

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von
Epilepsiemodellen:
Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell und im
Hippocampus-Kindling-Modell bei Mäusen**

von

Lena Marie-Luise Boldt

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

**Evidenzbasierte Belastungseinstufung von
Epilepsiemodellen:
Untersuchungen im Amygdala-Kindling-Modell und im
Hippocampus-Kindling-Modell bei Mäusen**

**von Lena Marie–Luise Boldt
aus Berlin**

München 2020

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 25.07.2020

„Nie dürfen wir abgestumpft werden. In der Wahrheit sind wir, wenn wir die Konflikte immer tiefer erleben.Wo ich irgendwelches Leben schädige, muss ich mir darüber klar sein, dass es notwendig ist. Über das Unvermeidliche darf ich in nichts hinausgehen, auch nicht in scheinbar Unbedeutendem.“

Albert Schweitzer (1875-1965)

Für meine Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	3
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
1.	Epilepsien	5
1.1.	Definition und Bedeutung	5
1.2.	Klassifizierung	7
1.3.	Bedeutung von Tiermodellen in der Epilepsieforschung	10
1.3.1.	Kindling-Modell	12
1.3.1.1.	Zielregion des Kindlings: Die Amygdala.....	14
1.3.1.2.	Zielregion des Kindlings: Der Hippocampus	15
1.3.2.	Post-Status-Epilepticus-Modelle	16
2.	Belastungseinstufung in Tierversuchen.....	17
2.1.	Rechtliche Grundlagen von Tierversuchen	17
2.2.	Ethische Vertretbarkeit von Tierversuchen	19
2.3.	Belastung und Stress.....	23
3.	Verhaltensuntersuchungen	25
3.1.	Heimkäfigverhalten.....	25
3.1.1.	Nestbauverhalten bei Ratten	25
3.1.2.	Nestbauverhalten bei Mäusen	26
3.2.	Wühlverhalten.....	28
3.3.	Social-Interaction-Test.....	29
3.4.	Open-Field-Test.....	30
3.5.	Black-and-White-Box-Test.....	31
3.6.	Elevated-Plus-Maze-Test.....	33
3.7.	Saccharin-Präferenz-Test.....	34
3.8.	Grimace Scale und Irwin Score	35
4.	Corticosteron.....	36
5.	Sexualzyklus.....	38
6.	Serotonin	39
6.1.	Metabolismus und Aufgaben	39
6.2.	Serotoninrezeptoren	42
6.2.1.	5-HT _{1A} -Rezeptor	44
6.2.2.	Bedeutung für die Medizin	45
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	47

IV.	MATERIAL UND METHODEN	50
1.	Evaluierung des Nestbauverhaltens bei Ratten	50
1.1.	Versuchstiere.....	50
1.2.	Nestbauverhalten bei Ratten	51
2.	Kindling-Modell bei Mäusen	54
2.1.	Versuchstiere.....	54
3.	Elektrodenimplantation	56
4.	Kindling-Prozess	58
5.	Verhaltensuntersuchungen	60
5.1.	Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad.....	61
5.2.	Burrowing-Test	62
5.3.	Social-Interaction-Test.....	62
5.4.	Open-Field-Test.....	63
5.5.	Black-and-White-Box-Test	64
5.6.	Elevated-Plus-Maze-Test.....	64
5.7.	Saccharin-Präferenz-Test.....	65
6.	Perfusion	65
7.	Biochemische Analysen	66
7.1.	Analyse von Kotproben.....	66
7.2.	Analyse von Serumproben.....	67
7.3.	Bestimmung des Sexualzyklus	68
8.	Histologische Aufbereitung: 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung	69
9.	Auswertung und Statistik	72
9.1.	Statistische Auswertung der Daten zum Nestbauverhalten bei Ratten.....	72
9.2.	Statistische Auswertung der Daten im Kindling-Modell bei Mäusen.....	72
V.	ERGEBNISSE	74
1.	Nestbauverhalten bei Ratten	74
2.	Kindling-Modell bei Mäusen	81
2.1.	Kindling-Verlauf	81
2.2.	Verhaltensuntersuchungen.....	84
2.2.1.	Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad.....	84
2.2.2.	Wühlverhalten.....	86
2.2.3.	Soziale Interaktion	89
2.2.4.	Aktivität und Lokomotion.....	90

2.2.5.	Angst-assoziiertes Verhalten	92
2.2.6.	Anhedonie-assoziiertes Verhalten	95
2.3.	Corticosteron	96
2.4.	Irwin Score, Grimace Scale und Körpergewicht	99
2.5.	Zyklusstand	101
2.6.	5-HT _{1A} -Rezeptor-Färbung.....	102
3.	Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse	105
3.1.	Korrelationsmatrix.....	105
3.2.	Hauptkomponentenanalyse	115
VI.	DISKUSSION	122
1.	Nestbauverhalten bei Ratten	122
2.	Kindling-Modell bei Mäusen	126
2.1.	Belastung von Mäusen durch die Elektrodenimplantation in Amygdala oder Hippocampus.....	127
2.2.	Belastung von Mäusen durch Stimulation von Amygdala oder Hippocampus im Kindling-Modell	132
VII.	AUSBLICK UND LIMITATIONEN	144
1.	Nestbauverhalten bei Ratten	144
2.	Kindling-Modell bei Mäusen	145
VIII.	ZUSAMMENFASSUNG	148
IX.	SUMMARY	150
X.	LITERATURVERZEICHNIS	152
XI.	ANHANG	181
1.	Geräte.....	181
2.	Software	183
3.	Lösungen und Substanzen.....	183
4.	Modifizierter Irwin Score	186
5.	R-Skripte	191
5.1.	Kreuzkorrelation	191
5.2.	Hauptkomponentenanalyse (PCA).....	192
XII.	DANKSAGUNG	195

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADD	Nachentladungsdauer (Afterdischarge duration)	HIP	Hippocampus
ADH	Antidiuretisches Hormon	HPA	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse
ADT	Nachentladungsschwelle (Afterdischarge threshold)	HRP	Meerrettichperoxidase
ANOVA	Varianzanalyse	Ig	Immunglobulin
ap	anterio-posterior	IL	Interleukin
AM	Amygdala	ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie
bpm	beats per minute (Umdrehungen pro Minute)	i.p.	intra peritoneal
BSA	Bovines Serumalbumin	IVETF	International Veterinary Epilepsy Task Force
BWB	Black-and-White-Box	lat	lateral
CK	Creatinkinase	MEZ	mitteleuropäische Zeit
CRH	Corticotropin-Releasing Hormon	MEZS	Mitteleuropäische Sommerzeit
DAB	Diaminobenzidin	mg	Milligramm
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	ml	Milliliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	n	Stichprobenumfang
dv	dorso-ventral	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
EEG	Elektroenzephalogramm	nm	Nanometer
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay	OF	Open-Field
EPM	Elevated-Plus-Maze	p	Signifikanzniveau
FCM	Fäkale Corticosteronmetaboliten	PBS	Phosphatgepufferte Saline
GABA	gamma-Aminobuttersäure	PCA	Hauptkomponentenanalyse (principal component analysis)

pg/ml	Pikogramm pro Milliliter	TierSchG	Tierschutzgesetz
r	Korrelationskoeffizient	TierSchVers V	Tierschutzversuchstier verordnung
RL	Richtlinie	ZNS	Zentrales Nervensystem
s.c.	subcutan	3 R	Replace, Reduce, Refine
SD	Anfallsdauer (seizure duration)	°C	Grad Celsius
SE	Status epilepticus		
SEM	Standardfehler		
SS	Anfallsschwere (seizure severity)		

I. EINLEITUNG

Epilepsie ist eine der bedeutendsten neurologischen Erkrankungen weltweit (HUANG et al., 2015). Dies trifft nicht nur auf Humanpatienten, sondern ebenso auf Veterinärpatienten zu (CHANDLER, 2006). In der Veterinärmedizin sind vor allem Hunde (KEARSLEY-FLEET et al., 2013; HESKE et al., 2014) und Katzen (SCHRIEFL et al., 2008) betroffen. Betroffene Patienten leiden unter Anfällen, die durch übermäßige elektrische Entladungen von Nervenzellen in bestimmten Hirnregionen entstehen. Es ist bis heute nicht möglich, die progressive Entwicklung der Epilepsie, die sogenannte Epileptogenese, aufzuhalten. Selbst die symptomatische Therapie stellt ein Problem dar, da sich bei einem Drittel der behandelten Patienten kein therapeutischer Effekt zeigt (KWAN & BRODIE, 2000). Es ist deshalb von großer Bedeutung, neue Therapieoptionen zu entwickeln und dafür das Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Epileptogenese zu erweitern. Dazu werden valide Tiermodelle benötigt, in welchen wiederholte Anfälle, aber auch andere notwendige Prozeduren wie die operative Implantation von Stimulationselektroden und das regelmäßige Hantieren mit den Tieren (*Handling*) zu Beeinträchtigungen des Wohlbefindens, Schmerzzuständen und Stress führen können. In der EU-Richtlinie 63/2010 und ihrer Umsetzung in nationales Recht durch die Tierschutzversuchstierverordnung wird eine prädiktive Belastungseinstufung gefordert. Diese sollte objektiv und evidenzbasiert erfolgen, außerdem sollte die Belastung in Tiermodellen durch robuste Parameter einfach zu überprüfen sein. Das 3-R-Prinzip, das 1959 entwickelt wurde (RUSSELL et al., 1959), ist Fundament der EU-Richtlinie 63/2010 und beschreibt die zu befolgenden Prinzipien „*replace*“, womit das vollständige Ersetzen eines Tierversuchs gemeint ist, „*reduce*“, also das Reduzieren der Tierzahl in Tierversuchen und „*refine*“, was die Verbesserung eines Tierversuchs bezogen auf das Tierwohl beschreibt. Im Sinne dieses Prinzips sollte auf der Grundlage evidenzbasierter Belastungseinstufungen verschiedener Tiermodelle das Modell ausgewählt werden, welches mit der geringsten Belastung für das Tier einhergeht. Die Forschergruppe FOR 2591 (www.severity-assessment.de), eine von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderte Forschergruppe, hat es sich zur Aufgabe gemacht, Methoden zur Erstellung von Belastungseinstufungen in einer Vielzahl unterschiedlicher Tiermodelle zu erarbeiten. Um die Belastung in einem Tiermodell zu beurteilen, müssen geeignete Parameter identifiziert und validiert werden, die einerseits möglichst sensitiv eine Belastung aufzeigen und andererseits einfach in den Laboralltag zu integrieren sind. Solche Parameter werden im Rahmen der Forschergruppe in der vorliegenden Studie aus einer umfassenden Untersuchungsreihe verschiedener Verhaltenstests identifiziert. Ein Parameter, der einfach im Heimkäfig der Tiere beurteilt werden kann, ist das Nestbauverhalten. Dieses wurde in Epilepsiemodellen bei Ratten schon untersucht (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Da das

Nestbauverhalten sich in diesen Studien nicht konsistent als sensitiver Parameter zur Belastungsbeurteilung zeigte, sind weiterführende Untersuchungen zur Überprüfung der Validität dieses Parameters notwendig. Außerdem existiert die Hypothese, dass das Nestbauverhalten bei Ratten nicht genetisch manifestiert, sondern ein erlerntes Verhalten sei (BAUMANS, 2004). Dies wäre ein einschränkender Faktor für die Auswahl des Nestbauverhaltens als Parameter zur Belastungsbeurteilung in Tiermodellen bei Ratten. Deshalb wird dieser Hypothese im Rahmen der vorliegenden Studie weiter nachgegangen.

Im hier durchgeführten Epilepsiemodell bei Mäusen wird das Nestbauverhalten ebenfalls analysiert. Bei dieser Spezies ist das Nestbauverhalten als Indikator für das Wohlbefinden und zur Detektion von Schmerz- und Stresszuständen schon etabliert (DEACON, 2006a; JIRKOF et al., 2013a; JIRKOF, 2014), ähnlich wie die Untersuchung des Wühlverhaltens (DEACON, 2006b; DEACON, 2012; JIRKOF et al., 2013b; JIRKOF, 2014). Weitere Untersuchungen betreffen das angst-assoziierte und anhedonie-assoziierte Verhalten der Tiere, außerdem werden die soziale Interaktion und die lokomotorische Aktivität beurteilt. Mit Hilfe klinischer und neurologischer Score-Systeme, wie dem *Irwin Score* und dem *Grimace Scale* wird der Allgemeinzustand sowie das spontane Verhalten im Heimkäfig und beim täglichen hantieren mit den Tieren (*Handling*) beobachtet und dokumentiert. Zusätzlich wird die Expression von 5-HT_{1A}-Rezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen der Tiere betrachtet. Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein Neurotransmitter, der im peripheren wie auch im zentralen Nervensystem eine bedeutende Rolle spielt. Zentral beeinflusst Serotonin emotionale Prozesse und ist auch in die Schmerzbewertung involviert. In der Humanmedizin werden Depressionen, die eine häufige Komorbidität der Epilepsie darstellen, schon erfolgreich mit Serotonin-Wiederaufnahmehemmern therapiert. In der Arbeitsgruppe, in der auch die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, konnte in einem Epilepsiemodell bei Ratten mit bildgebendem Verfahren eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Bindungspotential im Septum des Gehirns festgestellt werden (DI LIBERTO et al., 2018). Dies zeigte sich durch die gesteigerte Bindung eines entsprechenden *Tracers* an den 5-HT_{1A}-Rezeptoren (DI LIBERTO et al., 2018). Somit könnte das einerseits auf eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptordichte bei den Tieren mit epileptischen Anfällen hinweisen. Andererseits könnte es einen Hinweis auf eine geringere Konzentration an Serotonin im Extrazellulärraum dieser Tiere geben, durch die eine vermehrte Anlagerung des kompetitiv bindenden *Tracers* möglich war. Um daran anknüpfend weitere Erkenntnisse zum serotonergen System zu erhalten, wurde in der vorliegenden Studie eine immunhistochemische Färbung des 5-HT_{1A}-Rezeptors durchgeführt.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsien

1.1. Definition und Bedeutung

„Mit der sogenannten heiligen Krankheit verhält es sich folgendermaßen: sie ist nach meiner Ansicht keineswegs göttlicher oder heiliger als die anderen, sondern wie die anderen Krankheiten so hat auch sie eine natürliche Ursache, aus der sie entsteht [...]. Ich meine nun: diejenigen, die zuerst die Krankheit für heilig erklärt haben, waren Menschen, wie sie auch jetzt noch als Zauberer, Entsühner, Bettelpriester und Schwindler herumlaufen und beanspruchen, äußerst gottesfürchtig zu sein und mehr als andere zu wissen. Diese Menschen nahmen die göttliche Macht als Deckmantel ihrer Ratlosigkeit, weil sie nicht wußten, wie sie den Kranken helfen sollten; und damit ihre Unwissenheit nicht offenbar würde, brachten sie auf, daß diese Krankheit heilig sei [...].“ (SCHOTT, 2004).

So steht es in der hippokratischen Schrift vom Anfang des 4. Jh. v. Christus (SCHOTT, 2004). Seit den Zeiten Hippokrates hat sich viel getan. Die Internationale Liga gegen Epilepsie (International league against epilepsy, ILAE) veröffentlichte im Jahr 2005 eine Definition für Anfälle und Epilepsie, nach der eine Epilepsie vorliegt, wenn zwei nicht provozierte Anfälle in einem Zeitraum von 24 Stunden vorkommen (FISHER et al., 2005; BERENDT et al., 2015). Im Jahr 2014 wurde diese Definition ergänzt, nun wird auch schon von Epilepsie gesprochen, wenn einmalig ein nicht provozierter Anfall auftritt und danach die Wahrscheinlichkeit für das erneute Auftreten eines Anfalls innerhalb der nächsten zehn Jahre über 60% liegt und/oder wenn Epilepsie diagnostiziert wird (FISHER et al., 2014). Epilepsie ist eine Erkrankung, die das Gehirn betrifft und sich durch die starke Tendenz zur Erzeugung wiederkehrender und spontaner Anfälle auszeichnet. Zusätzlich gehören neurobiologische, kognitive, psychologische und soziale Komorbiditäten als Folgen der Anfälle zum Krankheitsbild der Epilepsie (FISHER et al., 2005).

Nach einem initialen Insult erfolgt die Entwicklung einer symptomatischen Epilepsie mit identifizierbaren strukturellen Läsionen im Gehirn (ENGEL, 2001). Dieser Prozess, die sogenannte Epileptogenese, besteht in einer progressiven Veränderung neuronaler Erregbarkeit. Es kommt zu strukturellen Änderungen wie Neurodegeneration, Neurogenese, axonalen Schädigungen sowie Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke und Mobilisierung von Entzündungszellen in das Hirngewebe (LUKASIUK & PITKÄNEN, 2009).

Die Epileptogenese kann entweder schon während des initialen Insults einsetzen, z.B. während eines Status Epilepticus (SE) oder einer Encephalitis. Oder aber die Epileptogenese beginnt erst nach dem initial auslösenden Geschehen, z.B. wenn sich dieses durch einen Schlaganfall oder eine traumatische Verletzung des Gehirns (*traumatic brain injury, TBI*) zeigt (ENGEL, 2001). An den initialen Insult schließt sich die sogenannte Latenzphase an, die bis zum ersten epileptischen Anfall andauert (PITKANEN & LUKASIUK, 2009; LÖSCHER & BRANDT, 2010). Mit dem ersten Anfall ist die Latenzphase somit beendet, die Epileptogenese kann möglicherweise noch weiter andauern (PITKANEN & SUTULA, 2002; PITKANEN & LUKASIUK, 2009).

Die Epilepsie gilt als überstanden, wenn ein Betroffener mit einer altersabhängigen Epilepsie älter ist, als das definierte Alter, in dem diese Epilepsieform vorkommt. Auch gilt die Epilepsie als überstanden, wenn ein Betroffener für einen Zeitraum von zehn Jahren oder länger keine Anfälle mehr durchlebt hat und die Medikation seit mindestens fünf Jahren abgesetzt wurde (FISHER et al., 2014; FALCO-WALTER et al., 2018).

In der Tiermedizin ist die Epilepsie von großer Bedeutung. Bei großen Haustieren wie Pferden ist die Epilepsie nicht weit verbreitet, da Pferde einen relativ hohen Schwellenwert neuronaler Erregung erreichen müssen, bis ein Anfall entsteht (LACOMBE, 2015). Anders ist es beim Kleintier: Hier stellt sie eine der weit verbreitetsten neurologischen Erkrankungen dar (CHANDLER, 2006). Die Prävalenz bei Hunden liegt vermutlich bei einer Häufigkeit von bis zu 0,75 %. (KEARSLEY-FLEET et al., 2013; HESKE et al., 2014). In Klinikpopulationen wird die Prävalenz mit bis zu 2,6 % sogar noch höher angesetzt (ZIMMERMANN et al., 2009), bei Katzen in Kliniken liegt die Krankheitshäufigkeit bei 2,1% (SCHRIEFL et al., 2008). Um der zunehmenden Bedeutung der Epilepsie in der Tiermedizin gerecht zu werden, wurde die *International Veterinary Epilepsy Taskforce (IVETF)* gegründet (BERENDT et al., 2015). Diese besteht aus einer Gruppe von klinischen Veterinärneurologen, Neuropharmakologen und Veterinär-Neuropathologen aus unter anderem Europa, USA und Australien, die seit 2010 an relevanten Themen wie zum Beispiel Terminologie, Klassifikation, Therapie und Diagnostik arbeiten (<http://www.ivetf.org/>).

Auch in der Humanmedizin ist die Epilepsie eine der weitverbreitetsten neurologischen Krankheiten überhaupt und betrifft über 50 Millionen Menschen weltweit (WHO, 2019; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>). Fast 80% der Betroffenen leben in Entwicklungsländern. Dies könnte auf viele Faktoren, wie Armut, ein erhöhtes Risiko für endemische Erkrankungen wie Malaria oder Neurozystizerkose, Unterschiede in der medizinischen Infrastruktur und der Verfügbarkeit präventiver Gesundheitsprogramme zurückzuführen sein (WHO, 2019; <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>). Die wenigen effizienten Gesundheitseinrichtungen, die es gibt,

kommen vorwiegend Menschen in städtischen Gegenden zugute, und nicht den ärmeren Menschen, die überwiegend in ländlichen Gebieten leben (RADHAKRISHNAN, 2009). In diesen Ländern erhalten $\frac{3}{4}$ der betroffenen Menschen nicht die Behandlung, die sie benötigen, was „*treatment gap*“ genannt wird (KALE, 2002). Doch auch in hoch entwickelten Ländern, wo eine Behandlung nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft gegeben ist, sprechen 30% der Patienten nicht auf die Therapie an (KWAN & BRODIE, 2000; DLUGOS et al., 2001). Diese Pharmakoresistenz bezeichnet den Zustand, bei dem nach der Behandlung mit mindestens zwei gut vertragenen Antiepileptika in ausreichend hoher Dosierung immer noch Anfälle auftreten. Außerdem muss eine ausreichend lange Behandlungsdauer gegeben sein, um die Wirksamkeit der Therapie richtig einschätzen zu können (KWAN & BRODIE, 2000).

1.2. Klassifizierung

Eine Epilepsieklassifizierung ist die Grundlage für eine adäquate klinische Diagnose, unerlässlich für die Forschung und die Entwicklung neuer Therapien und wichtig für eine weltweit einheitliche Fachsprache. Bereits im Jahr 1964 wurde eine Klassifizierung der Epilepsie entwickelt (GASTAUT, 1964). Im Jahr 1981 wurden verschiedene Anfalls- und Epilepsietypen in die Klassifizierung miteinbezogen (ILAE, 1981) und in den darauffolgenden Jahren wurde die Klassifizierung weiterentwickelt (ILAE, 1985). Eine Task Force der ILAE entwickelte 2017 die nun aktuellste Klassifizierung von Anfällen (FISHER et al., 2017a) und eine Klassifizierung der Epilepsie (SCHEFFER et al., 2017). Diese Einteilung gliedert sich in drei Stufen, deren Ausgangspunkt die Anfallsform darstellt (Abb 1). Diese kann nun als fokal, generalisiert oder als nicht klassifiziert eingeteilt werden. Bei einem fokalen Anfall ist, im Gegensatz zum generalisierten Anfall, nur einer Großhirnhemisphäre der Ursprung zuzuordnen und demzufolge kommt es hier zu einer regionalen bzw. lateralisierten Anfallssymptomatik (KNOWLES, 1998). Ein fokaler Anfallsbeginn kann dann weiter eingeteilt werden in einen Anfall bei Bewusstsein oder einen Anfall mit beeinträchtigtem Bewusstsein, mit oder ohne motorischem Krampfverhalten oder als Übergang von fokal bis bilateral tonisch-klonisch (FISHER et al., 2017b). Ein generalisierter Anfall wird nach dem motorischen Krampfverhalten des Betroffenen in tonisch-klonisch, Anfall mit anderer Motorik als dem tonisch-klonischen Krampfverhalten oder Absence-Anfall (kein Krampfverhalten) unterteilt (FISHER et al., 2017b). Das motorische Krampfverhalten kann dann noch weiter aufgegliedert werden (siehe Abb. 2). Die zweite Stufe der Klassifizierung ist die Art der Epilepsie. Diese wird anhand des klinischen Bildes ermittelt und von EEG-Befunden unterstützt (SCHEFFER et al., 2018). Die Gruppe „kombiniert generalisiert und fokal“ ist neu eingeführt worden, und

ermöglicht es nun, auch Betroffene mit beiden Anfallsformen einzuordnen. Die Kombination aus fokalen und generalisierten Anfällen ist z.B. typisch für das Dravet-Syndrom (SCHEFFER et al., 2018). Die dritte Stufe ist dann letztendlich ein diagnostiziertes Epilepsiesyndrom. Dieses Syndrom wird beschrieben als das Zusammenspiel von Befunden aus bildgebenden Verfahren, Befunden des EEGs, den auftretenden Anfallsformen und auch gegebenenfalls den Komorbiditäten (SCHEFFER et al., 2018). Zusätzlich sollte auch die Ätiologie immer mit betrachtet werden (siehe Abb.1).

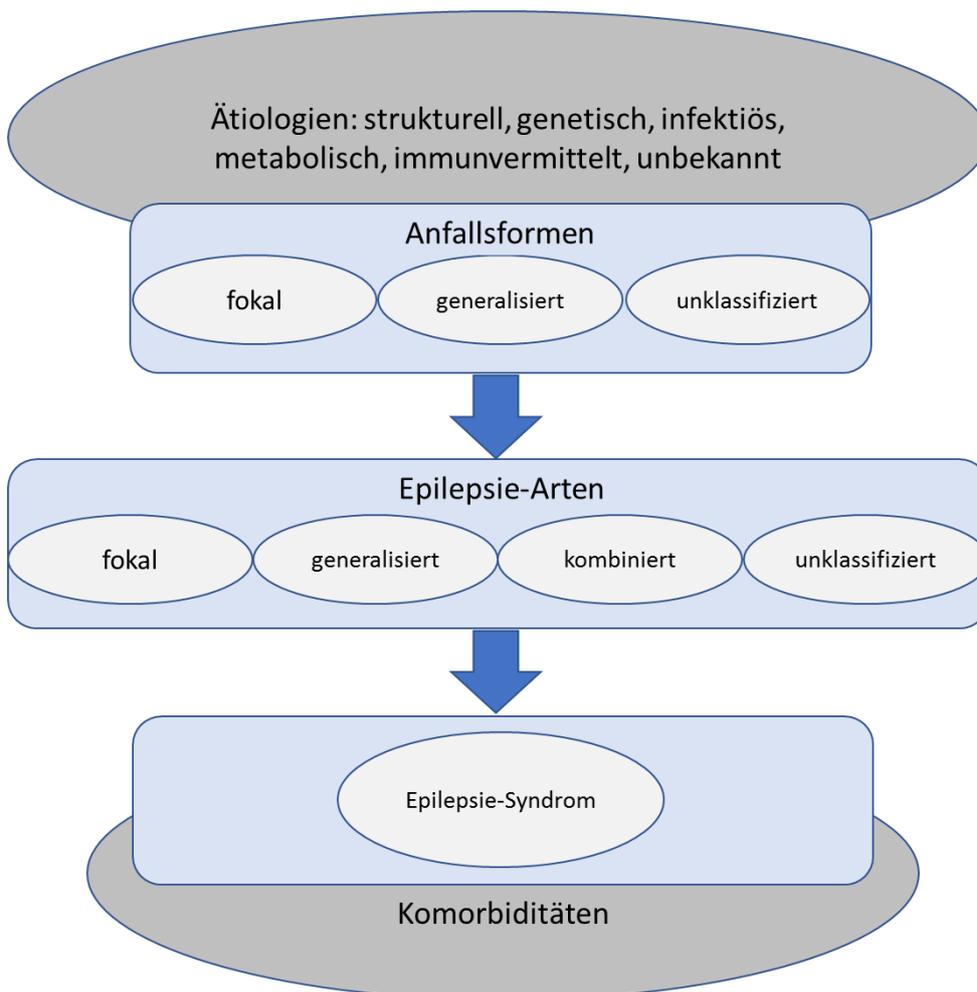
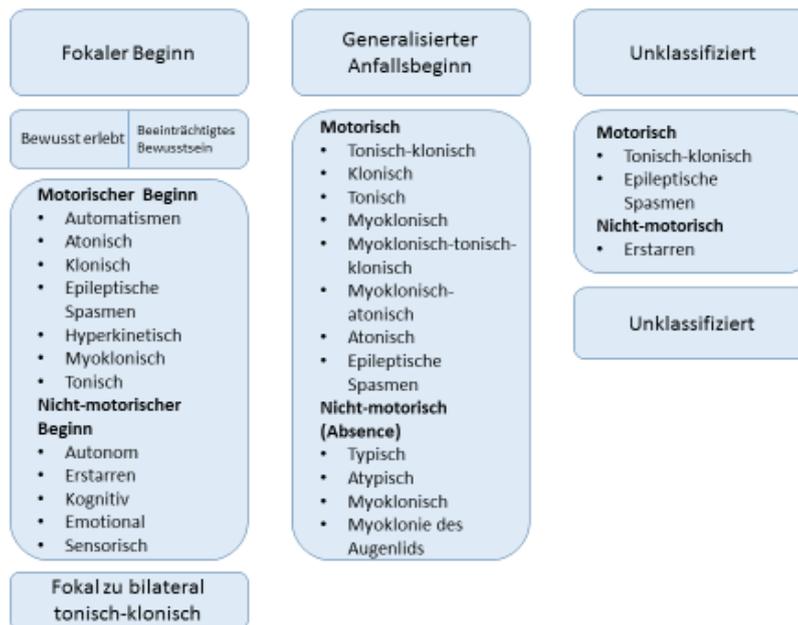


Abb.1. Gerüst der Epilepsieklassifikation nach ILAE 2017

(http://www.dgfe.org/home/index,id,361,selid,7080,type,VAL_MEMO.html)

Abb. 2. Erweiterte ILAE 2017 Klassifikation der Anfallstypen nach FISHER et al. (2017b), übersetzt aus dem Englischen.



Diese Klassifizierung aus der Humanmedizin wurde lange Zeit auch in der Veterinärmedizin verwendet. Zwar gab es einige Vorschläge für Klassifizierungen in der Tiermedizin, die an diejenigen der ILAE angelehnt waren (BERENDT & GRAM, 1999) (LICHT et al., 2002). Dabei gab es jedoch keine einheitliche Vereinbarung, wie die Terminologie und Klassifizierung bei der Translation von der Human- in die Tiermedizin angewendet werden sollte (BERENDT et al., 2015). Dies führte zu Veterinärpublikationen mit voneinander abweichenden Terminologien, was irreführend sein kann und auch die veterinärmedizinische Praxis beeinflussen kann, wenn es um die Definition und Diagnose von Epilepsie geht (BERENDT et al., 2015). Deshalb setzte sich die IVETF unter anderem das Ziel, die Terminologie und Klassifizierung von Anfällen und Epilepsie der Kleintiermedizin zu aktualisieren und veröffentlichte diese im Jahr 2015. Um eine Brücke zwischen der Terminologie der Human- und Veterinärmedizin zu bauen, ist es wichtig, sich die Unterschiede in der Diagnostik der Epilepsie vor Augen zu führen. Berendt und Kollegen (BERENDT et al., 2015) beschreiben in ihrem Bericht folgende Unterschiede:

- Veterinärpatienten können nicht selbst befragt werden, also kann die Beschreibung der Anfallszeichen nur durch den Patientenbesitzer erfolgen.
- Die Diagnostik mittels EEG ist bei Kleintieren nicht immer einfach durchzuführen und kann deshalb auch nicht analog zur Klassifizierung der ILAE in ein veterinärmedizinisches Klassifizierungsschema übertragen werden. Auch dadurch, dass Patientenbesitzer den Kostenaufwand für eine bestmögliche Diagnostik nicht

immer aufbringen können oder wollen, sind Kliniker auf den Vorbericht als oftmals wichtigstes diagnostisches Mittel angewiesen (BERENDT et al., 2015).

- Weiterhin gestaltet sich die Beurteilung möglicher Bewusstseinsstörungen beim Tier als schwierig. Diese sind bei der Klassifizierung der ILAE als wichtiger Faktor zur Diagnose angegeben (SCHEFFER et al., 2017).

Eingeteilt werden die epileptischen Anfälle von der IVETF nun in fokale und generalisierte Anfälle. Außerdem ist die Ausweitung eines fokalen Anfall zu einem sekundär generalisierten Anfall möglich (BERENDT et al., 2015). Dann wird eine Einteilung nach der Ätiologie vorgenommen, wobei einerseits von einer idiopathischen Epilepsie ausgegangen werden kann, andererseits gibt es auch die Möglichkeit der strukturellen Epilepsie (BERENDT et al., 2015). Bei Hunden wird die idiopathische Epilepsie als häufigste Epilepsieform diagnostiziert (CHANDLER, 2006). Als weitere Epilepsieform werden reaktive Anfälle genannt, diese sind allerdings im Gegensatz zu den anderen beiden Formen provozierte Anfälle, ausgelöst durch eine Stoffwechselstörung aufgrund metabolischer Erkrankungen oder Vergiftungen (BERENDT et al., 2015).

1.3. Bedeutung von Tiermodellen in der Epilepsieforschung

Kaliumbromid war die erste Einzelverbindung, die, nachdem Sir Charles Locock im Jahr 1857 zufällig ihre Wirkung entdeckte, zur Behandlung von Epilepsie verwendet wurde (SHORVON, 2009). Phenobarbital war die zweite Einzelverbindung, die zufällig für die Behandlung der Epilepsie entdeckt wurde (LÖSCHER & ROGAWSKI, 2012). Der deutsche Psychiater Alfred Hauptmann entdeckte im Jahr 1912 die antikonvulsive Wirkung des Phenobarbitals (HAUPTMANN, 1912). In den 1930er Jahren untersuchten Tracy Putnam und Houston Merritt die antiepileptischen Eigenschaften von Phenytoin, wobei sie ein Elektroschock-Anfallsmodell bei Katzen verwendeten (PUTNAM & MERRITT, 1937). Schon früher, im Jahr 1882 wurde ein Anfallsmodell mit Tieren verwendet. Der italienische Physiologe Pietro Albertoni induzierte Anfälle bei Hunden durch direkte elektrische Stimulation des motorischen Kortex (ALBERTONI, 1882). Allerdings war die Vorbereitung seines Anfallsmodells zu mühsam, um potenzielle antikonvulsive Mittel damit auf Wirksamkeit zu testen.

So war das 1937 entwickelte Elektroschock-Anfallsmodell bei Katzen das erste Tiermodell, mit dem schnell und zuverlässig Arzneimittel auf ihre antikonvulsiven Eigenschaften hin überprüft werden konnten. Damit konnte die Wirksamkeit von Phenytoin bestätigt werden, das kurz darauf auf den Markt kam (LÖSCHER, 2017). Der Nachweis der antikonvulsiven Wirkung von Phenytoin mit Hilfe des Tiermodells war ein bedeutendes Ereignis, nicht nur

weil es vielen Patienten mit unkontrollierter Epilepsie eine erfolgreiche Therapie ermöglichte, sondern auch wegen seiner Auswirkungen auf den Prozess der Arzneimittelstudien und -entwicklung (KRALL et al., 1978).

Tiermodelle bilden seitdem die Grundlage, auf der neue Therapien zur Behandlung von Epilepsie identifiziert wurden. Die zahlreichen neuen Antikonvulsiva, die durch Tests einer großen Anzahl von Prüfsubstanzen in Tiermodellen in den letzten Jahrzehnten entdeckt wurden, haben die therapeutischen Möglichkeiten enorm erweitert (LÖSCHER, 2017). Trotzdem kann ein Tiermodell immer nur eine Annäherung an die Gegebenheiten bei Menschen sein. Denn trotz der theoretischen Vorstellung, dass ein Modell alle Merkmale des untersuchten Phänomens reproduzieren sollte, wird dies selten erreicht, was die komplexen Manifestationen psychiatrischer Störungen und die enormen kognitiven Unterschiede zwischen Menschen und Labortieren widerspiegelt (CAMPOS et al., 2013). Die Arzneimittelresistenz bleibt jedoch nach wie vor eine große Herausforderung bei der Behandlung von Epilepsie. Bei etwa 30% der Patienten kann keine Anfallsfreiheit erreicht werden (POTSCHKA & BRODIE, 2012). Das Verständnis der komplexen Mechanismen, die der Epileptogenese und Anfallsauslösung bei Epilepsie zugrunde liegen, kann in klinischen Studien mit Humanpatienten nicht vollständig erlangt werden. Daher ist die Verwendung geeigneter Tiermodelle unerlässlich (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Die anzustrebenden Ziele betreffen demnach

- 1) ein besseres Verständnis der grundlegenden Mechanismen der Prozesse, die zur Epilepsie führen, wodurch Therapien zur Vorbeugung von Epilepsie bei Risikopatienten geschaffen werden
- 2) ein verbessertes Verständnis der biologischen Mechanismen der Pharmakoresistenz, um Medikamente zur Umkehrung oder Vorbeugung dieser zu entwickeln
- 3) Entwicklung von krankheitsmodifizierenden Therapien, die das Fortschreiten der Epilepsie hemmen (LÖSCHER & SCHMIDT, 2002).

Bei der Betrachtung von Tiermodellen in der Epilepsieforschung wird zwischen den akuten Modellen, den sog. Anfallsmodellen, und den chronischen Modellen unterschieden (LÖSCHER, 2002). Ein Vergleich der Pharmakologie von chronischen Modellen mit Modellen akuter Anfälle bei zuvor gesunden (nicht-epileptischen) Tieren zeigte, dass Wirkstoffprüfungen in chronischen Epilepsiemodellen prädiktivere Daten bezüglich der klinischen Wirksamkeit und der Nebenwirkungen liefern. Deshalb sollten chronische Modelle relativ früh in der Arzneimittelentwicklung verwendet werden, um falsch positive Ergebnisse zu minimieren (LÖSCHER, 2002).

Im Folgenden wird nun auf das in dieser Studie verwendete chronische Tiermodell näher

eingegangen.

1.3.1. Kindling-Modell

Das Kindling-Modell ist ein weit verbreitetes Modell der Temporallappenepilepsie (RUSSELL et al., 1959). Zuerst beschrieben wurde das Kindling-Modell im Jahr 1967 bzw. 1969 (GODDARD, 1967; GODDARD et al., 1969) e. Beim Kindling-Prozess werden über eine zuvor implantierte Stimulationselektrode elektrische Reize in die Zielregion, beispielsweise Teile des limbischen Systems wie Hippocampus oder Amygdala, weitergeleitet. Diese verschiedenen Zielregionen können unterschiedlich sensitiv auf den Kindling-Stimulus reagieren. So zeigten Ratten beim Amygdala-Kindling schon nach durchschnittlich 15 Stimulationen generalisierte Anfälle, beim Kindling des Hippocampus wurden dagegen 77 Stimulationen benötigt, um einen generalisierten Anfall auszulösen (GODDARD et al., 1969). Die nach der Stimulation auftretenden motorischen Verhaltensänderungen können in fünf Stadien beschrieben werden: 1) Mund- und Gesichtsbewegungen, 2) Kopfnicken, 3) Vorderextremitätenklonus, 4) Aufrichten, 5) Aufrichten und fallen (RACINE, 1972). Die Anfallsaktivität im EEG ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Frequenz und nachfolgend einer Phase erniedrigter Frequenz (BERTRAM, 2007). Die Amplitude steigt auf mindestens die doppelte Höhe der Amplitude der Basallinie an. Kennzeichnend für das Kindling sind der progressive Anstieg der elektrografischen und verhaltensbedingten Anfallsaktivität infolge der elektrischen Stimulation (LÖSCHER, 2002). Aus fokalen Anfällen werden im Laufe des Kindling-Prozesses sekundär generalisierte Anfälle (GODDARD et al., 1969). Beim Kindling treten die Anfälle nur direkt nach der induzierenden Stimulation auf. Erst nachdem über längere Zeit gekindelt wurde (*over-kindling*), können auch spontane Anfälle auftreten (WADA & SATA, 1974). Dies wurde bei Ratten nach 90-100 Anfällen des Stadiums 5 beobachtet (SAYIN et al., 2003). Es wurde kein Verfahren beschrieben, mit dem sich der Kindling-Effekt wieder umkehren lässt (MCNAMARA et al., 1980). Die permanent ansteigende Anfälligkeit für Anfallsaktivitäten geht mit langanhaltenden molekularen und zellulären Veränderungen einher (SUTULA, 2004). Es ist wahrscheinlich, dass eine strukturelle und funktionelle Umgestaltung der Schaltkreise im gesamten Zentralnervensystem bewirkt wird (SUTULA, 2004). Im Kindling-Modell als Modell der humanen Temporallappenepilepsie können diese Veränderungen untersucht werden: Zum einen die Veränderungen in der Region, in der eine Anfallsaktivität beginnt und aufrechterhalten wird, und weiterhin die Wege der Ausbreitung, durch die zusätzliche Bereiche rekrutiert werden (BERTRAM, 2007). Dadurch, dass die durch das Kindling ausgelösten molekularen und zellulären Veränderungen in den neuronalen

Schaltkreisen robust und reproduzierbar sind, gilt das Kindling als valides Modell zur Untersuchung von Epileptogenese-Mechanismen (KANDRATAVICIUS et al., 2014). So konnte das Kindling-Modell schon zur Identifizierung verschiedener antikonvulsiver Substanzen beitragen (LÖSCHER, 2002, 2017). Außerdem kann das Kindling-Modells dazu dienen, die Mechanismen einer Arzneimittelresistenz bei Temporallappenepilepsie zu untersuchen (LÖSCHER et al., 2013). Denn sowohl fokale als auch sekundär generalisierte Anfälle des Kindling-Modells sind durch die meisten klinisch etablierten antiepileptischen Arzneimittel schwieriger zu unterdrücken als Anfälle, die in akuten Tiermodellen wie dem Maximal-Elektroschock-Test ausgelöst werden (LÖSCHER et al., 1986). Das primär bei Ratten etablierte Kindling-Modell (GODDARD et al., 1969) kann auch bei Mäusen angewendet werden. Bei diesen werden erfolgreich verschiedenste anfallsbedingte Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht (BATTEN et al., 2017; LIU et al., 2017). Das Kindling-Modell ist jedoch, wie jedes andere Tiermodell auch, nur ein bestmöglicher Annäherungsversuch an die Situation beim Humanpatienten. Die Tiere im Kindling-Modell entwickeln normalerweise keine spontanen Anfälle, wie es beim Menschen mit Temporallappenepilepsie der Fall ist. Dadurch könnten sich neurologische Veränderungen von gekindelten Tieren und Humanpatienten unterscheiden (PITKANEN & HALONEN, 1998). Weiterhin wird beim Kindling keine der beim Menschen möglichen Ätiologien nachgeahmt (LÖSCHER & BRANDT, 2010). Ein weiterer Nachteil ist der mit dem Kindling verbundene Arbeits- und Zeitaufwand, was den Einsatz dieses Modells bei der Entwicklung von Arzneimitteln einschränkt. Derzeit gibt es kein anderes etabliertes und weniger aufwändiges Modell für Arzneimitteltests gegen fokale oder pharmakoresistente Anfälle, was die Suche nach neuen Wirkstoffen mit höherer Wirksamkeit bei solchen Epilepsien kritisch erschwert (LÖSCHER, 2002).

