuchten Parameter zwischen der naiven Gruppe und der elektrodenimplantierten Gruppe in der chronischen Phase eine mögliche Belastung in Bezug auf die Kabelableitung darstellen. Wenn zwischen der epileptischen Gruppe und der naiven Gruppe und zwischen der epileptischen Gruppe und der elektrodenimplantierten Sham-Gruppe ein signifikanter Unterschied besteht, ist davon auszugehen, dass sich dieser Effekt auf die wiederkehrenden Anfälle beziehungsweise auf die Epilepsieerkrankung bezieht. Der Faktor, der zu signifikanten Unterschieden zwischen der Sham-Gruppe beziehungsweise der naiven Gruppe und der Epilepsie-Gruppe führt, wobei die Kontrollgruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede aufweisen, ist der der Epilepsie und der damit assoziierten Anfälle. Bei der Auswertung der Ergebnisse zwischen den Gruppen konnte kein negativer Einfluss bedingt durch die Kabelableitung festgestellt werden. Allerdings konnte in Versuchsreihe 1 sowohl ein erhöhtes Nebennierengewicht und eine Erhöhung der FCM am Versuchsende festgestellt werden. Dies impliziert eine Aktivierung der HPA-Achse. In Versuchsreihe 2 (telemetrische Aufzeichnung des EEGs) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse würden die Arbeitshypothese stützen, dass durch die Kabelableitung eine stressbedingte Aktivierung der HPA-Achse induziert wurde. Wäre dies ausschließlich aufgrund der Anfälle geschehen, würde man das gleiche Ergebnis auch in Versuchsreihe 2 erwarten. Da das nicht der Fall war, würde das die These stützen, dass bedingt durch die kabelgebundene Ableitung eine Erhöhung des Stresses für die Tiere einhergeht. Darüber hinaus konnten auch mittels der PCA Parameter identifiziert werden, die zu einer Separierung der epileptischen Gruppen beider Versuchsreihen führte. Um eine aussagekräftige Antwort auf die Frage der Belastungserhöhung durch die Kabelableitung zu erlangen, hätte das Studiendesign der Versuchsreihe 2 dahingehend angepasst werden müssen, dass eine zweite Sham-Gruppe eingesetzt wird, die sowohl elektroden-, als auch transmitterimplantiert ist und das konventionellen EEG- und Video-Monitoring durchläuft, während die Aufzeichnung der anderen Sham-Gruppe im Heimkäfig durchgeführt wird. Dabei hätten die beiden Sham-Kontrollgruppen miteinander verglichen werden können. Zusätzlich zu den biochemischen und verhaltensbiologischen Parametern, die in der chronischen Phase erhoben wurden, wäre ein Vergleich der telemetrisch-ermittelten Daten möglich gewesen. Eine andere, tierzahlreduzierende und ressourcenschonende Variante stellt die FCM-Bestimmung während des Video- und EEG-Monitorings dar (LEPSCHY et al. 2007). Darüber hinaus hätte, ohne das Monitoring in Bezug auf die Qualität der Daten zu beeinflussen, der Saccharin-Präferenz-Test während der Aufzeichnung durchgeführt werden können (KLEIN et al. 2015). Die anderen verhaltensbiologischen Parameter wären nur bedingt für die Evaluierung der Belastung durch die Kabelableitung während des Monitorings geeignet, da die Datenaufzeichnung für die Durchführung der Tests unterbrochen

werden müsste.

- Blutentnahme

Das Corticosteron im Serum hat eine Halbwertszeit von ca. 10-30 min (LONG u. ULRICH 1956). Somit muss man das Studiendesign dahingehend anpassen, dass während eines konkreten Zeitintervalls zu einem potenziell stress-induzierenden Zeitpunkt, die Blutentnahme erfolgt. Erst dann lässt sich eine Aussage über den Stressor und die damit assoziierte Aktivierung der HPA-Achse treffen. In der vorliegenden Studie fand die Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus statt. Dabei wurden die Tiere in eine kurze Isofluran-Inhalationsnarkose versetzt. Die Narkose selbst, scheint bei Ratten, die eine gesunde Physiologie zeigen, keinen negativen Einfluss auf das Wohlbefinden zu haben (A. L. MILLER et al. 2016). Wird während der Narkose allerdings zusätzlich retrobulbär Blut entnommen, können die Tiere ein erhöhtes Angstverhalten in diversen Verhaltenstests zeigen (HARIKRISHNAN et al. 2018). Um den Stress durch die Blutentnahme so gering, wie möglich zu halten, wurde im Studiendesign deshalb ausschließlich das Versuchsende zur Probenentnahme festgelegt. In Versuchsreihe 1 konnten erhöhte Corticosteronkonzentrationen im Serum der naiven Tiere beobachtet werden. Somit konnte die Blutentnahme auch in dieser Studie als potenzieller Stressor identifiziert werden. Laut der Empfehlung der GV-SOLAS wird die einmalige Blutentnahme über den retrobulbären Venenplexus mit einer geringen-mäßigen Belastung eingestuft. Anhand der vorliegenden Studie gab es keine Indizien, die diese Belastungseinstufung widerlegen würden. Im Rahmen der Belastungseinstufung in dieser Studie muss dieser invasive Eingriff ebenso berücksichtigt werden.

## 2. Belastungseinschätzung in der Latenzphase

- Einfluss auf das Heimkäfigverhalten

Die Latenzphase stellt die Phase der Epileptogenese dar. Das Ende dieser Phase ist durch den Beginn spontaner, wiederkehrender Anfälle geprägt (CURIA et al. 2008). Während der Latenzphase zeigten die Tiere, bis auf wenige Ausnahmen (Versuchsreihe 2 (elektroden- und transmitterimplantiert) in den Wochen zwei und sechs nach SE-Induktion) keine signifikante Reduktion des Nestbauverhaltens. Beim *Level-of-Soiling* hingegen konnten während der dritten Woche nach dem SE eine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Während die darauffolgenden Wochen weiterhin unauffällig waren, tritt dieses Phänomen erneut in der siebten Woche nach dem SE auf. In der vorliegenden Studie findet das EEG- und Videomonitoring in der achten Woche nach dem SE statt, weil davon ausgegangen werden kann, dass sich in dieser Phase alle Tiere in der chronischen Phase befinden (GLIEN et al. 2001; CURIA et al. 2008). Das reduzierte Bestreben den Nestbereich vom Kotbereich zu trennen, könnte ein Indiz dafür sein, dass die Tiere keine Bemühung in dieses nicht-

essenzielle Verhalten investieren möchten. Wie bereits in der Literatur beschrieben kann davon ausgegangen werden, dass bei einem reduzierten Wohlbefinden zuerst nicht-essenzielle Verhaltensmuster eingestellt werden (BOISSY et al. 2007; JIRKOF 2014). Das nicht-essenzielle Verhalten dient nicht primär dem Lebenserhalt und wird erst dann gezeigt, wenn der Lebenserhalt gesichert ist. Den Kotbereich vom Nestbereich zu separieren kann dieser Kategorie des nicht-essenziellen Verhaltens zugeordnet werden.

- Varianz der Latenzphase

Vier der elf Tiere aus der Versuchsreihe 2 zeigten bereits vier Wochen nach dem SE während der telemetrischen Aufzeichnung spontane Anfälle. Die Dauer der Latenzphase im Pilocarpin-Modell kann durchaus stark variieren, wie bereits von CURIA et al. (2008) in einem vergleichenden Übersichtsartikel basierend auf den Ergebnissen verschiedener Studien, beschrieben wurde. Obwohl der SE in der zugrundeliegenden Studie bei allen Tieren in gleicher Weise induziert, beziehungsweise abgebrochen wurde, konnte diese Varianz im Einsetzen der chronischen Phase auch hier festgestellt werden. Somit kann man im Pilocarpin-Modell eigentlich nur bedingt von einer Latenzphase sprechen. Obwohl die Nomenklatur in der vorliegenden Studie so beibehalten wurde, muss dieser Umstand berücksichtigt werden.

- Untersuchung des Wühlverhaltens

Wie zuvor erwähnt, dient die Untersuchung des Wühlverhaltens als Methode, um schmerzhafte Zustände beurteilen zu können (JIRKOF et al. 2010; WODARSKI et al. 2016). Darüber hinaus kann es aber auch als Parameter zur Evaluierung einer Reduktion des Wohlbefindens bei Labornagern dienen (JIRKOF 2014). Die Latenzphase spiegelt keine Phase wider, die mit Schmerzen einhergeht. Dennoch war das Wühlverhalten sowohl in Versuchsreihe 1, als auch in Versuchsreihe 2 reduziert. Die Tiere, die einen SE erfuhren, beförderten signifikant weniger Kies aus der Röhre im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Allerdings war die FCM-Konzentration im Kot, unmittelbar bevor der Verhaltenstest durchgeführt wurde, nicht erhöht. In diesem Zusammenhang lässt sich daraus schließen, dass die Tiere sehr wohl ein reduziertes Wohlbefinden aufwiesen, auch wenn dieses nicht schmerzbedingt zu sein schien. Eine Reduktion des Wühlverhaltens im Pilocarpin-Modell konnte bereits von DI LIBERTO et al. (2018) festgestellt werden. STREKALOVA u. STEINBUSCH (2010) untersuchten in einer Studie bei Mäusen ein stressinduziertes anhedonie-ähnliches Verhalten. In dieser Studie konnte ebenfalls ein reduziertes Wühlverhalten bei den Tieren beobachtet werden. Die Ergebnisse aus der Literatur und die der vorliegenden Studie lassen darauf schließen, dass die Untersuchung des Wühlverhaltens dazu dienen kann ein reduziertes Wohlbefinden, das nicht schmerzbedingt ist, mittels dieses Tests untersuchen zu können. Die Interpretation der einzelnen Parameter setzt voraus, sie im Kontext zu betrachten. Die

HPA-Achse wurde während der Latenzphase nicht aktiviert, zumindest lassen die unveränderten FCM-Konzentrationen darauf schließen. Diese Ergebnisse geben ein Indiz dafür, dass die Belastung der Tiere in dieser Phase eher gering zu sein scheint. Diese Vermutung wird auch dadurch gestützt, dass die Tiere, die am schlechtesten in dieser Verhaltensuntersuchung abschneiden, diejenigen sind, die sich bereits in der chronischen Phase befinden. In Versuchsreihe 2 fand unmittelbar vor der Untersuchung des Wühlverhaltens eine 48 – stündige, telemetrische Aufzeichnung statt. Dabei zeigten vier von elf Tieren bereits während dieser Phase spontane Anfälle. Ein frühzeitiges Monitoring der Tiere, vornehmlich mittels der Telemetrie, könnte dazu dienen, Tiere früher zu erfassen, die bereits in der chronischen Phase sind. Dies könnte die Versuchsdauer verkürzen und die andauernde Belastung, bedingt durch die Epilepsie und die damit assoziierten Anfälle, reduzieren.

- Auswirkung auf die HRV

Während der telemetrischen Aufzeichnung in der späten Latenzphase, wurde ebenfalls das EKG ausgewertet. Dabei war die SDNN, ein Parameter der HRV, reduziert. Außerdem war die Herzfrequenz erhöht. Diese Parameter waren bereits in der vorherigen Aufzeichnung, eine Woche nach dem SE in gleichem Maße verändert. Die Aktivität war ebenfalls, wie zum vorherigen Zeitpunkt, während der Dunkelphase erhöht. Die Veränderungen, die sich aus der EKG-Auswertung ergaben, bestätigen die These, dass die Umbauprozesse am Myokard, die mit dem SE einhergehen, nicht von transienter Natur sind und auch während der späten Latenzphase erhalten bleiben (LAI et al. 2018). Wie bereits erwähnt kann eine Reduktion der HRV auch als Marker für Distress interpretiert werden (CAESAROVIC et al. 2011, LIPINSKI et al. 2017). Im Gegensatz zu den verhaltensbiologischen und biochemischen Parametern, die während der späten Latenzphase nicht verändert waren, scheinen die telemetrisch ermittelten Daten daher sensitiver zu sein. Obwohl die Tiere weder ein verändertes Verhalten, noch eine Aktivierung der HPA-Achse aufwiesen, so zeigen sie dennoch pathophysiologische Veränderungen, die ohne die Telemetrie nicht hätten beobachtet werden können. Interpretiert man die Reduktion der HRV als Parameter für Distress, so geht mit der späten Latenzphase durchaus eine geringe Belastung der Tiere einher. Dies könnte sich auch darauf zurückführen lassen, dass für einige Tiere bereits zu diesem Zeitpunkt die chronische Phase begonnen hat. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Versuchsreihe 2 nicht noch mehr, als die erwähnten Tiere, bereits spontane Anfälle zeigen, nur weil die Tiere während der 48-stündigen Aufzeichnung keine Anfälle zeigten. Dadurch wird die Notwendigkeit offensichtlich, das Studiendesign dahingehend anzupassen, dass die chronische Phase so kurz wie nötig gehalten wird. Hierdurch kann die kumulative Belastung für die Tiere reduziert werden. Diese Heterogenität induziert eine Subgruppierung in (1) Tiere mit spontanen Anfällen und (2) Tiere ohne spontane Anfälle.

- Prädiktiver Wert der untersuchten Parameter bezüglich der Anfallsfrequenz in der chronischen Phase

Obwohl die Erfolgsquote epileptische Tiere zu generieren, im Pilocarpin-Modell relativ hoch ist (CURIA et al. 2008), so wäre es dennoch wünschenswert, mittels geeigneter Parameter, diese Tiere zu einem frühen Zeitpunkt von den zukünftig nicht-epileptischen Tieren unterscheiden zu können. Somit könnten diejenigen Tiere zu einem früheren Zeitpunkt aus einer Studie exkludiert werden, die auch im weiteren Verlauf keine spontanen Anfälle zeigen werden. Folglich wären diese Tiere nicht den weiteren versuchsbedingten Prozeduren ausgesetzt, wodurch eine Reduktion der Belastung der Tiere erzielt werden könnte. Dies könnte eine *Refinement*-Maßnahme im Sinne der 3R darstellen. Darüber hinaus hätte dies auch ressourcensparende Aspekte für die versuchsdurchführenden Einrichtungen. Die Kosten, die durch die Haltung der Tiere entstehen, könnten dadurch reduziert werden. Einen Überblick über diese Parameter gibt die Korrelationsmatrix. Es korrelierten durchaus einige der Parameter stark mit der Anfallsfrequenz in der chronischen Phase, die bereits während der frühen Post-Insult- beziehungsweise während der Latenzphase untersucht wurden. Diese Parameter waren in der Versuchsreihe 1 zum Beispiel die FCM-Konzentration eine Woche nach dem SE, die mit der Anfallsfrequenz in der chronischen Phase korrelierte. Dieses Ergebnis konnte auch in Versuchsreihe 2 erzielt werden. Die Veränderungen der Parameter, die in der frühen Post-Insult-Phase verändert sind, stellen Auswirkungen des SE dar. Ein Zusammenhang zwischen dem initialen SE und der Länge der Latenzphase beziehungsweise der Anfallsfrequenz in der chronischen Phase wurde bereits in der Literatur beschrieben (BIAGINI et al. 2006; GOFFIN et al. 2007).

Eine andere, interessante Korrelation ist die zwischen der Anfallsfrequenz und dem Wühlverhalten nach der Operation. So wühlten die Tiere mit frequenten Anfällen bereits vor dem initialen SE weniger Kies aus der Versuchsapparatur. Dies könnte einen Zusammenhang zwischen der postoperativen Erholungsphase und der späten Auswirkung des SE darstellen. In der Versuchsreihe 2 flossen auch die telemetrisch ermittelten Daten in diese Korrelationsmatrix mit ein. Dabei konnte eine Korrelation der Anfallsfrequenz und des RMSSD eine und vier Wochen nach dem SE festgestellt werden. Darüber hinaus bestand eine Korrelation des SDNN während der Ruhephase eine und vier Wochen nach dem SE mit der Anfallsfrequenz. Anhand der erhobenen Daten, hätte man retrospektiv durchaus Tiere selektieren können, die zukünftig frequente Anfälle aufweisen würden.

Die Untersuchung der Belastung in der Latenzphase lässt die abschließende Bewertung zu, dass die Belastung durchaus geringer ist, im Vergleich zu der frühen Post-Insult- oder der chronischen Phase. Deshalb ist es wichtig die Phasen genau zu definieren und dadurch den Übergang in die chronische Phase frühzeitig feststellen zu können, um die Belastung der Tiere auf ein Minimum zu reduzieren. Außerdem würde es einen umfangreicheren

Einblick ermöglichen, wenn weitere Parameter in dieser Phase untersucht werden würden. So könnte die Saccharin-Präferenz auch hier ermittelt und beurteilt werden. Dieser Parameter eignet sich insofern für eine weitere Untersuchung in der Latenzphase, da er sich in der chronischen Phase bereits als sensitiv erwies und weil er ohne die Tiere zusätzlichem Stress auszusetzen, im Heimkäfig untersucht werden kann (KLEIN et al. 2015). Möglicherweise stellt dieser ebenfalls einen hoch-korrelierenden Parameter für die spätere Anfallsfrequenz dar. Zur abschließenden Beurteilung der Belastung in der Latenzphase, scheint das Wühlverhalten und die Untersuchung der HF und der SDNN sensitive Parameter darzustellen, die im Vergleich zur FCM-Konzentration Abweichungen aufwiesen.

### 3. Belastungseinschätzung in der chronischen Phase

- Nestbauverhalten

Die chronische Phase wird durch das Einsetzen der spontanen Anfälle definiert. Zur Belastungseinschätzung während dieser Phase wurden sowohl Verhaltensparameter und biochemische Parameter, als auch telemetrisch ermittelte Parameter untersucht. Dabei konnte im Heimkäfigverhalten in dieser Phase ein reduziertes Nestbauverhalten in der Versuchsserie 2 beobachtet werden. Dadurch, dass es sich beim Nestbauverhalten um kein essenzielles Verhalten handelt, sondern um das sogenannte *Luxury Behavior*, interpretiert JIRKOF (2014) ein reduziertes Nestbauverhalten im Zusammenhang mit einer Laparotomie und mit einer Transmitterimplantation als schmerzbedingtes reduziertes Nestbauverhalten. In der Literatur wird das Nestbauverhalten bei Labornagern analog dazu als Indikator für Wohlbefinden beschrieben (GASKILL et al. 2013; JIRKOF et al. 2013a). In dieser Studie wurde das Nestbauverhalten ebenfalls untersucht und überprüft, ob es sich auch im chemischen Post-SE-Modell als sensitiver Parameter erweist. Im Anschluss muss die Qualität dieses Parameters bezüglich der Aussagekraft über die Reduktion im Wohlbefinden der Tiere evaluiert werden. Essenziell ist auch bei diesem Verhaltensparameter, dass er im Zusammenhang interpretiert werden muss. Die Beurteilung der Nestkomplexität stellt die Beurteilung einer Momentaufnahme dar, die von diversen Störfaktoren insofern beeinflusst werden kann, dass durch eine nachträgliche Zerstörung des Nests andere Scores erzielt werden, die somit nicht das tatsächliche Nestbauverhalten widerspiegeln. Als möglicher Störfaktor in der chronischen Phase muss der spontane Anfall selbst genannt werden. Durch die Momentaufnahme kann nicht mehr rückwirkend beurteilt werden, ob die Tiere zuvor ein komplexes Nest gebaut und es danach während des Anfalls zerstört haben oder, ob überhaupt kein komplexes Nest vorhanden war. Diese Schwierigkeit in der Differenzierung limitiert die Aussagekraft der Beurteilung der Nestkomplexität, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass trotz zerstörtem Nest, nicht doch ein speziestypisches Nestbauverhalten von den Tieren betrieben wurde.

- Wühlverhalten

Ein anderer Parameter der zu den nicht-essenziellen Verhaltensmustern zählt, ist das Wühlverhalten. Dieses war in der chronischen Phase bei beiden Versuchsreihen, also sowohl bei den kabelabgeleiteten, als auch bei den telemetrisch abgeleiteten Tieren reduziert. Somit stellt das Wühlverhalten sowohl in der frühen Post-Insult-Phase, als auch in der Latenz- und in der chronischen Phase einen sensitiven Parameter dar. Somit scheint sowohl der Einfluss des SE, als auch die Epileptogenese und die Manifestation der Epilepsieerkrankung mit den spontanen Anfällen einen Einfluss auf das Wühlverhalten der Tiere zu haben.

- Aktivität im Heimkäfigverhalten

Ein anderer untersuchter Parameter der Versuchsreihe 2, der sowohl während der Latenzphase und der frühen Post-Insult-Phase, als auch während der chronischen Phase verändert war, war die Aktivität. Diese war zu allen Zeitpunkten während der Dunkelphase im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Eine beschriebene Komorbidität, die mit der Epilepsieerkrankung einhergehen kann, ist das ADHS (TAN u. APPLETON 2005; PINEDA et al. 2014; WANG et al. 2016). ADHS-ähnliches Verhalten wurde bereits in der chronischen Phase des Pilocarpin-Modells beschrieben (PINEDA et al. 2014; SULEYMANOVA et al. 2016). Obwohl ADHS zunächst nur mit der Hyperaktivität diskutiert wird, soll darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Interpretation des Aufmerksamkeitsdefizit nachfolgend vertieft wird. Zusammen mit ADHS-ähnlichem Verhalten, können die komorbidität-bedingten Verhaltensänderungen mit einer Belastungserhöhung für die Tiere einhergehen. Denn es sollte davon ausgegangen werden, dass die veränderten Verhaltensmuster, wie beispielsweise ein anhedonie-ähnliches Verhalten oder ein reduziertes *Luxury Behavior* bedingt sind durch ein reduziertes Wohlbefinden. Deshalb sollte auch durch das Auftreten dieses ADHS-ähnlichen Verhaltens eine potenziell erhöhte Belastung in Betracht gezogen werden. Die gesteigerte Aktivität der Versuchsratten ist nicht nur im Heimkäfig, sondern auch im Open-Field zu beobachten. Hier zeigten sowohl die Tiere aus der Versuchsreihe 1 (kabelabgeleitetes EEG), als auch die Tiere aus der Versuchsreihe 2 (telemetrisch abgeleitetes EEG) eine reduzierte Frequenz der Immobilität. Bei an ADHS erkrankten Kindern wurde bereits beschrieben, dass die Komorbidität des ADHS bei den Betroffenen zu einer Reduktion der Lebensqualität führen kann (EKINCI et al. 2017). Die Übertragbarkeit dieser Belastungseinstufung vom Menschen auf das Versuchstier unterliegt jedoch wieder Limitationen, da die Belastung des Humanpatienten vornehmlich auf konfliktreichen sozialen Interaktionen beruhen kann. Inwiefern das bei Ratten ebenfalls zu Problemen im Sozialverband und dadurch bedingt zu einer Erhöhung der Belastung führen kann, bleibt somit unklar.

- Saccharin-Präferenz-Test

Die Belastung der Tiere während der chronischen Phase kann weiter durch den reduzierten Saccharinkonsum evaluiert werden. In einer Studie von TANG et al. (2016) konnte gezeigt werden, dass Ratten, bei denen eine Depression durch hippocampale Inflammation induziert wurde, einen reduzierten Saccharinkonsum aufwiesen. Im Zusammenhang mit dem Pilocarpin-Modell bei Ratten konnte eine Veränderung des Konsumverhaltens von Saccharin auch von DI LIBERTO et al. (2018) festgestellt werden. In der vorliegenden Studie konnte der Saccharin-Präferenztest in Versuchsreihe 1 (kabelabgeleitetes EEG) ebenfalls als sensitiver Parameter identifiziert werden. Die Tiere aus der Versuchsreihe 1, die einen SE erfahren hatten, konsumierten signifikant weniger Saccharinlösung, als die Kontrollgruppen. Da ein anhedonie-ähnliches Verhalten, als Teilaspekt einer Depressionserkrankung, als Marker für reduziertes Wohlbefinden gedeutet werden muss (KLEIN et al. 2015), kann in der vorliegenden Studie, zusammen mit den anderen negativ beeinflussten Parametern von einer erhöhten Belastung der Tiere ausgegangen werden. Das anhedonie-ähnliche Verhalten konnte in der Versuchsreihe 2 allerdings nicht beobachtet werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse beider Versuchsreihen bezüglich des Saccharin-Konsums könnte auch durch die Unterschiede im Video- und EEG-Monitoring bedingt sein. Die Tiere, die einer Kabelableitung in den Aquarien ausgesetzt waren, wiesen die Reduktion im Saccharinkonsum auf, während die Tiere, die kabellos im Heimkäfig abgeleitet wurden, keine Reduktion des Saccharinkonsums zeigten.

- Soziale Interaktionen

Wie Eingangs in der Literaturübersicht erwähnt, sind Ratten sehr soziale Tiere, die das Leben in sozialen Verbänden bevorzugen (MACDONALD et al. 1999). Dieses Verhalten bezüglich der Interaktion mit einem Sozialpartner wurde in der chronischen Phase untersucht. Bei den Tieren mit spontanen Anfällen konnte eine signifikante Reduktion des Sozialverhaltens gegenüber Artgenossen beobachtet werden. Sie zeigten weniger Spielverhalten miteinander und ein reduziertes gegenseitiges Putzverhalten. Das Vermeidungsverhalten bezüglich sozialer Interaktionen von Epilepsiepatienten wurde bereits in der Literatur diskutiert (SCHULZE-BONHAGE u. KÜHN 2008). Dabei wird beschrieben, dass sich die Patienten aufgrund von stressvollen, unangenehmen Situationen aus dem sozialen Miteinander zurückziehen. In diesem Zusammenhang sei wieder auf die Limitation der Übertragbarkeit der Belastung vom Humanpatienten auf das Versuchstier hingewiesen. Allerdings konnte INOSTROZA et al. (2012) bei Ratten, die einen pilocarpin-induzierten SE erfahren, ebenfalls eine Reduktion der sozialen Interaktion beobachten. Dieses reduzierte Bestreben mit einem Sozialpartner zu interagieren ging mit erhöhten Corticosteronkonzentrationen im Serum einher. Auch in der vorliegenden Studie ging die Reduktion der sozialen Interaktionen mit einer Aktivierung der HPA-Achse einher. In Depressionsmodellen konnten

ebenfalls, je nach Stressor, Reduktionen im sozialen Verhalten zu Artgenossen beobachtet werden (CARNEVALI et al. 2017). Daher könnte das reduzierte Sozialverhalten als depressionsähnliches Verhalten interpretiert werden. In einem anderen Interpretationsansatz könnte das Sozialverhalten der Kategorie des *Luxury Behavior* zugeordnet werden. Auch hier handelt es sich um speziebedingtes Verhalten, das aber nicht primär dem Lebenserhalt dient. Somit könnte ein weniger ausgeprägtes Sozialverhalten, ähnlich dem Nestbau- und Wühlverhalten, einen Parameter für reduziertes Wohlbefinden darstellen, weil die Tiere sich nicht mehr an sozialen Interaktionen erfreuen können.