1.3.1.1. Zielregion des Kindlings: Die Amygdala

Die Tiefenstimulationselektrode, über die der elektrische Impuls beim Kindling gegeben wird, kann in unterschiedlichen Zielregionen implantiert werden (GODDARD et al., 1969). Elektrodenimplantationen in die Amygdala werden dabei in Ratten- sowie in Maus-Kindling-Modellen häufig durchgeführt (LIU et al., 2017; LI et al., 2018; NOZAKI et al., 2018 ; WANG et al., 2019). Die im Temporallappen paarig angelegte Amygdala ist Teil des limbischen Systems, einer Funktionseinheit, die das System emotionaler Schaltkreise im Gehirn beschreibt (LEDOUX, 1992). Keine andere Hirnregion ist so konsistent in emotionale Prozesse involviert wie die Amygdala (LEDOUX, 1992). Die Aufnahme sensorischer Informationen ist entscheidend für die emotionalen Funktionen der Amygdala. Viele dieser sensorischen Projektionen zur Amygdala enden im Bereich des lateralen Amygdaloidkerns. Diese Projektionen stammen hauptsächlich aus den sensorischen Verarbeitungsbereichen des Kortex und des Thalamus (LEDOUX, 1992). Vor allem Thalamus-Amygdala-Projektionen sind in emotionale Lernprozesse eingebunden, wobei besonders Angst und Angstkonditionierung in diesem Kontext eine Rolle spielen (LEDOUX, 1992). Die verschiedenen Kerngebiete der Amygdala stehen ebenso in Kontakt zueinander, so können beispielsweise Projektionen, die den lateralen Kern der Amygdala erreichen, auf andere amygdaloide Regionen und kortikale Assoziationsbereiche verteilt werden (PITKÄNEN & AMARAL, 1991). Klüver und Bucy stellten fest, dass es bei Temporallappenektomie bei Rhesusaffen zu einem Syndrom kommt, das mit dem Verlust von Angst, extremer Ablenkbarkeit und verändertem Sexualverhalten einhergeht (KLÜVER & BUCY, 1937). 1956 demonstrierte Weiskrantz, dass die Zerstörung der Amygdala dieses sogenannte *Klüver-Bucy-Syndrom* hervorruft, bei dem keine Angst mehr empfunden wird (WEISKRANTZ, 1956). Andererseits kann die Stimulation der Amygdala im Kindling-Modell bei Ratten ein gesteigertes angst-assoziiertes Verhalten bewirken (MÖLLER et al., 2018). Epilepsiepatienten beschreiben vor dem Erleben eines Anfalls oft einen traumähnlichen Zustand, eine „Aura“ mit starker emotionaler Komponente. Diese kann sich in positiven Gefühlszuständen äußern, oder auch mit starker Angst einhergehen. Jene emotionalen Erfahrungen während der „Aura“ gelten als Kennzeichen für die Einbindung der Amygdala (AGGLETON, 1992). Eine milde elektrische Stimulation der Amygdala kann das emotionale Erlebnis der „Aura“ reproduzieren (AGGLETON, 1992).

1.3.1.2. Zielregion des Kindlings: Der Hippocampus

Der Hippocampus befindet sich beidseitig im Temporallappen und gehört, wie auch die Amygdala, zum limbischen System. Morphologisch setzt sich der Hippocampus aus drei Zellschichten zusammen, die hornförmig zusammengekrümmt sind: Dem *Stratum moleculare*, dem *Stratum pyramidale* und dem *Stratum oriens* (SALZMANN, 1992). Dieser Aufbau der Zellschicht erstreckt sich vom inneren Ende, welches vom *Gyrus dentatus* umfasst wird, bis zum *Subiculum*. Die neuronale Verschaltung läuft innerhalb der beschriebenen hornförmigen Struktur der *Formatio hippocampalis* in mehreren Stufen ab (SALZMANN, 1992). Es existieren zahlreiche Verbindungen zwischen der hippocampalen Formation und anderen Hirnregionen wie unter anderem der Amygdala, dem Thalamus und dem Septum (SALZMANN, 1992). Der Hippocampus ist von essentieller Bedeutung für die Gedächtnisleistung. So ist er beispielsweise für die Überführung von Erinnerungen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis zuständig (SHAH et al., 2014). Dabei entsprechen Erinnerungen des Kurzzeitgedächtnisses der Gegenwart, nach 30 bis 60 Sekunden muss eine Erinnerung in eine Form überführt werden, die länger gespeichert werden kann (SHAH et al., 2014). Bei Entfernung beider Hippocampi können autobiografisches und episodisches Wissen nicht mehr neu gebildet werden, es kommt zur anterograden Amnesie. Allgemeines Wissen (semantisches Wissen) bleibt dagegen erhalten, denn dieses wird permanent im Cortex verankert (SHAH et al., 2014). Weiterhin ist der Hippocampus zuständig für das räumliche Lernen und das Gedächtnis für räumliche Strukturen (SHAH et al., 2014). Im Tiermodell der Temporallappenepilepsie wurde kurz nach der Induktion eines *Status epilepticus* durch Injektion von Kainat in den Hippocampus eine gesteigerte Neurogenese im *Gyrus dentatus* festgestellt (HATTIANGADY et al., 2004). In der chronischen Phase, fünf Monate nach der Kainat-Injektion, wurde jedoch Gegenteiliges beobachtet, nun hatte die Neurogenese stark abgenommen. Die hippocampus-abhängigen Defizite im Lernen und in der Gedächtnisleistung bei Temporallappenepilepsie könnten mit der verminderten hippocampalen Neurogenese in Verbindung stehen (HATTIANGADY et al., 2004). Der Hippocampus spielt jedoch schon bei der Entstehung und der lokalen Ausbreitung von Anfallsaktivitäten eine Rolle (MCINTYRE & RACINE, 1986). Im Kindling-Modell werden zwar auch bei größeren Läsionen des Hippocampus die gewünschten Anfallsaktivitäten erzielt (RACINE et al., 1988), wenn der Hippocampus allerdings entfernt wird, wird der Kindlingprozess deutlich verlangsamt (MCINTYRE & RACINE, 1986). Diese Beobachtung deckt sich mit der Tatsache, dass die operative Entfernung von Hippocampus-Gewebe zur Therapie bei Temporallappenepilepsie eingesetzt werden kann (SPENCER, 2002).

1.3.2. Post-Status-Epilepticus-Modelle

Die ILAE definiert den *Status Epilepticus* (SE) als einen Zustand, in dem Mechanismen versagen, die für das Beenden von Anfällen verantwortlich sind, oder in dem Mechanismen eingeleitet werden, die zu abnormal verlängerten Anfällen führen (TRINKA et al., 2015). Nach einem *Status Epilepticus* können langfristige Folgen wie neuronale Schädigungen und Veränderungen neuronaler Netzwerke auftreten (TRINKA et al., 2015). Dabei sind zwei Zeitpunkte von besonderer Bedeutung, diese wurden auf der Grundlage von tierexperimentellen Studien und klinischen Untersuchungen angegeben (TRINKA et al., 2015): Der erste Zeitpunkt ist der Zeitpunkt, ab dem der Anfall als "kontinuierliche Anfallsaktivität" zu betrachten ist. Dieser wurde mit fünf Minuten angegeben. Der zweite Zeitpunkt ist der Zeitpunkt der andauernden Anfallsaktivität, nach welchem das Risiko langfristiger Konsequenzen besteht. Dieser liegt bei einer Anfallsaktivität von 30 Minuten (TRINKA et al., 2015). Post-Status-Epilepticus-Modelle sind Tiermodelle der Temporallappenepilepsie, in denen durch verschiedene Methoden ein *Status Epilepticus* induziert wird (NIRWAN et al., 2018). Anschließend kommt es zu einer Latenzphase, in der die Tiere anfallsfrei sind, die Epileptogenese aber voranschreitet. In der darauffolgenden Phase kommt es zu wiederkehrenden, spontanen Anfällen (NIRWAN et al., 2018). Eine Methode, um ein chronisches Epilepsiemodell mit initialem *Status Epilepticus* zu erhalten, ist die Applikation von geeigneten Substanzen, wie die von Pilocarpin. Erstmals wurde die intraperitoneale Pilocarpin-Applikation im Jahr 1983 beschrieben (TURSKI et al., 1983). Die Aktivierung des cholinergen Systems, genauer gesagt der M1-Muskarinrezeptoren, trägt zur Auslösung von Anfällen bei und durch die Aktivierung von NMDA- (*N-Methyl-D-Aspartat*) Rezeptoren werden die Anfälle aufrechterhalten (NIRWAN et al., 2018). Durch komplexe Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke wird diese geschädigt, was das Fortschreiten der Anfallsaktivität begünstigt (NIRWAN et al., 2018). Weiterhin ist es möglich, einen *Status Epilepticus* durch Injektion von Kainsäure direkt in eine Zielregion im Gehirn, wie Amygdala oder Hippocampus, zu induzieren (TWELE et al., 2017; WELZEL et al., 2020). Außer durch chemische Reize kann auch durch elektrische Stimulation der Amygdala oder des Hippocampus ein *Status Epilepticus* induziert werden (LÖSCHER, 2017). Post-Status-Epilepticus-Modelle haben die Epilepsieforschung in großen Schritten vorangetrieben und tun es immer noch (GORTER et al., 2016). Deshalb ist es umso wichtiger, die Belastung der Versuchstiere in solchen Modellen zu erkennen (LIDSTER et al., 2016) und evidenzbasiert zu untersuchen. Es konnte in Rattenmodellen gezeigt werden, dass sowohl das chemische Pilocarpin-Modell als auch das elektrische SE-Modell phasenweise schwer belastend für die Tiere sein kann (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019).

2. Belastungseinstufung in Tierversuchen

2.1. Rechtliche Grundlagen von Tierversuchen

Auf internationaler Basis gibt es keine einheitlichen Gesetze oder Regelungen für Tierversuche: In den USA ist der „*Animal welfare act*“ die rechtliche Grundlage, die den Umgang mit Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken eingesetzt werden, regelt. Seit seiner Verabschiedung im Jahr 1966 wurde der „*Animal welfare act*“ mehrmals geändert und erweitert (MENDELSON III, 1996). In Japan wurde 1973 das „*Law concerning the Protection and Control of Animals*“ verabschiedet (<http://www.env.go.jp/en/laws/>). Laut diesem sollten jedoch „tierrechtlichen Bestimmungen nicht die Durchführung der notwendigen Forschungsaufgaben behindern“. Allein die hier implizierte Priorität der Wissenschaft rechtfertigte schließlich alle Versuche; d.h. „solange sie einem Forschungszweck dient, wurde jedwede Verwendung von Tieren im Labor ohne weiteres erlaubt“ (LINDEMANN et al., 2010). In Kanada ist die 1968 gegründete „*Canadian Council on Animal Care*“ die nationale Organisation, die die Verwendung von Tieren für wissenschaftliche Zwecke überwacht (TURNER et al., 2009). In diesen genannten Ländern ist der Tierschutz mehr oder weniger durch die entsprechenden Gesetze geregelt. In anderen Ländern, wie beispielsweise China, ist Tierschutz erst seit wenigen Jahren ein Thema und für Versuchstiere nur locker durch die 2006 veröffentlichte „*Guideline on the Humane Treatment of Laboratory Animals*“ und die „*Beijing Municipality Administration Office of Laboratory Animals*“ geregelt (KONG & QIN, 2010).

Anders sieht es in der Europäischen Union aus, denn die EU ist dazu berechtigt, für alle Mitgliedsstaaten verbindliche Rechtsakte anzuweisen. Im Jahr 1986 hat der Europarat das „Europäische Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere“ verabschiedet¹. Dieses legt zum Beispiel fest, dass Tierversuche soweit wie möglich durch andere Forschungsmethoden ersetzt werden sollten. Außerdem ist entsprechend Artikel 9 eine Genehmigungspflicht bei besonders belastenden Versuchen vorgesehen. Weiterhin trat im gleichen Jahr die Richtlinie 86/609/EWG „zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“² in Kraft.

¹ Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere, abgeschlossen in Strassburg am 18. März 1986, von der Bundesversammlung genehmigt am 17. Juni 1993

²Richtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedsstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere

Diese wurde im Jahr 2010 durch die novellierte „Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ (2010/63/EU)³ ersetzt. Diese Richtlinie soll dazu beitragen, Regelungen der einzelnen Mitgliedsstaaten, die noch nicht einheitlich genug sind, stärker zusammenzuführen. Dabei zielt sie im Kern auf das Prinzip der 3 R ab, das von William Russel und Fox Burch 1959 veröffentlicht wurde (RUSSELL et al., 1959). Dieses basiert auf den Grundsätzen *Replace* (Vermeiden), *Reduce* (Verringern) und *Refine* (Verbessern). Das heißt, dass Tierversuche soweit wie möglich durch *in vitro* Methoden ersetzt werden sollten, die Anzahl der verwendeten Tiere auf das nötige Minimum verringert werden und die Untersuchungsmethodik, Haltungsbedingungen und alle anderen anpassbaren Faktoren im Sinne des Tierwohls immer weiter verbessert werden sollten.

Das 3-R-Prinzip ist auch im deutschen Tierschutzgesetz ein zentraler Punkt des Abschnitts 5, der sich mit Tierversuchen beschäftigt⁴. So dürfen Tierversuche gemäß §7 TierSchGes nur durchgeführt werden, wenn sie unerlässlich sind und sich nicht durch Alternativmethoden ersetzen lassen. Wann genau sie unerlässlich sind, wird im Absatz 1 des §7 weiter definiert⁴. Die Einhaltung dieser Vorgaben wird im Rahmen der Genehmigungs- oder Anzeigepflicht eines jeden Tierversuchsvorhabens an Wirbeltieren oder Kopffüßlern überprüft. Die Vorschriften zur Genehmigung und Anzeige von Versuchsvorhaben werden detailliert in der Tierschutzversuchstierverordnung (TSchVersTV)⁵ aufgeführt, welche die Richtlinie 2010/63/EU³ in deutsches Recht überführt. Des Weiteren wird das zu erwartende Leiden der Tiere eines jeden Tierversuchs prospektiv beschrieben und „wissenschaftlich begründet“ (§ 31 Abs. 1 Nr. 2b, TierSchVersV)⁵. Dies muss im Rahmen einer Belastungseinschätzung in vier Schweregraden nach der Richtlinie 2010/63/EU³ geschehen. Diese teilen sich auf in Schweregrad 1 = „gering“, Schweregrad 2 = „mittel“, Schweregrad 3 = „schwer“, sowie „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ (Art. 15, Nr. 1, RL 2010/63/EU)³.

³ Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere

⁴ Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. Dezember 2018 (BGBl. I S. 2586),

⁵ Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), zuletzt geändert durch Artikel 394 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474)

⁶ Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 28. März 2019 (BGBl. I S. 404)

Um ein Modell einem Schweregrad zuordnen zu können, hat die Europäische Kommission das „Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung)“ zusammen mit dem Dokument „Beispiele zur Veranschaulichung des Prozesses der Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung), der täglichen Bewertung und der Bewertung des tatsächlichen Schweregrads“ erstellt. Letzteres ist hilfreich, um den tatsächlichen Schweregrad der durchgeführten Verfahren nach Artikel 38, 39 und 54³ zu dokumentieren.

Seit dem 01.08.2002 ist der Tierschutz als Staatsziel im Artikel 20a im Grundgesetz⁶ verankert. Es geht darum, den Tierschutz verfassungsrechtlich abzusichern. Bei Kollisionen mit anderen Grundrechten kommt den Tierschutzrechten damit eine erhöhte Bedeutung zu (HIRT et al., 2003). Somit sind Tierversuche in Deutschland nur in einem durch zentrale nationale Gesetze reglementiertem Rahmen und unter Kontrollen durch interne Instanzen, Amtsveterinäre und die zuständigen Behörden durchführbar.

2.2. Ethische Vertretbarkeit von Tierversuchen

Bei der Suche nach der Antwort auf die Frage, ob Tierversuche ethisch vertreten werden können, muss ergründet werden, ob der menschliche Status das Leiden von Tieren rechtfertigen kann und unter welchen Bedingungen dies möglich sein kann. Dies ist abhängig vom moralischen Status, den man Tieren im Vergleich zum Menschen zuspricht. Zum moralischen Status von Tieren gibt es verschiedene Positionen und Ansätze. Immanuel Kant beschreibt eine anthropozentrische Vernunftmoral, nach der sich die Würde des Menschen aus seinem Anteil an der Welt der Vernunft begründet (KANT, 2016). Da Tiere keine Vernunftwesen sind, kommt ihnen nach Kant nur ein relativer Wert zu (KANT, 2016). Trotzdem spricht er sich indirekt für die Rücksichtnahme auf Tiere aus. Kant argumentiert dies in einem Kapitel seiner Abhandlung "Metaphysik der Sitten" §§ 16-18. Er erklärt darin, dass jemand der Tiere quält, seine Fähigkeiten in Bezug auf seine Moral schwäche. Damit würde seine Pflicht nicht erfüllt, die er sich selbst gegenüber habe und setze außerdem seine empathischen Eignungen herab (KANT, 2016). Dem gegenüber steht der Biozentrismus, nach dem alle Lebewesen um ihrer selbst willen schützenswert sind. Der bekannteste Vertreter des Biozentrismus ist Albert Schweizer, der seine Position mit dem Satz "*Ich bin Leben, das leben will, inmitten von Leben, das leben will*" zusammenfasste (SCHWEITZER, 2008).

Eine andere ethische Position, nämlich die des Utilitarismus, begründeten die beiden englischen Philosophen Jeremy Bentham (1748–1832) und John Stuart Mill (1806–1873). Der Utilitarismus folgt dem Nützlichkeitsprinzip, demzufolge nur diejenigen Handlungen

moralisch gerechtfertigt sind, die die größtmögliche Menge von Wohlergehen für die größtmögliche Anzahl von Individuen nach sich ziehen (HÖFFE, 2013). Eine Form des Utilitarismus, den sogenannten Präferenzutilitarismus, vertritt Peter Singer (FLURY, 2017). Er macht den moralischen Status eines Individuums von dessen Interessen abhängig. Dazu zählt er beispielsweise ein Interesse an der Erhaltung des eigenen Lebens und ein Interesse an der Freiheit von Schmerz (SINGER, 1975). Aus diesem Denkansatz folgt einerseits eine moralische Aufwertung von interessenfähigen Tieren und andererseits eine Abwertung von menschlichem Leben, das nicht oder nur in geringem Umfang Interessen hat. Daraus ergibt sich, dass zum Beispiel Forschung an menschlichen Embryonen für Singer kein ethisches Problem darstellt, möglicherweise schmerzhaft Experimente an Mäusen dagegen schon (<http://www.drze.de/im-blickpunkt/tierversuche-in-der-forschung/kernfragen-der-ethischen-diskussion>). Aus einer utilitaristischen Grundposition kann der Ansatz der pathozentrischen Position entwickelt werden. Der Begriff „Pathozentrismus“ leitet sich vom griechischen „*pathos*“ = „leiden“ ab. Jeremy Bentham entwickelte den Grundgedanken des Pathozentrismus: „Die Frage ist nicht: Können sie denken? oder: Können sie sprechen? Sondern: Können sie leiden?“ (HÖFFE, 2013). Moralisch abzugrenzen sind, nach dem Grundgedanken dieser Position, also alle leidensfähigen Lebewesen von der restlichen Umwelt. Leidensfähig sind Lebewesen, die über ein zentrales Nervensystem (ZNS) verfügen, bzw. Cephalopoden, die verschmolzene Zerebralganglien besitzen (WESTHEIDE & RIEGER, 2007). Dies nimmt auch das Tierschutzgesetz (TSchG) in Paragraph 8a auf, in dem es eine Genehmigung für Tierversuche an Wirbeltieren oder Kopffüßern vorschreibt. Tierversuche nehmen bei den Überlegungen zu der Mensch-Tier-Beziehung meist einen Sonderstatus ein. Denn Tierversuche sind für viele Menschen ein abstraktes Geschehen, und das Ziel eines Versuchs oft nicht auf den ersten Blick einfach zu verstehen und nachzuvollziehen. Vor allem der Begriff „Grundlagenforschung“ scheint erstmal sehr abstrakt, denn dabei geht es nicht konkret um die Heilung einer bestimmten Krankheit, sondern vielmehr um das grundsätzliche Verstehen von Abläufen im Körper und das Wissen über komplexe Körperfunktionen. Der spätere Nutzen dieses Wissens ist nicht von vornherein absehbar. Doch gerade für die Komplexität eines Organismus, das Zusammenspielen der Organe und des Stoffwechsels und die Interaktion des Körpers mit der Umgebung gibt es keine Möglichkeit zum Wissenszuwachs durch alternative Forschungsmethoden. Dies spiegelt sich auch in den Zahlen zum Versuchszweck von Versuchstieren wider: Im Jahr 2017 wurden 50% der verwendeten Versuchstiere für die Grundlagenforschung eingesetzt (https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docId=11850874#doc11850874bodyText10). Durch Grundlagenforschung wurde und wird das medizinische und naturwissenschaftliche Wissen enorm erweitert (siehe Abb. 3).

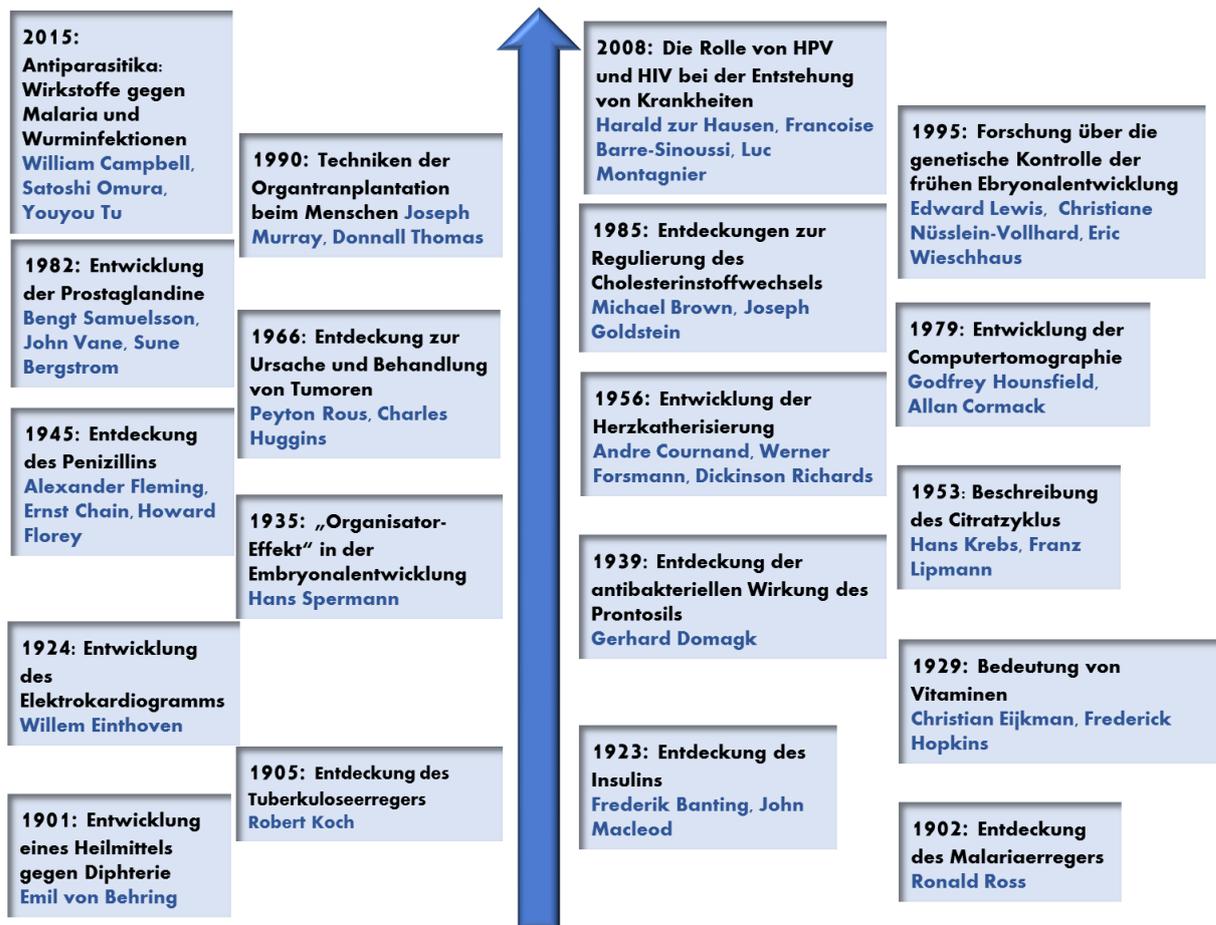


Abb. 3 Auswahl an Nobelpreisträgern für Medizin nach „Tierversuche in der Forschung“, Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 2004, (EXNER et al., 2004).

Im Jahr 2017 wurden rund 2 Millionen Wirbeltiere und Kopffüßer für Tierversuche eingesetzt. Dabei muss man sich vor Augen führen, dass nur 0,5% der in Deutschland im Jahr getöteten Tiere Versuchstiere sind, die in der Wissenschaft und Forschung genutzt werden. Dagegen werden 99,5% der Tiere aus anderen Gründen getötet, vor allem um als Nahrungsmittel für uns Menschen zu dienen (EXNER et al., 2004). Nach Angaben des Statistischen Bundesamts und Bundesministeriums für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft werden pro Jahr 44 Mio. Schweine, über 4,1 Mio. Rinder, 2,2 Mio. Schafe und Ziegen, außerdem etwa 16600 Pferde und 250 Millionen Hühner geschlachtet (EXNER et al., 2004). Der Deutsche Jagdschutz-Verband e.V. hat zusätzlich jährlich um die 250000 geschossenen Wildschweine und eine Million Rehe zu verzeichnen (EXNER et al., 2004).

Das deutsche Tierschutzgesetz spricht dem Menschen eine Verfügungsgewalt zu, gibt ihm aber gleichzeitig auch die Verantwortung, das Leben und Wohlergehen der Tiere zu

schützen. Tiere dürfen zwar für menschliche Zwecke genutzt werden, die Vermeidung von Schmerzen, Leiden und Schäden des Tieres muss aber unter allen Umständen beachtet werden. Daraus ergibt sich, dass vor der Planung eines jeden Tierversuchs ermittelt werden muss, ob sich der Tierversuch nicht durch andere Methoden ersetzen ließe, wie sich die benötigte Tierzahl so weit wie möglich verringern und das Leid jedes einzelnen Tieres minimieren ließe.

Dies entspricht dem Prinzip der 3 R, also „*replacement*“ (Vermeidung), „*reduction*“ (Verringerung) und „*refinement*“ (Verbesserung), dem sich Wissenschaftler aus Deutschland, Schweiz, England, Frankreich und Schweden in der Basler Deklaration verpflichtet haben. Die vorgeschriebene Unerlässlichkeit eines Tierversuchs kann durch Recherche in biomedizinischen Datenbanken überprüft werden. Dabei muss man sich bewusst sein, dass auch diese Recherche eingeschränkt sein kann, und zwar, weil „negative“ Ergebnisse oftmals nicht publiziert oder zur Publikation angenommen werden (ENGELHARDT, 2005). Die ethische Vertretbarkeit von Tierversuchen würde durch die konsequente Veröffentlichung auch von scheinbar uninteressanten Ergebnissen erheblich gesteigert werden, da eine doppelte Durchführung so vermieden und damit eine Reduzierung der Tierversuche erreicht werden könnte.

Um einen Fortschritt hinsichtlich der Bedingungen in Tierversuchen für die Tiere zu erreichen und damit das Wohlbefinden der Tiere im Sinne des 3-R-Prinzips zu verbessern, sind auch Tierversuche nötig. Dies scheint zunächst paradox. Doch um das Leiden von Tieren zu beurteilen, sollten nicht nur Vermutungen über eine Belastung der Tiere angestellt werden, sondern vielmehr sollten diese Annahmen wissenschaftlich verifiziert werden (FLECKNELL, 2002). Nur so kann sichergestellt werden, dass das Wohlergehen von Tieren in Tierversuchen durch eine Maßnahme wirklich nachweisbar gesteigert wird.

Doch letztendlich muss jeder Einzelne seine ethische Position in Bezug auf das Befürworten von Tierversuchen vor sich selbst rechtfertigen können. Dies schließt das Nachdenken über den moralischen Status von Tieren genauso mit ein wie das Einstehen für Werte wie Solidarität gegenüber Mitmenschen. Denn Solidarität beschreibt unter anderem die Aufgabe, Hilfsbedürftigen die bestmögliche Unterstützung zu bieten und damit Verantwortung für seine Mitmenschen zu übernehmen. Ein generelles Verbot von Tierversuchen würde sich gegen den menschlichen Wert der Solidarität stellen (BLUMER, 2016). Doch genau solche Werte wie Solidarität, Empathie, Verantwortungs- und Pflichtbewusstsein machen einen Menschen aus und sollten Mensch, Tier und der gesamten Umwelt gegenüber gezeigt und gelebt werden.

2.3. Belastung und Stress

Stress ist eine Reaktion, die durch ein Anpassungssystem eines Lebewesens vermittelt wird, und mit Hilfe dieses Systems kann es sich physisch und psychisch an Umwelтанforderungen adaptieren (SCHEDLOWSKI & SCHMIDT, 1996). Das heißt, dass der Körper mit Stress auf ihm unbekannte Stimuli reagiert. Die Stressreaktion unterstützt den Körper durch das Anpassen seines Verhaltens und seiner physiologischen Kondition dabei, fordernden und kritischen Gegebenheiten entgegenzutreten (TUCHSCHERER & MANTEUFFEL, 2000). Schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts ist bekannt, dass das Erleben einer physisch oder psychisch belastenden Situation zu einer gesteigerten Ausschüttung von Adrenalin und Cortisol aus den Nebennieren führt (CANNON, 1914). Heutzutage ist man sich der zugrundeliegenden Prozesse genau bewusst. Die sogenannte Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) wird aktiviert: Bei der zentralnervösen Verarbeitung von Stress werden Teile des limbischen Systems erregt. Dies führt zur Aktivierung des Hypophysenvorderlappens, woraufhin adrenocorticotropes Hormon (ACTH) ausgeschüttet wird. Dies führt wiederum zur Synthese von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Ein hemmendes Glukokortikoid-Feedback auf die ACTH-Sekretion begrenzt die Dauer der Exposition des gesamten Gewebes gegenüber Glukokortikoiden und minimiert somit die katabolen, antireproduktiven und immunsuppressiven Wirkungen dieser Hormone (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). Durch die Erregung des limbischen Systems kommt es außerdem gleichzeitig über den *Nukleus coeruleus* und den Hypothalamus zu einer Erregung des Sympathikus. Das Nebennierenmark produziert verstärkt Adrenalin, während über den Sympathikus vorwiegend Noradrenalin freigesetzt wird. Adrenalin und Noradrenalin, die sogenannten Katecholamine, sorgen für eine stärkere Perfusion von Skelett- und Herzmuskulatur, eine Herzfrequenzsteigerung, und eine gesteigerte Lipolyse und Proteolyse, um dem Körper schnell Energie bereitstellen zu können. Dadurch wird der Organismus bei möglichen Flucht- oder Kampfreaktionen belastbarer und leistungsfähiger (TUCHSCHERER & MANTEUFFEL, 2000). Stress kann sowohl positive (*Eustress*) als auch negative (*Distress*) Auswirkungen auf den Organismus haben. Hans Selye (SELYE, 1936) schrieb schon 1936 von der zweiseitigen Natur des „Allgemeinen Anpassungssyndroms“ (*general adaption syndrome, GAS*), wie er die Anpassungen des Organismus als Reaktion auf Stress nannte. Die Wahrnehmung und Interpretation der Situation durch den Einzelnen sei der Hauptfaktor, der bestimme, ob ein Stressor Eustress oder Distress verursache. Le Fevre und Kollegen sind der Ansicht, dass Stress nicht nur aufgrund der Wahrnehmung der Intensität des Reizes (Stressor) durch den Betroffenen als Eustress oder Distress eingestuft wird. Vielmehr spielt auch die Wahrnehmung anderer Merkmale, wie die Herkunft und die Kontrollierbarkeit des Reizes

eine Rolle (LE FEVRE et al., 2006). Des Weiteren kommt es auch auf das Alter des Individuums an. Bei älteren Menschen ist die stressbedingte Psychopathologie weit verbreitet und geht mit eingeschränkter Lebensqualität und kognitiven Beeinträchtigungen einher (BOWER et al., 2015). Langzeitstudien haben ergeben, dass bei älteren Erwachsenen chronisch erhöhte Stresshormone negativ mit dem Hippocampusvolumen und der Gedächtnisleistung korrelieren (LUPIEN et al., 1998). Bei zu wissenschaftlichen Versuchszwecken gehaltenen Tieren sollte Stress soweit wie möglich vermieden werden. Zum einen, damit die Ergebnisse einer Studie keine erhöhte Varianz aufgrund eines mehr oder weniger hohen Stresslevels aufweisen. Zum anderen ist es oberstes Gebot des Tierschutzgesetzes, die Belastung, und damit auch den Stresslevel eines jeden Tieres so gering wie möglich zu halten.

3. Verhaltensuntersuchungen

3.1. Heimkäfigverhalten

Bei der Untersuchung verschiedener Verhaltensweisen, für die der Experimentator das Tier aus seinem Heimkäfig in eine neue Umgebung bringen muss, ist dies relativ störend, zeit- und arbeitsaufwendig und erfordert zusätzlichen Laborraum. Die neue Umgebung kann das Verhalten beeinflussen, und auch das allgemeine Wohlbefinden und den Stoffwechsel des Tieres beeinträchtigen und somit das phänotypische Ergebnis verfälschen, auch wenn die Datenerhebungsmethode automatisiert ist (SINGH et al., 2019). Gerade wenn es darum geht, die Belastung eines Tieres in einem Versuch zu beurteilen, ist es wichtig, das spontan gezeigte Verhalten des Tieres an einem ihm vertrauten Ort nicht zu unterbrechen. Daher haben Verhaltensuntersuchungen im Heimkäfig entscheidende Vorteile.

3.1.1. Nestbauverhalten bei Ratten

Eine Nestbauaktivität ist bei Ratten schon ab dem 20. Lebenstag zu beobachten. Diese ist nicht vom Geschlecht abhängig (HAGEMANN & SCHMIDT, 2018). Allerdings wurde schon im Jahr 1927 festgestellt, dass sich die Nestbauaktivität bei tragenden und säugenden Weibchen erhöht (KINDER, 1927). Das maternale Nestbauverhalten wurde in vielen Studien weiterführend untersucht (REIS et al., 2014; MOUSSAOUI et al., 2016; SUN et al., 2018). Dass Ratten überhaupt ein Nestbauverhalten zeigen, scheint davon abzuhängen, ob sie als Jungtier gelernt haben, feste Gegenstände zu bearbeiten oder nicht. Dies ist zumindest eine Theorie, die 1927 aufgestellt wurde (EIBL-EIBESFELDT, 1955). Auch van Loo und Baumans vertreten die Meinung, dass Nestbauverhalten bei Ratten ein erlerntes Verhalten sei (BAUMANS, 2004). Eine andere Idee ist, dass Ratten eine Begrenzung ihres Schlafplatzes brauchen, und bei Vorhandensein einer solchen immer Nester bauen. Die Fähigkeit zum Hantieren und Tragen des Nestmaterials muss hiernach nicht erlernt werden, sondern ist angeboren. Was dagegen erlernt werden müsse, ist das Behandeln von Stoffen, die erst zu geeignetem Nestmaterial verarbeitet werden müssen (EIBL-EIBESFELDT, 1955). Fest steht, dass das Anbieten von Nestmaterial in vielerlei Hinsicht einen Zugewinn für Laborratten darstellt, wie Manser und Kollegen (MANSER et al., 1998) beschreiben: Durch das Bauen von Nestern können Ratten die Temperatur ihres Schlafplatzes kontrollieren. Des Weiteren kann durch den Aufenthalt in einem Nest einer höheren Lichtintensität entgangen werden. Bei Ratten, die in Gruppen gehalten werden, kann ein

Nest als Ausweichmöglichkeit für ein rangniedrigeres Tier dienen. Überhaupt ist ein Nest eine gute Möglichkeit, dem Tier ein Gefühl von Sicherheit zu geben, denn für die Ratte als Beutetier ist Sicherheit und die Möglichkeit zum Verstecken ein wichtiger Beitrag zum Wohlbefinden.

Wenn Ratten mit dem angebotenen Nestmaterial konstant Nester bauen, können diese beurteilt werden und Abweichungen bzw. Verschlechterungen im Nestbauverhalten können aufgedeckt werden. Im Jahr 2004 wurde ein Score-System für die Beurteilung des Nestbauverhaltens entworfen (BAUMANS, 2004). Dieses System besteht aus drei verschiedenen Scores, die für ein Nest vergeben werden können (BAUMANS, 2004):

- Score 1: flaches nest (*flat*)
- Score 2: leicht hochgewölbtes Nest (*slightly curved*)
- Score 3: höhlenartiges Nest (*deep*).

Dieses Score-System wurde in Epilepsiemodellen verwendet, um das Nestbauverhalten zu dokumentieren (MÖLLER et al., 2018; SEIFFERT et al., 2019). Die Beurteilung des Nestbauverhaltens weiblicher Sprague Dawley Ratten wurde als geeigneter Parameter zur Belastungseinschätzung in Epilepsiemodellen vorgeschlagen (MÖLLER et al., 2018).