- Langfristige Aktivierung der HPA-Achse

Ein weiterer Parameter, der während der chronischen Phase verändert war, war der FCM-Gehalt im Kot. Dieser war in der Versuchsreihe 1 signifikant erhöht. Diese Aktivierung der HPA-Achse könnte, wie zuvor beschrieben, durch die akut auftretenden, spontanen Anfälle bedingt sein (WULSIN et al. 2018) oder als Antwort auf einen Stressor. Die erhöhten FCM-Konzentrationen im Kot gingen mit einem Anstieg des Gewichts der Nebennieren einher. Somit kann bestätigt werden, dass es sich um eine langfristige Aktivierung der HPA-Achse handelte, da die Nebenniere bereits hypertrophierte – eine Reaktion auf eine chronisch erhöhte, funktionelle Beanspruchung der Nebenniere. Zusätzlich konnte ein Trend im Corticosterongehalt der Haare bei den epileptischen Tieren festgestellt werden. Leider kann nicht differenziert werden, ob die Aktivierung der HPA-Achse stressbedingt ist und deshalb mit einer erhöhten Belastung einhergeht. Berücksichtigt werden muss, dass die FCM-Gehalte während der Latenzphase in der Versuchsreihe 1 nicht erhöht waren. Dadurch, dass die Aktivierung der HPA-Achse im Zusammenhang mit Anfällen steht (WULSIN et al. 2018), könnte das erklären, warum die FCM-Gehalte während der Latenzphase nicht erhöht sind. Da aber, wie zuvor erwähnt, die Latenzphase im Pilocarpin-Modell stark variieren kann und in Versuchsreihe 1 kein Video- und EEG-Monitoring in der vierten Woche nach dem SE stattfand, lässt sich nicht belegen, ob die Tiere in dieser Phase schon spontane Anfälle hatten. Dadurch, dass die Latenzphase eine Phase mit geringerer Belastung dazustellen scheint, könnten die Ergebnisse auch darauf hindeuten, dass kein Stressor vorlag und in diesem Zusammenhang auch die Belastung nicht erhöht war. Schlussfolgernd kann der FCM-Gehalt als sensibler Parameter bestätigt werden, die Aussagekraft bezüglich des Stresses und nachfolgend der Belastung sind limitiert. Zusätzlich muss die Einschränkung berücksichtigt werden, dass selbst wenn die HPA-Achsen-Aktivierung stressbedingt ist, man nicht zwischen der Qualität des auslösenden Stressfaktors unterscheiden kann bezüglich Eustress und Distress (NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON u. ALLEVIATION OF DISTRESS IN LABORATORY 2008).

- Kurzfristige Aktivierung der HPA-Achse im Zusammenhang mit angstassoziiertem Verhalten

Am selben Tag, an dem die Kotproben gesammelt wurden, wurde auch mittels der retrobulbären Blutentnahme Serum gewonnen, das unter anderem dazu diente, die Corticosteronkonzentration zu bestimmen. Dabei wies die naive Gruppe einen signifikant erhöhten Corticosterongehalt im Vergleich zur kabelabgeleiteten Epilepsie-Gruppe auf. Faktoren, die eine Stressantwort induzieren könnten und mit der Probengewinnung einhergehen, könnten der Transport der Tiere in das entsprechende Labor sein (1), die kurze Isoflurannarkose inklusive der Einleitung in einer kleinen zylindrischen Kammer (2) und die Punktion des retrobulbären Venenplexus selbst (3). In der Literatur wurde die Isoflurannarkose als potenzieller Stressor untersucht (A. L. MILLER et al. 2016; HOHLBAUM et al. 2017). Dabei wurde ebenfalls Corticosteron im Blut der Tiere bestimmt. Anhand dieser Studie fand man heraus, dass die Isoflurannarkose selbst, ohne invasiven Eingriff, keine Auswirkung auf die Aktivierung der HPA-Achse hat. Je nach Blutentnahmetechnik variiert die Corticosteronausschüttung (HARIKRISHNAN et al. 2018). Anhand der Studie wurde festgestellt, dass die Ratten eine Punktion der Schwanzvene oder der Vena sublingualis besser tolerieren, als die Punktion des retrobulbären Venenplexus. Die in der vorliegenden Studie festgestellten erhöhten Corticosteronkonzentrationen im Serum der naiven Tiere im Vergleich zu den epileptischen, könnten dadurch bedingt sein, dass die Tiere in das Labor verbracht wurden (1). Obwohl es für alle Tiere der gleiche Stressor ist, könnte die Stressantwort jedoch eine andere sein. Auch wenn die epileptischen Tiere im Elevated-Plus-Maze und in der Black-White-Box kein reduziertes angstassoziiertes Verhalten zeigten, so konnte eine Reduktion im risikobeurteilenden Verhalten festgestellt werden (DUARTE et al. 2013). Dies bezog sich im Elevated-Plus-Maze auf eine Reduktion der *Head Dips*. Dieses Verhaltensmuster beschreibt, wenn die Tiere sich an den offenen Armen weit über den Steg hinauslehnen. In dieser Situation wägen sie ab, ob sie das Risiko eingehen, in die Tiefe zu springen. Die epileptischen Tiere zeigten dieses Verhalten weniger ausgeprägt im Vergleich zur naiven Gruppe und sprangen stattdessen vermehrt, ohne diese Risikoabwägung durchzuführen, vom Elevated-Plus-Maze. In der Black-White-Box kann das risikobeurteilende Verhalten durch die Frequenz der *Stretching Postures* beurteilt werden. Dabei bleiben die Tiere mit den Hinterläufen im dunklen Kompartiment stehen, während sie sich mit dem kranialen Körperabschnitt in das helle und aversive Kompartiment wagen. Dabei wägen sie auch hier ab, ob sie das Risiko eingehen, in den helle, weniger geschützten Bereich zu gehen. Die epileptischen Tiere beider Versuchsreihen zeigten hier eine Reduktion der *Stretching Postures*. Diese Reduktion in der Risikobeurteilung und das anstelle davon gezeigte Verhalten, vor allem im Elevated-Plus-Maze, lässt darauf schließen, dass die Tiere mögliche risikoreiche Situationen, beziehungsweise ihre Umgebung, nicht mehr aufmerksam wahrnehmen und potenzielle Gefahren nicht mehr adäquat einschätzen können. Dies könnte auch beim Verbringen in die weniger bekannte Umgebung der Fall gewesen sein.

In der Literatur wurde im Pilocarpin-Modell zuvor beschrieben, dass die Tiere Veränderungen im angstassoziierten Verhalten zeigten. Allerdings sind die Ergebnisse von Studie zu Studie nicht immer kongruent. So wurde in einigen Versuchen beobachtet, dass die Tiere ein reduziertes angstassoziiertes Verhalten (MÜLLER et al. 2009; DUARTE et al. 2013; GU et al. 2017) oder ein erhöhtes angstassoziiertes Verhalten zeigten (DETOUR et al. 2005; PINEDA et al. 2014). In der vorliegenden Studie konnte weder im Elevated-Plus-Maze, noch in der Black-White-Box eine Veränderung im Angstverhalten beobachtet werden. Dieses Ergebnis belegt die Annahme, die sich aus dem Open-Field und aus der Untersuchung der Aktivität im Heimkäfigverhalten, ergibt. Durch das Open-Field werden die Tiere in eine konfliktreiche Situation verbracht. Auf der einen Seite zeigen sie speziebedingt ein großes Interesse an der Erkundung unbekannter Umgebungen, andererseits kann die neue und unbekannte Umgebung auch eine Stresssituation darstellen. Bedingt durch diese Stresssituation können die Tiere dazu neigen, sich vermehrt ängstlich zu verhalten (PRUT u. BELZUNG 2003). In der vorliegenden Studie überwiegt bei den epileptischen Tieren die erkundungsbedingte Aktivität im Gegensatz zum angstassoziierten Verhalten. Dieses Ungleichgewicht, das zugunsten der Hyperaktivität verschoben ist, könnte wieder die Ausprägung der Komorbidität des ADHS widerspiegeln.

- EKG

Die EKG-Auswertung in dieser Phase hat ähnliche Veränderung der epileptischen Gruppe gezeigt, wie in der frühen Post-Insult-Phase und in der Latenzphase. In Anbetracht der Tatsache, dass die Veränderungen am Myokard nicht reversibel sind, war dieses Ergebnis allerdings zu erwarten (LAI et al. 2018). Somit stellen die HF und die SDNN durchaus sensible Parameter dar, die allerdings während aller Zeitpunkte verändert sind. Die Differenzierung inwiefern eine reduzierte HRV tatsächlich ein Marker für Distress und ein reduziertes Wohlbefinden darstellt, ist aufgrund der zuvor aufgeführten Argumente limitiert.

- Zusammenhang zwischen den untersuchten Parametern und der Anfallsfrequenz in der chronischen Phase

Auch wenn in der vorliegenden Studie keine manifeste Erhöhung der Belastung durch die Kabelableitung festgestellt werden konnte, so ist trotzdem nicht auszuschließen, dass diese vorhanden sein könnte (LIDSTER et al. 2016). Somit wäre es theoretisch von großem Interesse, Parameter zu bestimmen, mithilfe derer man das Video- und EEG-Monitoring verkürzen könnte. Dabei muss berücksichtigt werden, dass eine zweiwöchige Phase des Monitorings bereits relativ kurz ist. Im Pilocarpin-Modell können die spontanen Anfälle in Clustern auftreten (ARIDA et al. 1999; GOFFIN et al. 2007). Nach GOFFIN et al. (2007) treten diese Cluster alle fünf bis acht Tage auf, wohingegen ARIDA et al. (1999) sogar noch größere Intervalle zwischen den gehäuft auftretenden Anfällen feststellen konnte. Je größer

das Intervall zwischen den Clustern ist, desto länger müsste das Monitoring andauern, um so sicher bestätigen zu können, dass die Tiere Anfälle haben. Unter Berücksichtigung dieser Besonderheit, muss die Limitation dieser potenziellen *Refinement*-Maßnahme beachtet werden, da es nicht im Sinne der 3R ist, die Tierzahl zu erhöhen, weil mit einer Verkürzung des Monitoring-Phase Tiere nicht mehr erfasst werden würden, die sich aber dennoch in der chronischen Phase mit spontanen Anfällen befinden.

Nichtdestotrotz müssten für diese potenzielle *Refinement*-Maßnahme Parameter definiert werden, die mit der Anfallsfrequenz korrelieren. In dieser Situation geht es somit weniger um den prädiktiven Wert der Parameter, als vielmehr um Parameter, die in der chronischen Phase erhoben werden und das konventionelle Video- und EEG-Monitoring partiell ersetzen und somit verkürzen könnte. In diesem Zusammenhang könnte man dadurch das Studiendesign anpassen. So wäre es von Vorteil ein zweiwöchiges Monitoring durch wenige Verhaltenstests partiell zu ersetzen, die in einem kurzen Zeitraum durchgeführt werden können. Durch diese Verkürzung der Versuchsdauer, beziehungsweise durch diese Verkürzung der Zeit, in der sich die Tiere in der chronischen Phase befinden, könnte eine Reduktion des Tierleids erzielt werden. Ein Verhaltensparameter, welcher in hoher Korrelation mit der Anfallsfrequenz stand, war das Wühlverhalten in beiden Versuchsreihen während der chronischen Phase. Dabei zeigten die Tiere mit einer hohen Anfallsfrequenz und der Manifestation der Epilepsieerkrankung ein reduziertes Wühlverhalten. Zusätzlich korrelierten einige Parameter, die im Rahmen des Open-Fields ermittelt wurden, mit der Anfallsfrequenz. Je mehr Anfälle die Tiere hatten, desto weniger Strecke legten sie im Open-Field zurück. Darüber hinaus zeigten die Tiere, die eine frequente Anfallsaktivität aufwiesen, weniger *Rearings* im Open-Field. Zusätzlich waren die Tiere mit vielen Anfällen während des EEG- und Video-Monitorings weniger immobil. Andere Parameter, die mit der Anfallsfrequenz korrelierten waren der Saccharinkonsum, das Nestbauverhalten in der elften Woche, die BDNF-Serumkonzentration und die Corticosteronkonzentration in den Haaren. In Versuchsreihe 2 waren ähnliche Korrelationen, wenn auch weniger exorbitant, ausgeprägt. Ein anderer Parameter, der in Zusammenhang mit der Anfallsfrequenz stand, war die Gewichtszunahme der Tiere. Je mehr Anfälle die Tiere hatten, desto höher war die Gewichtszunahme und somit auch das Endgewicht. In Versuchsreihe 2 konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Anfallsfrequenz und dem Wühlverhalten beziehungsweise des Saccharinkonsums festgestellt werden. Beide Tests könnten innerhalb einer Woche durchgeführt werden, wobei der Saccharinkonsum sogar im Heimkäfig beziehungsweise im Aquarium untersucht werden kann. Dadurch könnte man eventuell die Dauer des Monitorings verkürzen. Inwiefern es sich hierbei allerdings um eine tatsächliche *Refinement*-Maßnahme handelt, müsste mittels zuvor bestimmter Parameter, die sich für eine Belastungseinstufung eignen, weiter validiert werden.