3.1.2. Nestbauverhalten bei Mäusen

Mäuse zeigen im Gegensatz zu Ratten natürlicherweise eine starke Nestbauaktivität (LISK et al., 1969; SHERWIN, 1997). Der Nestbau trägt zur Regulation der Umgebungstemperatur bei und schützt die Tiere vor Licht. Bei wilden Mäusen ist das Bauen von Nestern zusätzlich als Versteckmöglichkeit vor Raubtieren und zum Schutz der Jungen unerlässlich (LATHAM & MASON, 2004). Jede Änderung dieses hoch motivierten Nestbauverhaltens oder des Nestes selbst kann auf eine wesentliche Veränderung der Umwelt der Tiere oder der Tiere selbst hindeuten (GASKILL et al., 2013). Für die Beurteilung von Nestern von Mäusen werden Score-Systeme mit mehr Scores als bei Ratten vorgeschlagen. So beschreiben Jirkof und Kollegen (JIRKOF et al., 2013a) ein Score-System für die Beurteilung des Nestbaus mit dem Nestmaterial *Nestlets*, einem watteähnlichen Baumwollmaterial, das in ca. 5x5 cm große Quadrate gepresst ist. Dieses Score-System besteht aus sechs Stufen:

- Score 0: Das Nestlet ist nicht manipuliert.
- Score 1: Das Nestlet ist leicht bearbeitet, mehr als 80% sind noch intakt.
- Score 2: Das Nestlet ist sichtbar bearbeitet, weniger als 80% sind intakt.
- Score 3: Erkennbares Nest, weniger als 80% des Nestlets sind intakt, Fetzen des Nestmaterials sind meist im Nestbereich platziert, Maus beginnt Wände zu errichten.
- Score 4: Flaches Nest, Mulde im Einstreumaterial sichtbar, die Wände des Nests sind höher als die Maus und umgeben weniger als 50% des Nests.
- Score 5: Komplexes Nest, schalenförmig ausgehöhlt, die Wände sind höher als die Maus und umgeben mehr als 50% des Nests.

Ein ähnliches sechs-stufiges Score-System wurde auch für das Nestmaterial *Enviro-Dri*® vorgeschlagen (GASKILL et al., 2013). Mit solchen Score-Systemen lassen sich Veränderungen in der Nestbauaktivität engmaschig aufdecken. Somit hat sich die Beurteilung des Nestbauverhaltens als geeigneter Indikator für Veränderungen des Wohlbefindens von Mäusen in verschiedenen Tiermodellen präsentiert. Beispielsweise zeigen Mäuse postoperativ erniedrigte Nestscores, die umso niedriger sind, desto weniger Schmerzmedikation die Tiere erhalten haben (JIRKOF et al., 2013a). Auch der Stress sozialer Niederlagen führt bei Mäusen zu einer reduzierten Nestkomplexität (OTABI et al., 2016). Eine Studie aus dem Jahr 2018 (HARIKRISHNAN et al., 2018) vergleicht verschiedene Methoden der Blutprobenentnahme bei Mäusen unter Tierschutzgesichtspunkten, die sublinguale Venenpunktion, Schwanzvenenpunktion, retrobulbäre Blutentnahme unter Anästhesie und Punktion der *Vena facialis*. Es konnten bei allen Methoden außer bei der Punktion der *Vena facialis* reduzierte Nest Scores beobachtet werden. Auch bei neurologischen Beeinträchtigungen scheint die Beurteilung des Nestbauverhaltens ein sensibler Parameter zur Belastungsbeurteilung zu sein. So war die Nestkomplexität bei Mäusen mit Hippocampus-Läsionen reduziert (DEACON et al., 2002), genauso war auch bei Läsionen des präfrontalen Cortex eine verminderte Nestkomplexität zu beobachten (DEACON et al., 2003).

Da Mäuse nachtaktiv sind und tagsüber ruhen, ist es für eine aussagekräftige Beurteilung der Nestkomplexität wichtig, die Nestbauaktivität über Tag- und Nachtphase hinweg zu beachten. Die Nestkomplexität steigt über den Tag hinweg an, um mit Beginn der Dunkelphase abzufallen. Zum Ende der Dunkelphase steigt die Nestkomplexität dann wieder an (JIRKOF et al., 2013a). Aufgrund dieser Beobachtungen empfehlen Jirkof und Kollegen, das Nest neun Stunden nach Beginn der Tagphase zu beurteilen, da zu diesem Zeitpunkt hohe Nestscores zu erwarten sind (JIRKOF et al., 2013a).

3.2. Wühlverhalten

Das Wühlverhalten gehört bei Mäusen zu einer hochmotivierten Verhaltensweise, die aber nicht als essentielle Verhaltensweise eingestuft wird. Dieses sogenannte "Luxus" - Verhalten gehört zu den ersten Verhaltensweisen, die in belastenden Situationen reduziert werden (JIRKOF, 2014). Bei Humanpatienten spricht man von „Aktivitäten des täglichen Lebens“ (*activity of daily living, ADL*), die nach Beeinträchtigung des klinischen Zustands als Erstes eingeschränkt werden (MARTIN et al., 2017). Ein motiviertes, spontanes Wühlverhalten wird bei Mäusen als Indikator für normale Verhaltensfunktionen und Wohlbefinden vorgeschlagen (HUANG et al., 2013; JIRKOF, 2014). Deacon und Kollegen beschreiben das Wühlverhalten bei Mäusen (DEACON, 2006b):

„Wenn ein Glas mit Futterpellets über Nacht im Heimkäfig platziert wird, wird es am nächsten Morgen im Allgemeinen leer sein, aber die Pellets werden nicht an einem etwas weiter entfernten Ort gehortet, sondern lediglich um die Öffnung des Glases verteilt. Später zeigte die Beobachtung des Verhaltens der Mäuse, dass sie die Pellets mit koordinierten Bewegungen der Hinter- und Vorderbeine aus dem Gefäß wühlten und aus dem Behälter traten, wobei sie die Pellets nicht wie beim richtigen Horten vorsichtig an eine ausgewählte Stelle trugen.“

Mäuse zeigen das Wühlverhalten mit fast jedem angebotenen Substrat, wie Futterpellets, Einstreumaterial oder auch mit kleinen Tonkugeln (DEACON et al., 2005). Sherwin und Kollegen gingen der Fragestellung nach, ob Mäuse per se eine hohe Motivation zum Wühlen haben, oder ob die Konsequenzen des Wühlens die Motivation für das Wühlverhalten darstellen (SHERWIN, 1997). Sie kamen dabei zu dem Schluss, dass das Wühlverhalten an sich ein hoch motiviertes Verhalten ist. Nur manche Inzuchtstämme wie CBA und 129S2/Sv scheinen nicht gut zu graben (DEACON, 2006b), bei diesen Stämmen sollte das Wühlverhalten selbstredend nicht als Indikatorverhalten beurteilt werden. In verschiedenen Mausmodellen wurde ein reduziertes Wühlverhalten beobachtet, welches auf eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens hinweisen kann. So wurde das Wühlverhalten bei Colitis analysiert (JIRKOF et al., 2013b) und auch im komplexen Schmerz-Syndrom (GOEBEL et al., 2005). Des Weiteren scheint das Testen des Wühlverhaltens auch bei Mausmodellen neurologischer Erkrankungen geeignet zu sein, wie bei Scrapie-Infektion (DEACON et al., 2001) und Läsionen des Hippocampus oder des präfrontalen Cortex (DEACON et al., 2002). Doch das Wühlverhalten stellt nicht nur einen Parameter dar, um das generelle Wohlbefinden von Mäusen zu bewerten, sondern wurde auch verwendet, um die Nozizeption in verschiedenen Krankheitsmodellen besser einschätzen zu können. Eine Studie zeigte zum Beispiel, dass die Beurteilung des Wühlverhaltens ein geeigneter Parameter ist, um krebsinduzierten Knochenschmerz zu bewerten (SLIEPEN et al., 2019).

3.3. Social-Interaction-Test

Der *Social-Interaction-Test* wurde erstmals im Jahr 1978 beschrieben (FILE & HYDE, 1978). Dabei wurde bei Paaren von männlichen Ratten die soziale Interaktion in einem 10-minütigen Testzeitraum beobachtet, wobei zwischen der aktiven sozialen Interaktion und der passiven Interaktion unterschieden wurde (FILE & HYDE, 1978). Die passive Interaktion bezeichnet dabei den bloßen Körperkontakt der beiden Tiere, ohne dass dabei miteinander interagiert wird (FILE & HYDE, 1978). Der *Social-Interaction-Test* ist ein einfach durchzuführender Test, um das angst-assoziierte bzw. depressions-ähnliche Verhalten von Nagern zu beurteilen, wobei eine natürliche Verhaltensform die zu messende Größe darstellt. Die Dauer der aktiven sozialen Interaktion ist dabei am längsten, wenn der Testkäfig den Tieren schon bekannt ist und die Lichtintensität niedrig gehalten wird (FILE & HYDE, 1978). Bei hoher Lichtintensität oder der Durchführung des Tests in einem unbekanntem Umfeld reduziert sich die Dauer der sozialen Interaktion, wohingegen mehr Erstarren (*freezing*) und Defäkation gezeigt wird (FILE & HYDE, 1978). Durch die Applikation von angstlösenden Substanzen kann die soziale Interaktion unter diesen Bedingungen wieder gesteigert werden (FILE & HYDE, 1978). Männliche und weibliche Ratten zeigen das gleiche Ausmaß an sozialer Interaktion und reagieren auf Manipulationen in der Testarena auf die gleiche Weise (FILE & TUCKER, 1984). Deshalb ist der Test für Tiere beider Geschlechter gleichermaßen geeignet. Mäuse zeigen im *Social-Interaction-Test* genau wie Ratten bei Verminderung der Lichtintensität eine reduzierte soziale Interaktion, die Vertrautheit mit der Testarena führt bei Mäusen allerdings nicht zuverlässig zu einer längeren sozialen Interaktion als eine nicht vertraute Testarena (DE ANGELIS & FILE, 1979). Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei Ratten führt die Applikation von angstlösenden Substanzen bei Mäusen nicht zu weniger reduzierter sozialer Interaktion bei Veränderungen der Lichtintensität oder der Bekanntheit der Testarena (CUTLER et al., 1997). Doch nicht nur Stressoren wie die genannten veränderten Umweltbedingungen zeigen Auswirkungen auf die soziale Interaktion. Auch das Zusammenbringen eines Tiers mit einem deutlich dominanteren Tier (*social defeat*), Halten von vielen Tieren auf engem Raum (*crowding*) oder das Halten in Einzelhaltung (*isolation*) sind soziale Stressoren (BEERY & KAUFER, 2015). Je nach Stressor wird das Sozialverhalten der Tiere unterschiedlich beeinflusst. Angst-assoziiertes Verhalten und Depression gehen mit sozialem Rückzug und somit verminderter sozialer Interaktion einher (BEERY & KAUFER, 2015). Der soziale Rückzug ist bei Menschen ein diagnostisches Kriterium für posttraumatische Belastungsstörungen (ASSOCIATION, 2013; BEERY & KAUFER, 2015). Andererseits kann Stress auch genau das Gegenteil bewirken. Bei sozialen Säugetieren zeigt sich ein Phänomen, dass „*social buffering*“ genannt wird: Sie

erholen sich besser von Distress, wenn sie die Nähe von Artgenossen aufsuchen können (KIKUSUI et al., 2006). Der Zusammenhalt der Gruppe schützt sozial lebende Tiere vor Umweltbedrohungen. Sie kommunizieren innerhalb der Gruppe und informieren sich so gegenseitig über drohende Gefahren (SEYFARTH & CHENEY, 2003). *Social buffering* ist also ein multisensorisches Verhalten, was aus direktem physischen Kontakt aber auch aus visueller Beobachtung und dem Geruchssinn besteht (LIU & YUAN, 2016). Positive Effekte durch die soziale Interaktion mit einem Artgenossen werden unter vielen Gesichtspunkten gesehen: Auf physiologische und neurochemische Mechanismen wirkt *social buffering* indem als Reaktion auf die positiven sozialen Interaktionen Corticosteroide unterdrückt werden (KIKUSUI et al., 2006). Klinische Studien zeigten positive Effekte des *social bufferings* auf die Gesundheit, zum Beispiel können soziale Interaktionen kognitive und histologische Schäden, die durch einen experimentellen Schlaganfall bei Nagern verursacht werden, teilweise lindern (KIKUSUI et al., 2006).

3.4. Open-Field-Test

Der *Open-Field-Test* wurde im Jahr 1934 erstmals von Calvin Hall beschrieben (HALL, 1934). Er wurde entwickelt, um emotionales Verhalten zu messen (HALL, 1934). Die *Open-Field-Arena* besteht aus einer vollständig von Wänden umschlossenen Fläche. Die Wände sind so hoch, dass das Tier nicht aus der Arena herauspringen kann. Die Fläche der Arena ist groß genug, um dem Tier ein Gefühl der Offenheit in der Mitte der Arena zu geben (SEIBENHENER & WOOTEN, 2015). In diese Arena wird das Tier für einen definierten Zeitraum gesetzt und es wurden dabei ursprünglich zwei Verhaltensweisen gemessen, die lokomotorische Aktivität und die Defäkation, um Rückschlüsse auf das emotionale Verhalten zu ziehen (WOLFENSOHN et al., 2013). Diese beiden Verhaltensweisen zeigten oft eine negative Korrelation, die aber nicht immer konsistent war, je nach Unterschieden in Spezies, Stamm und Geschlecht (ARCHER, 1973). Es wurde gezeigt, dass beide Verhaltensweisen nicht zwingend miteinander zusammenhängen, was zur Schlussfolgerung führt, dass emotionales Verhalten bei Nagetieren mehrdimensional ist und sich nicht einfach durch die Korrelation dieser beiden Parameter messen lässt (RAMOS, 2008). Nichtsdestotrotz hat sich der *Open-Field-Test* zu einem der meistgenutzten Tests in dem weiten Feld der Verhaltenstests entwickelt (PRUT & BELZUNG, 2003). Mit Hilfe dieses Tests können bestimmte Verhaltensweisen in einem simplen Testaufbau beurteilt werden, weshalb der Test nicht nur bei Nagern Verwendung findet, sondern sich auch in der Forschung mit anderen Tierarten wie Schweinen, Kälbern, Primaten und Honigbienen großer Beliebtheit erfreut (PRUT & BELZUNG, 2003). So können mit Hilfe des *Open-Field-Tests* Aktivität und Lokomotion beurteilt werden. Je nach

Fragestellung können dem Tier auch unbekannte Gegenstände zum Testen des Erinnerungsvermögens gezeigt werden (*Novel-Object-Recognition-Test*) (HAN et al., 2014). Ein oft analysierter Parameter ist das Aufrichten der Tiere („*rearing*“), was Teil des Erkundungsverhaltens bei Nagern ist. Es ist jedoch umstritten, ob es sich beim Aufrichten um ein anxiolytisches oder anxiogenes Verhalten handelt, es wurde beschrieben, dass das Aufrichten mit angst-assoziierten Verhaltensweisen gemeinsam auftrat (BORTA & SCHWARTING, 2005), aber ebenso konnte in einer anderen Studie beobachtet werden, dass das Aufrichten mit anxiolytischem Verhalten zusammen gezeigt wurde (COSTALL et al., 1989). Im Jahr 2018 wurden bei Amygdala-gekündelten Ratten die Auswirkungen von *low frequency stimulation (LFS)*, einem möglichen Therapieansatz bei Temporallappenepilepsie, und der intrahippocampalen Applikation von dem selektiven 5HT_{1a}-Antagonisten NAD-299 untersucht (GHARIB et al., 2018). Im hiernach durchgeführten *Open-Field-Test* konnten allerdings keine Effekte von Kindling, LFS und NAD-299 in der lokomotorischen Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (GHARIB et al., 2018). Auch in anderen Studien, in denen einmal täglich gekündelt wurde, zeigten die Tiere keine Verhaltensänderungen im *Open-Field-Test* (HELFER et al., 1996; MÖLLER et al., 2018). In einem *Rapid-Amygdala-Kindling-Modell* dagegen, in dem Ratten 40 Stimulationen innerhalb von zwei Tagen erhielten, wurde mit Hilfe des *Open-Field-Tests* eine erhöhte lokomotorische Aktivität beobachtet (CHEN et al., 2016).

3.5. Black-and-White-Box-Test

Wie der *Open-Field-Test*, so ist auch der *Black-and-White-Box-Test* ein Test, der auf nicht konditioniertem Verhalten beruht. Das Tier wird auch hier in eine neuartige Umgebung verbracht und kann diese frei erkunden, während sein spontanes Verhalten beobachtet wird. Der Test beruht auf der Annahme, dass die Unsicherheit über die ungewohnte Situation Angst auslöst, da das Tier nicht wissen kann, was in der ungewohnten Testarena passieren könnte (HOLTER et al., 2015). Daher kann dieser Test nur einmal pro Tier und für einen kurzen Zeitraum von wenigen Minuten durchgeführt werden, da sich nur dann das angst-assoziierte Verhalten widerspiegelt, denn das Tier macht sich mit zunehmender Zeit und Erkundung mit der neuen Umwelt vertraut (HOLTER et al., 2015). Der *Black-and-White-Box-Test* wurde ursprünglich von Crawley und Kollegen als einfacher, automatisierter Test für die Untersuchung anxiolytischer Eigenschaften von Arzneimitteln bei Mäusen entwickelt (CRAWLEY & GOODWIN, 1980). Der Testapparat an sich besteht aus einem dunklen, kleineren Kompartiment und einem ungefähr doppelt so großem, hellem und beleuchtetem Kompartiment, die beide miteinander verbunden sind (CRAWLEY & GOODWIN, 1980). Der Test nutzt durch die Auswahlmöglichkeit zwischen dem hellen

und dem dunklen Kompartiment die natürliche Abneigung eines Nagetiers gegen einen hell erleuchteten Raum aus (WEISS et al., 2000). Eine Manipulation, die die Anzahl der Übergänge von einem Kompartiment in das andere, das Erkundungsverhalten oder die im Lichtbereich verbrachte Zeit erhöht, wird als anxiolytisch angesehen, während die Verringerung dieser Maßnahme wieder zu einem verstärkten angst-assoziiertem Verhalten führt (WEISS et al., 2000). Um mögliche Veränderungen in der lokomotorischen Aktivität feststellen zu können, wird in der Regel vor dem *Black-and-White-Box-Test* ein *Open-Field-Test* mit weniger aversiven Lichteinstellungen durchgeführt (CRAWLEY, 1985). Das ist besonders in Modellen wichtig, wo eine Veränderung der Aktivität erwartet wird. Dies ist in Epilepsiemodellen der Fall, wo die Tiere eine Hyperaktivität entwickeln können (WULSIN et al., 2018). Denn dann muss die Hyperaktivität als ein zu berücksichtigender Einflussfaktor bei der Interpretation der Daten aus Tests zum angst-assoziierten Verhalten bedacht werden. Doch auch im Mausmodell der Temporallappenepilepsie konnte verstärktes angst-assoziiertes Verhalten im *Black-and-White-Box-Test* gezeigt werden (UMPIERRE et al., 2014). Der *Black-and-White-Box-Test* wurde an verschiedenen Mausstämmen getestet, wobei stammspezifische Unterschiede beobachtet wurden (BOURIN & HASCOET, 2003). In einer Studie, die sich mit den Unterschieden im angst-assoziierten Verhalten und in der Empfindlichkeit gegenüber Diazepam bei unterschiedlichen Mausstämmen beschäftigte, wurde auch der *Black-and-White-Box-Test* herangezogen (GRIEBEL et al., 2000). Dabei wurden bei mit Vehikel behandelten Tieren Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt, durch die diese in drei Gruppen eingeteilt werden konnten: nicht reaktive Stämme (NZB und SJL), eine mittelmäßig reaktive Gruppe (C3H, CBA, DBA / 2, NMRI, C57BL / 6 und Swiss) und ein hochreaktiver Stamm (BALB / c). Das anxiolytisch wirkende Benzodiazepin Diazepam zeigte bei C57-, DBA / 2-, NMRI- und NZB-Mäuse, nur im *Elevated-Plus-Maze-Test* positive Effekte, im *Black-and-White-Box-Test* dagegen nicht (GRIEBEL et al., 2000). Konsistente geschlechtsspezifische Unterschiede konnten im *Black-and-White-Box-Test* nicht nachgewiesen werden (VOIKAR et al., 2001).

3.6. Elevated-Plus-Maze-Test

Im Jahr 1955 arbeitete Montgomery mit Y-förmigen Apparaturen, die sich aus geschlossenen und offenen Armen zusammensetzten. Er stellte fest, dass Ratten durchweg eine höhere Präferenz zur Erkundung der geschlossenen Arme aufwiesen (RODGERS & DALVI, 1997). Er kam zu dem Schluss, dass offene und geschlossene Arme denselben Erkundungsdrang hervorrufen müssten und die Vermeidung offener Arme darauf zurückzuführen sein muss, dass sie ein höheres Maß an Angst auslösen (RODGERS & DALVI, 1997). Pellow und Kollegen entwickelten im Jahr 1985 den *Elevated-Plus-Maze-Test*, um Wirkstoffe auf anxiolytische und anxiogene Effekte zu überprüfen (PELLOW et al., 1985). Der plusförmige Aufbau des *Elevated-Plus-Maze* besteht aus zwei gegenüberliegenden offenen und zwei ebenfalls sich gegenüberliegenden geschlossenen Armen, die durch einen Sockel erhöht werden (PELLOW et al., 1985). Dieser Aufbau wurde schon ein Jahr früher in einem Tiermodell für die Erfassung von angst-assoziiertem Verhalten beschrieben (HANDLEY & MITHANI, 1984). Die Verhaltensweisen, die beim *Elevated-Plus-Maze-Test* von Bedeutung sind und immer aufgezeichnet werden, sind die verbrachte Zeit in den offenen und geschlossenen Armen und die Übertritte von einem Arm zum anderen (WALF & FRYE, 2007). Das Verhalten in diesem Test bezüglich der Aktivität in den offenen Armen spiegelt einen Konflikt zwischen der Präferenz des Nagetiers für geschützte Gebiete (z. B. die geschlossenen Arme) und seiner angeborenen Motivation zur Erforschung neuer Umgebungen wider (WALF & FRYE, 2007). Reduziertes angst-assoziiertes Verhalten äußert sich demnach in einer erhöhten Zeit in den offenen Armen und / oder Eintritte in die offenen Arme. Andere Parameter, die bei Nagetieren im *Elevated-Plus-Maze* beobachtet werden können, sind die Frequenz des Aufrichtens, *Headdips*, Erstarren, gestreckte Körperhaltungen oder Defäkation (WALF & FRYE, 2007). Es konnte in einem Mausmodell der chemisch induzierten Epilepsie (Pilocarpin-Modell) gezeigt werden, dass Tiere mit epileptischen Anfällen ein erhöhtes angst-assoziiertes Verhalten zeigten (MOTO et al., 2018). Durch die Gabe eines antikonvulsiven Wirkstoffs konnte diesem Verhalten entgegengewirkt werden (MOTO et al., 2018). In einer abgewandelten Form des *Elevated-Plus-Maze*, dem *Open-Elevated-Plus-Maze*, sind alle vier statt nur zwei Arme des Aufbaus geöffnet (SORREGOTTI et al., 2018). In diesem Testaufbau wurde beobachtet, dass die Inaktivierung der Amygdala bei Mäusen zu reduziertem angst-assoziierten Verhalten führt (SORREGOTTI et al., 2018).

3.7. Saccharin-Präferenz-Test

Anhedonie ist die Unfähigkeit, Lust oder Freude über Dinge wie angenehme Aktivitäten oder über Belohnungen zu empfinden (LIU et al., 2018). Bei Humanpatienten wird die Anhedonie als eines der Kernsymptome bei Depressionen angesehen (KRÜGER, 2000). Dies lässt sich natürlich nicht unmittelbar auf Nagetiere übertragen, da es nicht möglich ist, das Empfinden von Tieren direkt nachzuvollziehen. Um immerhin einen Hinweis auf anhedonie-assoziiertes Verhalten bei Nagetieren zu bekommen, wurde der *Saccharin-Präferenz-Test* bei Mäusen entwickelt (KLEIN et al., 2015). Da Depression die häufigste Komorbidität bei Epilepsiepatienten darstellt, wurde der *Saccharin-Präferenz-Test* verwendet, um auch in Mausmodellen der Temporallappenepilepsie Rückschlüsse auf ein anhedonie- und folglich depressions-assoziiertes Verhalten ziehen zu können (KLEIN et al., 2015). Der Test basiert auf der Annahme, dass Nager normalerweise eine süße Lösung wie Saccharin- oder Sucroslösung gegenüber Leitungswasser bevorzugen. Wenn sich keine Präferenz für die süße Lösung zeigt, deutet dies auf anhedonie-assoziiertes Verhalten hin (KLEIN et al., 2015). Dies wurde in verschiedenen Stress-Modellen bestätigt, zum Beispiel nach chronischem physischen Stress (GOSHEN et al., 2008; ZHOU et al., 2011). Die Behandlung mit Antidepressiva stellt die Präferenz für die süße Lösung wieder her (LIU et al., 2015). Mazarati und Kollegen (MAZARATI et al., 2007) verglichen den Gebrauch von Sucrose- und Saccharinlösung in einem Kindling-Modell bei Ratten und stellten fest, dass sich nach zwei und vier Wochen Kindling nur in der Gruppe, die die Saccharinlösung erhalten hatte, ein Präferenzverlust zeigte. Der Konsum der Sucroslösung dagegen war bei den gekindelten Tieren sogar erhöht (MAZARATI et al., 2007). Sucrose, umgangssprachlich auch Haushaltszucker genannt, hat einen Brennwert von 4 kcal pro Gramm (BICKEL, 2018). Saccharin dagegen ist ein synthetischer Süßstoff mit so gut wie keinem Energiegehalt. Bei Depressionen wurde verringerter Appetit (OVERSTREET et al., 2005) aber auch gesteigerter Appetit beobachtet (MAZARATI et al., 2007). Die erhöhte Sucroseaufnahme könnte sich durch einen gesteigerten Appetit erklären lassen, der sich bei den gekindelten Tieren entwickelte (MAZARATI et al., 2007). Der absolute Aufnahmewert der süßen Lösung kann jedoch aufgrund der Gewichtsunterschiede bei Mäusen erheblich schwanken. Es kann vorkommen, dass die Tiere sehr wenig oder sehr viel Flüssigkeit aufnehmen, beide Extreme würden dann die Zuverlässigkeit der Messung des Saccharinkonsums beeinträchtigen (LIU et al., 2018). Deshalb wird empfohlen, sich als valides Maß das Präferenzverhältnis von Saccharin anzuschauen, denn dies ist unter verschiedenen Bedingungen stabiler und unabhängig vom Gewicht der Mäuse (LIU et al., 2018).

3.8. Grimace Scale und Irwin Score

Um einzuschätzen, wie belastend ein Experiment für ein Versuchstier ist, ist die Bewertung des entstandenen Schmerzes unerlässlich. Schmerz ist eine subjektive Wahrnehmung (WILLIAMS & CRAIG, 2016), die trotz einer objektiv gleichstarken Noxe individuell unterschiedlich empfunden werden kann. Ein Individuum, das Schmerzen ausdrückt, kann davon profitieren, wenn dieses Verhalten von Artgenossen beobachtet wird, die sich daraufhin entsprechend verhalten und Unterstützung bei Schutz vor Gefahr und Hilfe bei der Befriedigung der Grundbedürfnisse zu gewährleisten (WILLIAMS, 2002). Für Nagetiere dagegen ist es wichtig, Schmerz nicht zu zeigen (BENATO et al., 2019). Denn als Beutetiere kann ihnen jeder Ausdruck von Schwäche gefährlich werden. Das macht es gerade bei Nagetieren so schwierig, Schmerz richtig einzuschätzen. Zur Beurteilung des wahrgenommenen Schmerzes wurden verschiedene Methoden entwickelt, wie beispielsweise ein Score-System für postoperativen Schmerz (ROUGHAN & FLECKNELL, 2003) oder eine Methode, bei der die Tiere selbst darüber entscheiden konnten, ob sie eine Schmerzmedikation erhalten wollten oder nicht (SUFKA, 1994). Bei Menschen konnte schon gezeigt werden, dass ein eindeutiger und spezifischer Gesichtsausdruck bei Schmerz von der Kindheit an bis ins hohe Alter konsistent bleibt und von Beobachtern als Ausdruck von Schmerz zu erkennen ist (WILLIAMS, 2002). Ähnlich ist es auch bei Mäusen, hier entwickelten Langford und Kollegen den *Mouse Grimace Scale (MGS)*, der sich durch Genauigkeit und Zuverlässigkeit auszeichnet (LANGFORD et al., 2010). Dabei wird der Gesichtsausdruck des Schmerzes anhand verschiedener Merkmale als „0 = nicht vorhanden, 1 = moderat und 2 = schwer“ bewertet (LANGFORD et al., 2010). Der *Mouse Grimace Scale* wurde seitdem in vielen Studien zur Bewertung des Schmerzes herangezogen (LEACH et al., 2012; MATSUMIYA et al.; MILLER et al., 2016). Der *Irwin Score* wurde zur „Beurteilung des Verhaltens und des physiologischen Zustands der Maus“ entwickelt (IRWIN, 1968). Mit diesem Score-System, das auf systematischer Beobachtung beruht, ist es möglich, aus einem einzigen Mess-System ein breites Spektrum an Informationen zu gewinnen und damit auch Informationen zu erhalten, die man mit anderen Methoden nur schwer oder gar nicht bekommen würde (IRWIN, 1968). Der *Irwin Score* wird vor allem als Hilfestellung zur Beurteilung neurologischer Veränderungen verwendet. So wird das Score-System zum Beispiel bei der Bestimmung der letalen Dosis (LD) angewandt, um den Dosisbereich für ZNS-Reaktionen und die primären Auswirkungen auf die physiologischen Körperfunktionen abschätzen zu können (ROUX et al., 2005). Auch in Epilepsiemodellen wurde der *Irwin Score* in einer modifizierten Version eingesetzt um Hinweise auf die Aktivierung des autonomen und zentralen Nervensystems zu erhalten und daraus wiederum Hinweise auf eine mögliche Belastung der Tiere zu erhalten (MÖLLER et

al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019).

4. Corticosteron

Die Nebennierenrindenhormone, Corticoide, sind Abkömmlinge des Cholesterins (ENGELHARDT, 2005). Eine Gruppe der Nebennierenhormone sind die Glucocorticoide, die auf den Glucosestoffwechsel Einfluss nehmen, die andere Gruppe sind die Mineralcorticoide, die auf Kaliumausscheidung und Natriumretention wirken (ENGELHARDT, 2005). Zu den Glucocorticoiden zählen Corticosteron und Cortisol, wobei bei Vögeln, Mäusen und Ratten die Sezernierung von Corticosteron gegenüber dem Cortisol vorherrscht (ENGELHARDT, 2005). Bei Stress wird vom Hypothalamus aus über den *corticotropin releasing factor (CRF)* die Hypophyse angesprochen, welche adrenocorticotrophes Hormon (*ACTH*) ausschüttet. Dieses wiederum wirkt auf die Nebennierenrinde und löst dort die Freisetzung von Glucocorticoiden aus (ENGELHARDT, 2005). Doch nicht nur in Stresssituationen, sondern auch physiologischerweise werden CRF, ACTH und daraufhin Glucocorticoide in einem zirkadianen Rhythmus ausgeschüttet (SCORRANO et al., 2015). Bei Nagern sind die Glucocorticoidkonzentrationen dabei am Morgen am niedrigsten und erreichen am Anfang der bei Nagern aktiven Dunkelphase ihren Höhepunkt (SCORRANO et al., 2015).

Zwischen den Neuronen, die den *corticotropin releasing factor* produzieren, und serotonergen Neuronen besteht eine direkte Verbindung (LARISCH, 2003). Über die Bindung an 5HT_{1A}-, 5HT₂-, 5HT₃- und 5HT₄-Rezeptoren aktiviert Serotonin Neuronen des Hypothalamus, was in einer erhöhten *CRF*-Sekretion resultiert. Dies führt zu einem Anstieg von Glucocorticoiden im Blut, zum Beispiel nach Gabe von Serotoninagonisten (LARISCH, 2003). Durch die Erhöhung des Corticosteronspiegels steigt die Konzentration der Blutglucose an, außerdem hat Corticosteron eine proteinkatabole Wirkung: Die Gluconeogenese wird vermehrt aktiviert und es kommt zum Abbau von Eiweiß. Unter anderem dadurch bedingt werden weniger entzündungsfördernde Substanzen synthetisiert (ENGELHARDT, 2005). Glucocorticoide binden an entsprechende Rezeptoren im Hippocampus und lösen damit einen negativen Rückkopplungsmechanismus auf Hypophyse und Hypothalamus aus (TRIPATHI et al., 2019). Bei chronischem Stress kommt es zur Degeneration des Hippocampus (MAHAR et al., 2014; TRIPATHI et al., 2017, 2019). Dies führt zu stressbedingten Lerndefiziten im Begreifen der räumlichen Vorstellung, für die der Hippocampus zuständig ist (TRIPATHI et al., 2017). Glucocorticoidrezeptoren finden sich auch in der basolateralen Amygdala, die bei chronischem Stress hypertrophieren kann. Somit erzeugt sie einen exzitatorischen Antrieb auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (*HPA-Achse*) (TRIPATHI et al., 2019). Bei Inaktivierung der basolateralen Amygdala bleiben die Hippocampus-abhängigen Lernstörungen unter

chronischem Stress aus (TRIPATHI et al., 2017).

Eine Möglichkeit, Corticosteronkonzentrationen bei Nagern zu messen, ist die Analyse von Serumproben. Im Blut sind veränderte Corticosteronwerte nach einem stressauslösenden Erlebnis schon nach 15-30 Minuten messbar (BELDA et al., 2015). Dies ist zwar nützlich, um eine Aussage über akute Stressoren zu einem bestimmten Zeitpunkt machen zu können (BELDA et al., 2015), andererseits kann dadurch gerade bei Nagetieren das Probenahmeverfahren eine ernsthafte Schwierigkeit und Einschränkung für diesen Ansatz bedeuten (TOUMA et al., 2003). Denn das Hantieren (*Handling*) mit den Tieren vor und während der Blutentnahme sind Stressereignisse, die die Corticosteronkonzentrationen der Tiere beeinflussen können (TOUMA et al., 2003). Eine nicht-invasive und damit bei Nagern vorteilhaftere Methode ist die Bestimmung von Metaboliten des Corticosterons im Kot (TOUMA et al., 2003). Nach der Konfrontation mit einem Stressor werden die fäkalen Corticosteron-Metaboliten mit einer Verzögerung ausgeschieden, die abhängig vom zirkadianen Rhythmus der Tiere ist: Während der Tagphase, also der Ruhephase der Nager, beträgt die Verzögerung ungefähr zehn Stunden (TOUMA et al., 2003). Dagegen sind erhöhte Konzentrationen von Corticosteron-Metaboliten nach einem Stressereignis während der Dunkelphase schon nach vier Stunden nachweisbar (TOUMA et al., 2003). Daher ist es wichtig, Kotproben vom entsprechenden Zeitpunkt zu nehmen, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (TOUMA et al., 2003).

5. Sexualzyklus

Die Geschlechtsreife bei weiblichen Mäusen wird mit einem Alter von 28-49 Tagen erreicht (SCHNORR & KRESSIN, 2011). Mäuse sind ganzjährig polyöstrisch (SCHNORR & KRESSIN, 2011). Wenn sie in einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten werden, dauert ein Zyklus vier bis fünf Tage, d.h. sie ovulieren alle vier bis fünf Tage (BEHRINGER et al., 2016). Die Ovulation findet normalerweise drei bis fünf Stunden nach Beginn der Dunkelphase statt (BEHRINGER et al., 2016). In Einzelhaltung gehaltene Mäuse zeigen dabei einen regelmäßigeren Zyklus als in Gruppenhaltung gehaltene Mäuse (BELLE, 2004). Der Zyklus kann in vier verschiedene Phasen (BEHRINGER et al., 2016) unterteilt werden:

- Proöstrus: Entwicklung von Ovarialfollikeln (BEHRINGER et al., 2016), kernhaltige Epithelzellen und wenige kernlose und verhornte Zellen in der Vaginalzytologie sichtbar (EKAMBARAM et al., 2017);
- Östrus: Ovulation (BEHRINGER et al., 2016), größtenteils verhornte Epithelzellen in der Vaginalzytologie sichtbar (EKAMBARAM et al., 2017);
- Metöstrus: Bildung von *Corpora lutea* (BEHRINGER et al., 2016), in der Zytologie viele Leukozyten in verklumpter Form und wenige verhornte Epithelzellen zu erkennen (EKAMBARAM et al., 2017);
- Diöstrus: Beginn der Follikelentwicklung für die nächste Ovulation und Elimination vorheriger Eizellen (BEHRINGER et al., 2016), große Anzahl an Leukozyten, die jedoch nicht verklumpt vorliegen (EKAMBARAM et al., 2017).

Die Zyklusphase, in der eine Maus sich befindet, kann Auswirkungen auf Verhaltensparameter wie Lokomotion und Aktivität sowie auf das Erinnerungsvermögen haben (DATTA et al., 2019). Deshalb ist es wichtig, die Zyklusphasen der Tiere zu kennen, wenn diese Verhaltensparameter in den durchgeführten Versuchen von Bedeutung sind. Zur Zyklusbestimmung wurden verschiedene Methoden beschrieben. Zum einen kann ein Vaginalabstrich, wie er zuerst zur Zyklusbestimmung beim Meerschweinchen beschreiben wurde (STOCKARD & PAPANICOLAOU, 1917), auch bei der Maus durchgeführt werden (EKAMBARAM et al., 2017). Eine vaginalzytologische Bestimmung der Zyklusphase ist auch mittels einer Vaginalspülung möglich (MCLEAN et al., 2012). Des Weiteren kann man durch regelmäßige visuelle Inspektion der Vulva Hinweise auf die Zyklusphase bekommen, wobei die Zuverlässigkeit dieser Methode je nach Stamm und Farbe der Maus variieren kann (BYERS et al., 2012). Durch das vermehrte Auftreten von verhornten Zellen im Östrus ist der elektrische Widerstand der Vaginalschleimhaut in dieser Phase erhöht. So lässt sich mittels elektrischer Widerstandsmessung feststellen, ob ein Tier sich gerade im Östrus befindet (RAMOS et al., 2001).

6. Serotonin

6.1. Metabolismus und Aufgaben

Schon im 19. Jahrhundert wurde vermutet, dass eine vasokonstriktorisch wirkende Substanz im Blut vorhanden sein könnte (LUDWIG & SCHMIDT, 1868). Im Jahr 1848 entdeckten Maurice Rapport, Arda Green und Irvine Page einen blutdrucksteigernden Stoff in Rinderblutserum, den sie wegen ihrer Wirkung auf den Blutgefäßtonus und seiner Herkunft aus dem Serum „Serotonin“ nannten (RAPPORT et al., 1948). Kurz darauf gelang es Rapport, die Struktur des Serotonins zu identifizieren (RAPPORT et al., 1949) und Irvine Page und Betty Twarog konnten das Auftreten von Serotonin auch im Gehirn von Säugetieren belegen (TWAROG & PAGE, 1953).

Während sich mit 2% nur ein kleiner Teil des im Körper vorhandenen Serotonins im ZNS befindet, ist der überwiegende restliche Teil peripher lokalisiert. Davon sind 90% in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut lokalisiert, in denen das Serotonin synthetisiert und in Vesikeln gespeichert wird (KRIEGEBAUM et al., 2010). Durch eine Freisetzung ins Darmlumen wird die Kontraktilität der glatten Muskulatur erhöht und somit die Darmmotorik beeinflusst (ORMSBEE & FONDACARO, 1985). Bei Abgabe ins Blut wird Serotonin in den Thrombozyten gespeichert und trägt bei Gefäßläsionen zur Blutgerinnung bei (WALTHER et al., 2003).

Die Ausgangssubstanz der Serotoninsynthese ist die essentielle Aminosäure L-Tryptophan. In einer Reaktion, die aus zwei Schritten besteht, wird zuerst 5-Hydroxytryptophan hergestellt, wobei das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TPH) als Katalysator dient. Es sind zwei Isoformen der Tryptophan-Hydroxylase bekannt (TPH 1 und TPH 2), die sich in ihrem regulatorischen Bereich und in verschiedenen kinetischen Merkmalen unterscheiden (GUTKNECHT et al., 2009). Die Serotoninsynthese im Gehirn wird zeitlebens durch TPH 2 katalysiert, TPH 1 dagegen wird in der Peripherie und auch in der Epiphyse exprimiert (GUTKNECHT et al., 2009). Eine Hemmung der Tryptophanhydroxylase ist durch Parachlorophenylalanin möglich; Glucocorticoide hingegen führen zu einer Beschleunigung der Serotoninsynthese (HAMON et al., 1978). Im nächsten Schritt der Serotoninsynthese entsteht dann durch eine Decarboxylierung Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin) (STRYER, 1990). Nach diesen Syntheseschritten in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut wird das Serotonin über ein Transportprotein (SERT) an den Epithelzellen der Darmschleimhaut und an Thrombozyten gebunden und gelangt so in den gesamten Blutkreislauf. Der Abbau des Serotonins geschieht größtenteils über die Monoaminoxidase Typ A und Typ B, ein Enzym, das das

Serotonin zu 5-Hydroxy-Indolyl-Acetaldehyd umwandelt. Die Aldehyd-Dehydrogenase baut dies dann zu 5-Hydroxyindolessigsäure ab, die mit dem Urin ausgeschieden wird. Serotonin kann außerdem noch über einen weiteren Weg abgebaut werden: mit Hilfe der Serotonin-N-Acetyl-Transferase (AANAT) und des Co-Enzyme Acetyl-CoA entsteht aus Serotonin N-Acetyl-Serotonin. Dieses wird durch die Acetyl-Serotonin-O-Methyltransferase (ASMAT) und unter Beteiligung von S-Adenosyl-L-Methionin methyliert, wobei das Epiphysenhormon Melatonin als Endprodukt entsteht (STRYER, 1990). Ausschlaggebend für die Steuerung der Acetyltransferaseaktivität ist das Tageslicht, welches somit die Melatoninproduktion reguliert (KLEIN, 2007). Weiterhin ist das Serotonin in der Peripherie bei der T-Zell vermittelten Immunantwort beteiligt (GEBA et al., 1996) und moduliert Makrophagenfunktionen (JACKSON et al., 1985; STERNBERG et al., 1987). Außerdem spielt Serotonin eine Rolle bei dem Auslösen allergischer Reaktionen (EL-NOUR et al., 2007).

Serotonin selbst kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren, was bedeutet, dass nur Serotoninvorstufen wie L-Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan ins Gehirn gelangen können und daraus dann wiederum Serotonin synthetisiert werden muss (PARDRIDGE & OLDENDORF, 1975; OLDENDORF, 1977). Serotonerge Neurone finden sich vor allem in den rostralen und kaudalen Raphe-Nuclei-Komplexen und können von B1 bis B9 durchnummeriert werden (VITALIS et al., 2013). Die Neurone des kaudalen Raphe-Komplexes (B1-B4) projizieren zum motorischen und autonomen System des Rückenmarks, wo beispielsweise der *Nucleus raphe magnus* inhibierend auf das Dorsalhorn des Rückenmarks einwirkt. Dadurch werden eingehende nozizeptorische Reize und somit die Wahrnehmung von Schmerzen beeinflusst (KRIEGEBAUM et al., 2010). Die Neurone des rostralen Raphe-Komplexes (B5-B9) projizieren ins Prosencephalon und Diencephalon (KRIEGEBAUM et al., 2010; VITALIS et al., 2013) Dort werden unter anderem Cortex, Striatum, Amygdala und Hippocampus serotonerg innerviert (Abb. 4). Serotonin wirkt hier „bei der Regulation von Gedächtnisbildung, Stimmung, Kognition, Wach-Schlaf-Zyklen, emotionalem und sozialem Verhalten, Thermoregulation, Ess- und Sexualverhalten sowie Ausprägung des Angstverhaltens mit“ (KRIEGEBAUM et al., 2010).

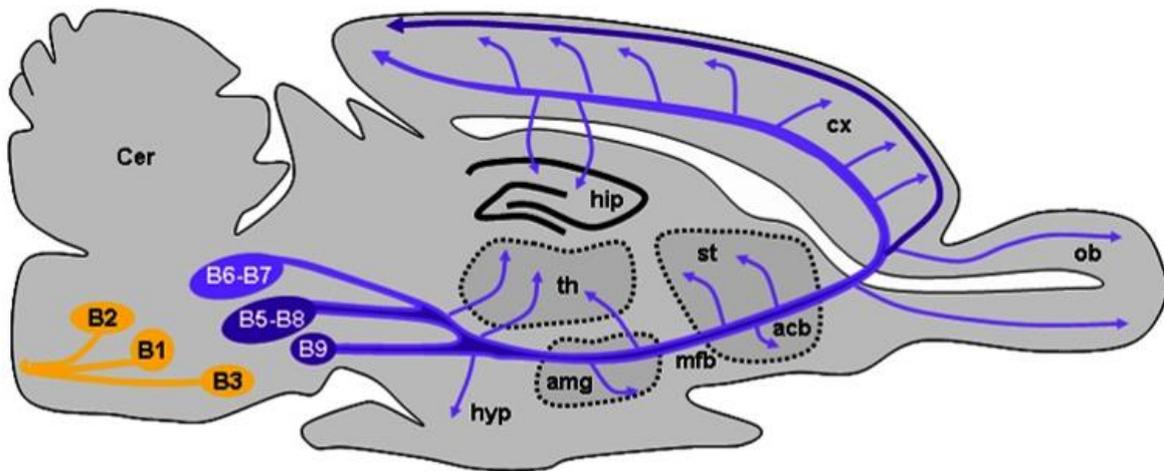


Abb. 4: Sagittalschnitt eines Mausgehirns mit serotonergen Neuronen und deren Projektionen. Hypothalamus (hyp), Amygdala (amg), Thalamus (th), Nucleus accumbens (acb), Striatum (st), Riechkolben, olfactory bulb (ob), Cerebraler Cortex (cx), Hippocampus (hip). Abbildung entnommen aus VITALIS et al. (2013). Mit freundlicher Genehmigung des Journals *Frontiers in Cellular Neuroscience* und Tania Vitalis.

Nach der Synthese wird das Serotonin im Gehirn in intrazellulären Vesikeln in den Synapsen gespeichert. Dies ist notwendig, um eine regulierte Freisetzung je nach neuronaler Aktivität sicherzustellen. Die Freisetzung wird durch ein die Zelle erreichendes Aktionspotenzial in Gang gesetzt. Ca^{2+} strömt in die Zelle ein und aktiviert eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinase (KRIEGEBAUM et al., 2010). Diese phosphoryliert Synapsin I, welches zu einer Proteinfamilie gehört, die die synaptischen Vesikel an ein Netzwerk aus Zytoskelettfilamenten bindet. Es sind drei Isoformen des Synapsins bekannt, Synapsin I, II und III. Mutationen in Synapsin I und II wurden mit der Anfälligkeit für die Entwicklung einer Epilepsie beim Menschen in Verbindung gebracht (CAVALLERI et al., 2007). Dies steht im Einklang mit Beobachtungen in Mausmodellen, bei denen epileptische Anfälle bei Mäusen beobachtet werden, bei denen die Gene für die Synapsin I, II oder I/II/III ausgeschaltet wurden (GITLER et al., 2004). Wenn Synapsin I phosphoryliert ist, werden Vesikel vom Zytoskelett der Zelle losgelöst und docken an der präsynaptischen Membran an spezifischen Stellen an. Dies geschieht durch Interaktionen zwischen integralen Proteinen der Vesikelmembran (vSNARES) und Rezeptorproteinen an der präsynaptischen Membran (tSNARES) (KRIEGEBAUM et al., 2010). Durch den Einstrom von Calcium vereinen sich vSNARES und tSNARES zu einem Komplex, somit kann der Vesikel an die Membran binden und sich durch Exozytose in den synaptischen Spalt entleeren. Anschließend legen sich sogenannte SNAP-Proteine an den SNARE-Komplex an und es kommt zur Auflösung des Komplexes, was über Endocytose zum Vesikelrecycling führt (KRIEGEBAUM et al., 2010).

6.2. Serotoninrezeptoren

Serotoninrezeptoren kann man aufgrund ihrer Genlokalisierung, ihrer Aminosäuresequenz, der physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften und der Mechanismen der Signaltransduktion in sieben Familien aufteilen (VANHOUTTE et al., 1996). Diesen Familien können derzeit 15 verschiedene Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) - Rezeptoren zugeordnet werden, deren Expression sowohl im Gehirn als auch außerhalb stattfindet (BERGER et al., 2009). Die Rezeptoren 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ und 5-HT₇ gehören zu den rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten, metabotropen Rezeptoren (*G-protein coupled receptors, GPCR*), wohingegen der 5-HT₃-Rezeptor als Liganden-gesteuerter Ionenkanal gilt (KROEZE et al., 2002). Die Struktur der 5HT-Rezeptoren mit Ausnahme von 5-HT₃ ist typisch für heptahelikale G-Protein gekoppelte Rezeptoren. So besitzen sie einen extrazellulären Aminoterminus, sieben hydrophobe Transmembranhelices, die durch drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verknüpft sind, und einen intrazellulären Carboxylterminus (KROEZE et al., 2002). Es lassen sich nach Kriegebaum et al. (KRIEGEBAUM et al., 2010) drei Gruppen der G-Protein-gekoppelten 5-HT-Rezeptoren unterscheiden:

- Rezeptoren, die an aktivierende G-Proteine gekoppelt sind (5-HT₄, 5-HT₆ und 5-HT₇); aktivieren die Adenylatcyclase
- Rezeptoren, die an hemmende G-Proteine gekoppelt sind (5-HT₁); inhibieren die Adenylatcyclase
- Rezeptoren, die an G_{q/11}-Proteine gebunden sind (5-HT₂-Rezeptoren); diese sind in den Phospholipase-C (PLC) Signalweg eingebunden.

Durch die Stimulation der Adenylatcyclase kommt es zum Anstieg von cAMP, was zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt (KRIEGEBAUM et al., 2010). Das Gegenteil ist bei einer Hemmung der Adenylatcyclase der Fall, es kommt zu einem Abfall des cAMP-Spiegels und einer Hemmung der Proteinkinase A. Wenn bei der dritten Gruppe die Phospholipase C aktiviert wird, resultiert dies in einer Änderung von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG), was durch Öffnung von entsprechenden Kanälen zu einem erhöhten intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und Aktivierung der Proteinkinase C führt (RAYMOND et al., 2001).

Die einzelnen Rezeptoren lassen sich in jeweils mehrere Subtypen unterteilen, die in unterschiedliche physiologische Vorgänge im Körper involviert sind (Tab. 1). Die Unterscheidung der verschiedenen Subtypen kann anhand pharmakologischer Kriterien

vorgenommen werden (FRAZER et al., 1990). In dieser Arbeit wird im Folgenden weiter auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor eingegangen.

Rezeptor	Vorkommen im ZNS	Vorkommen in der Peripherie	Physiologische Rolle
5-HT _{1A}	Kortex, Hippocampus, Amygdala, Septum, Hypothalamus, Raphe-Nuclei	myenterischer Plexus (Darm), Mil	Lernvorgänge, Regulation der Körpertemperatur, Ess- und Sexualverhalten, Signalweiterleitung, zentrale Blutdruckregulation, Anxiolyse
5-HT _{1B}	Kortex, Striatum, lateraler Geniculate Nucleus, Raphe-Nuclei; geringe Konzentration: Substantia nigra, Globus pallidus	Herz, Vaskulatur, nasale Mukosa	Unterdrückung der durch Migräne ausgelösten neuronalen Entzündungsprozesse, Vasokonstriktion in Koronar- und Meningealgefäßen, MDMA- (Ecstasy) Wirkung
5-HT _{1D}	Kortex, Hippocampus, Amygdala, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Superior Colliculus	Herz, Vaskulatur	Unterdrückung der durch Migräne ausgelösten neuronalen Entzündungsprozesse
5-HT _{1E}	Kortex, Hippocampus, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Amygdala, Hypothalamus	In geringer Konzentration: Herzkranzarterien, dorsales Wurzelganglion	emotionales Verhalten, Schmerzen, motorische Aktivität
5-HT _{1F}	Kortex, Striatum, Gyrus Dentatus (Hippocampus), Nucleus tractus solitarius, Bulbus olfactorius, Rückenmark	Uterus	an der Unterdrückung von neuronalen Entzündungen beteiligt
5-HT _{2A}	Kortex, Hippocampus, Amygdala, Nucleus accumbens, Striatum, Hypothalamus, Bulbus olfactorius	Thrombozyten, glatte Muskulatur, Blutgefäße, Harnwege, Darm, Uterus, dorsales Wurzelganglion	Wundverschluss, Kontraktion von Blutgefäßen, Harnwegen, Darm und Uterus, Erhöhung der Kapillarpermeabilität, Blutgerinnung, LSD-Wirkung
5-HT _{2B}	in geringer Konzentration: Neokortex, Amygdala, Septum, Hypothalamus, Zerebellum	in hoher Konzentration: Darm, Herz, Leber, Niere, Lunge, Vaskulatur, Plazenta	Migräne, chronische Hypertonie, Kontraktion der glatten Muskulatur, Vasorelaxation durch Ausschüttung von NO, Kontrolle der SERT-Aktivität in Raphe-Neuronen
5-HT _{2C}	5-HT _{2C} Plexus choroideus, Kortex, Substantia nigra, Globus pallidus, Septum, Hypothalamus, Rückenmark	Rückenmark keine Expression in der Peripherie	Peripherie Ess- und Sexualverhalten; Rezeptor-Antagonisten wirken anxiolytisch
5-HT ₃	Kortex, Hippocampus, Amygdala, Bulbus olfactorius, Rückenmark	an den Zellwänden von autonomen und sensorischen Neuronen	Darmmotilität, intestinale Sekretion, Auslösung des Brechreflexes (Nausea, Emesis)
5-HT ₄	Neokortex, Hippocampus, Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus, Substantia nigra)	Darm, Blase, Nebenniere, Herz	Neurotransmissionsverstärkung und Gedächtnisbildung durch erhöhte Transmitterfreisetzung, Kontrolle der Atmung, Regulation der Darmaktivität durch ACh-Ausschüttung
5-HT _{5A}	Kortex, Hippocampus, Hypothalamus, Zerebellum	keine Expression in der Peripherie	Einfluss auf das adaptive Verhalten bei Stress
5-HT _{5B}	Rezeptor-Sequenz nur in Maus und Ratte exprimiert; beim Menschen: Pseudogen, durch Stopcodons unterbrochen	keine Expression in der Peripherie	Einfluss auf das adaptive Verhalten bei Stress
5-HT ₆	Kortex, limbisches System	keine Expression in der Peripherie	Regulation von kognitivem Verhalten und Lernen, Ernährung, Gemütszustände, Krämpfe
5-HT ₇	Hippocampus, Thalamus, suprachiasmatischer Nucleus (SCN)	glatte Muskulatur, Gastrointestinaltrakt, kardiovaskuläres System, dorsales Wurzelganglion	Relaxation von Muskulatur, Tag-Nacht- und Wach-Schlaf-Zyklen, Ängstlichkeit, kognitive Beschwerden, Schmerzen

Abb. 5: Überblick über die verschiedenen 5-HT-Rezeptoren, deren Vorkommen im ZNS und in der Peripherie und die physiologische Rolle. Nach KRIEGEBAUM et al. (2010).

6.2.1. 5-HT_{1A}-Rezeptor

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist Teil der 5-HT₁-Rezeptorfamilie, bei der fünf Subtypen unterschieden werden. Die Aminosäuresequenzen von den Rezeptorsubtypen 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1e} und 5-HT_{1F} zeigen eine Übereinstimmung von 40 bis 63 % (RAYMOND et al., 2001). Bis auf die 5-HT_{1e} und 5-HT_{1F}-Subtypen zeigen alle Rezeptoren dieser Klasse nicht nur eine hohe Affinität zum 5-HT, sondern auch zum synthetischen Agonisten 5-Carboxamidtryptamin (5-CT) (LANFUMEY & HAMON, 2004). 5-HT_{1A}-Rezeptoren werden in zwei verschiedene Gruppen unterteilt: präsynaptische Autorezeptoren, die sich an den Dendriten und im Zellkörper von 5-HT-Neuronen in den Raphekernen befinden; und postsynaptische Heterorezeptoren, die auf den Dendriten und dem Zellkörper von Zielneuronen in 5-HT-Projektionsbereichen wie Kortex, Hippocampus, Amygdala und Septum existieren (RIAD et al., 2000; ALTIERI et al., 2013). Die 5-HT_{1A}-Autorezeptoren regulieren das 5-HT-System negativ. Das bedeutet, dass in den Raphekernen freigesetztes Serotonin 5-HT_{1A}-Autorezeptoren aktiviert, die die Aktivität von 5-HT-Neuronen hemmen (BLIER et al., 1998; LIU et al., 2005). Im Gegensatz dazu aktiviert die Freisetzung von Serotonin in Zielhirnregionen 5-HT-Heterorezeptoren, einschließlich des 5-HT_{1A}-Heterorezeptors. Der 5-HT_{1A}-Heterorezeptor ist im Hippocampus, im Septum, in der Amygdala und im präfrontalen Cortex (POMPEIANO et al., 1992) exprimiert und vermittelt dort Serotoninwirkungen, die sich auf Angst, Stress, Depression und kognitive Funktionen beziehen (BARNES & SHARP, 1999; GARCIA-GARCIA et al., 2014). Somit können 5-HT_{1A}-Rezeptoren als Autorezeptoren sowohl die Serotoninfreisetzung unterdrücken, sowie als Heterorezeptoren auch die für die Gehirnregion spezifischen Reaktionen auf freigesetztes Serotonin vermitteln. Das Serotoninsystem mit dem hier beschriebenen 5-HT_{1A}-Rezeptor ist also stark an der neuronalen Regulation des Stimmungsbildes und von Angstzuständen beteiligt. Daher ist das Interesse der wissenschaftlichen Forschung sehr hoch, dieses System pharmakologisch zu beeinflussen und für therapeutische Ansätze zu nutzen. Bei 5-HT_{1A}-Knockout-Mäusen wurde in verschiedenen Verhaltenstests ein gesteigertes angst-assoziiertes Verhalten festgestellt (HEISLER et al., 1998), sie zeigten eine erhöhte Tendenz zum Meiden eines neuen Umfelds und versuchten, stressigen Situationen zu entkommen (PARKS et al., 1998). Diese Beobachtungen decken sich mit der Tatsache, dass die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch Agonisten zu anxiolytischen Effekten führt (LUCKI et al., 1994; DE VRY, 1995). Bei Menschen mit unbehandelten Panikstörungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die prä- als auch die postsynaptische Bindung von Serotonin an den 5-HT_{1A}-Rezeptoren vermindert war (NASH et al., 2008).

6.2.2. Bedeutung für die Medizin

Die oben genannten Beispiele zeigen, wie viel Potenzial zur Entwicklung von Therapien im serotonergen System zu finden ist. Menschen mit vielen verschiedenen Krankheitsbildern profitieren von der Forschung, die bisher zum Serotoninsystems erfolgt ist und noch erfolgen wird. Diese sind nach Jones und Blackburn (JONES & BLACKBURN, 2002) unter anderem: Depressionen, Schizophrenie, generalisierte Angststörung (*generalized anxiety disorder, GAD*), Sozialphobie, Obsessiv-compulsive Störung (*obsessive-compulsive disorder, OCD*), Panikstörung, posttraumatische Belastungsstörung, Migräne, Schmerzbehandlung, Autismus, kognitive Störungen, Aggressionen, prämenstruelle Dysphorie (*premenstrual dysphoria, PMD*), durch Chemotherapie ausgelöster Übelkeit, Probleme des Verdauungstrakts, Übergewicht und Störungen des Appetits, Störungen der Sexualfunktion, Drogenmissbrauch. Auch Patienten mit Temporallappenepilepsie (*TLE*) zeigen Veränderungen des serotonergen Systems in verschiedenen Hirnarealen (LOTHE et al., 2008; BORGMANN et al., 2016).

Einer der bedeutendsten durch die Forschung an den 5-HT-Rezeptoren erreichten Fortschritte war die Entwicklung von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (*specific serotonin reuptake inhibitors, SSRI*). Diese hemmen die Wiederaufnahme, also das *Recycling* des Serotonins im synaptischen Spalt. Gemäß den Europäischen Richtlinien für klinische Untersuchungen von Antidepressiva wird eine Substanz als Antidepressivum akzeptiert, wenn nachgewiesen werden kann, dass sie wirksamer als ein Placebo ist. Diese Wirksamkeit muss sich bei Patienten mit schweren Depressionen zeigen, und zwar nicht nur in Kurzzeitstudien, also während einer akuten mindestens sechswöchigen Behandlungsdauer. Auch in mittelfristig andauernden Studien muss die Wirksamkeit nachgewiesen werden, das heißt in Studien, die die folgenden drei bis sechs Monate abdecken, was der üblichen Gesamtdauer einer Episode einer schweren Depression entspricht (GOODNICK & GOLDSTEIN, 1998). Denn die Erstbehandlung einer akuten Depression führt oft erst einmal zu einer Verbesserung der Symptomatik. Es besteht jedoch das Risiko, dass die Symptome wieder auftreten und es so zu einem Rückfall kommt, wenn die Therapie zu diesem frühen Zeitpunkt abgebrochen wird (MONTGOMERY & FINEBERG, 1989). *SSRI's* erfüllen diese Bedingungen, allerdings zeigen sie einen verzögerten Wirkungseintritt von zwei bis sechs Wochen, bevor sich die therapeutische Wirkung einstellt (JONES & BLACKBURN, 2002). In der Publikation von Jones und Kollegen (JONES & BLACKBURN, 2002) wird die Theorie erläutert, dass die Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme anfänglich die Aktivierung der präsynaptischen Rezeptoren in der dorsalen und medianen Raphe bewirke. Dies hemmt die Aktivität von 5-HT-Neuronen, wodurch die Freisetzung von Serotonin verringert wird. Der gewünschte Effekt, nämlich

eine erhöhte Aktivierung der postsynaptischen Serotonin-Rezeptoren, wird erst nach Desensibilisierung der Rezeptoren in den Raphekernen erreicht.

Auch in Tiermodellen der Temporallappenepilepsie (TLE) konnten Veränderungen im Serotoninsystem festgestellt werden. Bei epileptischen Ratten wurde eine verminderte Serotoninkonzentration im Hippocampus beobachtet, welche mit depressions-ähnlichen Verhaltensauffälligkeiten korrelierte (MAZARATI et al., 2008). Andererseits wurde ein erhöhtes 5-HT_{1A}-Bindungspotenzial im Septum epileptischer Ratten nachgewiesen (DI LIBERTO et al., 2018). Bei Humanpatienten mit Temporallappenepilepsie und zusätzlicher Depression konnte mit Hilfe eines PET-Scans eine reduzierte Serotoninkonzentration in verschiedenen Bereichen des Gehirns wie im Hippocampus und in den Raphekernen nachgewiesen werden. Die erniedrigte Serotoninkonzentration könnte in Beziehung zum Schweregrad der Depression stehen (LOTHE et al., 2008). Auch andere Studien zeigen, dass bei Patienten mit TLE in einigen Gehirnarealen die Affinität des 5-HT_{1A}-Rezeptors vermindert ist (DREVETS et al., 1999; TOCZEK et al., 2003). Eine post-mortem Studie an Suizidopfern mit Depressionen zeigte dagegen eine Zunahme der Expression des 5-HT_{1A}-Autorezeptors (STOCKMEIER et al., 1998). Da psychische Krankheiten wie Depressionen eine häufige Komorbidität der Epilepsie darstellen, sind die Auswirkungen von Antidepressiva auf epileptische Anfälle von großer Bedeutung. Bei Ratten mit Pilocarpin-induzierten Anfällen konnte beobachtet werden, dass Fluoxetin, ein SSRI, und der nichtselektive 5-HT-Agonist Trifluoromethylphenylpiperazin (*TFMPP*) die Anfallsfrequenz bei spontanen Anfällen reduzieren (HERNANDEZ et al., 2002). Umgekehrt wurde auch im Pilocarpin-Modell gezeigt, dass die Reduktion von Serotonin zu einer Erhöhung der Anfallsfrequenz führt (TRINDADE-FILHO et al., 2008). Eine Metaanalyse mit Patientendaten aus den USA der Jahre 1985-2004 hat ergeben, dass Antidepressiva die das Serotonin-System beeinflussen, die Inzidenz für spontane Anfälle bei Patienten mit Depressionen senken können (ALPER et al., 2007). Die hierbei betrachteten Antidepressiva umfassten Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*SSRI*), selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (*SNRI*) und noradrenerge spezifisch serotonerge Antidepressiva (*NaSSA*). Diese Studie zeigt auch, dass es beim Einsatz der genannten Antidepressiva keine Hinweise auf einen durch sie induzierten niedrigeren Schwellenwert für Anfälle gibt und sie deshalb bei Epilepsiepatienten angewandt werden können. So könnte die Modulation des serotonergen Systems einen neuen Ansatzpunkt im Kampf gegen die Problematik der Pharmakoresistenz liefern (LÖSCHER & LEPPIK, 2002).

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Nagetiere sind grundsätzlich Beutetiere. Als solche ist es ihr evolutionär angelegtes Bestreben, Schmerzen und Leiden so gut wie möglich zu verbergen, um sich nicht als leichte Beute für Prädatoren zu präsentieren. Deshalb ist es schwierig, für Labornager belastende Situationen zu erkennen und zusätzlich den Schweregrad der Belastung zu definieren. Doch genau das wird in der EU-Richtlinie 63/2010 und deren nationaler Umsetzung in die Tierschutzversuchstierverordnung gefordert. Die Einstufung der Belastung für die Tiere in einem spezifischen Tiermodell sollte dabei möglichst evidenzbasiert erfolgen und keine subjektive Meinung einzelner Personen wiedergeben. Das Hauptziel dieser Studie ist es, für eine solche Belastungseinstufung geeignete Parameter anhand umfassender Untersuchungen zu identifizieren und zu validieren. Dabei wird ein Epilepsiemodell, das Kindling-Modell in Mäusen, betrachtet. Tiermodelle der Epilepsie sind unerlässlich, um die Mechanismen zu verstehen, die der Epileptogenese zugrunde liegen (LÖSCHER & BRANDT, 2010) und darauf aufbauend therapeutische Strategien zu entwickeln, um in den Prozess der Epileptogenese einzugreifen. Dadurch könnten auch mit Epilepsie einhergehende Komorbiditäten und die Entstehung therapieresistenter Epilepsien verhindert werden. Umso wichtiger ist es, bei diesen dringend benötigten Tiermodellen die Belastung für die Tiere richtig einzuschätzen und zu verstehen. Denn Leiden und Distress in Epilepsiemodellen kann verschiedene Ursachen haben, sowohl die Induktion der Anfälle selbst, die Methode der Anfallsinduktion, Komorbiditäten, sowie die notwendige Handhabung (*Handling*) mit den Tieren können eine Belastung hervorrufen (LIDSTER et al., 2016). Die beschriebenen Faktoren können in verschiedenen Modellen unterschiedlich belastend für die Tiere sein. Um im Sinne des Tierwohls handeln zu können, müssen Belastungen erkannt und richtig eingeschätzt werden. Dazu werden valide Parameter benötigt, anhand derer Belastungen beurteilt werden können. Diese Parameter sollten einfach in den Laboralltag zu integrieren und ohne großen Aufwand durchführbar sein. Deshalb werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Parameter identifiziert, mit deren Hilfe die Belastung der Mäuse im Kindling-Modell zuverlässig eingeschätzt werden kann. Auch in anderen Epilepsiemodellen werden zukünftig Parameter zur Belastungseinschätzung bei der Spezies Maus identifiziert. Diese können dann mit den Parametern zur Belastungseinschätzung, die für das Kindling-Modell selektiert wurden, verglichen werden. Somit kann daraufhin eine Empfehlung für die Auswahl der Methodik zur Beurteilung der Belastung von Mäusen in Epilepsiemodellen ausgesprochen werden. Des Weiteren können die in Epilepsiemodellen bei Mäusen identifizierten Parameter mit Parametern zur Belastungseinschätzung bei der Ratte

verglichen werden. Damit wird eine speziesspezifische Validierung von geeigneten Parametern möglich, und speziesspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten des Verhaltens unter einer Belastung werden dargelegt. Perspektivisch wird ein Scoring-System (*Composite measure scheme, CMS*) erstellt, in der eine Einstufung von Tieren in Tiermodellen basierend auf den geeignetsten Parametern zur Belastungseinstufung erfolgen kann.

Des Weiteren wird die Belastung der Tiere im hier durchgeführten Kindling-Modell evidenzbasiert eingeschätzt. Dadurch, dass Belastungseinstufungen zukünftig auch in anderen Epilepsiemodellen bei Mäusen durchgeführt werden, wird es möglich, eine Empfehlung für die Priorisierung eines Epilepsiemodells im Vergleich zu anderen Modellen zu geben. Mit der Auswahl des für das Tier am wenigsten belastenden Modells wird im Sinne des 3-R-Prinzips gehandelt, das eine tierwohlbezogene Verbesserung (*refinement*) bei der Nutzung von Labortieren verlangt.

In bereits durchgeführten Belastungseinstufungen bei Epilepsiemodellen bei Ratten wurden Parameter des nicht-essentiellen Wohlfühlverhaltens wie das Wühlverhalten und das Nestbauverhalten als solche Parameter zur Belastungseinschätzung vorgeschlagen (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Das Wühlverhalten zeigte sich dabei als Parameter mit hoher Sensitivität, der geeignet war, ein reduziertes Wohlbefinden aufzudecken. Das Nestbauverhalten dagegen war nicht so konsistent verändert wie das Wühlverhalten. Deshalb soll in dieser Studie untersucht werden, ob das Nestbauverhalten bei Ratten einen geeigneten, robusten Parameter zur Belastungseinschätzung darstellt. Außerdem wird getestet, von welchen Faktoren das Nestbauverhalten beeinflusst wird und wie zuverlässig die Auswertung des Nestbauverhaltens durch Score-Systeme ist.

Somit sollen folgenden Fragestellungen in Bezug auf das Nestbauverhalten bei Ratten beantwortet werden:

- Ist das Nestbauverhalten bei Ratten ein erlerntes Verhalten und nicht genetisch festgelegt, wie bei Mäusen?
- Gibt es demzufolge Unterschiede in der Fähigkeit, komplexe Nester zu errichten, abhängig von der Erfahrung, die ein Tier mit einem bestimmten Nestmaterial hat?
- Gibt es Unterschiede in der Fähigkeit, komplexe Nester zu errichten, abhängig vom Geschlecht?
- Haben standortspezifische Bedingungen einen Einfluss auf das Nestbauverhalten?
- Hat die Beurteilung der Nestkomplexität durch verschiedene Personen eine Auswirkung auf die Ergebnisse?

Die bereits erwähnten Parameter des Wohlfühlverhaltens werden, zusammen mit vielen anderen verhaltensbezogenen und biochemischen Parametern, auch im Kindling-Modell bei Mäusen untersucht, um zur evidenzbasierten Belastungseinstufung geeignete Parameter zu identifizieren. Die Gehirne der Tiere werden nach der Versuchsdurchführung histologisch aufbereitet und die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptors untersucht. Für die Durchführung eines Kindling-Modells können grundsätzlich Tiefenstimulationselektroden in verschiedene Zielregionen implantiert werden, in der vorliegenden Studie wird das Amygdala-Kindling-Modell mit dem Hippocampus-Kindling-Modell verglichen. Die Stimulation unterschiedlicher Zielregionen könnte in unterschiedlicher Ausprägung von Distress resultieren. Zum Vergleich der Elektrodenimplantation und der Stimulation der unterschiedlichen Hirnregionen werden zwei Versuchsgruppen Elektroden jeweils entweder in den rechten dorsalen Hippocampus oder in die rechte dorsale Amygdala implantiert und in diesen Zielregionen stimuliert. Zwei weitere Gruppen erhalten die gleiche Elektrodenimplantation in Amygdala bzw. Hippocampus, werden aber nicht stimuliert und dienen damit als elektrodenimplantierte Kontrollgruppen. Eine fünfte Gruppe, die naive Kontrollgruppe, erhält keine Elektrodenimplantation und keine Stimulation.

Daraus ergeben sich für das Amygdala-Kindlingmodell und das Hippocampus-Kindlingmodell bei Mäusen folgende Fragestellungen:

- Welche der betrachteten verhaltensbezogenen und biochemischen Parameter können als geeignete Parameter für die Belastungseinstufung bei Mäusen in Tiermodellen identifiziert werden?
- Wie wird das Verhalten der Tiere im hier betrachteten Kindling-Modell beeinflusst?
- Wie werden die Corticosteronlevel der Tiere im hier betrachteten Kindling-Modell beeinflusst?
- Wie wird die Expression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren der Tiere im hier betrachteten Kindling-Modell beeinflusst?
- Welche Auswirkungen hat die Implantation der Tiefenstimulationselektrode in Amygdala bzw. Hippocampus auf die Parameter des Verhaltens, der Corticosteronlevel und auf die 5-HT_{1A}-Rezeptoren?
- Welche Unterschiede zwischen dem Amygdala-Kindling-Modell und dem Hippocampus-Kindling-Modell gibt es in Hinblick auf das Verhalten, die Corticosteronlevel und die 5-HT_{1A}-Rezeptoren der Tiere?
- Welche der untersuchten Parameter korrelieren miteinander?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Evaluierung des Nestbauverhaltens bei Ratten

1.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen des Nestbauverhaltens bei Ratten wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ ROB-55.2-2532.Vet_03-15-11 und ROB-55.2-2532.Vet_02-14-120) bzw. von der Regierung Niedersachsen (LAVES AZ 16/2315, 14/1533 und 17/2477) und wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Bei der Publikation der Ergebnisse wurden die ARRIVE-Guidelines (KILKENNY et al., 2010) befolgt. Diese Studie wurde in Kooperation mit der MH Hannover durchgeführt. In den Tierhaltungen dieses Kooperationspartners und an der LMU München wurde das Nestbauverhalten von Ratten im Wochenverlauf evaluiert.

An der LMU München wurden 20 männliche und 20 weibliche Sprague Dawley Ratten verwendet. Es wurden jeweils weibliche (n=10) und männliche (n=10) Ratten vom Züchter Envigo (Horst, Niederlande) bzw. vom Züchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt. Die Tiere waren 12 Wochen alt. Sie wurden in Paaren in Makrolon Typ IV Käfigen (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) gehalten. Sie erhielten Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum. Die Käfige wurden mit Weichholzgranulat (Premium Scientific Bedding J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co KG, Rosenberg, Deutschland) eingestreut. Einmal pro Woche wurden die Tiere in saubere, frisch eingestreute Käfige mit 28 g Enviro-Dri Nestmaterial (Claus GmbH, Limburgerhof, Deutschland) pro Käfig umgesetzt. Als Enrichment wurden den Tieren pro Käfig zwei *Crawl Balls* (Plexx B.V., Elst, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Die Haltung erfolgte unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 ± 2 ° C, 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit) mit einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus (Helligkeitsphase von 6:00 – 18:00 Uhr). Am Ende der Untersuchungen zum Nestbauverhalten wurden die Tiere für andere Studien verwendet.

An der MH Hannover wurden 28 weibliche und 26 männliche Sprague Dawley Ratten im Alter von 12 Wochen verwendet. Vom Züchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland) stammten 14 weibliche und 12 männliche Ratten. Weitere 14 weibliche und 14 männliche Ratten der F1-Generation mit Eltern von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) wurden in der zentralen Tierhaltung der MH Hannover aufgezogen. Die Tiere wurden in Paaren in Makrolon Typ IV S Käfigen gehalten (Techniplast, Hohenpeissenberg, Deutschland) und

lebten unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 ± 2 ° C, 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit) in einem 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkel-Zyklus (Helligkeitsphase begann um 06:00 Uhr). Eingestreut waren die Käfige mit Weichholzgranulat (Espentiereinstreu AB P3, AsBe-wood GmbH, Gransee, Deutschland). Sie enthielten 28 g Enviro Dri Nestmaterial. Auch hier wurden die Käfige einmal wöchentlich gewechselt. Das Umsetzen in die frischen, sauberen Käfige erfolgte am gleichen Wochentag wie in München.

1.2. Nestbauerhalten bei Ratten

In den Tierhaltungen des Kooperationspartners MH Hannover und an der LMU München wurde das Nestbauerhalten von Ratten im Wochenverlauf evaluiert. Um zu betrachten, wie sich das Nestbauerhalten im Verlauf der Woche nach Erhalt des frischen Nestmaterials verändert, wurden die Nester über mehrere Tage hinweg beurteilt: An der LMU München in der Woche der Ankunft und in den beiden darauffolgenden Wochen; an der MH Hannover in zwei aufeinanderfolgenden Wochen. Das Nestbauerhalten bei den Tieren der LMU München und der MH Hannover wurde dann unter Einbeziehung folgender Parameter miteinander verglichen:

- Einfluss der Vertrautheit mit dem angebotenen Nestmaterial,
- Einfluss der beiden verschiedenen Standorte LMU München und MH Hannover,
- Einfluss der unterschiedlichen Beurteiler, die die Nester bewertet haben.

Um den Einfluss der Vertrautheit mit einem Nestmaterial untersuchen zu können, wurden verschiedene Tiergruppen betrachtet. Diese hatten mehr oder weniger Erfahrung mit dem Nestmaterial Enviro-Dri, welches ihnen im Rahmen dieser Untersuchungen zur Verfügung gestellt wurde. An der LMU München waren das auf der einen Seite männliche und weibliche Ratten vom Züchter Charles River (Sulzfeld, Deutschland), die beim Züchter handelsüblichen Zellstoff als Nestmaterial bekommen hatten. Auf der anderen Seite männliche und weibliche Ratten vom Züchter Envigo (Horst, Niederlande), die vom Züchter das Nestmaterial Enviro-Dri kannten. An der MH Hannover wurden auch männliche und weibliche Tiere von Charles River untersucht, welche ebenso nur den Zellstoff als Nestmaterial kannten. Zusätzlich wurden an der MH Hannover Tiere als F1-Generation mit dem Nestmaterial Enviro-Dri aufgezogen (Elterngeneration von Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

Zur Beurteilung der Nester wurden jeden Morgen zwischen 08:00 und 09:00 Uhr Fotos von den Nestern erstellt. Um eine möglichst realitätsnahe Abbildung der Nester zu ermöglichen, wurde jedes Nest aus drei Perspektiven fotografiert:

- Waagrecht von der Seite, ca. 0 ° Winkel zum Käfig,
- Direkt von oben, ca. 90 ° Winkel zum Käfig,
- Schräg von der Seite, ca. 45 ° Winkel zum Käfig.

Die Beurteilung der Nester erfolgte dann nach einem Score-System, das an das von Baumann und van Loo (BAUMANS, 2004) beschriebene Score-System angelehnt war (BAUMANS, 2004). Allerdings wurde dieses erweitert und die einzelnen Scores konkretisiert, um weniger Spielraum für subjektive Interpretationen zu geben. Nach dem neu entwickelten Score-System wurden die Nester nun wie folgt beurteilt (siehe Abb. 6):

- Score 0: Das Nestmaterial ist fast unberührt.
- Score 1: Das Nestmaterial ist bearbeitet und über mehr als die Hälfte der Käfiggrundfläche verteilt, ohne dass ein Nestbereich erkennbar ist.
- Score 2: Ein Nestbereich ist deutlich zu erkennen, dieser ist kleiner als die Hälfte der Käfiggrundfläche. Das Nest ist flach ohne erkennbare Eindellung (d.h. unter 1/5 bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig). Die Ränder des Nests können eine ausgefranste Gestalt haben.
- Score 3: Das Nest ist hoch (mind. als 1/5 der Käfighöhe bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig) ohne komplexe Neststruktur oder flach mit erkennbarer Delle. Der Nestbereich ist klar definiert und abgegrenzt.
- Score 4: Das Nest ist hoch (mind. ¼ der Käfighöhe bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig) und eingedellt oder höhlenartig ausgebaut.