## 4. Schlussfolgerung

Mithilfe der vorliegenden Studie konnten sowohl der Einfluss der versuchsbedingten Prozeduren, als auch der Einfluss der Epileptogenese und der chronischen Phase in Hinblick auf das Wohlbefinden bei Ratten untersucht werden. Einige Parameter konnten in diesem Epilepsiemodell als sensitive Parameter identifiziert werden, wie beispielsweise das Wühlverhalten, FCM-Konzentrationen und der Saccharinkonsum. Es eigneten sich allerdings nicht alle Parameter gleichermaßen für eine adäquate Belastungseinstufung. Die Untersuchung des Verhaltens zielte darauf ab, einen Einblick in die mit dem Modell assoziierten Komorbiditäten zu erlangen und anhand der Ergebnisse die Belastung einzustufen. Geeignete Verhaltensparameter zur Evaluierung der Belastungsschwere waren vornehmlich das Wühlverhalten und die Saccharin-Präferenz. Dabei konnten mit beiden Parametern ein depressionsähnliches Verhalten der Tiere in den verschiedenen Phasen der Epileptogenese beziehungsweise der chronischen Phase festgestellt werden. Das Wühlverhalten diente beispielsweise darüber hinaus auch dazu, schmerzhaft Zustände und somit eine physische Belastung, wie sie im Rahmen des operativen Eingriffs auftreten kann, zu evaluieren. Somit muss bei den Parametern darauf geachtet werden, dass die Beurteilung der Qualität des zugrundeliegenden Faktors, der die Reduktion induziert, mit in die Interpretation einbezogen wird. So kann beispielsweise eine Reduktion des Wühlverhaltens bedingt durch schmerzhaft Zustände durch die Anpassung der Analgesie positiv beeinflusst werden, was folglich auch zu einer Reduktion der Belastung der Tiere führt. Die telemetrisch ermittelten Daten eigneten sich dafür, frühzeitig pathologische Veränderungen des vegetativen Nervensystems und des Myokards erfassen zu können. Allerdings waren diese Parameter von der Induktion des SE an bis in die chronische Phase pathologisch verändert. Somit eigneten sie sich weniger dafür die Belastung differentiell für jede Phase beurteilen zu können. Zusätzlich zu den verhaltensbiologischen und (patho-)physiologischen Veränderungen, konnten akute Stresszustände mittels der Corticosteronmetabolitenbestimmung im Kot erfasst werden. Im Vergleich zu den anderen beiden Varianten der Probenentnahme zur Corticosteronbestimmung in dieser Studie, stellten die Kotproben die Proben dar, die nicht invasiv gesammelt werden konnten. Somit war es möglich, ohne zusätzliche Stressoren wie *Handling* oder eine Narkose, einen Einblick in die HPA-Achsen-Aktivierung zu erlangen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, dass das Pilocarpin-Modell ein Epilepsiemodell darstellt, das phasenweise mit einer schweren Belastung für die Tiere einhergeht. Dabei ist die frühe Post-Insult-Phase mit einer schweren Belastung einzustufen. Die Belastung in der chronischen Phase ist durch starke interindividuelle Unterschiede geprägt. Dies wird durch die große Varianz der Ergebnisse in der Epilepsie-Gruppe repräsentiert. Somit ist es nur bedingt möglich in dieser Phase eine uniforme Belastungseinstufung für die

epileptischen Tiere abzuleiten, da es sich nicht um eine homogene Gruppe handelt. Dadurch, dass die klinische Manifestation der Epilepsieerkrankung und der damit assoziierten Komorbiditäten diese interindividuellen Unterschiede hervorrufen, muss die Belastungseinstufung auf einer individuellen Basis stattfinden. Anhand der klinischen Beurteilung mittels der Score Sheet und des Irwin-Score-Systems können die Tiere, die aufgrund der Epilepsieerkrankung beziehungsweise der frequenten auftretenden Anfälle einer erhöhten Belastung unterliegen, identifiziert und gegebenenfalls euthanasiert werden. In diesem Zusammenhang soll deshalb betont werden, dass eine prädiktive Belastungseinstufung der chronischen Phase im Pilocarpin-Modell aufgrund der Heterogenität der Krankheitsmanifestation, nur bedingt möglich ist. Die klinische Beurteilung der Tiere stellt daher ein wichtiges Werkzeug dar, die Tiere, die einer schweren Belastung ausgesetzt sind zu identifizieren und zu erlösen. Die Belastung, die in der frühen Post-Insult-Phase entsteht, ist von transienter Natur. Die der chronischen Phase hingegen nur bedingt und mitunter deswegen ist es von bedeutsamer Notwendigkeit, den Zeitpunkt zu bestimmen, wann die chronische Phase beginnt. Ist zum Erreichen des Studienziels die Latenzphase im Fokus, sollte am Ende dieser Phase der Versuch so zeitnah wie möglich beendet werden. Dadurch kann die Belastung der verwendeten Tiere, durch das Ausbleiben der chronischen Phase reduziert werden. Ist die chronische Phase von Interesse, so sollten die Tiere so kurz, wie möglich in dieser Phase belassen werden. Fasst man dieses dynamische Erscheinungsbild der Belastung über den Zeitraum der Studie zusammen, so bleibt abschließend zu sagen, dass das Pilocarpin-Modell ein Modell mittlerer Belastung darstellt mit Phasen von schwerer Belastung, die entweder transient sind oder durch den Experimentator beendet werden. Im Fokus von zukünftigen Studien muss die Entwicklung weiterer *Refinement*-Maßnahmen stehen, anhand derer die Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Tiere durch experimentell-bedingte Prozeduren reduziert werden kann.

## 5. Grenzen der Belastungsbeurteilung und Ausblick

Die Interpretation der Daten, die aus der vorliegenden Studie hervorgehen, unterliegt einer gewissen Limitation. So wurden für diese Studie ausschließlich weibliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Bei weiblichen Tieren hat der Sexualzyklus einen Einfluss auf die HPA-Achse und auch auf die Induktion des SE (BRANDT et al. 2016; OYOLA u. HANDA 2017). Auf der einen Seite können dadurch robuste Parameter identifiziert werden, auf der anderen Seite kann es die Belastungseinstufung prekär gestalten. Andere Faktoren, die im Zusammenhang mit der Belastungseinstufung berücksichtigt werden müssen, sind die versuchsbedingten Prozeduren. Darüber hinaus müssen die entsprechend angepassten Haltungsbedingungen berücksichtigt werden. Dies beinhaltet die Einzelhaltung der Tiere und die standardisierte Umgebungsanreicherung, so wie das begrenzte Raumangebot für die Tiere.

Die Separierung der Tiere muss aufgrund des Implantats erfolgen. Da Ratten einer sehr sozialen Spezies angehören, ist die Einzelhaltung eine zusätzliche Belastung der Tiere. Dies wird auch in der Richtlinie 2010/63/EU als eine, je nach Zeitraum mit gering bis mäßiger Belastung entsprechend eingestuft. In der vorliegenden Studie hatten die Tiere olfaktorischen und auditiven Kontakt zu ihren Artgenossen, was sich positiv auf die Belastungsreduktion auswirken kann. Ein anderer Faktor, der die in dieser Arbeit getroffene Belastungseinstufung beeinflussen kann, ist die Versuchsabfolge, die im Studiendesign festgelegt wurde. Ebenfalls berücksichtigt werden muss der Einfluss der Blutentnahme. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, war der Transport der Tiere und die Narkoseeinleitung bereits ein Stressor, der zu einer Aktivierung der HPA-Achse führte. Die Vorbereitung der Tiere und die Durchführung der Probenentnahme muss deshalb verbessert werden beziehungsweise muss die Blutentnahmetechnik durch eine für das Tier schonendere ersetzt werden. In diesem Zusammenhang müssen auch die Interpretation und Aussagekraft der einzelnen Parameter berücksichtigt werden. Mittels der Corticosteronbestimmung kann nicht zwischen Distress und Eustress differenziert werden. Diese Differenzierung ist jedoch für die Belastungseinstufung und somit die Einschätzung der Erfahrung des Tieres essenziell. Eine mögliche Beeinflussung der erhobenen Daten und somit der getroffenen Belastungseinstufung kann jedoch auch durch die Art der Beurteilung in Form der Beurteilungsschemata erfolgen. Wie zuvor erwähnt war die Beurteilung der Nestkomplexität nur das Ergebnis einer Momentaufnahme, die keine Rückschlüsse auf eine reduzierte Nestbauaktivität oder auf die Zerstörung des Nests zulässt. Die Beurteilung des RGS und des Irwin-Scores ist ebenfalls die Beschreibung einer Momentaufnahme des Zustands der Tiere. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Nagetiere bestrebt sind, schmerzbedingtes Verhalten zu unterdrücken. Dies dient in der freien Wildbahn dazu das Überleben zu sichern. Dieser Voraussetzung muss bei der Beurteilung der Mimik beachtet werden. Darüber hinaus kann eine verblindete Beurteilung beispielsweise nach der Implantation der Tiefenelektrode nur sehr bedingt stattfinden. Darüber hinaus muss ebenfalls in Betracht gezogen werden, dass die Tiere in dieser Studie, von der beurteilenden Person regelmäßig gehandelt wurden. Dies trägt dazu bei, dass die Tiere Zustände des Unwohlseins weniger bis gar nicht vor dieser Person verbergen. Aber dennoch müssen interindividuelle Unterschiede jedes einzelnen Tieres berücksichtigt werden. Wichtiglich, dass diese Parameter Limitationen unterliegen, muss beachtet werden, dass die Belastungseinstufung vorläufig nur für diese Studie herangezogen werden kann. Ob die in der Studie bestimmten Parameter sich auch in anderen Laboren und für andere Versuchsprotokolle beispielsweise für die operativen Eingriffe oder die Induktion des SE eignen, muss deshalb weiter untersucht werden. Zusätzlich sollen die definierten Parameter nicht dazu dienen, die projektspezifischen Score Sheets zu ersetzen, die von der Behörde genehmigt werden. Diese Beurteilungsbögen dienen dazu, nach der täglichen Inaugenscheinnahme der Tiere, den klinischen Zustand der

Tiere zu erfassen. Wie zuvor erwähnt, stellt diese klinische Beurteilung ein wichtiges Werkzeug zur Belastungseinstufung dar. Es wird klar definiert, ab welchem Zeitpunkt der humane Endpunkt erreicht ist. Dieses System trägt dazu bei, das Tierwohl zu steigern und ermöglicht allen Personen, die die Tiere kontrollieren, anhand des Scoringsystems, den richtigen Zeitpunkt für den Abbruch des Versuchs zu erkennen.

Die Studie wurde in einer Einrichtung durchgeführt, in der auch das Amygdala-Kindling-Modell und das elektrische Post-SE-Modell untersucht wurden. Bisherige Ergebnisse zeigen, dass das Amygdala-Kindling-Modell ein Modell mit einer milden, aber langandauernden Belastung und somit mit einer mittleren Belastung darstellt. Der Vergleich mit dem elektrischen Post-SE-Modell steht zum momentanen Zeitpunkt noch aus. Nachdem alle Analysen abgeschlossen sind, sollen diese Studien dazu dienen, eine Priorisierung der Modelle bezüglich der Belastung zu ermöglichen. Diese Priorisierung soll als Hilfestellung dienen sich, je nach Fragestellung einer Studie, für das Modell entscheiden zu können, das mit der geringsten Belastung für die Tiere einhergeht. Diese Auswahl und die entsprechende Begründung dafür werden auch von der Behörde vorausgesetzt. Die durchgeführten Studien sollen dazu dienen eine Belastungseinstufung zu ermöglichen, die auf wissenschaftlich ermittelten Parametern basiert. Diese wissenschaftlich-basierte und objektive Belastungseinstufung soll eine empirische und subjektive Belastungseinstufung ersetzen und maßgeblich zur Steigerung des Tierwohls in Epilepsiemodellen beitragen.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

In-vivo-Versuche stellen ein wichtiges Werkzeug in der Epilepsieforschung dar, um pathophysiologische Mechanismen dieser Erkrankung besser verstehen zu können und neue Therapiestrategien zu entwickeln. Die Notwendigkeit der Forschung in diesem Bereich liegt darin begründet, dass bislang nur bedingt erfolgreiche Therapiemöglichkeiten zur Verfügung stehen. Immer noch weisen ca. ein Drittel der Epilepsiepatienten eine pharmakoresistente Epilepsieerkrankung auf. Das Ziel in der Epilepsieforschung muss deshalb weiterhin sein, neue Therapien zu entwickeln, die den Patienten eine Anfallsfreiheit ermöglichen und sich somit positiv auf die Lebensqualität auswirken. Dieses Ziel gilt es nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch in der Tiermedizin zu realisieren. Da es leider noch nicht möglich ist in diesem Bereich auf Tierversuche zu verzichten, muss es unsere Aufgabe sein, die Schmerzen, Leiden, Schäden und Ängste, die die Versuchstiere erfahren so gering wie möglich zu halten. Dies setzt allerdings voraus, dass Schmerzen, Leiden, Schäden und Ängste adäquat, objektiv und zuverlässig eingeschätzt werden können. Dadurch, dass den Tieren, im Vergleich zum Humanpatienten die Möglichkeit fehlt, verbal eine Reduktion des Wohlbefindens mitzuteilen, ist es deshalb notwendig Parameter zu identifizieren, die zur objektiven und wissenschaftlich-basierten Belastungseinstufung geeignet sind. Diese Belastungseinstufung stellt die Grundlage für die ethische Vertretbarkeit eines Tierversuchs dar. So muss für jedes geplante Versuchsvorhaben auch im Tierversuchsantrag die zu erwartende Belastung und basierend darauf die ethische Vertretbarkeit begründet werden, den Versuch durchzuführen. Deshalb wird diese Belastungseinstufung auch in anderen Arbeitsgruppen und darin verwendeten Tiermodellen implementiert. Die vorliegende Studie wurde zusammen mit diesen Arbeitsgruppen im Rahmen einer Kooperation der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Zur Beurteilung der Belastung im Pilocarpin-Modell bedingt durch die Manifestation der Epilepsieerkrankung und der damit einhergehenden epileptischen Anfälle wurden verschiedene Parameter angewendet. Es wurden verhaltensbiologische Änderungen bezüglich der sozialen Interaktionen, des Heimkäfigverhaltens, des Wühlverhaltens und des angst- und depressions-assoziierten Verhaltens untersucht. Darüber hinaus wurden biochemische Parameter untersucht, die zur Evaluierung von Stress in Ratten dienen sollten. Dabei wurden Corticosteronmetaboliten im Kot, Corticosteron in Haaren und Serum quantifiziert. Zusätzlich wurde eine Teilstudie durchgeführt, in der mittels telemetrischer Aufzeichnungen pathologische Veränderungen im EKG und die Aktivität der Tiere im Heimkäfig untersucht werden konnten. Die telemetrische Ableitung des EEGs wurde darüber hinaus bezüglich der Qualität als *Refinement*-Maßnahme gegenüber der konventionellen Kabelableitung untersucht.