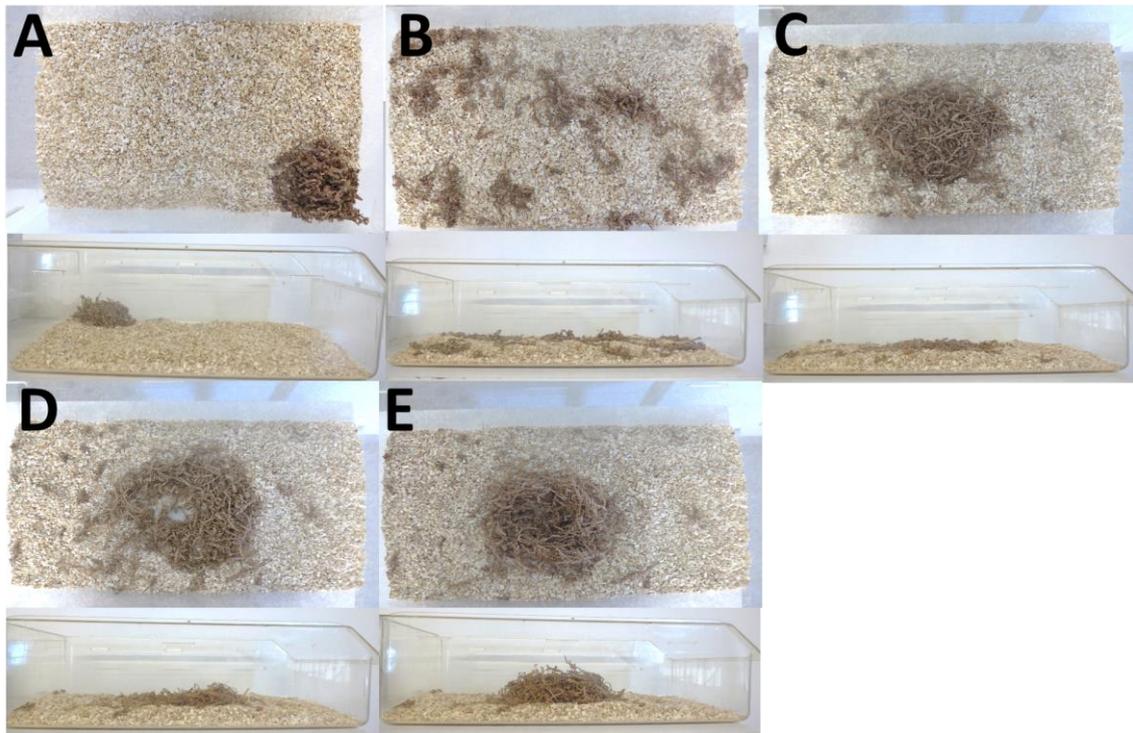


Abb. 6: Neuer Nest-Score. (A) Score 0: Das Nestmaterial ist fast unberührt. (B) Score 1: Das Nestmaterial ist bearbeitet und über mehr als die Hälfte der Käfiggrundfläche verteilt, ohne dass ein Nestbereich erkennbar ist. (C) Score 2: Ein Nestbereich ist deutlich zu erkennen, dieser ist kleiner als die Hälfte der Käfiggrundfläche. Das Nest ist flach ohne erkennbare Eindellung (d.h. unter 1/5 bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig). Die Ränder des Nests können eine ausgefranste Gestalt haben. (D) Score 3: Das Nest ist hoch (mind. als 1/5 der Käfighöhe bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig) ohne komplexe Neststruktur oder flach mit erkennbarer Delle. Der Nestbereich ist klar definiert und abgegrenzt. (E) Score 4: Das Nest ist hoch (mind. 1/4 der Käfighöhe bei Käfig Typ IV Makrolonkäfig) und eingedellt oder höhlenartig ausgebaut.

Alle Nestfotos von den Tieren aus Hannover sowie München wurden von einem Beurteiler jedes der beiden Institute beurteilt. Zusätzlich wurden alle Nestfotos auch noch von einem dritten Beurteiler der MH Hannover des ZTL (Zentrales Tierlaboratorium) beurteilt. Bevor diese Bewertung der Nestfotos durchgeführt wurde, hat jeder der drei Beurteiler ein Trainingsset absolviert. Dieses bestand aus 120 Nestfotos, denen von zwei erfahrenen Beurteilern jeweils ein Score zugeteilt wurde. Die drei Beurteiler der beiden Institute mussten dieses Trainingsset nun mit einer Erfolgsquote von 80 % abschließen, um dann die gesamten Nestfotos aller Tiere der LMU München und MH Hannover beurteilen zu können. Alle drei Beurteiler waren gegenüber der Herkunft, dem Geschlecht und dem Standort der Tiere verblindet.

2. Kindling-Modell bei Mäusen

2.1. Versuchstiere

In der Studie zur Belastungseinstufung im Amygdala-Kindling-Modell vergleichend zum Hippocampus-Kindling-Modell wurden alle Untersuchungen von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ ROB-55.2-2532.Vet_02-17-68) und unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes und der EU-Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Bei der Publikation der Ergebnisse wurden die ARRIVE-Guidelines (KILKENNY et al., 2010) befolgt. Es wurden weibliche NMRI-Mäuse (10 Wochen alt, 25–30 g, Envigo, Horst, Niederland verwendet. Aufgrund der implantierten Stimulationselektroden war die Einzelhaltung der Tiere unerlässlich. Die Haltung erfolgte in Makrolon Typ III Käfigen (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland unter kontrollierten Umweltbedingungen (22 ± 2 °C, $55 \pm 10\%$ mit künstlichem Licht in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus (Helligkeitsphase von 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ). Alle Versuche wurden zur Winterzeit (MANDILLO et al., 2008) durchgeführt, um einen Einfluss der Zeitumstellung zu umgehen. Die Heimkäfige der Tiere waren mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) ausgestattet und beinhalteten als Enrichment jeweils zwei Nestlets (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) und ein Maushaus (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland). Einmal pro Woche erhielten die Tiere frische, saubere Käfige. Leitungswasser und Futter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) stand für die Tiere ad libitum bereit. Nach ihrer Ankunft hatten die Tiere in einer sieben Tage langen Eingewöhnungsphase Zeit, sich an Experimentator, Personal und an die neuen Umweltbedingungen zu gewöhnen. Der klinische Zustand der Tiere wurde täglich anhand eines Score-Sheets beurteilt, welches von der Regierung von Oberbayern überprüft und an das Modell angepasst war. Zusätzlich wurden Parameter des klinischen und neurologischen Zustands mit Hilfe des modifizierten *Irwin Scores* beurteilt. Nach der Elektrodenimplantation wurde zusätzlich der *Grimace Scale* herangezogen, um Dauer und Intensität eines möglichen Schmerzausdrucks im Gesicht der Tiere zu dokumentieren. Einmal wöchentlich wurden die Tiere gewogen. Sowohl die Durchnummerierung der Tiere nach Ankunft als auch die Käfigreihenfolge in den Tierhaltungsräumen, die Zuteilung der Tiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen und später die Reihenfolge der Tiere in den einzelnen Tests wurde randomisiert durchgeführt (<https://www.randomizer.org>). Die Tiere wurden randomisiert auf fünf Versuchsgruppen aufgeteilt: Der Amygdala-Kindling-Gruppe, der Hippocampus-Kindling-Gruppe und den elektrodenimplantierten Gruppen (Amygdala-Sham-Gruppe und Hippocampus-Sham-Gruppe) wurde jeweils eine Stimulationselektrode implantiert. Die Kindling-Gruppen wurden in der Kindlingphase des Projekts täglich stimuliert. Die Sham-Gruppen machten,

bis auf die Stimulationen, alle anderen Vorgänge wie das notwendige hantieren (*Handling*) mit, die während des Kindlings nötig waren. Der fünften Gruppe (Naive Gruppe) wurde keine Elektrode implantiert. Während mit den anderen Gruppen das durch das Kindling bedingt hantiert wurde, blieb diese Kontrollgruppe ungestört im Tierhaltungsraum zurück. Direkt nach den Versuchen wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 600 mg/kg Pentobarbital euthanasiert. Es wurden insgesamt 80 Tiere verwendet. Drei Tiere verstarben während der Operation, zwei Tiere wurden nach der Operation aus tierschutzrechtlichen Gründen euthanasiert. Für jede Gruppe wurden nun 15 Tiere verwendet. Es wurden die Daten von vier Tieren exkludiert, da sich später in der histologischen Aufbereitung der Gehirne zeigte, dass die Elektrodenimplantation die gewünschte Lokalisation nicht korrekt getroffen hatte. Die Daten von einem weiteren Tier wurden exkludiert, da dieses im Laufe des Kindling-Prozesses aufhörte, Anfälle zu zeigen, und seine Daten somit nicht mehr mit den Daten der anderen Tiere der Gruppe vergleichbar waren.

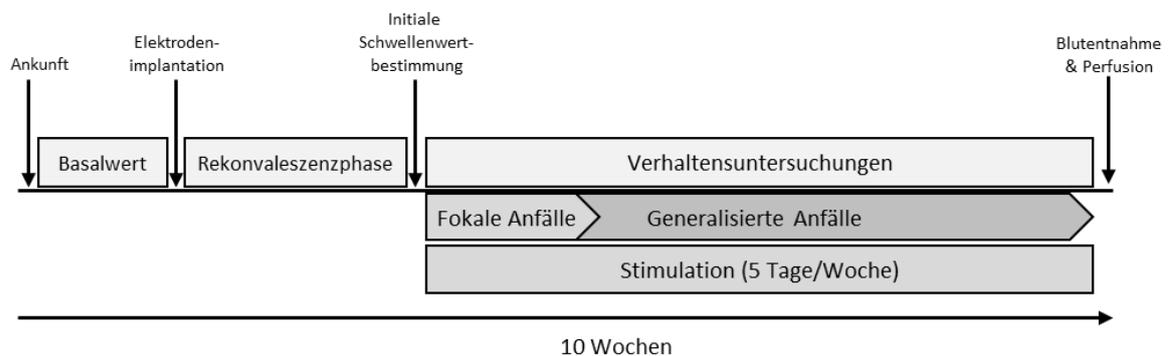


Abb. 7: Schema des Studiendesigns mit chronologisch dargestellten Abläufen während des Kindling-Projekts über den Zeitraum von zehn Wochen hinweg.

3. **Elektrodenimplantation**

Die Tiere erhielten zur analgetischen Versorgung 30 Minuten vor der Implantation der Stimulationselektrode 1 mg/kg Meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) subkutan (s.c.) gespritzt. Anschließend wurde die Anästhesie mit 440 mg/kg Chloralhydrat i.p. (440 mg/kg, 44 mg/ml in NaCl gelöst, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 10 ml 0,9 prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung (B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland) durchgeführt. Das Erreichen und Beibehalten des chirurgischen Toleranzstadiums wurde regelmäßig durch das Nichtvorhandensein des Zwischenzehenreflexes kontrolliert. Der zu eröffnende Schädelbereich wurde rasiert und desinfiziert. Dann wurde zur Lokalanästhesie 0,5%ige Bupivacainlösung (Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1: 200 000), Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland) durch subkutane Infiltration in die entsprechenden Bereiche appliziert, außerdem nach Inzision der Haut auf das Periost. Die Augen der Tiere wurden mit einer Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) abgedeckt. Während der Operation wurden die Tiere auf Wärmepads gelagert, um ein Absinken der physiologischen Körpertemperatur zu verhindern. Die Fixation der Tiere erfolgte in einem Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland), dessen Oberkieferhalterung auf -0,1 mm eingestellt war. Dadurch wurde eine genau gleiche Höhe der Punkte Bregma und Lambda erreicht. Bregma bezeichnet den rostralen Kreuzungspunkt der Knochennähte, Lambda den kaudalen Kreuzungspunkt (Abb. 8). Mit Hilfe des stereotaktischen Atlas von PAXINOS u. WATSON (2005) wurden die genauen Koordinaten für die Lokalisation der Elektrode eingestellt. Diese waren für die Implantation in die rechte Amygdala relativ zu Bregma: anterioposterior + 1,0; lateral + 3,2; dorsoventral +5,3. Für die Implantation in den rechten dorsalen Hippocampus wurden in Vorversuchen die genauen Koordinaten für die Implantation der Stimulationselektrode ermittelt, diese waren relativ zu Bregma: anterioposterior + 1,8; lateral + 1,6; dorsoventral + 1,7. Es wurden nun vier Löcher in die Schädeldecke gebohrt, eines für die Elektrode unter genauer Einhaltung der genannten Koordinaten und drei weitere für Fixations- und Erdungsschrauben. In das passende Loch wurde dann die bipolare, mit Teflon ummantelte Stimulationselektrode eingesetzt. Zur Befestigung der Elektrode wurden zwei Schrauben, je eine rostral und kaudal der Elektrode, in die dafür vorgebohrten Löcher eingebracht. Eine dritte Schraube wurde über der linken Hemisphäre befestigt, um diese wurde der Erdungsdraht der Elektrode gewickelt. Die Fixationsschrauben wurden mit kaltpolymerisierendem Kunststoff (Paladur®, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) mit der Elektrode verbunden und abgedeckt. Auch die Schraube mit dem Erdungsdraht wurde mit Paladur® abgedeckt und alle Schrauben, Elektrode und Ableitungsdraht abschließend

ummantelt. Die Wunde wurde aufgefrischt und mit Einzelknopfnähten mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen. Zum Aufwachen wurden die Tiere in frische, sauber eingestreute Käfige, die auf Wärmematten standen, gesetzt. Eine postoperative Analgesie erfolgte 24 Stunden nach dem Eingriff erneut durch s.c. Applikation von 1 mg/kg Meloxicam.

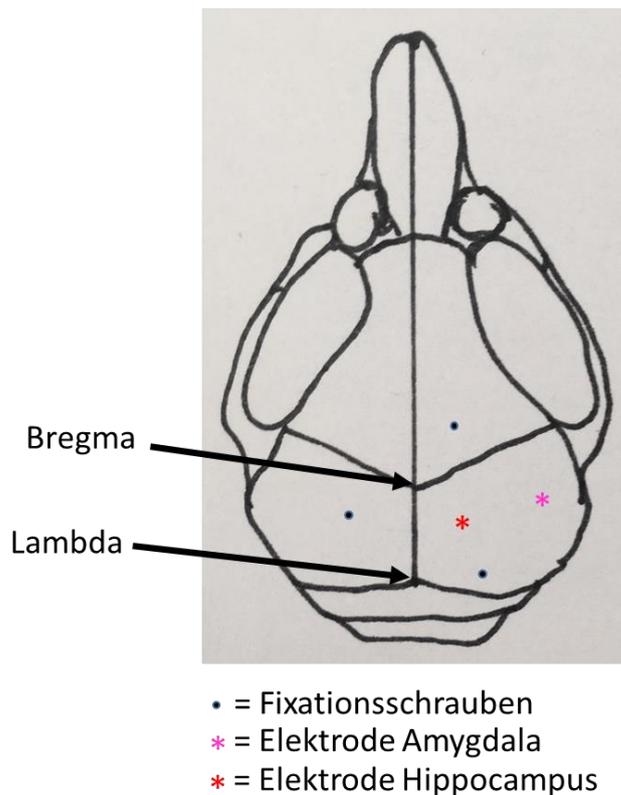


Abb. 8: Aufsicht auf einen Mausschädel.

Dargestellt sind die Lokalisation der Ableitungs- und Stimulationselektrode, die entweder in den rechten dorsalen Hippocampus oder in die rechte Amygdala implantiert wurde, sowie der Fixationsschrauben und die Knochenpunkte Bregma und Lambda.

4. Kindling-Prozess

Nach der Elektrodenimplantation hatten die Tiere in einer zweiwöchigen Regenerationsphase Zeit, sich von der Operation zu erholen. Danach begann der Kindling-Prozess bei den Tieren der hierzu gehörigen Versuchsgruppe (Kindling-Gruppe). Die naiven Tiere verblieben die ganze Zeit über in den Tierhaltungsräumen. Die Sham-Gruppe wurde genauso behandelt wie die Kindling-Gruppe, nur die Stimulationen wurden nicht durchgeführt. So konnte einerseits der Einfluss des Hantierens (*Handlings*), das zum Kindling nötig war, durch den Vergleich zwischen naiver und Sham-Gruppe beurteilt werden. Andererseits konnte der Einfluss des Kindlings an sich, d.h. der hierdurch induzierten Anfälle, durch den Vergleich zwischen Sham- und Kindling-Gruppe eingeschätzt werden. Auch der kumulative Einfluss des Hantierens (*Handlings*) und der Anfallsaktivität (Kindling-Gruppen) gegenüber der naiven Gruppe konnte so beurteilt werden. Bei allen elektrodenimplantierten Gruppen konnte noch dazu der Vergleich zwischen den beiden Elektrodenlokalisationen Amygdala und Hippocampus gezogen werden. Zum Kindling wurden die Tiere in ein Glasaquarium gesetzt und ihr Verhalten im Aquarium wurde mittels Videokamera (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet. Auf den Steckeraufsatz des Implantats der Tiere wurde ein zur bipolaren Elektrode passendes Kabel der Stimulationseinheit (HSE Type 215 E12 SV1, Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) aufgesteckt. Es wurde ein Stimulus von einer Sekunde bei einer Frequenz von 50 Hertz gegeben. Mit einer zwischengeschalteten Switchbox wurde von der Stimulation auf die EEG-Aufzeichnung gewechselt. Um das EEG aufzuzeichnen, wurde ein Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30, ADInstruments LTD., Hastings, UK) angewendet. Außerdem wurde mit einem angeschlossenen Ein-Kanal-Verstärker (BioAmp, ADInstruments LTD., Hastings, UK) ein 100-fach stärkeres EEG-Signal erreicht. Eventuell auftretende Störsignale wurden mit Hilfe eines passenden Filters ausgeschaltet (low pass Filter > 5 kHz, high pass Filter < 3 Hz). Durch den Notchfilter konnten Störsignale im Bereich von 50 Hz herausgefiltert werden. Zur Analyse der EEG-Daten wurde die Software Labchart 7 (ADInstruments LTD., Hastings, UK) verwendet. Zu Beginn des Kindling-Prozesses wurde bei jedem Tier die individuelle initiale Nachentladungsschwelle (*initial afterdischarge threshold; ADT*) bestimmt. Diese bezeichnet die Stromstärke in μA , bei der sich im EEG erstmals anfallstypische Nachentladungsmuster darstellen. Die Nachentladungsdauer muss mindestens fünf Sekunden umfassen, eine Frequenz von mindestens einem Hertz aufweisen und die Amplitude muss mindestens die doppelte Höhe der Amplitude zur Basallinie im EEG erreichen. Meist gehen die Nachentladungen im EEG mit einer motorischen Anfallsaktivität einher, die nach ihrer Krampfschwere (*seizure severity; SS*) wie in Abb. 9 gezeigt, nach RACINE (1972)

eingestuft wird. Zur Bestimmung der initialen Nachentladungsschwelle wurde nun ausgehend von einer Stromstärke von 21 μA stimuliert. Wenn auf die Stimulation hin keine Nachentladung im EEG sichtbar war, wurde nach der Dauer von einer Minute mit einer 20 % höheren Stromstärke erneut stimuliert. Sobald die initiale Nachentladungsschwelle bei einem Tier bestimmt war, erhielt das Tier an diesem Tag keine weitere Stimulation mehr. Ab dem Tag nach der initialen Schwellenbestimmung wurden die Tiere an fünf Tagen in der Woche zwischen 13 und 15 Uhr mit einer Stromstärke von jeweils 700 μA einmalig stimuliert. Durch die lange Pause, welche Tiere zwischen dem nachmittäglichen Kindling und den Verhaltensuntersuchungen am darauffolgenden Vormittag hatten, wurde ein direkter Einfluss der Kindlingprozedur auf die Verhaltenstests vermieden. Die Krampfschwere wurde dokumentiert, genauso wie die sichtbare motorische Krampfdauer (*seizure duration; SD*), die mit einer Stoppuhr erfasst wurde. Außerdem wurde die Nachentladungsdauer 1 und 2 dokumentiert (*afterdischarge duration; ADD*). Die ADD 1 beschreibt die Gesamtdauer der auftretenden Nachentladungsmuster, sogenannter *Spikes*. Hin und wieder kam es zu einer Veränderung im Muster gegen Ende des EEGs. Dann wurde die Zeit bis zur ersten Veränderung im Spikemuster als ADD1 und die Gesamtdauer der Nachentladung als ADD2 bezeichnet. Kürzere Unterbrechungen im Spikemuster mit einer Länge von maximal drei Sekunden wurden nicht beachtet.

Abb. 9: Krampfstadien im Kindling-Modell, modifiziert nach RACINE (1972).

<u>Krampfschwere</u>		<u>Anfallsmerkmale</u>
Stadium I	Fokale Anfallsaktivität	Schwacher Fazialklonus (stereotypes Schnüffeln, Schließen des ipsilateralen Auges), Immobilität
Stadium II		Starker Fazialklonus (Kaubewegungen, Kopfnicken)
Stadium III		Unilateraler Vorderextremitätenklonus
Stadium IV	Generalisierte Anfallsaktivität	Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes
Stadium V		Bilateraler Vorderextremitätenklonus, Aufrichten des Rumpfes, Verlust der Stellreflexe (nach hinten überfallen) ohne Verlust der Stellreflexe (z.B. bei klonischen Krämpfen in Seitenlage)

5. **Verhaltensuntersuchungen**

Mit den Verhaltensuntersuchungen wurde begonnen, als jedes Tier der Kindling-Gruppe drei generalisierte Anfälle entwickelt hatte. Folgende Reihenfolge wurde festgelegt: *Social-Interaction-Test*, *Open-Field-Test*, *Black-and-White-Box-Test*, *Elevated-Plus-Maze-Test*, *Saccharin-Präferenz-Test*, *Burrowing-Test*. Die Untersuchungen wurden zwischen 6:00 und 12:00 Uhr morgens von Montag-Freitag durchgeführt. Einzige Ausnahme war der *Burrowing-Test*, bei dem ein Wert der letzten beiden Stunden vor der Dunkelphase und ein zweiter Wert am Anfang der Hellphase evaluiert wurde (siehe Abschnitt 5.2.). Der *Burrowing-Test* wurde als einziger Verhaltenstest nicht wie die anderen einmalig, sondern zu vier Zeitpunkten durchgeführt: in der zweiten Woche nach Ankunft der Tiere zur Bestimmung der Baseline (Zeitpunkt 1), in der zweiten Erholungswoche nach der OP (Zeitpunkt 2), in der frühen Phase des Kindling-Prozesses (Zeitpunkt 3), und wie oben schon erwähnt, in der fortgeschrittenen Phase des Kindlings während der Phase der generalisierten Anfälle (Zeitpunkt 4). Es wurden zu allen Zeitpunkten alle Tiergruppen getestet. Zusätzlich wurde das Heimkäfiverhalten der Tiere anhand des Nestbauverhaltens und des Nestverschmutzungsgrads (*Level of soiling*) bewertet. Das Nestbauverhalten wurde erst eine Woche vor der OP zur Baseline-Bestimmung beurteilt, dann in den beiden Erholungswochen nach der OP und anschließend während der gesamten Kindlingphase. Zum *Burrowing-Test*, *Saccharin-Präferenz-Test* und zur Beurteilung des Heimkäfiverhaltens konnten die Tiere in den Tierhaltungsräumen verbleiben. Zum *Social-Interaction-Test*, *Open-Field-Test*, *Black-and-White-Box-Test* und *Elevated-Plus-Maze-Test* wurden die Tiere in einen eigens dafür vorgesehenen Verhaltensraum gebracht. Dieser verfügte über schalldicht gedämmte Wände und Tür. Zusätzlich waren sowohl der Boden als auch die Decke und Wände in schwarz gehalten, sodass die Tiere nicht durch Umweltreize abgelenkt werden konnten. Zur Vermeidung der Ablenkung durch Artgenossen wurden alle zum Versuch gehörigen Apparaturen nach jedem Durchgang mit 0,1%iger Essigsäure gesäubert. Zur Adaptation an die unbekannte Umgebung wurden die Tiere schon mindestens 30 Minuten vor jeder der dort durchgeführten Untersuchungen in den Verhaltensraum verbracht. Für die Versuche selbst wurde das Licht mittels vier beweglicher Lampen (SpotLight Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) eingestellt und die gewünschte Helligkeit mit einem Luxmeter (Voltcraft MS 1300, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland) kontrolliert. Die Versuche wurden per Videoaufzeichnung (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) und mit einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) überwacht.

5.1. **Nestbaurverhalten und Nestverschmutzungsgrad**

Um das Heimkäfigverhalten bei Mäusen im Kindling-Modell zu untersuchen, wurden unter anderem die beiden Parameter Nestbaurverhalten und Nestverschmutzungsgrad herangezogen. Um die Bestimmung einer Baseline zu ermöglichen, wurde das Nestbaurverhalten eine Woche vor der Elektrodenimplantation täglich beurteilt. Anschließend wurde es nach der Operation in den zwei Wochen der Regenerationsphase bestimmt und danach ab dem Beginn des Kindlings bis zum Ende der Studie. Das Nestbaurverhalten wurde angelehnt an ein von Jirkof und Kollegen (JIRKOF et al., 2013a) beschriebenes Score-System beurteilt. Die Beschreibung der einzelnen Scores lautet wie folgt:

- Score 1: Das Nestlet ist fast unberührt (>90% sind intakt).
- Score 2: Das Nestlet ist teilweise aufgerissen (50-90% sind noch intakt).
- Score 3: Das Nestlet ist zum größten Teil zerfetzt (50-90% des Nestlets sind aufgerissen). Dabei sind <50% des Nestlets intakt; <90% des Nestlets befinden sich in einem Viertel des Käfigbereichs; die Baumwolle ist nicht zu einem Nest geformt, sondern im Käfig verteilt.
- Score 4: Ein identifizierbares, flaches Nest (>90% sind aufgerissen). Das Material befindet sich in Nestform innerhalb eines Viertels des Käfigbereichs. Das Nest ist flach: weniger als 50% des Umfangs der Nestwand sind höher als die Körperhöhe der zusammengerollten Maus.
- Score 5: Ein nahezu perfektes Nest (>90% sind aufgerissen). Das Nest gleicht einem Krater: Mehr als 50% des Umfangs der Nestwand sind höher als die Körperhöhe der zusammengerollten Maus.
- Score 6: Perfektes Nest (>90% sind aufgerissen). Das Nest gleicht einem Krater: mehr als 90% des Umfangs der Nestwand sind höher als die Körperhöhe der zusammengerollten Maus.

Die Nester wurden morgens um 8:00 fotografiert und die Fotos wurden am Ende der Studie von einer projektfremden Person beurteilt, die verblindet gegenüber den Versuchsgruppen und den Entstehungszeitpunkten der Fotos war.

Einmal wöchentlich, bevor die Tiere in frische, saubere Käfige umgesetzt wurden, wurde der Nestverschmutzungsgrad (*Level of soiling*) jedes Käfigs festgehalten. Dazu wurde der gesamte Käfig ohne Deckel von oben fotografiert (ca. 90° zum Käfig) und die Fotos wurden am Ende der Studie analog zur Beurteilung der Nestfotos von einer projektfremden Person beurteilt, die verblindet gegenüber den Versuchsgruppen und den Entstehungszeitpunkten der Fotos war. Der Nestverschmutzungsgrad wurde dabei nach folgendem Score-System

bewertet: 1 = sauber, 2 = leicht verschmutzt, 3 = stark verschmutzt. Es wurde dabei beurteilt, wie sauber - also frei von Kot und Urin - die Tiere ihr Nest gelassen hatten.

5.2. Burrowing-Test

Der *Burrowing-Test* zur Beurteilung des Wühlverhaltens der Mäuse wurde zu vier Zeitpunkten im Laufe der Studie durchgeführt. Das erste Mal vor der Elektrodenimplantation zur Bestimmung der Basalwerte (Zeitpunkt 1). Sieben Tiere haben zu diesem Zeitpunkt kein Wühlverhalten gezeigt, weshalb ihre Daten von der Auswertung exkludiert wurden. Das zweite Mal wurde der *Burrowing-Test* zwei Wochen nach der Elektrodenimplantation durchgeführt (Zeitpunkt 2), danach in der frühen Phase des Kindlings (Zeitpunkt 3) und zum letzten Mal in der späten Phase des Kindlings, nachdem alle gekindelten Tiere dreizehn generalisierte Anfälle gezeigt hatten (Zeitpunkt 4). Der *Burrowing-Test* wurde im Tierhaltungsraum in den Heimkäfigen der Tiere durchgeführt. Der Versuchsablauf war angelehnt an das *Burrowing*-Protokoll von Deacon und Kollegen (DEACON, 2006a, 2009; DEACON, 2012). Leere runde Wasserflasche (Zoonlab, Deutschland) mit einer Länge von 20 cm mit einem um 2 cm erhöhten Eingang von 3,5 cm Durchmesser wurden verwendet. In diese Flaschen wurden jeweils 200 ± 1 g Futterpellets (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) eingewogen. Zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase wurde nun eine gefüllte Flasche in der hinteren linken Ecke des Heimkäfigs jedes Tieres platziert. Die Öffnung der Flasche zeigte zur Käfigmitte, das geschlossene Ende zur Käfigwand. Nach zwei Stunden wurden die noch in der Flasche befindlichen Pellets gewogen, um die innerhalb dieser zwei Stunden gebuddelte Menge zu evaluieren. Danach wurden die Flaschen mit den noch darin enthaltenen Pellets wieder zurück in die Käfige gelegt. Am Ende der Dunkelphase wurde das Gewicht der über Nacht gebuddelten Pellets erfasst.

5.3. Social-Interaction-Test

Dieser Test wurde basierend auf den Protokollen von Holter und Kollegen (HOLTER et al., 2015) und File und Seth (FILE & SETH, 2003) durchgeführt. Die von diesen Autoren geforderte Einzelhaltung der Tiere in einer mindestens zweiwöchigen Phase vor dem Test, um die soziale Interaktion zu steigern, war durch die durchgehende Einzelhaltung der Tiere in dieser Studie sowieso gegeben. Zwei Tage vor dem eigentlichen Test wurden die Tiere an den Verhaltensraum und an den Testkäfig habituiert. Dabei wurden die Tiere für jeweils zehn Minuten einzeln in den Testkäfig (Makrolon Typ III, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gesetzt und anschließend wieder in den Heimkäfig verbracht. Am auf den

zweiten Tag der Habituation folgenden Tag fand der Testtag statt. Dazu wurden Tierpaare gebildet, die zum einen nach möglichst gleichem Gewicht und zum anderen nach der gleichen Versuchsgruppzugehörigkeit (Kindling-Kindling, Sham-Sham und Naiv-Naiv) gewählt wurden. Schon 30 Minuten vor dem Test wurden die Tiere in den Verhaltensraum gebracht, damit sie sich an die Umgebung adaptieren konnten. Jedes Paar wurde dann für zehn Minuten in den Testkäfig gesetzt und beobachtet. Es wurde die Zeit der aktiven (schnüffeln, Pflegeverhalten, über-/untereinander krabbeln) und passiven (nebeneinandersitzen oder -liegen) sozialen Interaktion dokumentiert. Nach jedem Tierpaar wurde der Testkäfig mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt und die Tiere wieder in ihren Heimkäfig verbracht.

5.4. Open-Field-Test

Die Tiere wurden 30 Minuten vor Versuchsbeginn in den Verhaltensraum verbracht. Die Lichtintensität wurde auf ca. 12 Lux eingestellt, was der Helligkeit in den Tierhaltungsräumen entsprach. Danach wurden die Tiere einzeln mit ca. 10 cm Abstand zur Wand und Blickrichtung zur Wand in das *Open Field* gesetzt. Dieses bestand aus einer schwarzen zylindrischen Arena aus Hartplastik von 60 cm Durchmesser und einer Wandhöhe von 40 cm. Es wurden zwei Arenen gleichzeitig verwendet und somit zwei Versuchsdurchgänge parallel ausgeführt, um Zeit zu sparen. Das Verhalten der Tiere in dem *Open Field* wurde jeweils über einen Zeitraum von zehn Minuten mittels Videoaufzeichnung (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) und mit einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) beobachtet. Während des Versuches wurde zwischen verschiedenen Verhaltensweisen unterschieden: Der totalen zurückgelegten Laufstrecke; der Zeit, in der sich das Tier nicht bewegte (Immobilität); der Zeit, die das Tier mit Thigmotaxis (Zeit im Wandbereich der Arena) verbrachte; der Zeit, die das Tier im Zentrum der Arena verbrachte; die vertikale Aktivität (Aufrichtefrequenz). Anschließend wurden die Tiere in ihre jeweiligen Heimkäfige zurückgesetzt und das *Open Field* mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt, um die Geruchsspuren der anderen Tiere zu entfernen.

5.5. **Black-and-White-Box-Test**

Auch für diesen Test wurden die Tiere wieder 30 Minuten vor Versuchsbeginn in den Verhaltensraum verbracht. Jedes Tier wurde einzeln getestet. Die *Black-and-White-Box*, in der der Test stattfand, bestand aus einem schwarzen 40 x 21 cm und einem weißen 40 x 40 cm großen Kompartiment, die über eine Durchgangsfläche von 10 x 10 cm miteinander vereinigt waren. Durch verschieblich angebrachte Lampen konnte die Lichtintensität in den beiden Kompartimenten individuell angepasst werden. Sie betrug im schwarzen Teil der Box 20 Lux, im weißen Teil 40 Lux. Zum Beginn des Tests wurden die Tiere in die weiße Box gesetzt, wobei der Kopf des Tieres auf die Wand in dem gegenüberliegenden schwarzen Kompartiment ausgerichtet wurde. Nun wurde die Latenzzeit bis zum Eintritt in den schwarzen Teil, die Dauer des Aufenthalts in den beiden Kompartimenten und die Anzahl der Übertritte in den weißen Teil dokumentiert. Dies geschah manuell durch eine Person, die gegenüber der Versuchsgruppe eines jeden Tieres verblindet war. Der gesamte Test wurde durch Videoaufnahme (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) überwacht. Nach jedem Testdurchgang wurde die *Black-and-White-Box* mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt und die Tiere wurden wieder in ihre Heimkäfige zurückgesetzt.

5.6. **Elevated-Plus-Maze-Test**

Analog zu den anderen Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere auch für diesen Test 30 Minuten vor Versuchsbeginn zur Adaptation in den Verhaltensraum gebracht. Das Plus-Maze bestand aus einem aus weißem Hartplastik hergestellten Kreuz mit zwei offenen Armen ohne Seitenwände und zwei geschlossenen Armen mit Seitenwänden von 12,5 cm Höhe. Die Arme waren je 40 cm lang und in der Form eines Pluszeichens angeordnet. Durch individuell ausrichtbare Beleuchtung wurde in den offenen Armen eine Lichtintensität von 40 Lux, in den geschlossenen Armen eine Lichtintensität von 20 Lux erreicht. Jedes Tier wurde zu Testbeginn in den Kreuzungsbereich der Arme gesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es stets in denselben offenen Arm blickte. In den fünf Minuten Dauer des Testdurchgangs wurden die gelaufene Gesamtstrecke, die mittlere Laufgeschwindigkeit, die Aufenthaltsdauer in den geschlossenen und offenen Armen, sowie die Anzahl der *Head dips* (Herunterschauen von den offenen Armen) festgehalten. Die Anzahl der *Head dips* wurde dabei von einer verblindeten Person manuell erfasst, die anderen Parameter überwachte eine Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande). Nach jedem Testdurchgang wurde das Plus-Maze mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt und die Tiere wieder in ihre Heimkäfige verbracht.

5.7. Saccharin-Präferenz-Test

Der *Saccharin-Präferenz-Test* wurde in den Heimkäfigen der Tiere in den Tierhaltungsräumen durchgeführt. Während des gesamten Versuchsablaufs waren zwei Wasserflaschen mit einem Fassungsvermögen von je 250 ml am Heimkäfig der Tiere angebracht, um eine Seitenpräferenz der Tiere im *Saccharin-Präferenz-Test* zu vermeiden. Die Öffnung der Tränkenippel hatten einen Durchmesser von einem mm. Der eigentliche Test wurde nun über vier Tage hinweg nach der Methodik von Klein und Kollegen (KLEIN et al., 2015) folgendermaßen ausgeführt: Zunächst wurde die Wasseraufnahme der Tiere über 24 Stunden ermittelt. Dafür wurden in jede Flasche 200 g Wasser eingewogen. Nach 24 Stunden wurde die aufgenommene Menge der Flüssigkeit aus beiden Flaschen jedes Käfigs ermittelt. Anschließend wurde die Rechte der beiden Flaschen jedes Käfigs mit 200 g einer Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Eschenstr. 5, D-82024 Taufkirchen) gefüllt, die andere Flasche wurde mit 200 g Wasser gefüllt. Wieder wurde nach 24 Stunden die genaue Menge der aufgenommenen Flüssigkeit aus beiden Flaschen dokumentiert. Danach wurden in beide Flaschen jedes Käfigs wieder 200 g Wasser eingewogen und nach erneut 24 Stunden die getrunkene Wassermenge aus beiden Flaschen festgehalten. Zuletzt wurde wieder in eine Flasche, nun die linke, 200 g Saccharin-Lösung eingewogen. Die zweite Flasche jedes Käfigs wurde mit 200 g Wasser gefüllt. Nach 24 Stunden wurde wieder die Menge der Flüssigkeitsaufnahme beider Flaschen bestimmt.

6. Perfusion

Am Ende des Versuchs wurden die Tiere nach der Euthanasie durch i.p. Applikation von 600 mg/kg Pentobarbital perfusionsfixiert. Dazu wurde eine Knopfkanüle im linken Herzventrikel befestigt. Durch diese wurde erst eine 0,01 M mit Phosphat gepufferte 0,9-prozentige Kochsalzlösung und dann eine Lösung zur Fixation aus vierprozentigem Paraformaldehyd gepumpt. So wurde zuerst das gesamte Blut aus dem Körper gespült und anschließend das Fixans unter Zuhilfenahme des natürlichen Gefäßsystems im gesamten Körper verteilt. Die Gehirne wurden entnommen und für 24 Stunden in vierprozentigem Paraformaldehyd bei 4° C aufbewahrt. Anschließend wurden sie in einer 30 prozentige Saccharose-Lösung eingelegt, um einen Gefrierschutz sicherzustellen. Die Gehirne wurden durch den Einsatz von Isopentan (2-Methylbutan, Honeywell, Offenbach, Deutschland) und flüssigem Stickstoff (Linde AG Gases Division, Pullach, Deutschland) in Gefriermedium

(Tissue Tek Freezing Medium, Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) tiefgefroren und bei -80°C aufbewahrt, bis sie für histologische Färbungen verwendet wurden (siehe Abschnitt 8).

7. Biochemische Analysen

In der vorliegenden Studie zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung im Kindling-Modell bei der Maus wurden verschiedene biochemische Analysen durchgeführt, um zusätzliche Daten zu erhalten und diese mit den Ergebnissen der Verhaltensuntersuchungen vergleichen zu können. Kotproben aus dem Käfig zu entnehmen stellt eine einfache und nicht-invasive Form der Probennahme dar, deshalb wurde diese mehrmals während des Versuchs durchgeführt. So war es möglich, Informationen zur Stressbelastung der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs zu erhalten. Blutproben wurden nur final am Ende des Versuchs genommen. Somit wurden die Tiere nicht zusätzlich durch mehrmalige Blutentnahme während des Versuchs belastet.

7.1. Analyse von Kotproben

Im Laufe des gesamten Versuchs wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten Kotproben der Tiere genommen: nach der Eingewöhnungsphase von einer Woche nach Ankunft der Tiere, in der frühen Kindlingphase und dann in der späten Kindlingphase am Ende des Versuchs. Diese Kotproben wurden anschließend auf ihren Gehalt an fäkalen Corticosteron-Metaboliten überprüft. Der Vorteil gegenüber der Analyse der Corticosteronkonzentration im Blut lag in der Unkompliziertheit der Probennahme, denn der Kot konnte einfach aus dem Käfig entnommen werden und stellt damit einen nicht-invasiven Eingriff dar. Die Kotprobenentnahme erfolgte nach einem Protokoll der Forschergruppe FOR 2591. Um Kot zu erhalten, der in einem definierten Zeitrahmen abgesetzt wurde, erfolgte zuerst ein ruhiges Umsetzen der Tiere in frische Käfige zwischen 7 und 9 Uhr morgens. Nach 24 Stunden wurden dann alle Kotpellets aus diesem Zeitfenster eingesammelt. Die Kotproben wurden bis zur darauffolgenden Analyse bei -20°C zwischengelagert. Bevor die Proben ausgewertet werden konnten, mussten dafür erst die fäkalen Corticosteronmetaboliten aus den Kotproben freigesetzt werden. Zu dieser Extraktion wurde der Kot in einem Trockenschrank bei 60°C getrocknet und der trockene Kot fein zermörsert. Anschließend wurden von jeder Kotprobe 0,1 Gramm abgewogen und

zwei Milliliter Methanol 80% (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugegeben. So wurden die Proben dann 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit Hilfe eines Multi-Vortex (RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) geschüttelt und darauffolgend zehn Minuten lang bei 3500 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) zentrifugiert. Von dem entstandenen Überstand wurden jeweils fünf Mikroliter abpipettiert und mit 495 Mikroliter Essigsäure aufgefüllt.