Durch diese umfangreichen verhaltensbiologischen, biochemischen und (patho-)physiologischen Untersuchungen war es möglich Parameter zu identifizieren, die sich im Lithium-Pilocarpin-Modell als sensitiv erwiesen und für eine Belastungseinstufung geeignet sind. Als vielversprechende Parameter erwiesen sich der Saccharin-Präferenz-Test und die Untersuchung des Wühlverhaltens. Dabei zeigten die epileptischen Tiere in der chronischen Phase eine Reduktion des Saccharinkonsums. Diese Verhaltensänderung kann einen Hinweis auf anhedonie-ähnliches Verhalten geben. Das Wühlverhalten war ebenfalls negativ beeinflusst. Hierbei handelt es sich um ein nicht-essenzielles Verhalten, das bei einer Reduktion des Wohlbefindens eingestellt wird, da es nicht primär dem Lebenserhalt dient. Darüber hinaus gaben Veränderungen der HF und HRV ebenfalls Anzeichen für eine Reduktion des Wohlbefindens der Tiere. Allerdings muss hier abgewogen werden, inwiefern es sinnvoll ist auf diese Parameter zurückzugreifen, wenn mittels anderer Parameter, die einfacher in der Durchführung sind, ebenfalls aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden können. Ein anderer Parameter, der sich als sensitiv erwies, war die FCM-Quantifizierung. Allerdings unterliegt die Interpretation hier einer gewissen Limitation, da die Ursache der aktivierten HPA-Achse anfallsbedingt sein kann. Weiterhin konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass zwischen den verschiedenen Phasen der Epileptogenese und der Krankheitsmanifestation differenziert werden muss, um eine adäquate Belastungseinstufung implementieren zu können. Darüber hinaus müssen die experimentellen Prozeduren mit in die Belastungseinstufung miteinbezogen werden. In der vorliegenden Studie konnte vor allem in Bezug auf die Induktion des SE eine erhöhte Belastung festgestellt werden.

Anhand dieser Studie lässt sich das Lithium-Pilocarpin-Modell als Modell mit einer mäßigen Belastung einstufen, das mit Phasen von schwerer Belastung einhergeht. Diese Phasen der schweren Belastung sind entweder transient, wie nach der Induktion des SE oder werden unter Berücksichtigung von humanen Endpunkten durch den Experimentator beendet. Diese Arbeit soll weiterhin als Grundlage dienen, sich mit *Refinement*-Maßnahmen im Sinne der 3R auseinander zu setzen und in diesem Tiermodell anzuwenden, um das Tierwohl zu steigern und dadurch die Belastung zu reduzieren. Anhand der Studie war es möglich eine wissenschaftlich-basierte Belastungseinstufung im Lithium-Pilocarpin-Modell zu implementieren und von einer empirischen Belastungseinstufung abzulösen.

## VIII. SUMMARY

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

Epilepsy is one of the most common chronic neurologic disorders in cats and dogs. However, epilepsy does not only occur in veterinary but also in human medicine. Approximately 0.8 % of the world population is affected by epilepsy. One third of these patients are suffering from a pharmacoresistant manifestation of this disorder. So far, there is no possibility to suppress seizures completely in these patients. In addition to the lack of therapy to decrease seizure frequency there is a need for therapies modulating disease progression. Furthermore, several psychiatric comorbidities can occur resulting in limitations in everyday life of patients. Taking these reasons into account, it is essential to find new therapeutic strategies to increase patients' quality of life. Finding new therapies requires the use of appropriate animal epilepsy models. Due to the fact that we cannot translate the burden of disease and comorbidities directly to animals there is a need for an evidence-based severity assessment in these animal models. In order to assess severity, we need to identify and validate appropriate parameters. This assessment of severity offers a basis for the ethical justification of animal experiments. The underlying study was performed as a part of a cooperation with a series of working groups investigating severity in different animal models.

In order to assess severity in the pilocarpine model of epilepsy in rats several behavioral parameters were investigated. These parameters included social interaction, home cage as well as burrowing behavior and depression-like and anxiety-associated behavior. In addition, several biochemical parameters were quantified including corticosterone in hair and serum and its metabolites in feces. In a further study, physiological parameters including heart rate and heart rate variability were evaluated by telemetric devices. Moreover, we were able to investigate home cage activity in these animals telemetrically.

Using this approach, we were able to identify sensitive parameters for assessing severity in this model. Promising parameters were burrowing behavior and saccharin preference. During the chronic phase with spontaneous recurrent seizures, animals exhibited a reduced performance in the burrowing paradigm. Burrowing behavior in rodents represents a non-essential behavioral pattern. The reduction can indicate a reduced well-being in these animals. In the saccharin preference test they showed a decreased interest for sweetened solution in comparison to control animals. Telemetric data revealed that animals with a history of status epilepticus showed decreased heart rate variability and increased heart rates during different phases of epileptogenesis and disease manifestation. However, taking into account the costs and the long-lasting surgery needed for implantation of telemetric devices, it is questionable whether it is worthwhile to investigate these parameters as

compared to behavioral parameters. In this study we also observed alterations in fecal corticosterone metabolites. However, considering the impact seizures have on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, it is still questionable whether this can be interpreted as an indicator of stress in these animals.

In conclusion, in the performed study the severity in the pilocarpine model can be described as moderate with severe phases. These severe phases are transient like the early post-insult phase following status epilepticus or determined regarding the human endpoints. This study shall form the basis for further improvements of animal welfare in this model of epilepsy concerning the refinement as a part of the 3R concept. This study contributes to a better understanding of the burden in the pilocarpine model by implementing a scientific evidence-based severity assessment by replacing an empiric.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

AID, T., A. KAZANTSEVA, M. PIIRSOO, K. PALM u. T. TIMMUSK (2007):

Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited.

Journal of neuroscience research 85, 525-535

AKINTOLA, T., C. RAVER, P. STUDLACK, O. UDDIN, R. MASRI u. A. KELLER (2017):

The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain.

Neurobiology of pain (Elsevier) 2, 13-17

ARIDA, R. M., F. A. SCORZA, C. A. PERES u. E. A. CAVALHEIRO (1999):

The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy.

Epilepsy research 34, 99-107

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

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

Cellular and molecular neurobiology 32, 749-758

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

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

BMC veterinary research 3, 16

BAMBERG, E., R. PALME u. J. G. MEINGASSNER (2001):

Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats.

Laboratory animals 35, 307-314

BANKSTAHL, J. P. u. W. LOSCHER (2008):

Resistance to antiepileptic drugs and expression of P-glycoprotein in two rat models of status epilepticus.

Epilepsy research 82, 70-85

BASHIRI, H., A. REZAYOF, M. SAHEBGHARANI, S. M. TAVANGAR u. M. R. ZARRINDAST (2016):

Modulatory effects of the basolateral amygdala alpha2-adrenoceptors on nicotine-induced anxiogenic-like behaviours of rats in the elevated plus maze.

Neuropharmacology 105, 478-486

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

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

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

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

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

BERETTA, S., D. CARONE, C. ZANCHI, E. BIANCHI, M. PIROVANO, C. TRENTINI, G. PADOVANO, M. COLOMBO, D. CEREDA u. S. SCANZIANI (2017):

Long-term applicability of the new ILAE definition of epilepsy. Results from the PRO-LONG study.

Epilepsia 58, 1518-1523

BERRY, A., V. BELLISARIO, S. CAPOCCIA, P. TIRASSA, A. CALZA, E. ALLEVA u. F. CIRULLI (2012):

Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice.

Psychoneuroendocrinology 37, 762-772

BERTRAM, E. (2007):

The relevance of kindling for human epilepsy.

Epilepsia 48 Suppl 2, 65-74

BHATTI, S. F., L. DE RISIO, K. MUÑANA, J. PENDERIS, V. M. STEIN, A. TIPOLD, M. BERENDT, R. G. FARQUHAR, A. FISCHER u. S. LONG (2015):

International Veterinary Epilepsy Task Force consensus proposal: medical treatment of canine epilepsy in Europe.

BMC veterinary research 11, 176

BIAGINI, G., E. BALDELLI, D. LONGO, L. PRADELLI, I. ZINI, M. A. ROGAWSKI u. M. AVOLI (2006):

Endogenous neurosteroids modulate epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy.

Experimental neurology 201, 519-524

BJORKHOLM, C. u. L. M. MONTEGGIA (2016):

BDNF - a key transducer of antidepressant effects.

Neuropharmacology 102, 72-79

BOISSY, A., G. MANTEUFFEL, M. B. JENSEN, R. O. MOE, B. SPRUIJT, L. J. KEELING, C. WINCKLER, B. FORKMAN, I. DIMITROV, J. LANGBEIN, M. BAKKEN, I. VEISSIER u. A. AUBERT (2007):

Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare.

Physiology & behavior 92, 375-397

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

The mouse light/dark box test.

European journal of pharmacology 463, 55-65

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.

International Journal of Neuropsychopharmacology 17, 1621-1633

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

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

Epilepsy & behavior : E&B 61, 141-152

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

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

Epilepsia 57, 1907-1915

BRIELLMANN, R. S., M. J. HOPWOOD u. G. D. JACKSON (2007):

Major depression in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: clinical and imaging correlates.

Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry 78, 1226-1230

CALDEIRA, M. V., C. V. MELO, D. B. PEREIRA, R. CARVALHO, S. S. CORREIA, D. S. BACKOS, A. L. CARVALHO, J. A. ESTEBAN u. C. B. DUARTE (2007):

Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons.

The Journal of biological chemistry 282, 12619-12628

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

Animal models of anxiety disorders and stress.

Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999) 35 Suppl 2, S101-111

CANITANO, R. (2007):

Epilepsy in autism spectrum disorders.

European child & adolescent psychiatry 16, 61-66

CANNON, W. B. (1932):

The wisdom of the body.

CARNEVALI, L., N. MONTANO, R. STATELLO, G. COUDE, F. VACONDIO, S. RIVARA, P. F. FERRARI u. A. SGOIFO (2017):

Social stress contagion in rats: Behavioural, autonomic and neuroendocrine correlates.

Psychoneuroendocrinology 82, 155-163

CASCINO, G. D. (2004):

Surgical treatment for epilepsy.

Epilepsy research 60, 179-186

CAVALHEIRO, E. A. (1995):

The pilocarpine model of epilepsy.

Italian journal of neurological sciences 16, 33-37

CHAPMAN, A., P. E. KEANE, B. S. MELDRUM, J. SIMIAND u. J. C. VERNIERES (1982):

Mechanism of anticonvulsant action of valproate.

Progress in neurobiology 19, 315-359

CHEN, Z. Y., D. JING, K. G. BATH, A. IERACI, T. KHAN, C. J. SIAO, D. G. HERRERA, M. TOTH, C. YANG, B. S. MCEWEN, B. L. HEMPSTEAD u. F. S. LEE (2006):

Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior.

Science (New York, N.Y.) 314, 140-143

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.

Toxicologic pathology 43, 776-793

CRAIG, K. D. (2009):

The social communication model of pain.

Canadian Psychology/Psychologie canadienne 50, 22

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

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

Pharmacology, biochemistry, and behavior 13, 167-170

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.

Journal of neuroscience methods 172, 143-157

CURIA, G., C. LUCCHI, J. VINET, F. GUALTIERI, C. MARINELLI, A. TORSELLO, L. COSTANTINO u. G. BIAGINI (2014):

Pathophysiogenesis of mesial temporal lobe epilepsy: is prevention of damage antiepileptogenic?

Current medicinal chemistry 21, 663-688

DARWIN, C. (1872):

Der Ausdruck der Gemüthsbewegungen bei dem Menschen und den Thieren.

E. Schweizerbart'sche Verlagshandlung,

DEACON, R. M. (2006a):

Assessing nest building in mice.

Nature protocols 1, 1117-1119

DEACON, R. M. (2006b):

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

Nature protocols 1, 118-121

DEACON, R. M. (2009):

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

Behavioural brain research 200, 128-133

DEACON, R. M. (2013):

The successive alleys test of anxiety in mice and rats.

Journal of visualized experiments : JoVE

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

Burrowing into prion disease.

Neuroreport 12, 2053-2057

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

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

Behaviour 34, 1-16

DENG, X., X. FENG, S. LI, Y. GAO, B. YU u. G. LI (2015):

Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on heart rate variability (HRV) in rat hearts via electronic lesion.

Bio-medical materials and engineering 26 Suppl 1, S487-495

DETOUR, J., H. SCHROEDER, D. DESOR u. A. NEHLIG (2005):

A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats.

Epilepsia 46, 499-508

DEUFEL, T. (2009):

Klinische Chemie und Hämatologie: 69 Tabellen;[Taschenlehrbuch].

Georg Thieme Verlag,

DI LIBERTO, V., R. M. VAN DIJK, M. BRENDEL, A. M. WALDRON, C. MOLLER, I. KOSKA,

I. SEIFFERT, F. GUALTIERI, F. J. GILDEHAUS, B. VON UNGERN-STERNBERG, M. LINDNER, S. ZIEGLER, R. PALME, R. HELLWEG, P. GASS, P. BARTENSTEIN u. H. POTSCCHKA (2018):

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

Neurobiology of disease 118, 9-21

DUARTE, F. S., M. DUZZIONI, A. A. HOELLER, N. M. SILVA, A. L. ERN, T. C. PIERMARTIRI, C. I. TASCA, E. C. GAVIOLI, T. LEMOS, A. P. CAROBREZ u. T. C. DE LIMA (2013):

Anxiogenic-like profile of Wistar adult rats based on the pilocarpine model: an animal model for trait anxiety?

Psychopharmacology 227, 209-219

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

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

Journal of comparative psychology (Washington, D.C. : 1983) 97, 249-259

DUNCAN, J. S., J. W. SANDER, S. M. SISODIYA u. M. C. WALKER (2006):

Adult epilepsy.

The Lancet 367, 1087-1100

EKINCI, O., C. OKUYAZ, S. ERDOGAN, S. GUNES, N. EKINCI, M. KALINLI, H. TEKE u. M. C. DIREK (2017):

Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Epilepsy and Primary ADHD: Differences in Symptom Dimensions and Quality of Life.

Journal of child neurology 32, 1083-1091

FALCICCHIA, C., G. PAOLONE, D. F. EMERICH, F. LOVISARI, W. J. BELL, T. FRADET, L. U. WAHLBERG u. M. SIMONATO (2018):

Seizure-Suppressant and Neuroprotective Effects of Encapsulated BDNF-Producing Cells in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy.

Molecular therapy. Methods & clinical development 9, 211-224

FILE, S. E. u. J. R. HYDE (1978):

Can social interaction be used to measure anxiety?

British journal of pharmacology 62, 19-24

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

Animal tests of anxiety.

Current protocols in neuroscience Chapter 8, Unit 8.3

FINLAYSON, K., J. F. LAMPE, S. HINTZE, H. WURBEL u. L. MELOTTI (2016):

Facial Indicators of Positive Emotions in Rats.

PloS one 11, e0166446

FISAHN, A., F. G. PIKE, E. H. BUHL u. O. PAULSEN (1998):

Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro.

Nature 394, 186-189

FISHER, R. S., C. ACEVEDO, A. ARZIMANOGLU, A. BOGACZ, J. H. CROSS, C. E. ELGER, J. ENGEL JR, L. FORSGREN, J. A. FRENCH u. M. GLYNN (2014):

ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.

Epilepsia 55, 475-482

FISHER, R. S., J. H. CROSS, J. A. FRENCH, N. HIGURASHI, E. HIRSCH, F. E. JANSEN, L. LAGAE, S. L. MOSHÉ, J. PELTOLA u. E. ROULET PEREZ (2017):

Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology.

Epilepsia 58, 522-530

FLAK, J. N., B. MYERS, M. B. SOLOMON, J. M. MCKLVEEN, E. G. KRAUSE u. J. P. HERMAN (2014):

Role of paraventricular nucleus-projecting norepinephrine/epinephrine neurons in acute and chronic stress.

European Journal of Neuroscience 39, 1903-1911

FOMBONNE, E. (2005):

Epidemiology of autistic disorder and other developmental disorders.

The Journal of Clinical Psychiatry 66, 3-8

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

FORCE, T. (1996):

Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology.

Circulation 93, 1043-1065

FORTIN, D. A., T. SRIVASTAVA, D. DWARAKANATH, P. PIERRE, S. NYGAARD, V. A. DERKACH u. T. R. SODERLING (2012):

Brain-derived neurotrophic factor activation of CaM-kinase kinase via transient receptor potential canonical channels induces the translation and synaptic incorporation of GluA1-containing calcium-permeable AMPA receptors.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 32, 8127-8137

FRANKE, H. u. H. KITTNER (2001):

Morphological alterations of neurons and astrocytes and changes in emotional behavior in pentylenetetrazol-kindled rats.

Pharmacology, biochemistry, and behavior 70, 291-303

FRYE, C. A. (2008):

Hormonal influences on seizures: basic neurobiology.

International review of neurobiology 83, 27-77

FUNDER, M., JOHN W (1997):

Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance.

Annual review of medicine 48, 231-240

GAO, W., T. STALDER, P. FOLEY, M. RAUH, H. DENG u. C. KIRSCHBAUM (2013):  
Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 928, 1-8

GARCIA, C. S. (2012):

Depression in temporal lobe epilepsy: a review of prevalence, clinical features, and management considerations.

Epilepsy research and treatment 2012, 809843

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

GHOSH, A., J. CARNAHAN u. M. E. GREENBERG (1994):

Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons.

Science (New York, N.Y.) 263, 1618-1623

GILLIAM, F. G., B. M. MATON, R. C. MARTIN, S. M. SAWRIE, R. E. FAUGHT, J. W. HUGG, M. VIIKINSALO u. R. I. KUZNIECKY (2007):

Hippocampal 1H-MRSI correlates with severity of depression symptoms in temporal lobe epilepsy.

Neurology 68, 364-368

GLIEN, M., C. BRANDT, H. POTSCHKA, H. VOIGT, U. EBERT u. W. LOSCHER (2001):

Repeated low-dose treatment of rats with pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy.

Epilepsy research 46, 111-119

GODDARD, G. V. (1983):

The kindling model of epilepsy.

Trends in neurosciences 6, 275-279

GOFFIN, K., J. NISSINEN, K. VAN LAERE u. A. PITKANEN (2007):

Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat.

Experimental neurology 205, 501-505

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

GORTER, J. A., E. A. VAN VLIET u. E. ARONICA (2015):

Status epilepticus, blood-brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis.

Epilepsy & behavior : E&B 49, 13-16

GOWER, A. J., E. HIRSCH, A. BOEHRER, M. NOYER u. C. MARESCAUX (1995):

Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy.

Epilepsy research 22, 207-213

GRASSO, P., M. ROZHAVSKAYA u. L. E. REICHERT, JR. (1998):

In vivo effects of human follicle-stimulating hormone-related synthetic peptide hFSH-beta-(81-95) and its subdomain hFSH-beta-(90-95) on the mouse estrous cycle.

Biology of reproduction 58, 821-825

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.

Nature neuroscience 18, 339-343

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

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

Experimental neurology 207, 329-349

GU, F., I. PARADA, F. SHEN, J. LI, A. BACCI, K. GRABER, R. M. TAGHAVI, K. SCALISE, P. SCHWARTZKROIN, J. WENZEL u. D. A. PRINCE (2017):

Structural alterations in fast-spiking GABAergic interneurons in a model of posttraumatic neocortical epileptogenesis.

Neurobiology of disease 108, 100-114

GUNNAR, M. u. K. QUEVEDO (2007):

The neurobiology of stress and development.

Annu. Rev. Psychol. 58, 145-173

HALL (1934):

EMOTIONAL BEHAVIOR IN THE RAT I. DEFECATION AND URINATION AS MEASURES OF INDIVIDUAL DIFFERENCES IN EMOTIONALITY.

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

HARIKRISHNAN, V. S., A. K. HANSEN, K. S. ABELSON u. D. B. SORENSEN (2018):

A comparison of various methods of blood sampling in mice and rats: Effects on animal welfare.

Laboratory animals 52, 253-264

HATCH, A., G. WIBERG, Z. ZAWIDZKA, M. CANN, J. AIRTH u. H. GRICE (1965):

Isolation syndrome in the rat.

Toxicology and applied pharmacology 7, 737-745

HATCHER, J. P., D. J. BELL, T. J. REED u. J. J. HAGAN (1997):

Chronic mild stress-induced reductions in saccharin intake depend upon feeding status.  
Journal of psychopharmacology (Oxford, England) 11, 331-338

HELLWEG, R., C. A. VON ARNIM, M. BUCHNER, R. HUBER u. M. W. RIEPE (2003):  
Neuroprotection and neuronal dysfunction upon repetitive inhibition of oxidative phosphorylation.  
Experimental neurology 183, 346-354

HERMAN, J. P. u. W. E. CULLINAN (1997):  
Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis.  
Trends in neurosciences 20, 78-84

HERZOG, A. G. (2008):  
Catamenial epilepsy: definition, prevalence pathophysiology and treatment.  
Seizure 17, 151-159

HESKE, L., A. NØDTVEDT, K. H. JÄDERLUND, M. BERENDT u. A. EGENVALL (2014):  
A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: incidence, mortality and survival after diagnosis.  
The Veterinary Journal 202, 471-476

HOHLBAUM, K., B. BERT, S. DIETZE, R. PALME, H. FINK u. C. THONE-REINEKE (2017):  
Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress.  
PloS one 12, e0179588

HÖLTER, S. M., J. EINICKE, B. SPERLING, A. ZIMPRICH, L. GARRETT, H. FUCHS, V. GAILUS-DURNER, M. H. DE ANGELIS u. W. WURST (2015):  
Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice.  
Current protocols in mouse biology 5, 291-309

HONCHAR, M. P., J. W. OLNEY u. W. R. SHERMAN (1983):  
Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats.

Science (New York, N.Y.) 220, 323-325

HORT, J., G. BROZEK, V. KOMAREK, M. LANGMEIER u. P. MARES (2000):  
Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus.  
Behavioural brain research 112, 77-83

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

INOSTROZA, M., E. CID, J. BROTONS-MAS, B. GAL, P. AIVAR, Y. G. UZCATEGUI, C. SANDI u. L. MENENDEZ DE LA PRIDA (2011):

Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats.

PloS one 6, e22372

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

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

PloS one 7, e38959

IRWIN, S. (1968):

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

Psychopharmacologia 13, 222-257

JIRKOF, P. (2014):

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

Journal of neuroscience methods 234, 139-146

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

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

Frontiers in behavioral neuroscience 4, 165

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

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

Laboratory animals 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.

Laboratory animals 47, 274-283

JOBE, P. C. (2003):

Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective.

Epilepsy & behavior : E&B 4 Suppl 3, S14-24

JONES, D. M., N. ESMAEIL, S. MAREN u. R. L. MACDONALD (2002):

Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus.

Epilepsy research 50, 301-312

JOPE, R. S., R. A. MORRISETT u. O. C. SNEAD (1986):

Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats.

Experimental neurology 91, 471-480

JOVANOVIC, J. N., P. THOMAS, J. T. KITTLER, T. G. SMART u. S. J. MOSS (2004):

Brain-derived neurotrophic factor modulates fast synaptic inhibition by regulating GABA(A) receptor phosphorylation, activity, and cell-surface stability.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 24, 522-530

KALIL NETO, F. u. M. L. NUNES (2017):

Evaluation of sleep organization in patients with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) and ADHD as a comorbidity of epilepsy.

Sleep medicine 33, 91-96

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.

Neuropsychiatric disease and treatment 10, 1693-1705

KANNER, A. M. (2003):

Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment.

Biological psychiatry 54, 388-398

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. O'NEILL, H. VOLK, D. CHURCH u. D. BRODBELT (2013):

Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK.

Veterinary Record 172, 338-338

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.

Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics 1, 94-99

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

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

Experimental neurology 263, 263-271

KLINKE, R., H.-C. PAPE, A. KURTZ u. S. SILBERNAGL (2009):

Physiologie.

Georg Thieme Verlag,

KLITGAARD, H., A. MATAGNE, J. VANNESTE-GOEMAERE u. D. G. MARGINEANU (2002):

Pilocarpine-induced epileptogenesis in the rat: impact of initial duration of status epilepticus on electrophysiological and neuropathological alterations.

Epilepsy research 51, 93-107

LAI, Y. C., N. LI, W. LAWRENCE, S. WANG, A. LEVINE, D. M. BURCHHARDT, R. G. PAUTLER, M. VALDERRABANO, X. H. WEHRENS u. A. E. ANDERSON (2018):

Myocardial remodeling and susceptibility to ventricular tachycardia in a model of chronic epilepsy.