Die Auswertung wurde vom Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme (Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie des Departments für Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, Österreich) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels eines 5 α -Pregnan-3 β ,11 β ,21-Triol-20-one Enzymimmunoassays nach einem Protokoll von Touma und Kollegen (TOUMA et al., 2003).

7.2. Analyse von Serumproben

Am Ende des Versuchs wurde durch Herzpunktion nach Euthanasie Blut gewonnen. Aufgrund der relativ geringen Blutmenge, die man bei Mäusen durch Herzpunktion gewinnen kann (max. 0,7-1ml Blut pro Maus (GV-SOLAS et al. 2009)), waren die Möglichkeiten, vielfältige biochemische Parameter im Blut zu bestimmen, stark limitiert. Aus einem Teil des entnommenen Blutes wurde jeweils Serum für die Analyse der Corticosteronkonzentration im Blut gewonnen. Corticosteron im Blut hat eine kurze Halbwertszeit von 10-30 Minuten, wodurch eine Aussage über das akute Stressempfinden der Tiere getroffen werden kann. Zuerst wurde das Blut in Eppendorf-Gefäße gegeben, die mit je 10 μ l Antiprotease (Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) gefüllt waren. Nach einer Koagulationszeit von 45 min wurde das Blut für 10 min bei 1500 x g abzentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde in Eppendorf-Gefäße abpipettiert und bei -80° C eingefroren. Zur Auswertung der Corticosteronkonzentration im Serum wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922, Demeditec, Kiel, Deutschland) genutzt und nach Herstellerprotokoll angewendet. Standardlösungen, Serumproben und deren Duplikate zur Doppelbestimmung wurden in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Da es sich um einen kompetitiven ELISA handelte, war die Mikrotiterplatte schon mit einem polyklonalen Kaninchen-Anti-Corticosteron-Antikörper behaftet. Inkubationspuffer und Enzymkonjugat (Corticosteron mit Meerrettichperoxidase konjugiert) wurden in jede Mulde gegeben und anschließend erfolgte eine Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach,

Deutschland) bei 600 rpm. Darauf folgten vier Waschschriffe, um ungebundenes Corticosteron sowie Puffer- und Konjugatreste zu entfernen. Dann wurde die Substratlösung (Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid) für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurde die Reaktion mit einer Stopplösung (Salzsäure 2N) beendet. Die Auswertung wurde mit einem ELISA-Messgerät und der zugehörigen Software (Gen 5 microplate reader, Biotek; Gen 5 Imager Software, Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm analysiert. Die Werte der Standardlösungen ergeben eine sigmoidale Kurve, anhand derer die Corticosteronkonzentration in ng/ml ermittelt wird. Dadurch, dass eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, konnte von beiden Werten jedes Tieres ein Mittelwert gebildet werden. Durch die geringe Varianz zwischen beiden Werten wurde sichergestellt, dass keine Pipettierfehler gemacht wurden.

7.3. Bestimmung des Sexualzyklus

Die Bestimmung des Sexualzyklus erfolgte am Ende des Versuchs nach Euthanasie mit Hilfe eines Ohmmeters. Ein handelsübliches Multimeter wurde dazu nach einem Protokoll von Ramos und Kollegen (RAMOS et al., 2001) genutzt. Nach der Euthanasie der Tiere wurde das Ende des Klinkenkabels ca. 0,5 cm weit in die Vagina eingeführt und der Widerstand der Vaginalschleimhaut in mOhm ermittelt. Durch vermehrt auftretende kornifizierte Zellen im Östrus ist in diesem der Widerstand deutlich höher als während des restlichen Zyklus. So ist die Zyklusbestimmung mittels Ohmmeter eine einfache und sichere Methode, um zu unterscheiden, ob eine Maus sich im Östrus befindet oder nicht.

8. Histologische Aufbereitung: 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung

Die gefrorenen Gehirne der Mäuse wurden mit Hilfe eines Kryostats (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) in koronale Serien geschnitten, wobei die Dicke jedes einzelnen Schnitts 40 µm betrug. So entstanden Serien mit einem Intervall von 480 µm, die in einer Kryoprotekt-Lösung (1:1 Glycerol und 0,1 Phosphatpuffer mit pH 7.4) bei -80°C gelagert wurden. Um die Lokalisation der Elektroden bei den implantierten Tieren zu überprüfen, wurde eine komplette Serie mit Thionin (Thionin Acetat, Carl Roth, Deutschland) gefärbt.

Die immunhistochemische Färbung des 5-HT_{1A}-Rezeptors wurde an freischwimmenden (*free-floating*) Gehirnschnitten durchgeführt. Nach drei Waschschrritten mit PBST (siehe Anhang Abschnitt 3) wurden die Antigen-Epitope freigelegt. Dies wurde durch Hitzeinduktion für 30 Minuten bei 80°C im Wasserbad mit Natrium-Citrat (10 mM, pH 6) erreicht. Dann wurden die Gehirnschnitte zehn Minuten lang auf Eis gekühlt. Nach drei erneuten Waschschrritten wurde die endogene Peroxidase durch 30-minütige Inkubation mit 3% H₂O₂ inaktiviert. Darauf folgten wieder drei Waschschrritte. Das Blocken unspezifischer Bindungen geschah durch die Inkubation in Blocklösung (siehe Anhang Abschnitt 3) bei Raumtemperatur für eine Stunde.

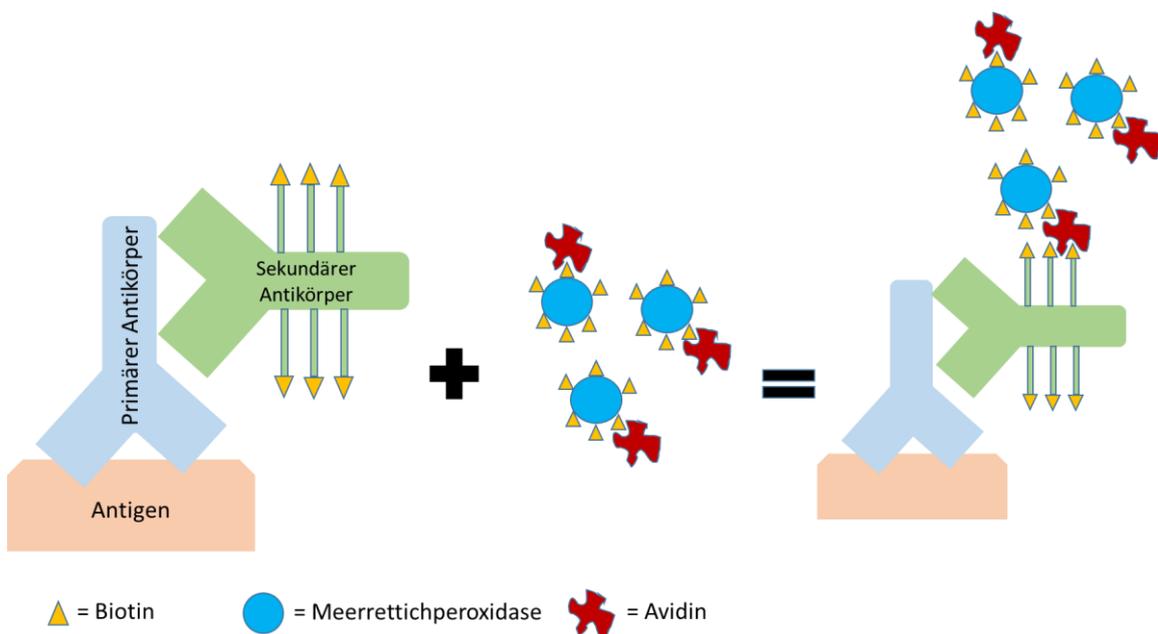


Abb. 10: Schematische Darstellung der verstärkenden Enzymreaktion durch den Avidin-Biotin-Komplex.

Dann erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen Anti-5-HT_{1A}-Rezeptor- Antikörper (ab227165, Abcam, Cambridge, England; Konzentration des Antikörpers 1:1000) über Nacht bei 4°C. Negativkontrollen ohne diesen primären Antikörper wurden parallel dazu angefertigt. Am nächsten Morgen wurde nach vier Waschschritten in PBS (siehe Anhang Abschnitt 3) die Schnitte in den sekundären Antikörper, einen Biotin-markierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper (BA-1000, Vector, Deutschland; Konzentration 1:1000) überführt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurden wieder vier Waschschriffe vorgenommen und die Schnitte wurden danach eine Stunde lang in Meerretichperoxidase-markiertes Streptavidin (Jackson ImmunoResearch Labs Cat 016-030-084, RRID: AB_2337238, USA) gegeben und eine Stunde lang inkubiert. Nach vier erneuten Waschschriffen wurde die Farbreaktion mit Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt. Diese dauerte eine Minute lang, danach wurden die Schnitte kurz in bidestilliertes Wasser überführt und dann in PBS gewaschen. Danach wurden alle Schnitte auf Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurden sie mit Hilfe von Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgedeckt. Von den eingedeckten Schnitten wurden mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus BH-2, Hamburg, Deutschland) Fotos ausgewählter Regionen in 20-facher Vergrößerung erstellt. Diese Regionen wurden basierend auf Probefärbungen ausgewählt, in denen in diesen Regionen Veränderungen des 5-HT_{1A}-Rezeptors erkannt wurden. Es handelt sich hierbei um den lateralen Septumskomplex und den medialen Nukleus des Septums (Bregma +1,10 bis +0,26), die Amygdala (Bregma -1,46 bis -2,7) und die Pyramidenzellschichten der CA1- und CA3-Region des Hippocampus (Bregma -1,46 bis -2,7). Für jede Region wurde das geschätzte Volumen bestimmt, wofür die Methode nach Cavalieri (GUNDERSEN & JENSEN, 1987) genutzt wurde. Hierfür wurde die Software Stereo Investigator Version 2017.03.3 (64 bit) und ein Mikroskop (Leica DMLB, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Die Fotos wurden zur Bestimmung der optischen Dichte (*optical density*, OD) verwendet. Dazu wurde die Software Image J (ImageJ 1.51 version, [https://imagej.nih.gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/ij](https://imagej.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/ij).) genutzt, mit der die optische Dichte als Wert der Farbintensität über einem automatisch festgelegten Schwellenwert bestimmt wird. Mit Hilfe von Image J wurden die Bilder zuerst in eine 8-bit-Version in Graustufen konvertiert. Die durchschnittliche optische Dichte wurde mit der Rodbard-Transformation, die das Programm automatisch durchführte, bestimmt. Die Werte der optischen Dichte sowie der über dem Schwellenwert angefärbte Fläche wurden in Excel-Arbeitsblätter exportiert und konnten so statistisch ausgewertet werden. Aufgrund von Artefakten auf den Schnitten konnten diese bei sechs Tieren nicht ausgewertet werden. Bei einem weiteren Tier konnten die Amygdala und die CA3-Region nicht ausgewertet werden.

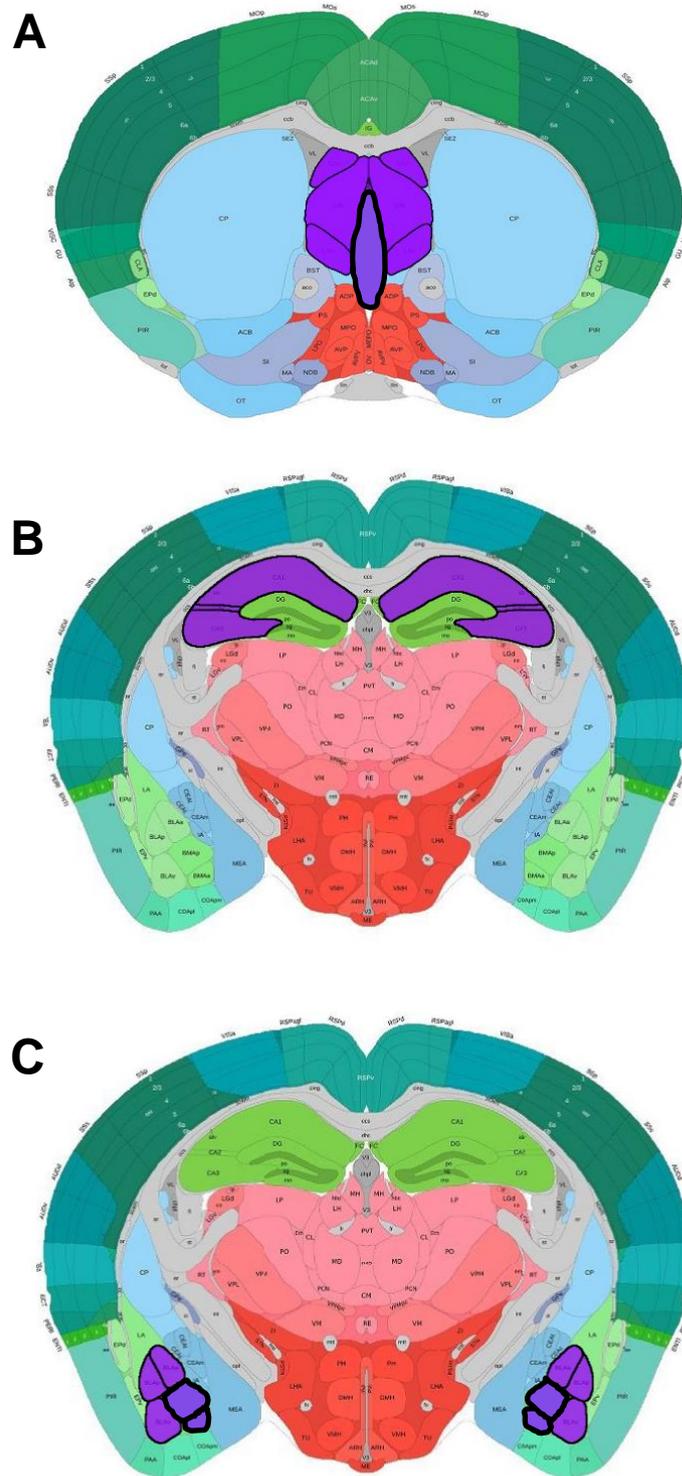


Abb. 11: Schematische Darstellung der Hirnregionen, in denen die 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung ausgewertet wurde. Betreffende Hirnregionen sind in lila dargestellt. Koronare Schnittebene. (A) Lateraler Septumskomplex und medialer Nucleus des Septums. (B) CA1- und CA3-Region des dorsalen Hippocampus. (C) Basolateraler und basomedialer Nucleus der Amygdala. Abbildung erstellt mit Hilfe des Allen-Brain-Atlas (www.brain-map.org).

9. Auswertung und Statistik

9.1. Statistische Auswertung der Daten zum Nestbauverhalten bei Ratten

Die statistische Auswertung wurde mit der Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) und R Version 3.3.2 (R-STUDIO & CORE TEAM) durchgeführt. Für den Vergleich unterschiedlicher Vertrautheit mit dem Nestmaterial und unterschiedlichem Geschlecht wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) angewendet, genauso für den Vergleich der Züchter und des Geschlechts für die ersten vier Tage nach Ankunft an der LMU München. Als Post-hoc-Test wurde der Bonferroni-Test angewendet. Eine dreifaktorielle Varianzanalyse (3-way ANOVA) für wiederholte Messungen mit dem für diese angepassten Post-hoc-Test nach Benjamini und Hochberg wurde für den Vergleich zwischen den verschiedenen Standorten, Geschlecht und verschiedenen Zeitpunkten der Nestbeurteilung durchgeführt. Mit Hilfe des Pakets „irr“ wurden die Korrelationskoeffizienten (VITALO et al., 2012) und der Kendall's Konkordanzkoeffizient W erstellt. Das Signifikanzniveau zur Verwerfung der Nullhypothese wurde mit dem p-Wert $<0,05$ festgelegt.

9.2. Statistische Auswertung der Daten im Kindling-Modell bei Mäusen

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test für parametrische Datensätze angewendet. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen und parametrischen Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) eingesetzt. Um Vergleiche zwischen zwei Faktoren ziehen zu können, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (2-way ANOVA) verwendet. Für den Vergleich der Daten des *Burrowing-Tests* zu verschiedenen Zeitpunkten und zum Vergleich der Daten der fäkalen Corticosteronwerte zu verschiedenen Zeitpunkten wurde der 2-way ANOVA für wiederholte Messungen angepasst. Bei der einfaktoriellen und auch bei der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde der Bonferroni-Test als Post-hoc-Test genutzt. Auch für die Auswertung der Entwicklung des Kindling-Prozesses und für den Gewichtsverlauf wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen (2-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test als Post-hoc-test erstellt. Bei non-parametrischen Daten wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Test als Post-hoc-Test angewendet. Das

Signifikanzniveau zur Verwerfung der Nullhypothese wurde mit dem p-Wert $<0,05$ festgelegt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte mit dem Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM). Es wurde mit der $3\text{-}\sigma$ -Regel überprüft, ob es Werte gab, die sich als Ausreißer herausstellten, dies war allerdings nicht der Fall.

Für die Darstellung der Korrelationsmatrix wurde das R-Paket „corrplot“ (WEI u. SIMKO 2016) verwendet. Für die Darstellung der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurde das R-Paket “made4” (CULHANE et al. 2005) genutzt. Die Daten der PCA wurden so skaliert und zentriert, dass jede der Variablen in der PCA einen Mittelwert von Null aufweist und die Standardabweichung einen Wert von Eins aufweist.

V. ERGEBNISSE

1. Nestbauverhalten bei Ratten

Nachdem alle zu bewertenden 861 Nester von allen drei Beurteiler ausgewertet waren, wurden der Korrelationskoeffizient (VITALO et al., 2012) und der Kendall'sche Konkordanzkoeffizient W bestimmt. Der Korrelationskoeffizient gibt den linearen Zusammenhang zwischen den jeweiligen Variablen, also hier den drei Beurteilern an. Der Kendall'sche Konkordanzkoeffizient W quantifiziert die Übereinstimmung zwischen verschiedenen Beurteilern. Unter Anwendung des Score-Systems nach BAUMANS (2004) erreichte der ICC einen Wert von 0,54 ($p < 0,001$) und der Kendall'sche Konkordanzkoeffizient W einen Wert von 0,60 ($p = 0,0475$). Mit dem neu entwickelten Score-System ergab sich ein ICC von 0,79 ($p < 0,001$) und ein Kendall'scher Konkordanzkoeffizient W von 0,63 ($p < 0,001$), demzufolge konnte mit dem neuen Score-System die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den Beurteilern verbessert werden.

Um eine Aussage über das Nestbauverhalten unter den Einflussfaktoren des Standorts, der Herkunft der Tiere und des Geschlechts treffen zu können, wurde das Nestbauverhalten der Tiere der LMU München und der MH Hannover miteinander verglichen. Hierfür wurden an jedem der beiden Standorte Tiere beider Geschlechter des Züchters „Charles River“ verwendet und in zwei aufeinanderfolgenden Wochen die Nestkomplexität betrachtet. Zur Auswertung wurden die Tage vier bis sechs jeder Woche herangezogen, da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die Nestkomplexität während dieser Zeit auf einem konstanten Niveau blieb und diese Tage auch der höchsten erreichten Nestkomplexität innerhalb einer Wochen entsprachen (MÖLLER et al., 2018). Dann wurde der Mittelwert der Auswertung aller drei Beurteiler betrachtet. Dabei wurde ein Gesamtunterschied zwischen den beiden Standorten (Abb.12; $F(1,37)=5,884$, $p=0,0203$) und zwischen Woche 1 und Woche 2 festgestellt (Abb.12; $F(1,37)=5,328$, $p=0,0267$). Die Nester der weiblichen Ratten an der LMU München erreichten in der zweiten Woche eine höhere Komplexität als die weiblichen Ratten an der MH Hannover (Abb. 12; $p=0,0141$). Die weiblichen Ratten der LMU München zeigten in der zweiten Woche eine höhere Nestkomplexität als in der ersten Woche (Abb. 12; $p=0,0449$). Ein geschlechtsspezifischer Unterschied wurde in der zweiten Woche bei den Ratten der MH Hannover festgestellt. Die Nester der männlichen Ratten erreichten eine höhere Nestkomplexität als die der weiblichen Ratten (Abb.12; $p=0,0380$).

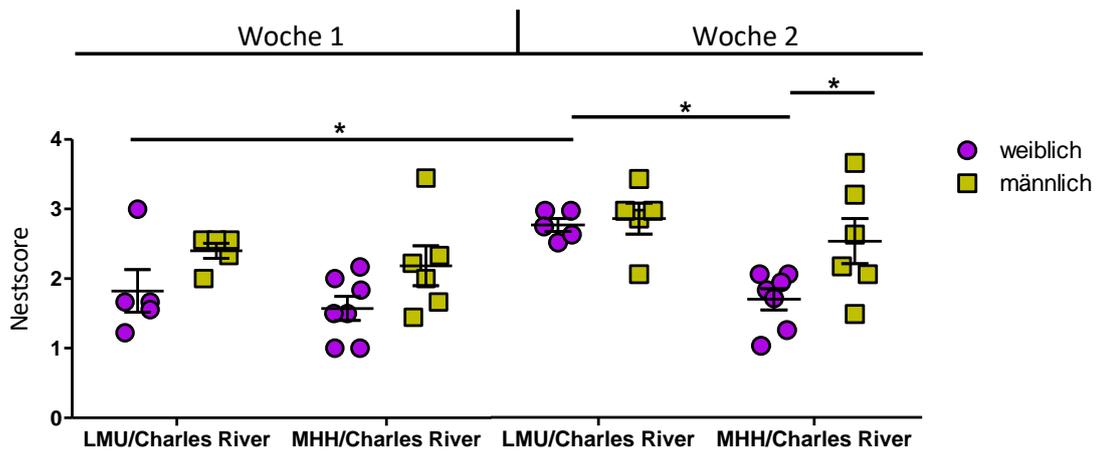


Abb. 12: Vergleich der Nestscores an zwei verschiedenen Standorten (LMU und MHH), zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1 und Woche 2) und beider Geschlechter. Verglichen wurden Nester von Ratten vom Züchter Charles River. Dargestellt sind die durchschnittlichen Nestscores aller drei Beurteiler. (LMU/Charles River weiblich n=5, LMU Charles River männlich n=5, MHH/Charles River weiblich n=7, MHH/Charles River männlich n=6). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 4-6 jeder Woche, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

Bei der Betrachtung der Nestscores, die durch die einzelnen Beurteiler vergeben wurden, fällt auf, dass es zwischen ihrer Beurteilung der Nester Unterschiede gibt (Abb.13). Das zeigte sich schon im Korrelationskoeffizienten und im Kendall'schen Konkordanzkoeffizienten W.

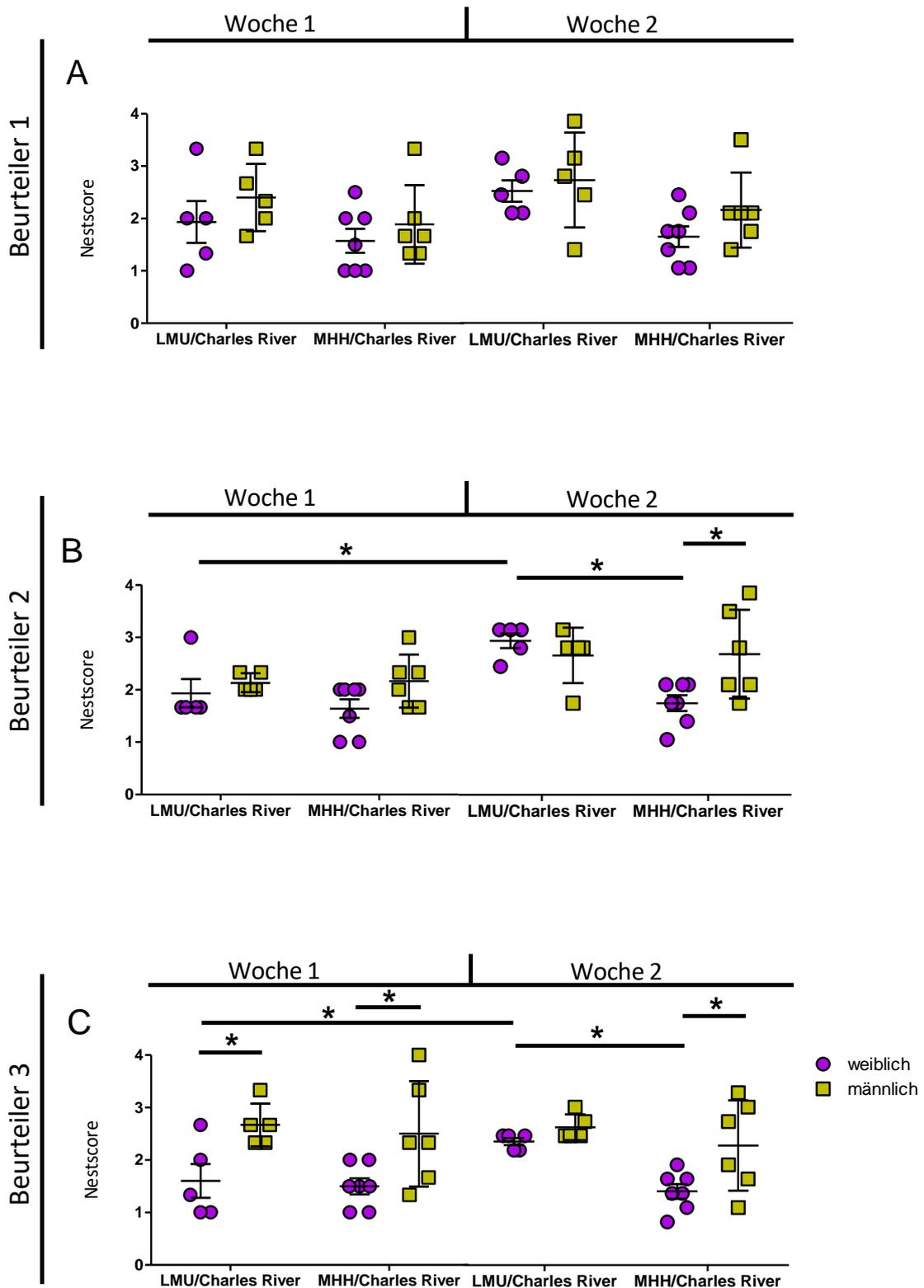


Abb.13: Vergleich der Nestscores an zwei verschiedenen Standorten (LMU und MHH), zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (Woche 1 und Woche 2) und beider Geschlechter. Verglichen wurden Ratten vom Züchter Charles River. (A) Beurteiler 1, (B) Beurteiler 2, (C) Beurteiler 3. (LMU/Charles River weiblich n=5, LMU Charles River männlich n=5, MHH/Charles River weiblich n=7, MHH/Charles River männlich n=6). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 4-6 jeder Woche, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

Nun wurde getestet, inwieweit sich die Nestkomplexität in der zweiten Woche der Nestbeurteilung von den verschiedenen Züchtern, Envigo und Charles River, an der LMU unterschieden. Dazu wurde auch das Geschlecht der Tiere miteinbezogen. Die Tiere von Envigo kannten das an der LMU verwendete Nestmaterial Enviro Dri® schon von Geburt an, wohingegen die Tiere von Charles River als Jungtiere herkömmlichen Zellstoff erhielten. Somit war das Material Enviro Dri® für die Tiere von Charles River bis zur ersten Exposition an der LMU unbekannt. An der MH Hannover wurden statt Tieren von Envigo Tiere betrachtet, die an der MH Hannover selbst aufgezogen wurden und schon früh das Nestmaterial Enviro Dri® erhielten. Die Eltern dieser Tiere stammten von Charles River, sodass überprüft werden konnte, ob der frühe Umgang mit einem Nestmaterial das Nestbauverhalten zu einem späteren Zeitpunkt beeinflussen kann.

Der Vergleich der Tiere von Envigo und Charles River an der LMU ergab keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen (Abb. 14). Es konnte nur ein geschlechtsspezifischer Unterschied bei den Ratten von Envigo festgestellt werden, dort bauten die weiblichen Tiere von Envigo bessere Nester als die männlichen Tiere (Abb. 14 A; $p < 0,05$). Dieser Unterschied wurde beobachtet, wenn der Mittelwert aller drei Beurteiler betrachtet wurde (Abb. 14 A), und in den individuellen Nestbewertungen zeigte sich dieser Trend bei zwei der drei Beurteiler (Abb. 15 A, C; $p < 0,1$). Auch der Vergleich der Gruppen in Hannover ergab keinen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Aufzuchten (Abb. 14 B). Im Vergleich der Geschlechter zeigte sich hier, dass die Nester der männlichen Tiere von Charles River eine höhere Nestkomplexität aufwiesen als die weiblichen Tiere (Abb. 14 B; $p < 0,05$, Fig 15 D-F; $p < 0,05$).

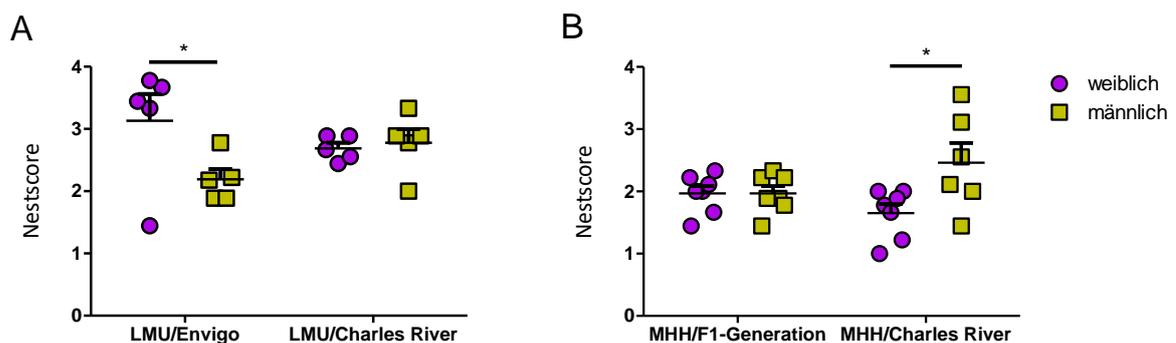


Abb.14: Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Envigo, Charles River) bzw. aufgezogen an der MHH (F1-Generation), und beider Geschlechter. (A) Vergleich unterschiedlicher Herkunft (Envigo, Charles River) und beider Geschlechter an der LMU. (B) Vergleich unterschiedlicher Herkunft (Charles River, selbst aufgezogene F1-Generation) und beider Geschlechter an der MHH. Dargestellt sind die durchschnittlichen Nestscores aller drei Beurteiler. (LMU/Envigo weiblich $n=5$, LMU/Envigo männlich $n=5$, LMU/Charles River weiblich $n=5$, LMU/Charles River männlich $n=5$, MHH/F1-Generation weiblich $n=7$, MHH/F1-Generation männlich $n=7$, MHH/Charles River weiblich $n=7$, MHH/Charles River männlich $n=6$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 4-6 jeder Woche, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

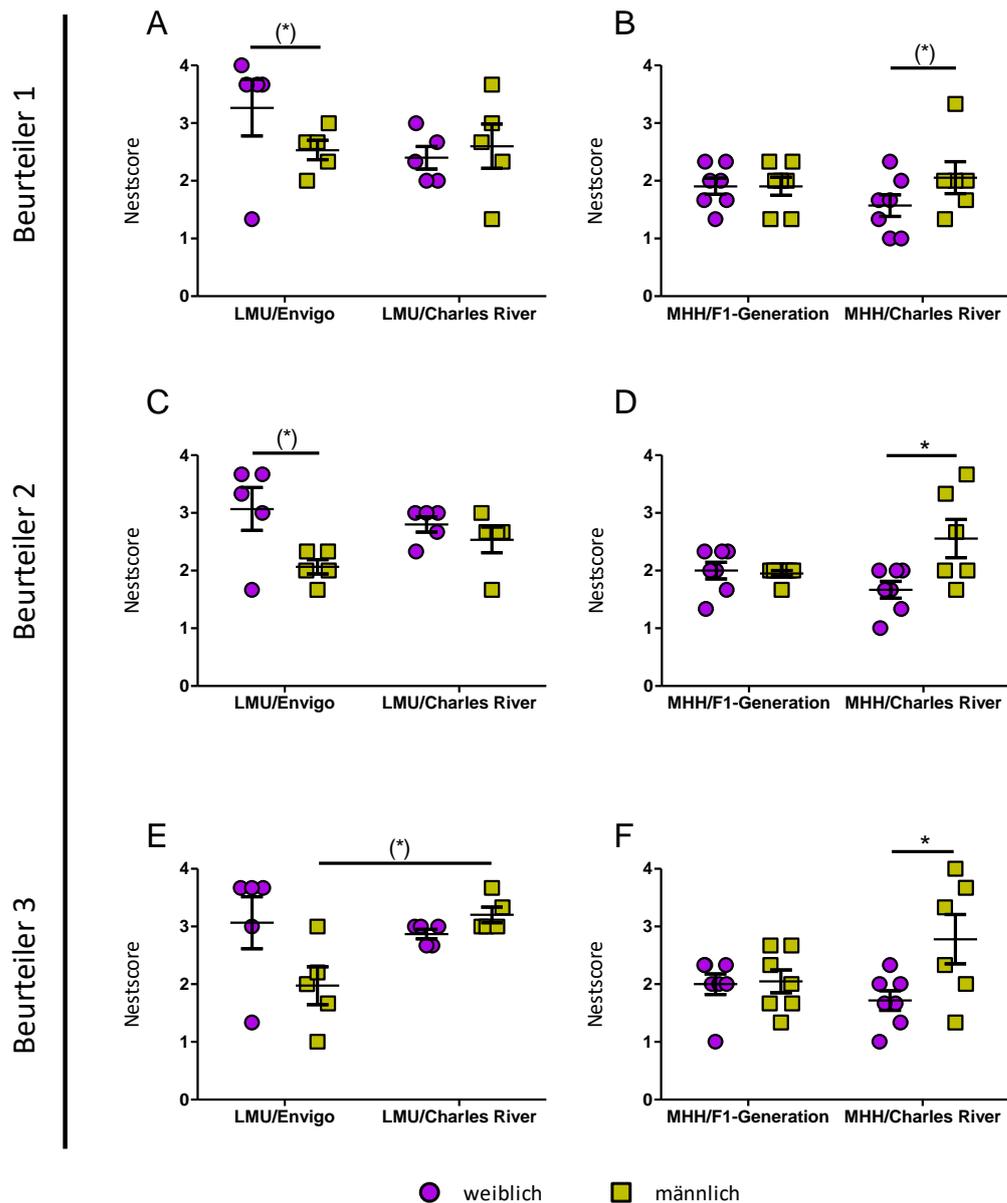


Abb.15: Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft bzw. Aufzucht an der MHH (F1-Generation), und beider Geschlechter. (A) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Envigo, Charles River) und beider Geschlechter an der LMU. Nestscores vergeben von Beurteiler 1. (B) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Charles River, selbst aufgezogene F1-Generation) und beider Geschlechter an der MHH. Nestscores vergeben von Beurteiler 1. (C) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Envigo, Charles River) und beider Geschlechter an der LMU. Nestscores vergeben von Beurteiler 2. (D) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Charles River, selbst aufgezogene F1-Generation) und beider Geschlechter an der MHH. Nest Scores vergeben von Beurteiler 2. (E) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Envigo, Charles River) und beider Geschlechter an der LMU. Nestscores vergeben von Beurteiler 3. (F) Vergleich der Nestscores bei unterschiedlicher Herkunft (Charles River, selbst aufgezogene F1-Generation) und beider Geschlechter an der MHH. Nestscores vergeben von Beurteiler 3. (LMU/Envigo weiblich n=5, LMU/Envigo männlich n=5, LMU/Charles River weiblich n=5, LMU/Charles River männlich n=5, MHH/F1-Generation weiblich n=7, MHH/F1-Generation männlich n=7, MHH/Charles River weiblich n=7, MHH/Charles River männlich n=6). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 4-6 jeder Woche, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$), statistische Trends ($p < 0,1$) als Stern in Klammern.

An der LMU München erhielten die Tiere beider Züchter schon vom Tag der Ankunft an das Nestmaterial Enviro Dri®. So konnte hier während der ersten Tage nach der Ankunft beobachtet werden, wie sich die Tiere vom Züchter Envigo verhielten, die das Nestmaterial Enviro Dri® bereits vom Züchter kannten. Im Vergleich dazu wurde das Nestbauverhalten der Tiere vom Züchter Charles River betrachtet, die das Nestmaterial Enviro Dri® nicht kannten. Es wurde festgestellt, dass die weiblichen Tiere von Envigo während der ersten vier Tage nach der Ankunft im Vergleich zu allen anderen Tieren komplexere Nester bauten (Abb. 16; Interaktion: $F(1,16)=25,39$, $p<0,001$, Geschlecht: $F(1,16)=7,087$, $p=0,017$, Züchter: $F(1,16)=17,5$, $p<0,001$, LMU/Envigo versus alle anderen Gruppen $p<0,001$). Dies zeigte sich sowohl im Durchschnitt aller drei Beurteiler (Abb. 16), als auch bei individueller Betrachtung bei zwei der drei Beurteiler (Abb. 17).

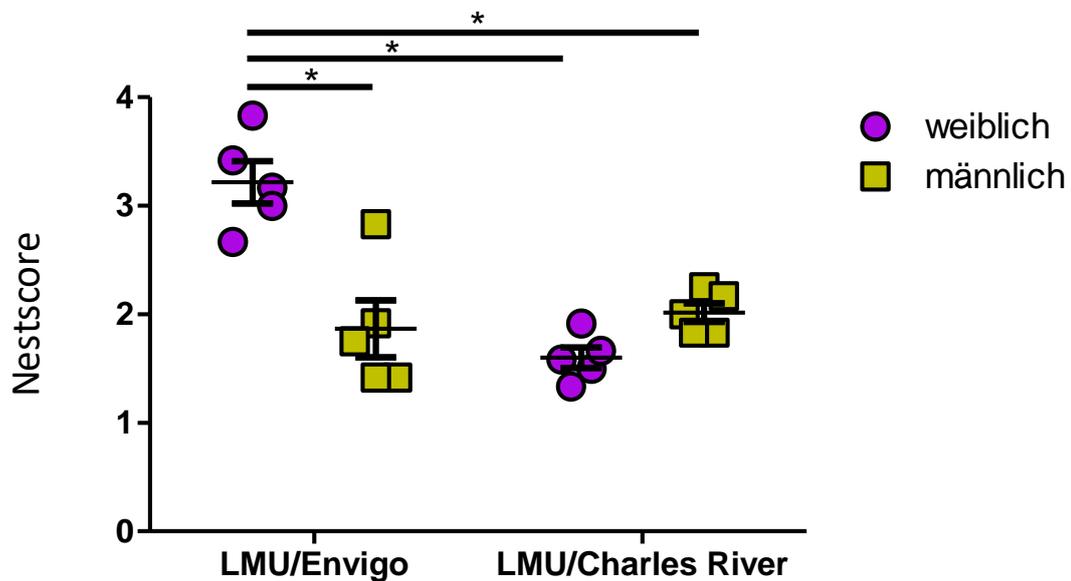


Abb.16: Nestscores in den Tagen 1-4 nach Ankunft an der LMU München, Vergleich der Nestscores von Tieren der Züchter Envigo und Charles River, jeweils beider Geschlechter. Höhere Nestscores wurden bei den weiblichen Tieren von Envigo im Vergleich zu allen anderen Gruppen festgestellt. Dargestellt sind die durchschnittlichen Nestscores aller drei Beurteiler. (LMU/Envigo weiblich $n=5$, LMU/Envigo männlich $n=5$, LMU/Charles River weiblich $n=5$, LMU/Charles River männlich $n=5$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 1-4 der ersten Woche nach Ankunft, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p<0,05$).