Epilepsia open 3, 213-223

LANGFORD, D. J., A. L. BAILEY, M. L. CHANDA, S. E. CLARKE, T. E. DRUMMOND, S. ECHOLS, S. GLICK, J. INGRAO, T. KLASSEN-ROSS, M. L. LACROIX-FRALISH, L. MATSUMIYA, R. E. SORGE, S. G. SOTOCINAL, J. M. TABAKA, D. WONG, A. M. VAN DEN MAAGDENBERG, M. D. FERRARI, K. D. CRAIG u. J. S. MOGIL (2010):

Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse.

Nature methods 7, 447-449

LEAL, G., C. R. BRAMHAM u. C. B. DUARTE (2017):

BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity.

Vitamins and hormones 104, 153-195

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

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

Laboratory animals 41, 372-387

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

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

Laboratory animals 44, 192-198

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

Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats.  
Scientific reports 6, 31667

LEVESQUE, M., M. AVOLI u. C. BERNARD (2016):

Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration.

Journal of neuroscience methods 260, 45-52

LEVINE, E. S., R. A. CROZIER, I. B. BLACK u. M. R. PLUMMER (1998):

Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95, 10235-10239

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

Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice.

American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 276, R500-R504

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

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

Journal of neuroscience methods 260, 2-25

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

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, C. N. u. F. ULRICH (1956):

Effects of stress on serum C14 levels in rats following administration of hydrocortisone-4-C14 and corticosterone-4-C14.

Endocrinology 59, 170-180

LONGO, B., L. COVOLAN, G. CHADI u. L. E. MELLO (2003):

Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus.

Experimental neurology 181, 57-67

LOPES, M. W., S. C. LOPES, D. B. SANTOS, A. P. COSTA, F. M. GONCALVES, N. DE MELLO, R. D. PREDIGER, M. FARINA, R. WALZ u. R. B. LEAL (2016):

Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy.

Epilepsy & behavior : E&B 55, 92-100

LÖSCHER, W. (2011):

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

Seizure 20, 359-368

LÖSCHER, W. (2015):

Single versus combinatorial therapies in status epilepticus: Novel data from preclinical models.

Epilepsy & behavior : E&B 49, 20-25

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

LUEDTKE, K., S. M. BOUCHARD, S. A. WOLLER, M. K. FUNK, M. ACEVES u. M. A. HOOK (2014):

Assessment of depression in a rodent model of spinal cord injury.

Journal of neurotrauma 31, 1107-1121

MACDONALD, D. W., F. MATHEWS u. M. BERDOY (1999):

The behaviour and ecology of *Rattus norvegicus*: from opportunism to kamikaze tendencies.

Singleton, G; Hinds, L.; Leirs, H 49-80

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.

Laboratory animals 34, 351-361

MARIN, J. C., P. J. MOURA, R. M. CYSNEIROS, D. B. COLUGNATI, E. A. CAVALHEIRO, F. A. SCORZA, G. F. XAVIER, M. ZILBOVICIUS u. M. T. MERCADANTE (2008):

Temporal lobe epilepsy and social behavior: an animal model for autism?

Epilepsy & behavior : E&B 13, 43-46

MATHERN, G. W., P. D. ADELSON, L. D. CAHAN u. J. P. LEITE (2002):

Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited.

Progress in brain research 135, 237-251

MATSUDA, N., H. LU, Y. FUKATA, J. NORITAKE, H. GAO, S. MUKHERJEE, T. NEMOTO, M. FUKATA u. M. M. POO (2009):

Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite.

The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 29, 14185-14198

MAZARATI, A., A. BRAGIN, R. BALDWIN, D. SHIN, C. WILSON, R. SANKAR, D. NAYLOR, J. ENGEL u. C. G. WASTERLAIN (2002):

Epileptogenesis after self-sustaining status epilepticus.

Epilepsia 43 Suppl 5, 74-80

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 : a journal of neurology 131, 2071-2083

MCEWEN, B. S. (1998):

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

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

MEEKER, R. B. u. K. S. WILLIAMS (2015):

The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death.

Neural regeneration research 10, 721-725

MEERLO, P., G. OVERKAMP, S. DAAN, R. VAN DEN HOOFDAKKER u. J. KOOLHAAS (1996):

Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats.

Stress (Amsterdam, Netherlands) 1, 21-32

MILLER, A. L., H. D. GOLLEDGE u. M. C. LEACH (2016):

The Influence of Isoflurane Anaesthesia on the Rat Grimace Scale.

PloS one 11, e0166652

MILLER, W. R., M. E. SELIGMAN u. H. M. KURLANDER (1975):

Learned helplessness, depression, and anxiety.

The Journal of nervous and mental disease 161, 347-357

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

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

Epilepsy & behavior : E&B 92, 36-44

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

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

Epilepsia 59, 765-777

MÖLLER, C. (2018)

Evidenzbasierte Belastungseinstufung von Epilepsiemodellen.

MONTGOMERY, K. C. u. J. A. MONKMAN (1955):

The relation between fear and exploratory behavior.

Journal of comparative and physiological psychology 48, 132-136

MÜLLER, C. J., I. GROTIKKE, M. BANKSTAHL u. W. LOSCHER (2009):

Behavioral and cognitive alterations, spontaneous seizures, and neuropathology developing after a pilocarpine-induced status epilepticus in C57BL/6 mice.

Experimental neurology 219, 284-297

NATIONAL RESEARCH COUNCIL COMMITTEE ON, R. u. A. ALLEVIATION OF DISTRESS IN LABORATORY (2008):

The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health.

In: Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals

National Academies Press (US)

National Academy of Sciences., Washington (DC), S.

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

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

Epilepsy research 108, 29-43

OTSUKA, S., T. OHKIDO, M. ITAKURA, S. WATANABE, S. YAMAMORI, Y. IIDA, M. SAITO, H. MIYAOKA u. M. TAKAHASHI (2016):

Dual mechanisms of rapid expression of anxiety-related behavior in pilocarpine-treated epileptic mice.

Epilepsy research 123, 55-67

OYOLA, M. G. u. R. J. HANDA (2017):

Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity.

Stress (Amsterdam, Netherlands) 20, 476-494

PANEBIANCO, M., C. ZAVANONE, S. DUPONT, D. A. RESTIVO u. A. PAVONE (2016):

Vagus nerve stimulation therapy in partial epilepsy: a review.

Acta neurologica Belgica 116, 241-248

PAPP, M., P. WILLNER u. R. MUSCAT (1991):

An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress.

Psychopharmacology 104, 255-259

PARK, H. u. M. M. POO (2013):

Neurotrophin regulation of neural circuit development and function.

Nature reviews. Neuroscience 14, 7-23

PETERSON, N. C. (2004):

Assessment of pain scoring.

Contemporary topics in laboratory animal science 43, 74, 76

PHILIPS, B. H., C. L. WEISSHAAR u. B. A. WINKELSTEIN (2017):

Use of the Rat Grimace Scale to Evaluate Neuropathic Pain in a Model of Cervical Radiculopathy.

Comparative medicine 67, 34-42

PINEDA, E., J. D. JENTSCH, D. SHIN, G. GRIESBACH, R. SANKAR u. A. MAZARATI (2014):

Behavioral impairments in rats with chronic epilepsy suggest comorbidity between epilepsy and attention deficit/hyperactivity disorder.

Epilepsy & behavior : E&B 31, 267-275

PINEL, J. P. u. D. TREIT (1978):

Burying as a defensive response in rats.

Journal of comparative and physiological psychology 92, 708

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

Epileptogenesis.

Cold Spring Harbor perspectives in medicine 5,

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

PRUUNSILD, P., A. KAZANTSEVA, T. AID, K. PALM u. T. TIMMUSK (2007):

Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters.

Genomics 90, 397-406

PUTNAM, T. J. u. H. H. MERRITT (1937):

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE ANTICONVULSANT PROPERTIES OF SOME PHENYL DERIVATIVES.

Science (New York, N.Y.) 85, 525-526

RACINE, R. J. (1972):

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

Electroencephalography and clinical neurophysiology 32, 281-294

RATMAN, D., W. V. BERGHE, L. DEJAGER, C. LIBERT, J. TAVERNIER, I. M. BECK u. K. DE BOSSCHER (2013):

How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering.

Molecular and cellular endocrinology 380, 41-54

ROGAWSKI, M. A. (2006):

Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery.

Epilepsy research 68, 22-28

ROGAWSKI, M. A. u. W. LOSCHER (2004):

The neurobiology of antiepileptic drugs.

Nature reviews. Neuroscience 5, 553-564

RONKAINEN, E., H. ANSAKORPI, H. HUIKURI, V. MYLLYLÄ, J. ISOJÄRVI u. J. KORPELAINEN (2005):

Suppressed circadian heart rate dynamics in temporal lobe epilepsy.

Journal of Neurology, Neurosurgery & 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

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

The principles of humane experimental technique.

Methuen London,

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

SASI, M., B. VIGNOLI, M. CANOSSA u. R. BLUM (2017):

Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling.

Pflügers Archiv : European journal of physiology 469, 593-610

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 u. S. L. MOSHÉ (2017):

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

Epilepsia 58, 512-521

SCHNEIDER, M., P. J. DE VRIES, K. SCHONIG, V. ROSSNER u. R. WALTEREIT (2017):

mTOR inhibitor reverses autistic-like social deficit behaviours in adult rats with both Tsc2 haploinsufficiency and developmental status epilepticus.

European archives of psychiatry and clinical neuroscience 267, 455-463

SCHULZE-BONHAGE, A. u. A. KÜHN (2008):

Unpredictability of Seizures and the Burden of Epilepsy.

Seizure prediction in epilepsy: from basic mechanisms to clinical applications

SCHWARTZ, L. P., J. S. KIM, A. SILBERBERG u. D. N. KEARNS (2017):

Heroin and saccharin demand and preference in rats.

Drug and alcohol dependence 178, 87-93

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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 29, 859-867

SELIGMAN, M. E. u. G. BEAGLEY (1975):

Learned helplessness in the rat.

Journal of comparative and physiological psychology 88, 534-541

SELYE, H. (1975):

Stress and distress.

Comprehensive therapy 1, 9-13

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

SOPPET, D., E. ESCANDON, J. MARAGOS, D. S. MIDDLEMAS, S. W. REID, J. BLAIR, L. E. BURTON, B. R. STANTON, D. R. KAPLAN, T. HUNTER, K. NIKOLICS u. L. F. PARADA (1991):

The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor.

Cell 65, 895-903

SORREGOTTI, T., A. C. CIPRIANO, F. C. CRUZ, D. C. MASCARENHAS, R. J. RODGERS u. R. L. NUNES-DE-SOUZA (2018):

Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze.

Behavioural brain research 338, 159-165

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.

Molecular pain 7, 55

SPÄNI, D., M. ARRAS, B. KÖNIG u. T. RÜLICHE (2003):

Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs.

Laboratory animals 37, 54-62

STABLES, J. P., E. BERTRAM, F. E. DUDEK, G. HOLMES, G. MATHERN, A. PITKANEN u. H. S. WHITE (2003):

Therapy discovery for pharmaco-resistant epilepsy and for disease-modifying therapeutics: summary of the NIH/NINDS/AES models II workshop.

Epilepsia 44, 1472-1478

STASIAK, K. L., D. MAUL, E. FRENCH, P. W. HELLYER u. S. VANDEWOUDE (2003):

Species-specific assessment of pain in laboratory animals.

Contemporary topics in laboratory animal science 42, 13-20

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

Circadian and ultradian rhythms in heart rate variability.

Biomedizinische Technik 51, 155-158

STREKALOVA, T. u. H. W. STEINBUSCH (2010):

Measuring behavior in mice with chronic stress depression paradigm.

Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry 34, 348-361

STROUTHES, A. (1971):

Thirst and saccharin preference in rats.

Physiology & behavior 6, 287-292

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

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

Neuroscience 315, 79-90

TAN, M. u. R. APPLETON (2005):

Attention deficit and hyperactivity disorder, methylphenidate, and epilepsy.

Archives of disease in childhood 90, 57-59

TANG, M. M., W. J. LIN, Y. Q. PAN, X. T. GUAN u. Y. C. LI (2016):

Hippocampal neurogenesis dysfunction linked to depressive-like behaviors in a neuroinflammation induced model of depression.

Physiology & behavior 161, 166-173

THAYER, J. F. u. E. STERNBERG (2006):

Beyond heart rate variability: vagal regulation of allostatic systems.

Annals of the New York Academy of Sciences 1088, 361-372

THOMOVSKY, S. A., A. V. CHEN, D. M. DEAVILA u. A. M. KISZONAS (2019):

Serum Melatonin Values in Normal Dogs and Dogs with Seizures.

Journal of the American Animal Hospital Association 55, 78-82

TOUMA, C., R. PALME u. N. SACHSER (2004):

Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones.

Hormones and behavior 45, 10-22

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

TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, M. SCHWARZ, S. J. CZUCZWAR, Z. KLEINROK u. L. TURSKI (1983):

Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study.

Behavioural brain research 9, 315-335

VALZELLI, L. (1973):

The "isolation syndrome" in mice.

Psychopharmacologia 31, 305-320

VAN DER LINDEN, S., F. PANZICA u. M. DE CURTIS (1999):

Carbachol induces fast oscillations in the medial but not in the lateral entorhinal cortex of the isolated guinea pig brain.

Journal of neurophysiology 82, 2441-2450

VAN HERCK, H., V. BAUMANS u. S. DE BOER (1994):

Assessment of discomfort in laboratory animals.