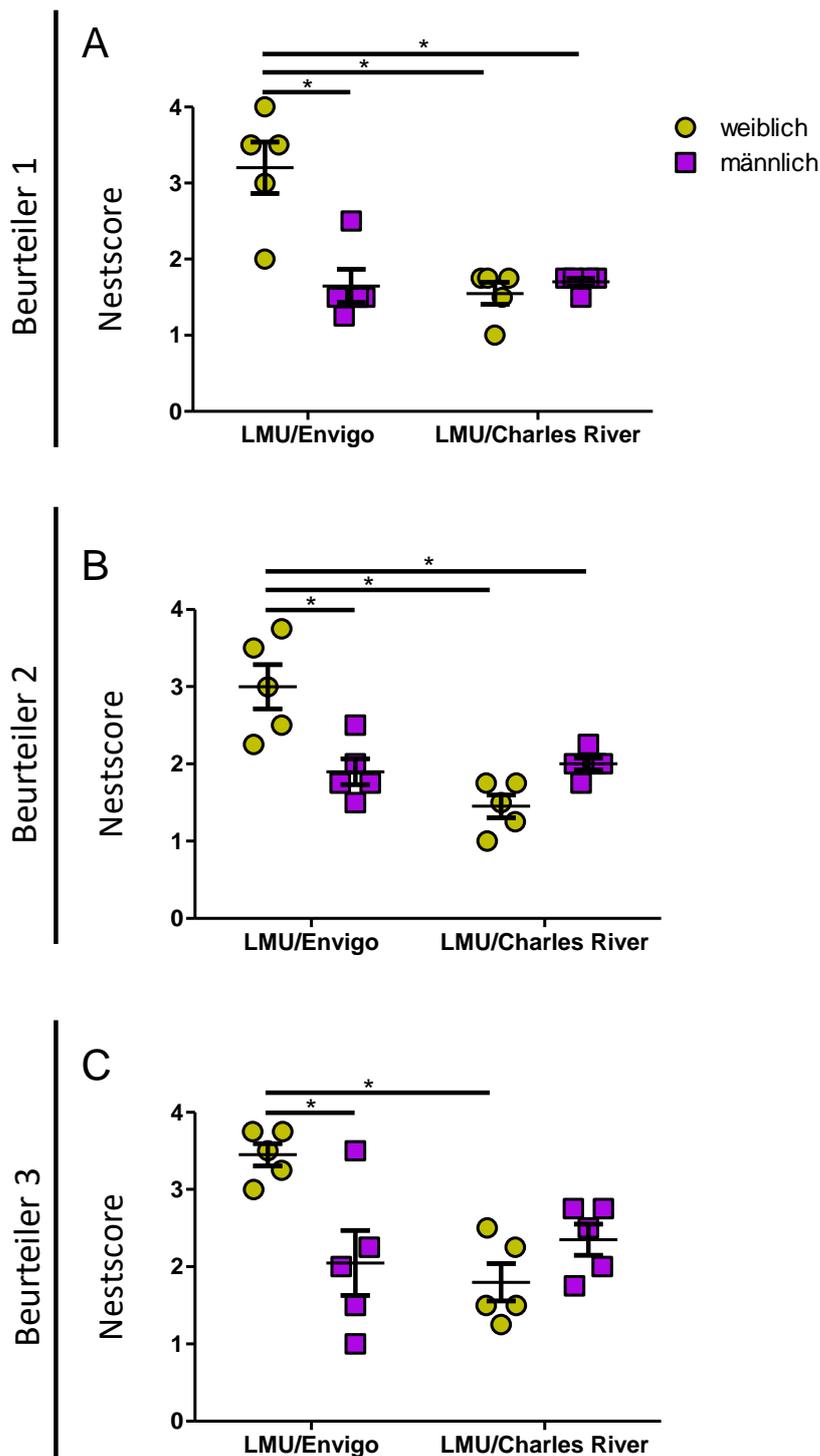


Abb.17: Nestscores in den Tagen 1-4 nach Ankunft an der LMU München, Vergleich von Nestscores der Tiere der Züchter Envigo und Charles River, jeweils beider Geschlechter. Höhere Nestscores wurden bei den Nestern der weiblichen Tiere von Envigo im Vergleich zu allen anderen Gruppen festgestellt. (A) Nestscores vergeben von Beurteiler 1. (B) Nestscores vergeben von Beurteiler 2. (C) Nestscores vergeben von Beurteiler 3. (LMU/Envigo weiblich n=5, LMU/Envigo männlich n=5, LMU/Charles River weiblich n=5, LMU/Charles River männlich n=5). Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Tage 1-4 der ersten Woche nach Ankunft, den SEM und die Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

Die Verläufe der Anfallsschwere (*seizure severity*, SS) von HIP- und AM-Kindling-Gruppen weisen einen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf auf, außerdem unterscheidet sich die Entwicklung der Anfallsstärke zwischen HIP- und AM-gekindelten Tieren (Abb.20 A; Zeiteffekt: $p < 0,05$, Lokalisation, d.h. Elektrode in Hippocampus versus Amygdala: $p < 0,05$). Die Anfälle wurden im Laufe der fortschreitenden Stimulationstage länger, was sich sowohl in dem motorischen anfallsassoziierten Verhalten zeigte (Anfallsdauer, *seizure duration*, SD), als auch in der Länge der Nachentladungsdauer (Abb. 20 B-D; Zeiteffekt: $p < 0,05$). Die Länge der Nachentladungsmuster im EEG vom Beginn der Stimulation bis zur ersten Veränderung des Musters in Frequenz und/oder Amplitude wird Nachentladungsdauer 1 (ADD1, *after discharge duration 1* genannt (Abb.19). Die Verläufe der Nachentladungsdauer 1 von beiden Kindling-Gruppen unterscheiden sich signifikant voneinander (Abb. 20 C; Lokalisation: $p < 0,052$). Die Nachentladungsdauer 1 der AM-Kindling-Gruppe stieg dabei mit der Anzahl der Stimulationstage stärker an als die Nachentladungsdauer 1 der HIP-Kindling-Gruppe. Genauso verhielt es sich mit der Nachentladungsdauer 2 der beiden Kindling-Gruppen. Auch hier unterscheiden sich beide Verläufe signifikant voneinander (Abb. 20 D; Lokalisation: $p < 0,05$). Die Nachentladungsdauer 2 (ADD2, *after discharge duration 2*) beschreibt die Länge der Nachentladungsmuster im EEG vom Beginn der Stimulation an bis zum Ende, nicht nur bis zum ersten Wechsel des Musters (Abb. 19).

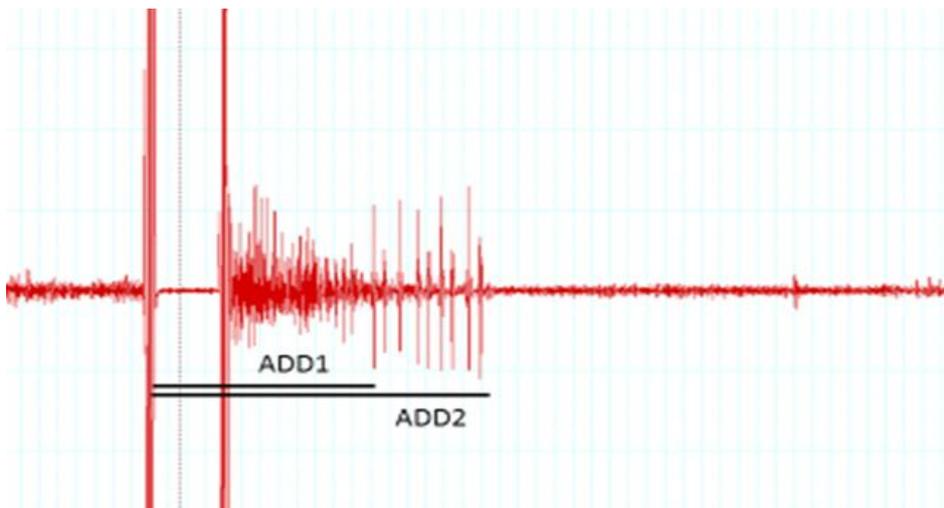


Abb. 19: Typisches Nachentladungsmuster im EEG. Die Nachentladungsdauer 1 (ADD1) zeigt die Länge des anfallstypischen Nachentladungsmusters bis zum ersten Wechsel des Musters. Die Nachentladungsdauer 2 (ADD2) zeigt die Länge des gesamten Nachentladungsmusters.

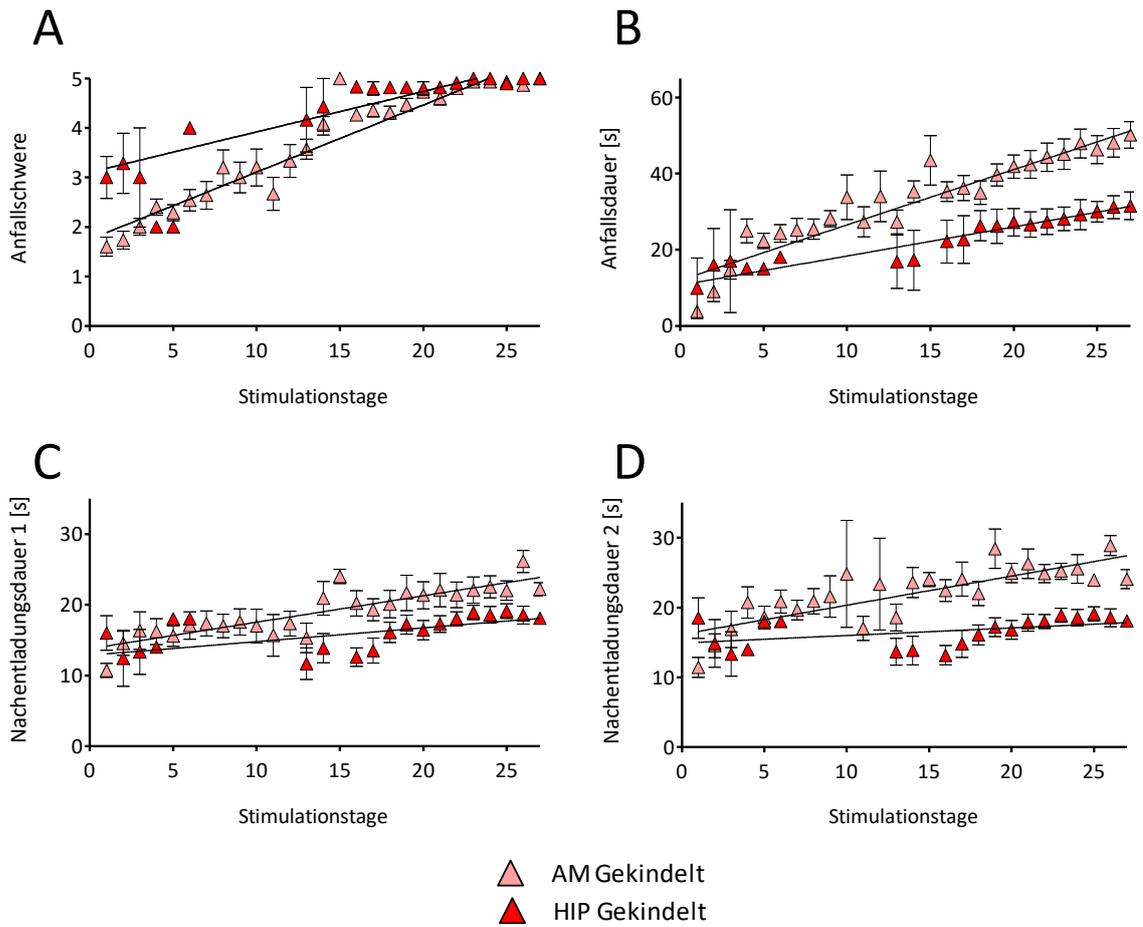


Abb. 20: Parameter des Kindling-Prozesses. (A) Anfallsschwere der AM-Kindling-Gruppe und der HIP-Kindling-Gruppe an den einzelnen Stimulationstagen. (B) Anfallsdauer der AM-Kindling-Gruppe und der HIP-Kindling-Gruppe an den einzelnen Stimulationstagen. (C) Nachentladungsdauer 1 (ADD1) der AM-Kindling-Gruppe und der HIP-Kindling-Gruppe an den einzelnen Stimulationstagen. (D) Nachentladungsdauer 2 (ADD2) der AM-Kindling-Gruppe und der AM-Kindling-Gruppe an den einzelnen Stimulationstagen. (AM n=14 Tiere, HIP n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Regressionsgeraden.

2.2. Verhaltensuntersuchungen

2.2.1. Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad

Zur Bewertung des Nestbauverhaltens wurden täglich zwischen 6:00 und 8:00 Uhr Fotos von dem Nest eines jeden Tieres erstellt und ausgewertet. Einmal pro Woche erhielten die Tiere neues Nestmaterial. Zur Bestimmung von Basalwerten wurde die Nestkomplexität eine Woche vor der Elektrodenimplantation bewertet. Dabei wurden weder zwischen den einzelnen Tagen noch zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen Unterschiede festgestellt (Abb. 21 A). Um die Auswirkungen der Elektrodenimplantation auf das Nestbauverhalten beurteilen zu können, wurde die Nestkomplexität in den Folgetagen der Operation betrachtet. Dabei zeigte sich eine signifikant reduzierte Nestkomplexität an den ersten beiden Tagen nach der Elektrodenimplantation bei allen operierten Versuchstieren (Abb. 21 B; naive Tiere versus alle implantierten Tiere: $p < 0,0001$). Während der Kindlingphase wurde das Nestbauverhalten jeden Tag über fünf Wochen hinweg beurteilt. Somit konnte eine Aussage über die Auswirkungen des Kindlings auf die Nestkomplexität getroffen werden. Während der gesamten Phase des Kindlings zeigten sich keine Unterschiede zwischen den gekindelten Gruppen, den elektrodenimplantierten Kontrollgruppen (Sham) und der naiven Kontrollgruppe (Abb. 21 C-G). Des Weiteren wurde der Nestverschmutzungsgrad beurteilt. Dazu wurden einmal wöchentlich, vor dem Umsetzen der Tiere in frische Käfige, Fotos von den verschmutzten Käfigen erstellt und bewertet. Es konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den Gruppen im Verschmutzungsgrad festgestellt werden.

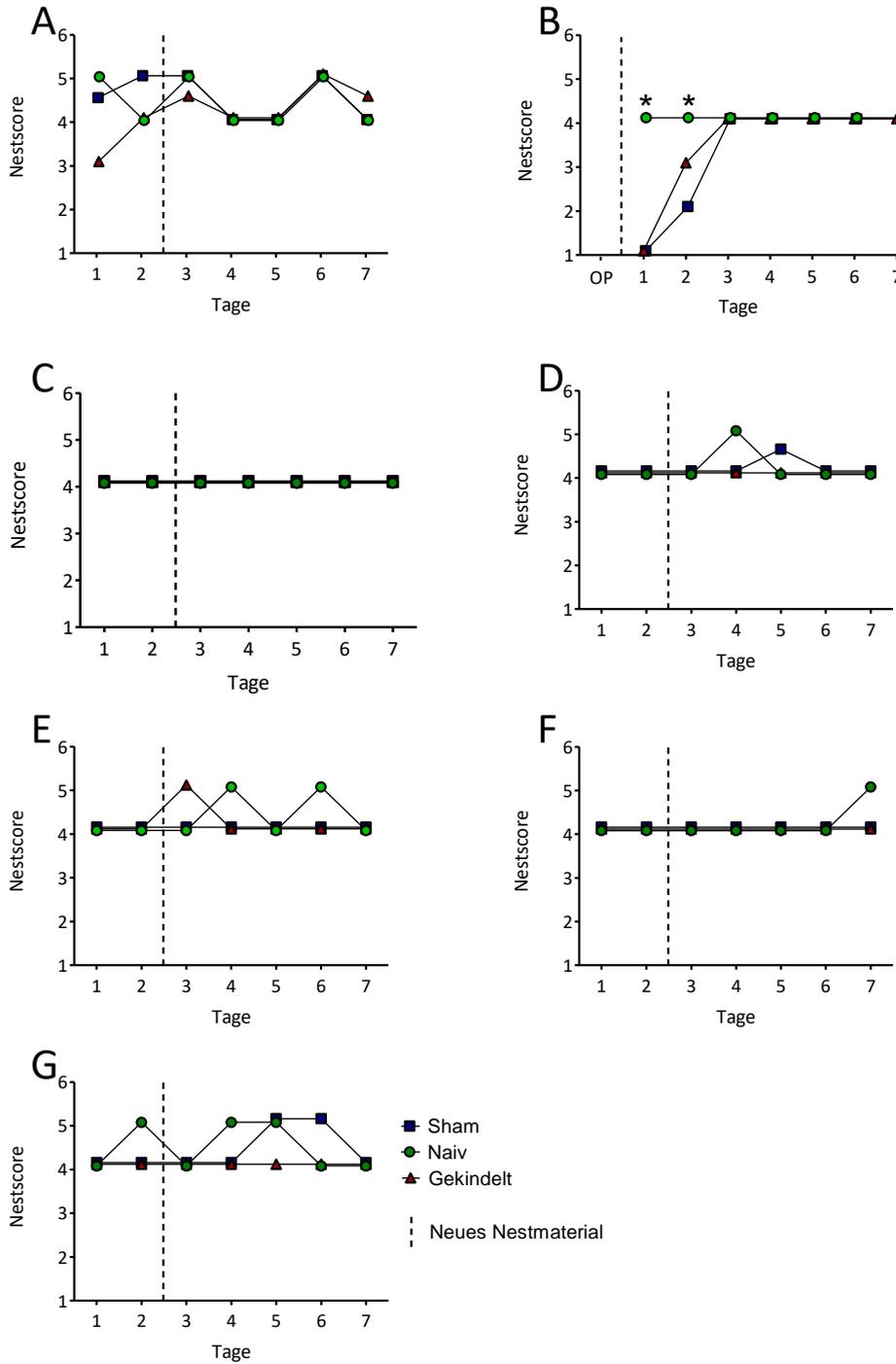


Abb. 21: Nestkomplexität. (A) Basalwerte über sieben Tage hinweg. (B) Nestscores nach der Elektrodenimplantation über sieben Tage hinweg. Einen und zwei Tage nach der Implantation zeigten alle operierten Tiere ein reduziertes Nestbauverhalten. Nestscores in (C) Woche 1, (D) Woche 2, (E) Woche 3, (F) Woche 4, (G) Woche 5 der Kindlingphase. Zu keinem Zeitpunkt der Kindlingphase konnte ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. (Naiv n=15 Tiere, Sham n=30 Tiere, Gekindelt n=26 Tiere). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$). Die Abbildung zeigt den Median jeder Versuchsgruppe pro Tag.

2.2.2. Wühlverhalten

Das Wühlverhalten wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten betrachtet. Zuerst wurde das Wühlverhalten vor der Elektrodenimplantation evaluiert, um den Basalwert für jedes Tier erfassen zu können (Zeitpunkt 1). Dann wurde der *Burrowing-Test* in der zweiten Woche nach der Elektrodenimplantation erneut durchgeführt, um die Auswirkungen der Operation auf das Wühlverhalten beurteilen zu können (Zeitpunkt 2). Der dritte Testdurchlauf fand in der frühen Kindlingphase statt (Zeitpunkt 3), der vierte in der späten Kindlingphase nachdem jedes gekindelte Tier 13 generalisierte Anfälle gezeigt hatte (Zeitpunkt 4). So war die Beurteilung der Auswirkungen des Kindlings auf das Wühlverhalten bei den gekindelten Tieren möglich, außerdem konnte eine Aussage über die Auswirkungen der Elektrodenimplantation und des Hantierens (*Handlings*) mit den Sham-Tieren auf das Wühlverhalten getroffen werden. Zu allen vier Zeitpunkten wurde die gebuddelte Menge einmal nach 120 Minuten direkt vor Beginn der Dunkelphase evaluiert und ein zweites Mal 12 Stunden später nach der Dunkelphase.

Die Evaluation des Wühlverhaltens der Kontrollgruppen, also der Sham-Gruppen und der naiven Gruppe über die vier Zeitpunkte hinweg ergab keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 22 A-F). Die Tiere der AM-Kindling-Gruppe zeigten in der späten Kindlingphase ein im Vergleich zu ihrem Basalwert und den anderen Zeitpunkten gesteigertes Wühlverhalten über Nacht (Abb. 22 H; $F(3,12)=6,499$, $p<0,05$). Bei der HIP-Kindling-Gruppe dagegen konnte in der frühen sowie auch in der späten Kindlingphase ein reduziertes Wühlverhalten im Vergleich zu ihrem Basalwert in den 120 Minuten vor der Dunkelphase beobachtet werden (Abb. 22 I; $F(3,10)=8,403$, $p<0,05$).

Im Vergleich der Versuchsgruppen miteinander konnte bei der Betrachtung des Basalwerts kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 23 A-B). Auch nach der Elektrodenimplantation und in der frühen Phase des Kindlings unterschied sich das Wühlverhalten zwischen den Gruppen nicht voneinander (Abb. 23 C-F). In der späten Kindlingphase konnte mit Hilfe des 2-way ANOVA eine Interaktion zwischen den beiden Kindling-Gruppen gezeigt werden (Abb. 23 G; Interaktion: $F(1,47)=6,94$, $p=0,0142$; Abb. 15 H; Interaktion $F(1,47)=10,44$, $p=0,0013$). Des Weiteren wurde bei der HIP- Kindling-Gruppe ein reduziertes Wühlverhalten im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe, der HIP-Sham-Gruppe, beobachtet (Abb.23 G; HIP Kindling versus HIP Sham: $p<0,05$).

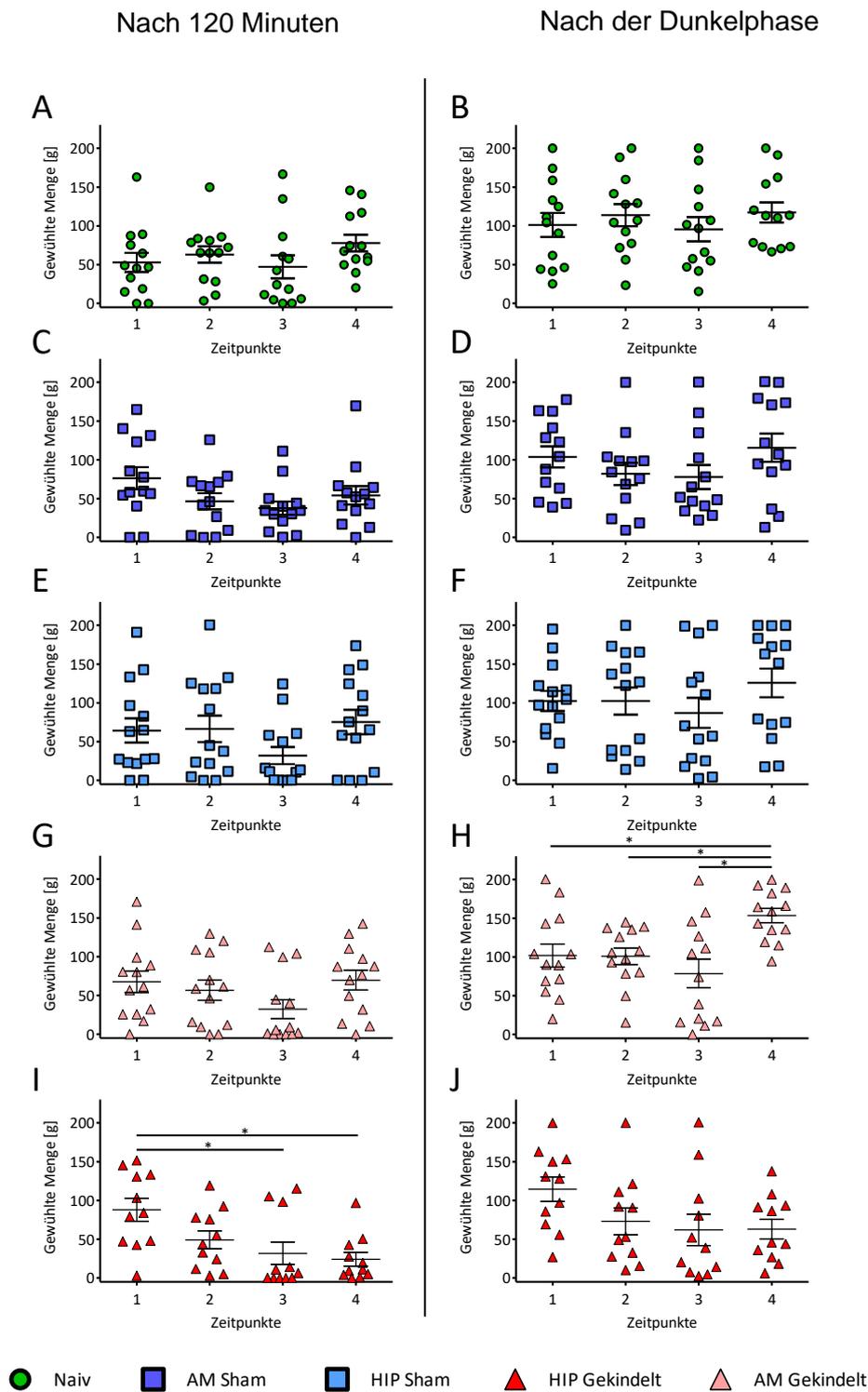


Abb. 22: Mit dem Burrowing-Test evaluiertes Wühlverhalten jeder einzelnen Gruppe zu den verschiedenen Testzeitpunkten. Nach 120 Minuten gewühlte Menge von der (A) naiven Gruppe, (C) AM-Sham-Gruppe, (E) HIP-Sham-Gruppe, (G) AM-Kindling-Gruppe, (I) HIP-Kindling-Gruppe. In der Dunkelphase gewühlte Menge von der (B) naiven Gruppe, (D) AM-Sham-Gruppe, (F) HIP-Sham-Gruppe, (H) AM-Kindling-Gruppe, (J) HIP-Kindling-Gruppe. Ein gesteigertes Wühlverhalten wurde bei der AM-Kindling-Gruppe in der späten Kindlingphase festgestellt. Ein reduziertes Wühlverhalten konnte bei der HIP-Kindling-Gruppe in der frühen wie auch in der späten Kindlingphase festgestellt werden (Naiv n=13 Tiere, AM Sham n=13 Tiere, HIP Sham n=14 Tiere, AM gekindelt n=13 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

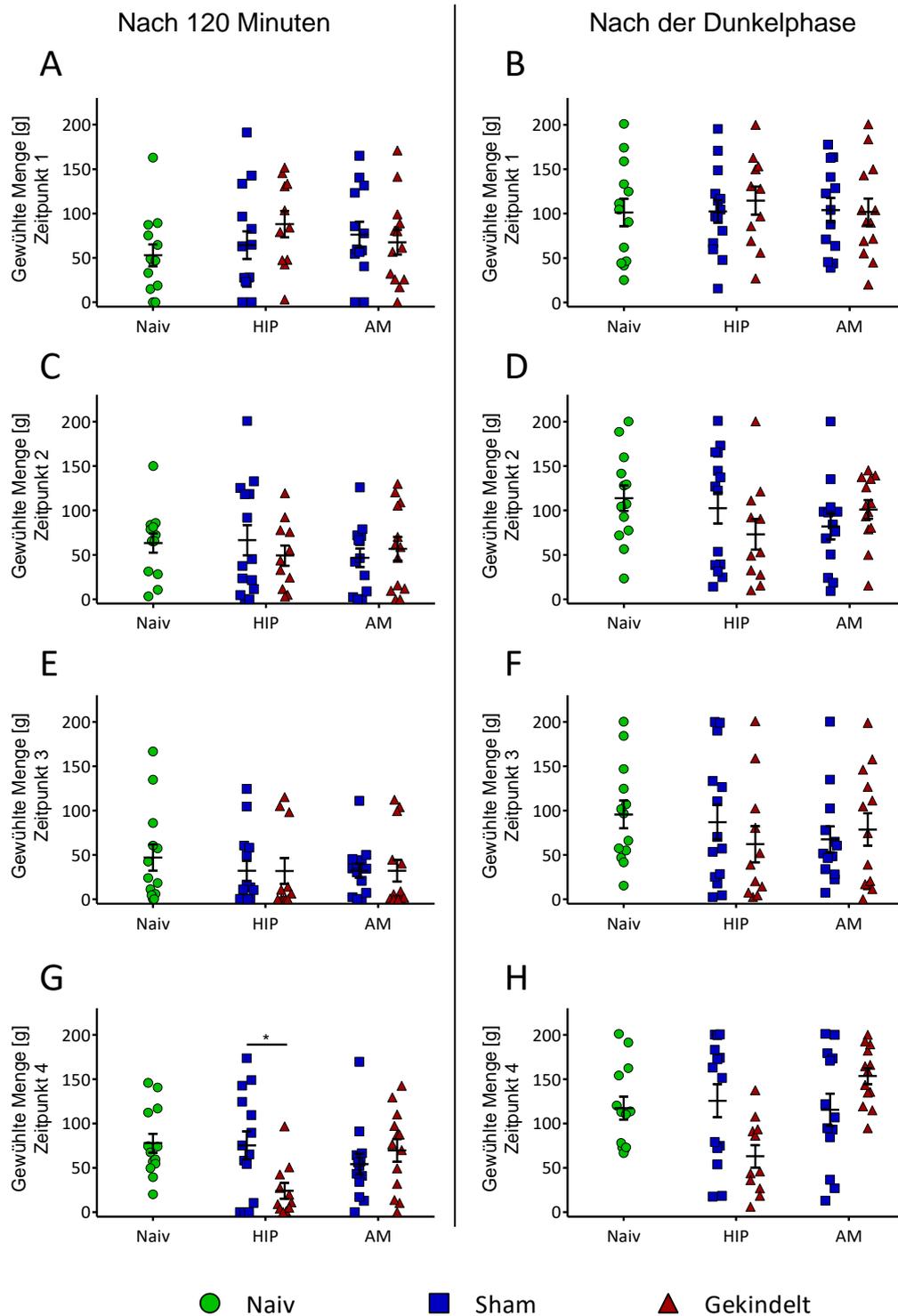


Abb. 23: Durch den Burrowing-Test evaluiertes Wühlverhalten. Gewühlte Menge nach 120 Minuten zum Zeitpunkt (A) 1, (C) 2, (E) 3, (G) 4. Gewühlte Menge während der Dunkelfase zum Zeitpunkt nach 120 Minuten. (B) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 1 über Nacht. (C) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 2 nach 120 Minuten. (D) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 2 über Nacht. (E) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 3 nach 120 Minuten. (F) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 3 über Nacht. (G) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 4 nach 120 Minuten. (H) Gewühlte Menge zum Zeitpunkt 4 über Nacht. (Naiv n=13 Tiere, AM Sham n=13 Tiere, HIP Sham n=14 Tiere, AM gekindelt n=13 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

2.2.3. Soziale Interaktion

Während des *Social-Interaction-Tests* wurden Tiere der gleichen Versuchsgruppe für zehn Minuten in einen gemeinsamen Käfig gesetzt. Dadurch, dass die Tiere in den Tierräumen in Einzelhaltung gehalten wurden, war keines der Tiere während dem Projekt mit seinem Interaktionspartner vorher in Berührung gekommen. Die Zeit, welche die Tiere in passiver sozialer Interaktion verbrachten, war immer nur wenige Sekunden lang (Abb. 24 A). Die in aktiver sozialer Interaktion verbrachte Zeit war bei den Tieren der HIP-Kindling-Gruppe länger als bei den anderen Versuchsgruppen (Abb. 24 B; Versuchsgruppe, d.h. Kindling- versus Kontrollgruppen: $F(1,21)=11,92$, $p=0,0024$, Lokalisation: $F(1,21)=11,88$, $p=0,0024$, HIP Kindling versus alle anderen Gruppen: $p<0,05$).

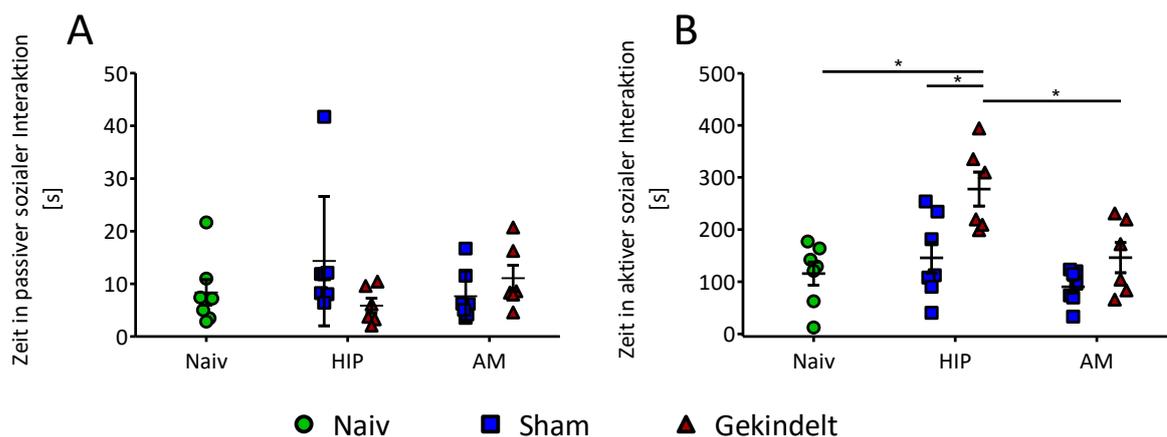


Abb. 24: Soziale Interaktion. (A) Zeit in passiver sozialer Interaktion. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt. (B) Zeit in aktiver sozialer Interaktion. Die HIP-Kindling-Gruppe verbrachte mehr Zeit in aktiver sozialer Interaktion als die anderen Versuchsgruppen. (Naiv $n=7$ Paare, AM Sham $n=7$ Paare, HIP Sham $n=7$ Paare, AM gekindelt $n=6$ Paare, HIP gekindelt $n=6$ Paare). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der Tierpaare. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p<0,05$).

2.2.4. Aktivität und Lokomotion

Daten zur Aktivität und Lokomotion der Tiere wurden mit Hilfe des *Open-Field-Tests* ermittelt. Dieser Test wurde durchgeführt, bevor Untersuchungen zum angst-assoziierten Verhalten gemacht wurden. So konnte ein Einfluss durch Aktivitätsparameter auf die anderen Verhaltensuntersuchungen zuerst beurteilt werden. Bei der zurückgelegten Strecke zeigte sich ein Gesamtunterschied zwischen den gekindelten Tieren und den Kontrollgruppen. Die gekindelten Tiere legten im *Open Field* eine längere Strecke zurück und bewegten sich mit einer höheren Durchschnittsgeschwindigkeit als ihre Sham-Kontrollgruppen (Abb. 25 A; $F(1,51)=14,33$, $p=0,0004$, AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$; HIP Kindling versus HIP Sham: $p<0,05$; Abb. 25 B; $F(1,51)=14,33$, $p=0,0004$, AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$; HIP Kindling versus HIP Sham: $p<0,05$). Ein Gesamtunterschied zwischen gekindelten und nicht gekindelten Tieren sowie ein Gesamtunterschied zwischen Hippocampus- und Amygdala-implantierten Tieren zeigte sich bei der in Immobilität verbrachten Zeit und beim Aufrichteverhalten (*Rearing*) (Abb. 25 C; Versuchsgruppe: $F(1,51)=14,85$, $p=0,0003$; Lokalisation: $F(1,51)=4,832$, $p=0,327$; Abb. 25 D; Versuchsgruppe: $F(1,51)=14,33$, $p=0,0004$; Lokalisation: $F(1,51)=7,885$, $p=0,0070$). Die Zeit, die die gekindelten Tiere in Immobilität verbrachten, war kürzer als die ihrer jeweiligen Sham-Kontrollgruppen (Abb. 25 C; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$, HIP Kindling versus HIP Sham: $p<0,05$). Das Aufrichteverhalten (*Rearing*) war bei beiden Kindling-Gruppen häufiger zu beobachten als bei ihren jeweiligen elektrodenimplantierten Kontrollgruppen, die AM-Kindling-Gruppe zeigte das Aufrichteverhalten (*Rearing*) außerdem häufiger als die naive Gruppe (Abb. 25 D; AM Kindling versus AM Sham und versus naive: $p<0,05$; HIP Kindling versus HIP Sham: $p<0,05$). Bei der in Thigmotaxis verbrachten Zeit und der im Zentrum der Arena verbrachten Zeit wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 25 E, F).

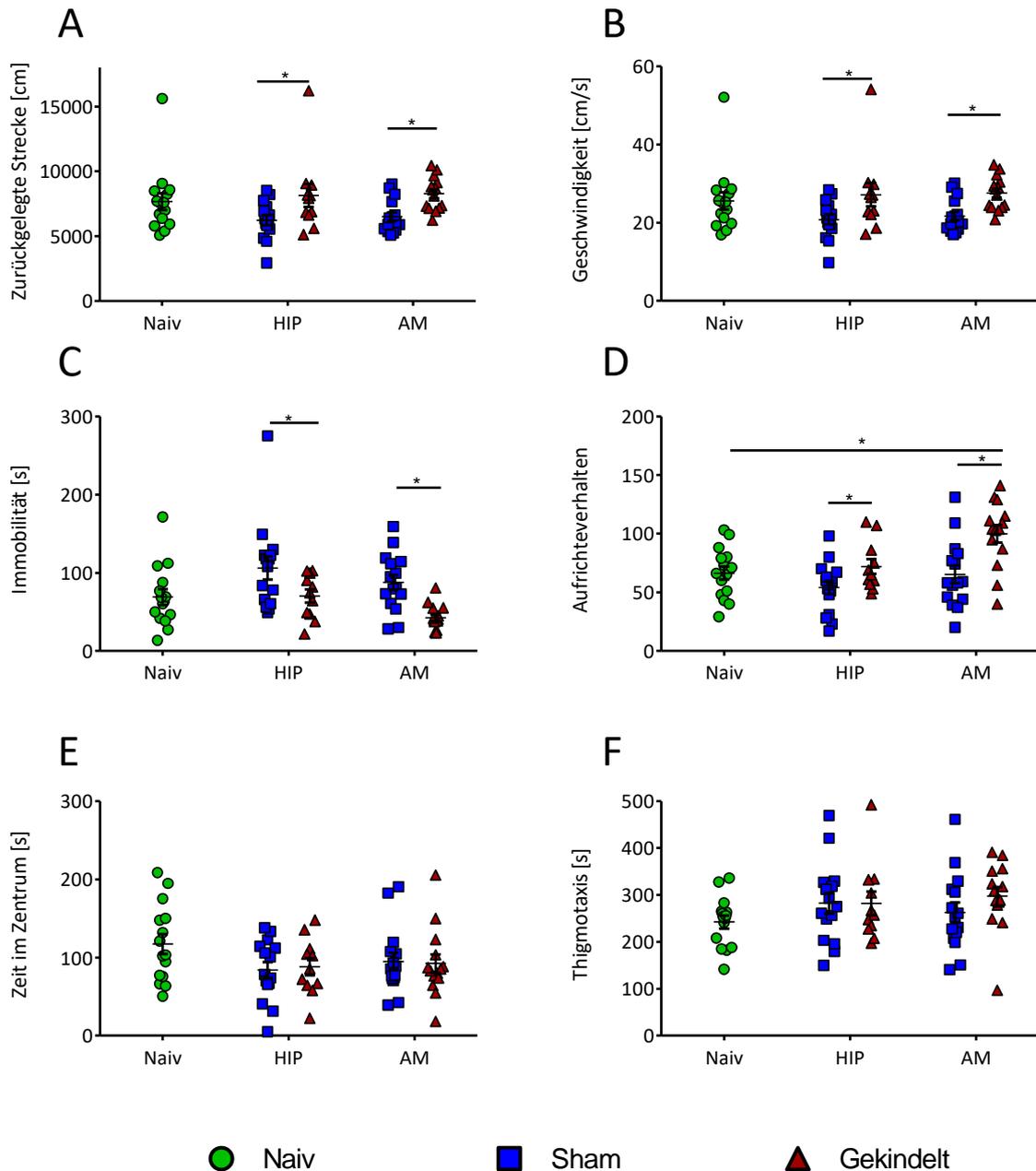


Abb. 25: Open Field. (A) Zurückgelegte Strecke in cm. Die beiden Kindling-Gruppen zeigten eine weitere zurückgelegte Strecke als ihre Sham-Kontrollgruppen. (B) Durchschnittliche Geschwindigkeit in cm/s. Die beiden Kindling-Gruppen zeigten eine höhere Geschwindigkeit als ihre Sham-Kontrollgruppen. (C) In Immobilität verbrachte Zeit in s. Die beiden Kindling-Gruppen verbrachten weniger Zeit in Immobilität als ihre Sham-Kontrollgruppen. (D) Häufigkeit des Aufrichteverhalten (*Rearings*). Die beiden Kindling-Gruppen zeigten das Aufrichteverhalten (*Rearing*) häufiger als ihre Sham-Kontrollgruppen, die AM-Kindling-Gruppe zeigte das Aufrichteverhalten (*Rearing*) häufiger als die naive Gruppe. (Naiv n=15 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=15 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt (p<0,05).