In: Autoimmune Disease Models

Elsevier, S. 303-320

VAN LOO, P. L. u. V. BAUMANS (2004):

The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats.

Laboratory animals 38, 17-24

VAN VLIET, E. A., E. ARONICA u. J. A. GORTER (2015):

Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy.

Seminars in cell & developmental biology 38, 26-34

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

VRINDA, M., A. SASIDHARAN, S. APARNA, B. N. SRIKUMAR, B. M. KUTTY u. B. S. SHANKARANARAYANA RAO (2017):

Enriched environment attenuates behavioral seizures and depression in chronic temporal lobe epilepsy.

Epilepsia 58, 1148-1158

WALKER, A., V. RUSSMANN, C. A. DEEG, C. VON TOERNE, K. J. H. KLEINWORT, C. SZOBER, M. L. RETTENBECK, E. L. VON RUDEN, J. GOC, T. ONGERTH, K. BOES, J. D. SALVAMOSER, A. VEZZANI, S. M. HAUCK u. H. POTSCSKA (2016):

Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: Focus on inflammation.

Brain, behavior, and immunity 53, 138-158

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

WANG, X., X. SONG, L. WU, J. V. NADLER u. R. Z. ZHAN (2016):

Persistent Hyperactivity of Hippocampal Dentate Interneurons After a Silent Period in the Rat Pilocarpine Model of Epilepsy.

Frontiers in cellular neuroscience 10, 94

WEI, T., V. SIMKO, M. LEVY, Y. XIE, Y. JIN u. J. ZEMLA (2017):

Package 'corrplot'.

Statistician 56, 316-324

WODARSKI, R., A. DELANEY, C. ULTENIUS, R. MORLAND, N. ANDREWS, C. BAASTRUP, L. A. BRYDEN, O. CASPANI, T. CHRISTOPH, N. J. GARDINER, W. HUANG, J. D. KENNEDY, S. KOYAMA, D. LI, M. LIGOCKI, A. LINDSTEN, I. MACHIN, A. PEKCEC, A. ROBENS, S. M. ROTARIU, B. S. VO, M. SEGERDAHL, C. STENFORS, C. I. SVENSSON, R. D. TREEDE, K. UTO, K. YAMAMOTO, K. RUTTEN u. A. S. RICE (2016):

Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study.

Pain 157, 2350-2365

WOLF, U. (2012):

Ethik der Mensch-Tier-Beziehung.

KlostermannRoteReihe,

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

WOOLLEY, C. S. u. P. A. SCHWARTZKROIN (1998):

Hormonal effects on the brain.

Epilepsia 39 Suppl 8, S2-8

WULSIN, A. C., A. FRANCO-VILLANUEVA, C. ROMANCHECK, R. L. MORANO, B. L. SMITH, B. A. PACKARD, S. C. DANZER u. J. P. HERMAN (2018):

Functional disruption of stress modulatory circuits in a model of temporal lobe epilepsy.

PloS one 13, e0197955

WULSIN, A. C., J. P. HERMAN u. S. C. DANZER (2016):

RU486 Mitigates Hippocampal Pathology Following Status Epilepticus.

Frontiers in neurology 7, 214

YOKOYAMA, J., H. YAMAGUCHI, H. SHIGETO, T. UCHIUMI, H. MURAI u. J. KIRA (2016):

[A case of rhabdomyolysis after status epilepticus without stroke-like episodes in mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes].

Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology 56, 204-207

YOUNG, P. T. u. H. W. RICHEY (1952):

Diurnal drinking patterns in the rat.

Journal of comparative and physiological psychology 45, 80-89

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.

Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences 1002, 267-276

ZAFRA, F., E. CASTREN, H. THOENEN u. D. LINDHOLM (1991):

Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 10037-10041

ZOBEL (2004):

Impairment of inhibitory control of the hypothalamic pituitary adrenocortical system in epilepsy.

## X. ANHANG

### 1. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems™ by life technologies, Darmstadt
Allegra™ 6KR Zentrifuge	Beckman Coulter™, Krefeld
Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Beobachtungskäfige (Glasaquarien)	Domes Aquaristik, München, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Cisco Small Business Switch	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Cobas Integra® 400 plus System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCalibur™ mit Apple-Computer	Becton Dickinson, Heidelberg
EEG-Ableitung (Powerlab 4/30 und 8/30, Animal BioAmp)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EEG-Ableitungs- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München, Deutschland
EEG-Auswertungssoftware Chart 5	ADInstruments, Spechbach, Deutschland
Ein-Kanal-Verstärker 8/30, Animal BioAmp	ADInstruments LTD., Hastings, UK
Feinwaage bis 0,005 g	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Freezmobile 12SL Sentry	VirTis, SP Scientific, Warminster, PA, USA
Gekühlte Mikro-Ultrazentrifuge „SORVALL® RC-M150GX“	Sorvall Products L.P., Newton, Connecticut, USA
GeneAmp® PCR System 9700 (Thermocycler)	Applied Biosystems™ by life technologies, Darmstadt
Glaspotter	neoLab®, Heidelberg
Kinematica Homogeniser Polytron® PT10-35	Kinematica, Littau, Schweiz

Kleinschüttler „IKA-VIBRAX-VRX“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Labsystems Fluoroskan II	GMI Inc., MN, USA
Luxmeter	Conrad Electronic SE, Hirschau
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	Heidolph, Schwabach
Matrix 2.0	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Microplate reader	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikro 200 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikro-Ultrazentrifuge M150 GX	Sorvall Products L.P., Newton, CT, USA
Multifuge 3R	Heraeus® by Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Perfusionspumpe	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stimulatoreinheit	World Percision Instruments, Berlin
Switchbox (HSE Type 215E12)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Tierkäfige und Wasserflaschen	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen,
Tischzentrifuge „Rotina 35R“	Fa. Hettlich, Tuttlingen
Transmitter HD-X-02	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Universalschrank UN	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

## 2. Software

<i>Software</i>	<i>Hersteller</i>
-----------------	-------------------

EEG Software (Chart 7 für Windows)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EthoVision, Version 8.5	Noldus, Wageningen, Niederlande
Gen 5 Imager Software	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Graph Pad Prism Version 5.04	GraphPad, San Diego, CA, USA
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Electrocardiogram Analysis Software Module v5.30 NeuroScore™ © Version 3.0 Ponemah® 5.20 und 6.41,	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA

### 3. Lösungen, Medikamente und Substanzen

#### Lösungen

##### *Chloralhydrat*

- 720 mg Chloralhydrat
- in 20 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung lösen

##### *0,4 M Phosphatpuffer (Stammlösung, pH 7,6)*

- 45,43 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei)
- 12,48 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O
- In Aqua dest. Lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

##### *0,01 M phosphatgepufferte 0,9 prozentige Kochsalzlösung (pH 7,6)*

- 100 ml 0,2 M Phoshatpuffer
- 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  $\geq$  98%
- 100 ml Wasser

*Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (30 prozentig)*

- 6 g Haushaltszucker
- ad 20 ml 0,1 mol Phosphatpuffer

### Medikamente

<b>Medikament</b>	<b>Hersteller</b>
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1 : 200 000)	JENAPHARM®, Mibe GmbH, Jena
Bupivacain 0,5 %	JENAPHARM®, Mibe GmbH, Jena
Isofluran CP®	cp-pharma, Burgdorf
Marbofloxacin (Marbocyl®)	Vétoquinol, Ravensburg
Meloxicam (Metacam®)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein
Metamizol (Vetalgin®)	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos

### Substanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Acetonitril	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Actril®, cold sterilant	Medivators Inc. Minneapolis, USA
Antiprotease	Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922	Demeditec, Kiel, Deutschland,
Diff-Quick® Schnellfärbeset	Medion Diagnostics, Düdingen, Schweiz
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Gentamicinsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopentan (2-Methylbutan,) in	Honeywell, Offenbach
Lithiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Methylscopolamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Phenobarbital	
Pilocarpin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Saccharin $\geq$ 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

#### 4. Modifizierter Irwin-Score

Nummer	Parameter	Score und Beschreibung
1	Körperlage	-2 flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus
		-1 teilweise erhaltener Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen
		0 normale Haltung
		+1 starre oder verkrampfte Haltung (e.g., Opisthotonus)
		+2 Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden
2	Ptosis	0 Augenlider geöffnet
		+1 Augenlider partiell geöffnet
		+2 Augenlider geschlossen
3	Lokomotorische Aktivität	-2 keine Aktivität
		-1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten
		0 normale Aktivität
		+1 erhöhte Aktivität z.T. nicht fließender Bewegungsablauf
		+2 ruheloser Bewegungstyp
4	Berührungsreaktion	-2 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion

		-1 nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion
		0 normale Reaktion auf leichte Berührung
		+1 ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
		+2 Flucht über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisierung auf leichte Berührung
5	Reizbarkeit (Beißverhalten während des <i>Handlings</i> )	0 keine, +1 leichte, +2 deutlich
6	Neugier gegenüber einem präsentierten Objekt (z.B. Stift)	-2 keine Reaktion
		-1 verminderte Neugier
		0 normal, Interesse an präsentiertem Objekt
		+1 ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug
		+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

## XI. DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst möchte ich meinen Dank an Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka aussprechen. Ich bin sehr dankbar über das interessante und wichtige Thema meiner Doktorarbeit und darüber, dass ich diese Arbeit unter ihrer Aufsicht anfertigen konnte. Nur durch ihr Vertrauen und die unterstützende fachliche Kompetenz, die zu interessanten, fachlichen Diskussionen führte, war die Anfertigung dieser Arbeit möglich. Durch die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe gab sie mir die Möglichkeit mich mit dem versuchstierkundlichen Bereich auseinanderzusetzen und diesbezüglich Erfahrungen zu sammeln. Darüber hinaus möchte ich mich dafür bedanken, dass sie meine weitere Aus- und Weiterbildung in diesem Bereich unterstützte und förderte.

Ein weiterer besonderer Dank geht an meinen Postdoc Dr. Maarten van Dijk, der mich während der gesamten Doktorandenzeit hervorragend betreute und nie müde wurde, mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Egal ob es um Diskussionen bezüglich der Datenauswertung und -interpretation oder um praktische Tätigkeiten im Labor ging, war er stets bereit sein Wissen mit mir zu teilen und mich an seiner langjährigen Laborerfahrung teilhaben zu lassen. Danke für deine Geduld lieber Maarten!

Ein besonders lieber Dank geht an meine Mitdotorandin Isabel für die gemeinsame Doktorandenzeit und die Freundschaft, die sich daraus entwickelte. Die gemeinsame Zeit im OP, in der Tierhaltung und im Doktorandenzimmer werde ich stets in guter Erinnerung behalten. Ich danke ihr für die Unterstützung bei der Durchführung der Studie, ihre fröhliche und lebensfrohe Art und ihr offenes Ohr für Probleme fachlichen und privaten Ursprungs. Zusammen mit dir, liebe Isabel, waren selbst die stressigsten Phasen gut zu meistern!

Ganz besonders möchte ich auch Sarah Driebusch danken für die liebe und stets gewissenhafte Unterstützung und die ausgezeichnete Betreuung im Labor. Ich danke ihr für den unermüdlichen Einsatz und ihre herzensgute und geduldige Art. Danke dafür liebe Sarah, dass auch du stets ein offenes Ohr für berufliche und privaten Angelegenheiten hattest.

Ich danke der DFG-Forschergruppe FOR 2591 für die finanzielle Unterstützung, die die Durchführung der Studie ermöglichte und für den Einsatz der FOR 2591 den Tierschutz in der Versuchstierkunde weiter zu fördern. Meinen Kooperationspartnern Prof. Palme (Vet-med Uni Wien), Prof. Hellweg (Charité Berlin) und Prof. Kirschbaum (Dresden LabService) danke ich für die Probenanalyse.

Des Weiteren möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe der Pharmakologie danken. Christina, Fabio, Lena, Marta, Michael, Nina und Verena danke ich für die schöne Zeit im

Doktorandenzimmer und im Labor. Des Weiteren möchte ich mich auch bei Dr. Valentina di Liberto für die Einarbeitung bedanken und bei den Postdocs Dr. Vera Bierling, Dr. Eva-Lotta von Rüden und Dr. Josephine Salvamoser für die Unterstützung und Ausbildung in der neurobiologischen Forschung. Außerdem möchte ich mich bei Sieglinde Fischlein, Claudia Siegl, Grazyna Langer, Regina Rentsch, Sabine Sass, Isabella Waclawczyk, Andreas Kutschka und unserer Studentin Katharina Schönhoff für die großartige technische Unterstützung bedanken. Ohne dieses hervorragende Team wäre die Durchführung dieser Studie nicht möglich gewesen. Für die Pflege meiner Tiere möchte ich mich bei Sabine Vican, Katharina Gabriel und Uwe Birett bedanken.

Einen besonderen Dank möchte ich Hans, Marcus, Rebecca und Ölm für das Korrekturlesen dieser Arbeit aussprechen.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für die Unterstützung und den Rückhalt danken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt, auch wenn ich es manchmal vielleicht nicht getan habe. Ebenso möchte ich meinen lieben Freunden Becca, Jasi, Ölm, Rebecca und Urmel danken. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir in allen Lebenslagen zur Seite steht. Ihr seid die Besten! Und, last but not least, ein liebes Dankeschön an dich Michi, dafür, dass auch du mich begleitet hast und für mich da warst!