2.2.5. Angst-assoziiertes Verhalten

Der *Black-and-White-Box-Test* liefert Informationen zum angst-assoziierten Verhalten der Tiere. Die Anzahl der Eintritte in die weiße Box war insgesamt bei den Kindling-Tieren erhöht, im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander konnte eine erhöhte Anzahl der Eintritte bei der AM-Kindling-Gruppe im Vergleich zur AM-Sham und zur naiven Gruppe festgestellt werden (Abb. 26 A; $F(1,51)=12.29$, $p=0,0010$, AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$, AM Kindling versus Naiv: $p<0,05$). Die Dauer der in der weißen Box verbrachten Zeit unterschied sich jedoch nicht zwischen den einzelnen Gruppen. Auch bei der Latenzzeit bis zum Eintritt in die schwarze Box und dem Streckverhalten (*Stretching*) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 26 B-D).

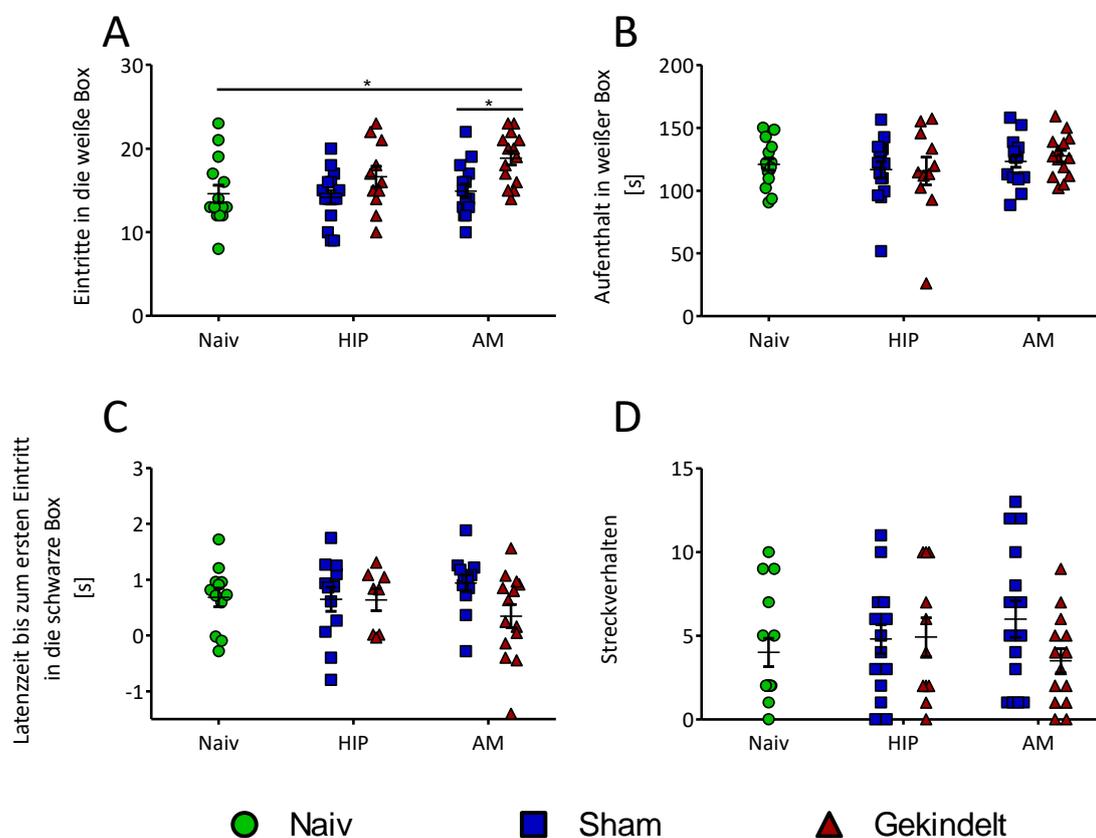


Abb. 26: Black-and-White-Box. (A) Eintritte in die weiße Box. Erhöhte Anzahl der Eintritte bei der AM-Kindling-Gruppe im Vergleich zur AM-Sham-Gruppe und zur naiven Gruppe. (B) Aufenthaltsdauer in der weißen Box. (C) Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box. (D) Frequenz des Streckverhaltens (*stretching postures*). (Naiv $n=15$ Tiere, AM Sham $n=15$ Tiere, HIP Sham $n=15$ Tiere, AM gekindelt $n=14$ Tiere, HIP gekindelt $n=11$ Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p<0,05$).

Im *Elevated-Plus-Maze-Test* werden, ähnlich wie im *Black-and-White-Box-Test*, Beobachtungen zum angst-assoziierten Verhalten der Tiere angestellt. Es konnte dabei bei folgenden Parametern ein Gesamtunterschied zwischen den gekindelten und nicht gekindelten Tieren gezeigt werden: Bei der Zeit, die in den offenen Armen des *Elevated-Plus-Maze* verbracht wurde (Abb. 27 A; $F(1,51)=4,634$, $p=0,0361$); bei der Zeit, die im vorderen Drittel der offenen Arme verbracht wurde (Abb. 27 B; $F(1,51)=16,62$, $p=0,0002$); und bei der Zeit, die in den geschlossenen Armen verbracht wurde (Abb. 27 C; $F(1,51)=10,32$, $p=0,0023$). Die Tiere der beiden Kindling-Gruppen verbrachten dabei mehr Zeit in den offenen Armen als ihre jeweiligen Sham-Gruppen und weniger Zeit in den geschlossenen Armen. Im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander wurde bei diesen genannten Parametern jedoch nur ein Unterschied zwischen der AM-Kindling-Gruppe und der AM-Sham-Gruppe festgestellt (Abb. 27 A; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,01$; Abb. 27 B; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,001$, Abb. 27 C; AM Kindling versus AM Sham $p<0,01$). Auch bei der Häufigkeit der *Head dips* wurde ein Gesamtunterschied zwischen gekindelten und nicht gekindelten Tieren beobachtet. Hierbei konnte bei der AM- sowie bei der HIP-Kindling Gruppe ein Unterschied zu den jeweiligen Sham-Gruppen festgestellt werden (Abb. 27 D; $F(1,51)=25,59$, $p<0,0001$; AM Kindling versus AM Sham $p<0,0001$; HIP Kindling versus HIP Sham $p<0,05$). Um einen potenziellen Einfluss der Aktivität auf die Ergebnisse des *Elevated-Plus-Maze-Test* auszuschließen, wurden auch die zurückgelegte Strecke und die durchschnittliche Geschwindigkeit gemessen. Dabei konnte jedoch kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

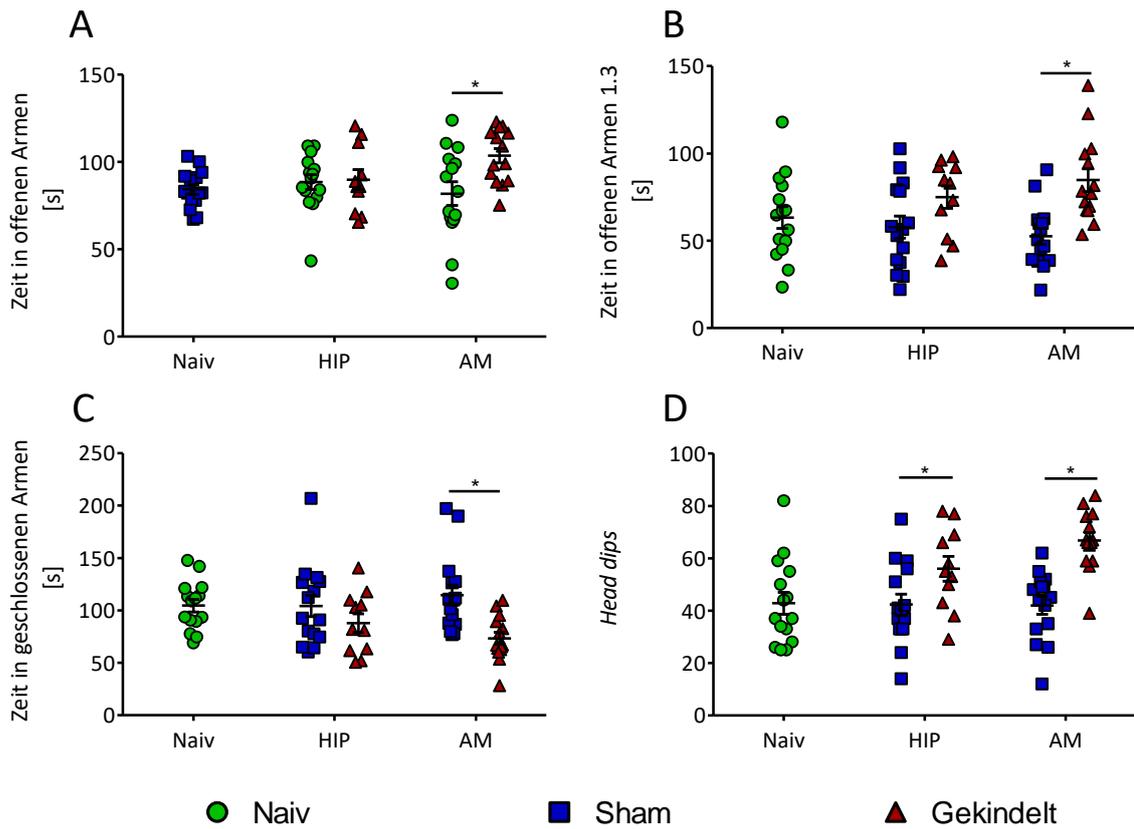


Abb. 27: Elevated-Plus-Maze. (A) In den offenen Armen verbrachte Zeit. Die AM-Kindling-Gruppe verbrachte mehr Zeit in den offenen Armen als ihre Sham-Kontrollgruppe. (B) Im vorderen Drittel der offenen Arme verbrachte Zeit. Die AM-Kindling-Gruppe verbrachte mehr Zeit im vorderen Drittel der offenen Arme als ihre Sham-Kontrollgruppe. (C) In den geschlossenen Armen verbrachte Zeit. Die AM-Kindling-Gruppe verbrachte weniger Zeit in den geschlossenen Armen als ihre Sham-Kontrollgruppe. (D) Anzahl der *Head dips*. Beide Kindling-Gruppen zeigten mehr *Head dips* als ihre jeweiligen Sham-Kontrollgruppen (Naiv n=15 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=15 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

2.2.6. Anhedonie-assoziiertes Verhalten

Der *Saccharin-Präferenz-Test* wurde durchgeführt, um Informationen über das anhedonie-assoziierte Verhalten der Tiere zu erhalten. Die gekindelten Tiere zeigten einen Gesamtunterschied im Vergleich zu den nicht gekindelten Tieren, wobei die gekindelten Tiere weniger Saccharinlösung konsumierten als die Kontrollgruppen. Die AM-Kindling-Gruppe und die HIP-Kindling-Gruppe nahmen weniger Saccharinlösung auf als die naiven Tiere (Abb. 28 $F(1,46)=7,955$, $p=0,0071$; AM Kindling versus naiv $p<0,05$; HIP Kindling versus naiv $p<0,05$).

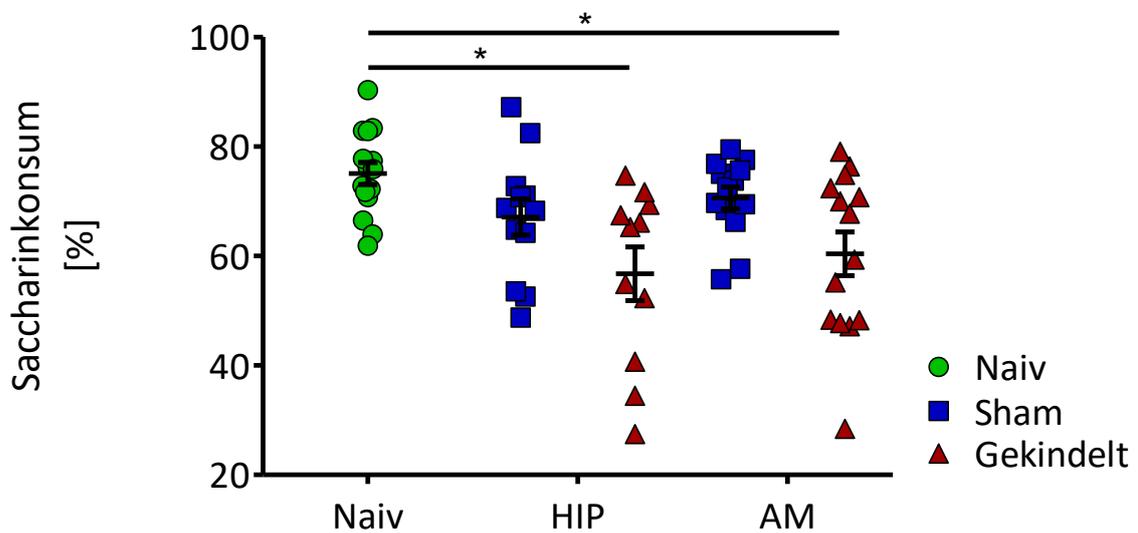


Abb. 28: Saccharinkonsum. Die beiden Kindling-Gruppen nahmen im Vergleich zur naiven Gruppe weniger Saccharinlösung auf (Naiv $n=15$ Tiere, AM Sham $n=13$ Tiere, HIP Sham $n=12$ Tiere, AM gekindelt $n=14$ Tiere, HIP gekindelt $n=11$ Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p<0,05$).

2.3. Corticosteron

Um die fäkalen Corticosteronmetaboliten zu bestimmen, wurden Kotproben zu verschiedenen Zeitpunkten gesammelt. Zeitpunkt 1 lag vor der Elektrodenimplantation, um für jedes Tier einen Basalwert bestimmen zu können. Danach wurde zum Zeitpunkt 2, in der frühen Kindlingphase, als die meisten Tiere noch fokale Anfälle zeigten, Kot gesammelt. Zum Zeitpunkt 3, in der späten Kindlingphase, als alle Tiere generalisierte Anfälle zeigten, wurden erneut Kotproben entnommen. Die Auswertung der Corticosteronmetaboliten zeigte einen Gesamtunterschied zum Zeitpunkt 2 zwischen den gekindelten und nicht gekindelten Tieren (Abb. 29 A; $F(1,50)=6.095$, $p=0,0170$). Im Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte bei den einzelnen Gruppen zeigten sich bei beiden Sham-Gruppen und der naiven Gruppe keine Unterschiede (Abb. 30 A-C). Bei beiden Kindling-Gruppen wurde eine erhöhte Konzentration an fäkalen Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 2 festgestellt (Abb. 30 D; $F(2,13)=7,547$, $p<0,05$; Abb. 21 E; $F(2,10)=6,895$, $p<0,05$). Zum Zeitpunkt 3 waren die Werte nicht mehr erhöht, bei der AM-Kindling-Gruppe sogar im Vergleich zum Zeitpunkt 2 erniedrigt (Abb. 30 D; $F(2,13)=7,547$, $p<0,05$). Außerdem wurden Blutproben am Ende der Studie entnommen, um die Corticosteronwerte des Serums bestimmen zu können. Es konnten jedoch keine Unterschiede der Corticosteronlevel zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abb. 31).

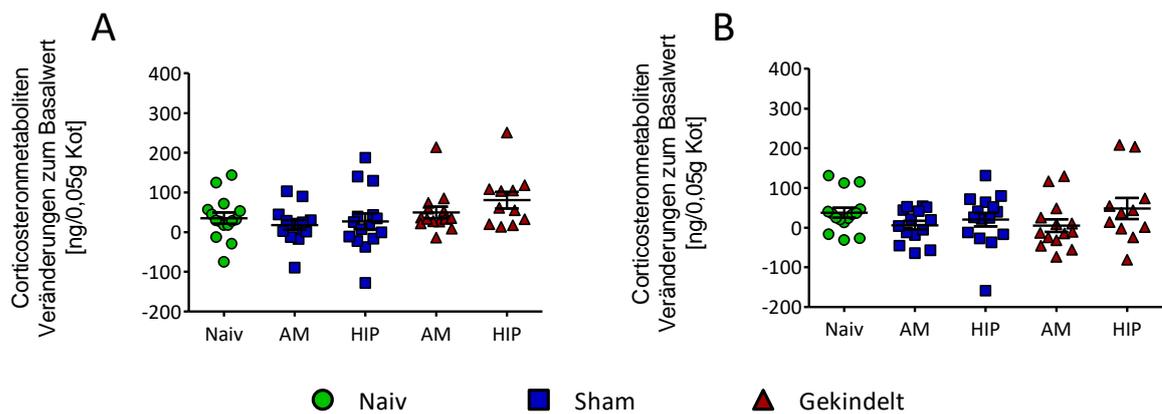


Abb. 29: Veränderungen der fäkalen Corticosteronmetaboliten im Vergleich zum Basalwert. (A) Zeitpunkt 2 (B) Zeitpunkt 3 (Naiv $n=15$ Tiere, AM Sham $n=14$ Tiere, HIP Sham $n=15$ Tiere, AM gekindelt $n=14$ Tiere, HIP gekindelt $n=11$ Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere.

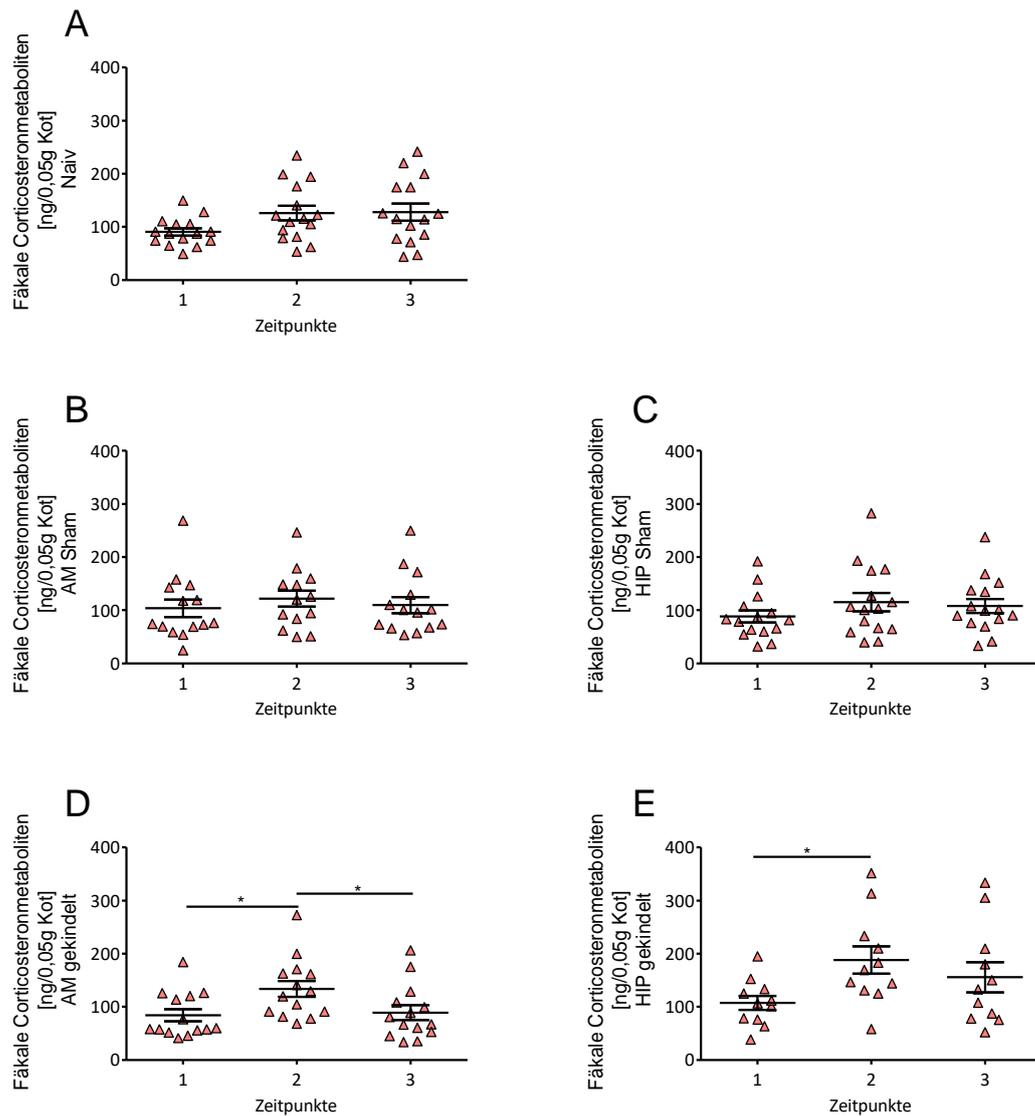


Abb. 30: Vergleich der Konzentration fäkaler Corticosteronmetaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten (Zeitpunkt 1=Basalwert, Zeitpunkt 2=frühe Kindlingphase und Zeitpunkt 3=späte Kindlingphase). Konzentration fäkaler Corticosteronmetaboliten der (A) naiven Gruppe, (B) AM-Sham-Gruppe, (C) HIP-Sham-Gruppe, (D) AM-Kindling-Gruppe, (E) HIP-Kindling-Gruppe. Bei der AM-Kindling-Gruppe erhöhte fäkale Konzentration an Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 2 im Vergleich zum Basalwert. Erniedrigte fäkale Konzentration an Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 3 im Vergleich zum Zeitpunkt 2 (D). Bei der HIP-Kindling-Gruppe erhöhte fäkale Konzentration an Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 2 im Vergleich zum Basalwert (E) (Naiv n=15 Tiere, AM Sham n=14 Tiere, HIP Sham n=15 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

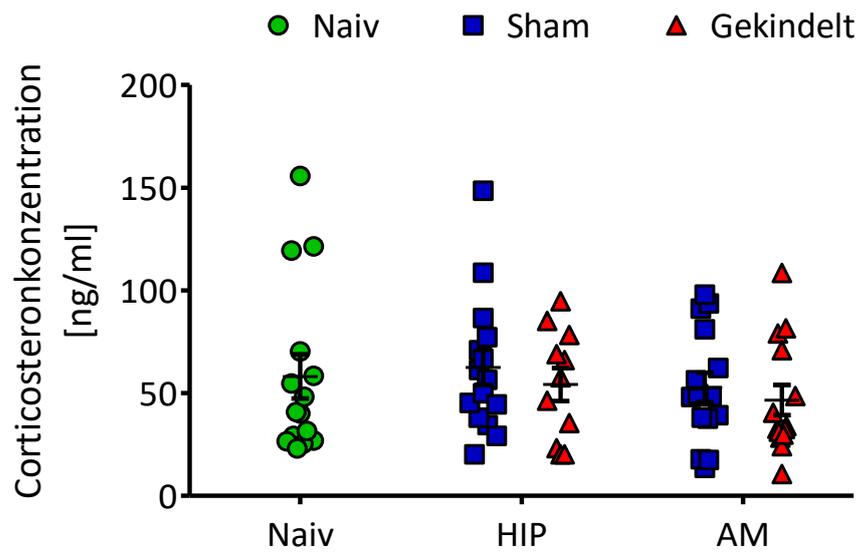


Abb. 31: Corticosteronkonzentration im Serum. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv n=15 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=15 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere.

2.4. Irwin Score, Grimace Scale und Körpergewicht

Mit Hilfe des *Irwin Scores* wurden Parameter des klinischen Allgemeinzustandes und neurologische Parameter bewertet, die auf die Aktivierung des zentralen Nervensystems und des autonomen Nervensystems zurückgeführt werden konnten. Die einzelnen Versuchsgruppen zeigten keine Unterschiede im *Irwin Score* in den Basalwerten (Abb. 32 A). Auch nach der Elektrodenimplantation wurden keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (Abb. 32 B). Ein ansteigender *Irwin Score* wurde bei den Kindling-Gruppen im Laufe des Kindling-Prozesses beobachtet (Abb.10 C; Versuchsgruppe: $p < 0,0001$, Zeiteffekt: $p = 0,0003$). Der *Irwin Score* der AM-Kindling-Gruppe war ab dem 13. Stimulationstag signifikant erhöht. Bei der HIP-Kindling-Gruppe konnte ab dem 20. Stimulationstag ein signifikant erhöhter *Irwin Score* festgestellt werden (Abb. 32 C; AM Kindling versus Kontrollgruppen $p < 0,05$, HIP Kindling versus Kontrollgruppen $p < 0,05$).

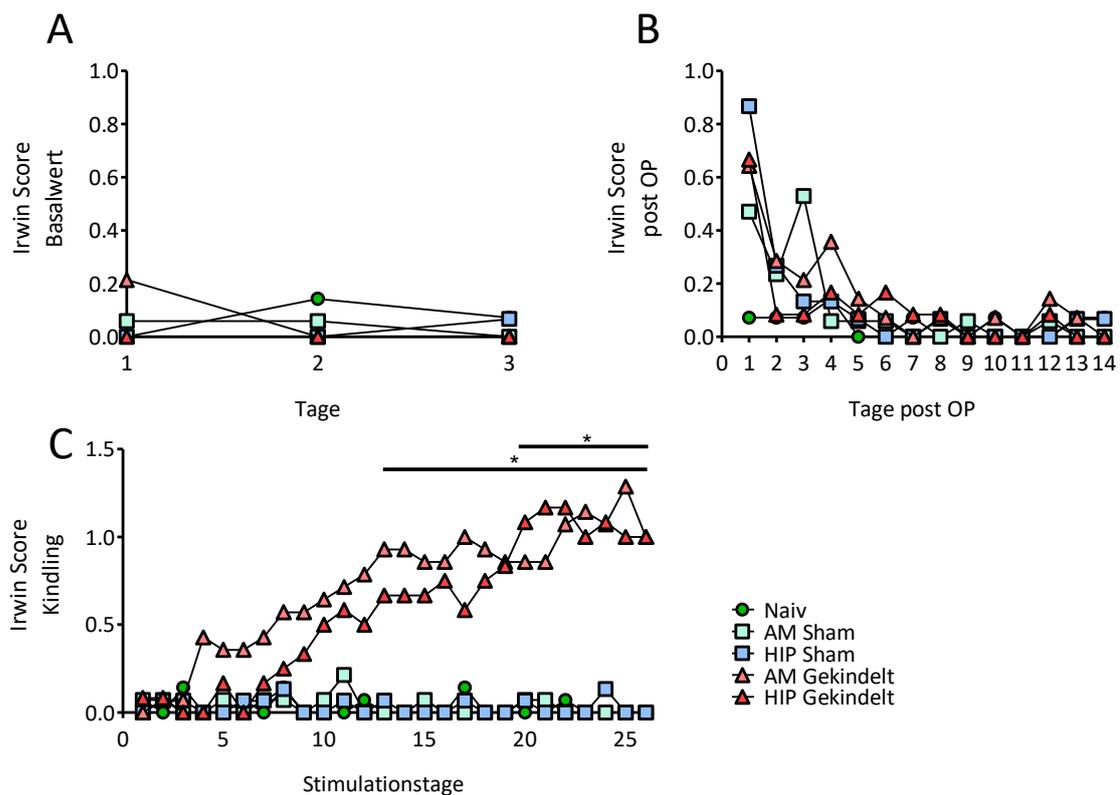


Abb. 32: Irwin Score. (A) Basalwert der verschiedenen Versuchsgruppen über drei Tage hinweg. (B) Irwin Score der verschiedenen Versuchsgruppen über 14 Tage nach der OP. (C) Irwin Score der verschiedenen Versuchsgruppen über die gesamten Stimulationstage hinweg. Die Tiere der AM-Kindling-Gruppe zeigten ab dem 13. Stimulationstag einen erhöhten Irwin Score, die Tiere der HIP-Kindling-Gruppe ab dem 20. Stimulationstag (Naiv $n=15$ Tiere, AM Sham $n=15$ Tiere, HIP Sham $n=15$ Tiere, AM gekindelt $n=14$ Tiere, HIP gekindelt $n=11$ Tiere). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$).

Der *Grimace Scale* wurde während der Tage nach der Elektrodenimplantation beurteilt, um eine Aussage über die schmerzbedingte Mimik der Tiere treffen zu können. Ein gesteigerter *Grimace Scale* war bei den operierten Tieren direkt nach der Operation und an den beiden darauffolgenden Tagen zu sehen (Abb. 33; Versuchsgruppe: $p < 0,0001$, Zeiteffekt: $p < 0,0001$). Die Tiere wurden wöchentlich gewogen und das Gewicht dokumentiert. Es wurden dabei keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen festgestellt (Abb. 34).

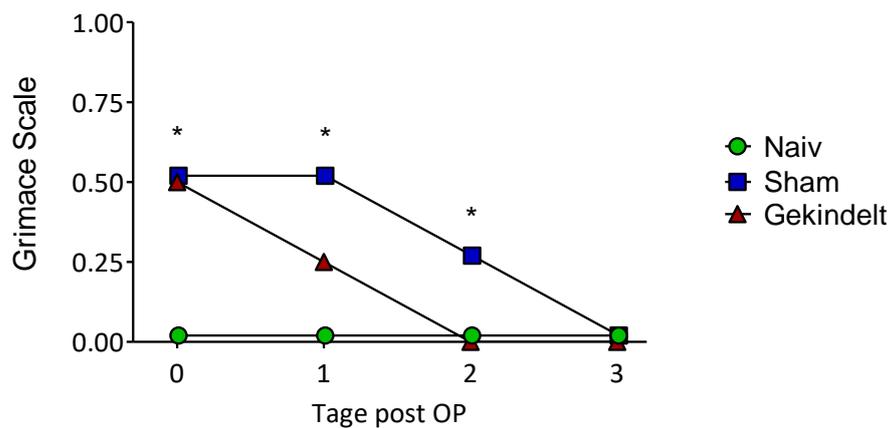


Abb. 33: Grimace Scale nach der Elektrodenimplantation. Nach der Operation (Tag 0) sowie einen und zwei Tage später zeigten die operierten Tiere einen höheren Grimace Scale im Vergleich zu den naiven Tieren (Naiv $n=15$ Tiere, Sham $n=30$ Tiere, Gekindelt $n=26$ Tiere). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt ($p < 0,05$). Die Abbildung zeigt den Median jeder Versuchsgruppe pro Tag.

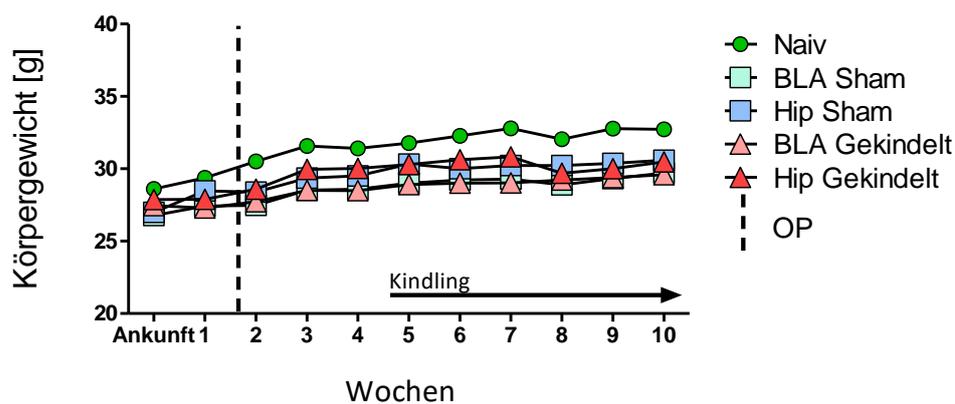


Abb. 34: Entwicklung des Körpergewichts während der gesamten Studie. Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt (Naiv $n=15$ Tiere, AM Sham $n=15$ Tiere, HIP Sham $n=15$ Tiere, AM gekindelt $n=14$ Tiere, HIP gekindelt $n=11$ Tiere). Die Abbildung zeigt den Mittelwert jeder Versuchsgruppe pro Woche.

2.5. Zyklusstand

Anhand des elektrischen Widerstandes der Vaginalschleimhaut wurde ermittelt, ob die Tiere sich im Östrus befanden oder in einer anderen Zyklusphase. Insgesamt befanden sich 10 von 70 Tieren am Ende der Studie im Östrus, pro Gruppe ein bis drei Tiere. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 34).

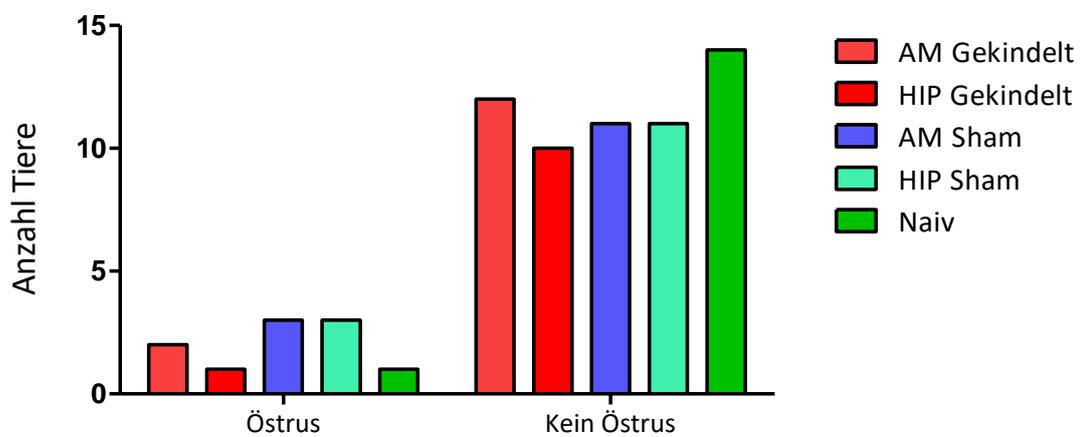


Abb. 34: Anzahl der Tiere jeder Gruppe, die sich im Östrus bzw. nicht im Östrus befanden (Naiv n=15 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=15 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt die absolute Tierzahl.

2.6. 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung

Um den Einfluss der Elektrodenimplantation und des Kindlings auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor zu untersuchen, wurde die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptors in verschiedenen Hirnregionen der Tiere untersucht. Dazu wurde die optische Dichte (*optical density*, OD) des immunhistochemischen Signals gemessen. Die Methode für die Messung wurde, genau wie die Auswahl der verschiedenen Hirnregionen, basierend auf den Ergebnissen vorangegangener Probefärbungen ausgewählt. Diese ausgewählten Hirnregionen liegen im Septum, der Amygdala und den CA1- und CA3-Regionen des dorsalen Hippocampus. Die Auswertung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression ergab einen Gesamtunterschied zwischen den gekindelten und nicht gekindelten Tieren im Septum (Abb. 35 A; $F(1,47)=16,66$, $p=0,0002$) und in der Amygdala (Abb. 35 B; $F(1,47)=3,73$, $p=0,0440$), wobei sich in den entsprechenden Regionen der gekindelten Tiere eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression zeigte. Im Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander wurde in den genannten Regionen eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression der AM-Kindling-Gruppe im Vergleich zur AM-Sham-Gruppe und den naiven Tieren festgestellt (Abb. 35 A; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$, AM Kindling versus naive Tiere: $p<0,05$, Abb. 35 B; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$, AM Kindling versus naive Tiere: $p<0,05$). In der CA1-Region des Hippocampus wurde ebenfalls ein Gesamtunterschied zwischen den gekindelten und nicht gekindelten Tieren beobachtet (Abb. 35; $F(1,47)=5,29$, $p=0,0188$). Außerdem ergab sich ein Gesamtunterschied zwischen den Hippocampus-implantierten Tieren und den Amygdala-implantierten Tieren. Dabei zeigten die Amygdala-implantierten Tiere eine gesteigerte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression (Abb. 35; $F(1,47)=5,77$, $p=0,0203$). Im Vergleich zu ihrer Sham-Gruppe und der naiven Gruppe zeigte die AM-Kindling-Gruppe hier eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression (Abb. 35; AM Kindling versus AM Sham: $p<0,05$, AM Kindling versus naive Tiere: $p<0,05$). Des Weiteren konnte in der CA1-Region zusätzlich ein Effekt der Interaktion zwischen den Gruppen beobachtet werden (Abb. 35; $F(1,47)=4,09$, $p=0,0046$). In der CA3-Region des dorsalen Hippocampus konnten keine Unterschiede in der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression festgestellt werden. Um herauszufinden, ob die wiederholten Anfälle oder die Implantation der Elektrode eine Veränderung des Volumens in den untersuchten Hirnregionen hervorriefen, wurde das Volumen jeder dieser Regionen mit Hilfe der Cavalieri-Methode eingeschätzt. Die Auswertung ergab jedoch keine Volumenänderungen (Abb. 36 A-D).

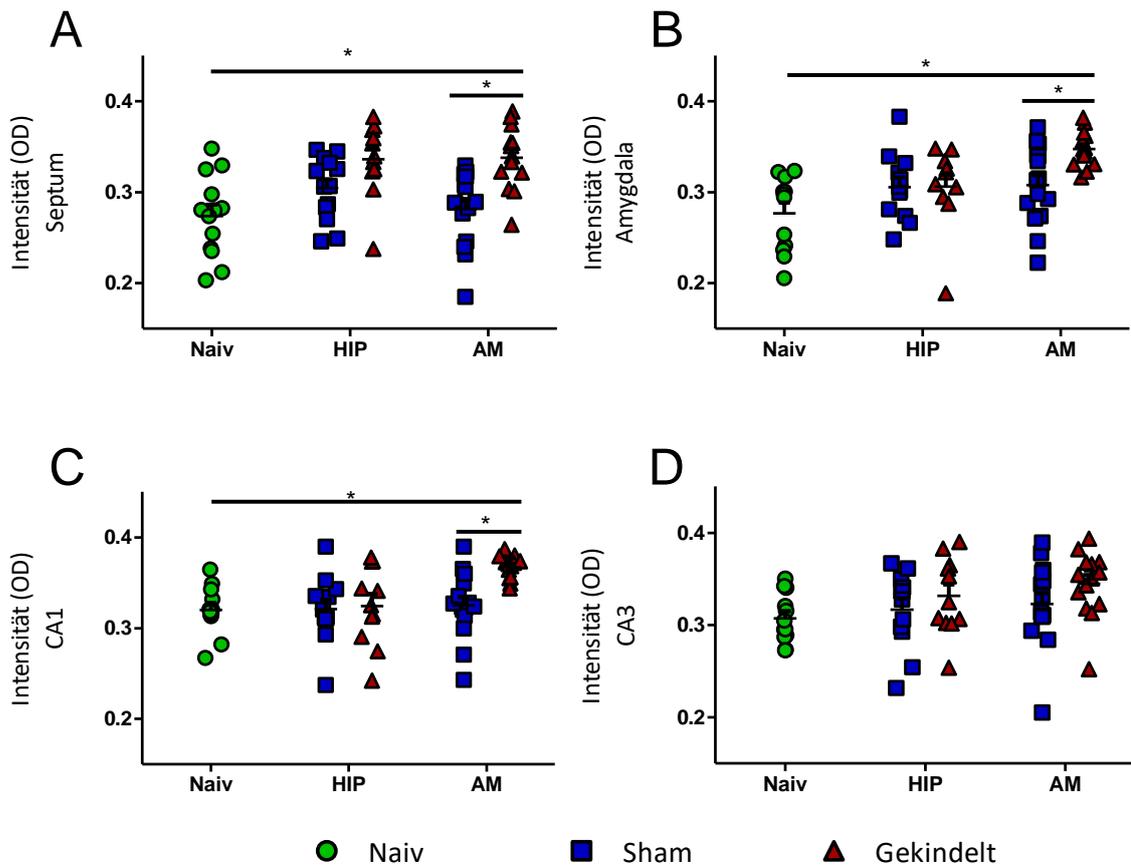


Abb. 35: Optische Dichte des immunhistochemischen Signals der mit 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antikörper angefärbten Strukturen in den verschiedenen Hirnregionen. (A) Optische Dichte im Septum. Bei der AM-Kindling-Gruppe wurde eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression im Vergleich zu ihrer Sham-Gruppe und zu der naiven Gruppe festgestellt (Naiv n=13 Tiere, AM Sham n=14 Tiere, HIP Sham n=13 Tiere, AM gekindelt n=13 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). (B) Optische Dichte in der Amygdala. Bei der AM-Kindling-Gruppe wurde eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression im Vergleich zu ihrer Sham-Gruppe und zu der naiven Gruppe festgestellt (Naiv n=12 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=12 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=10 Tiere). (C) Optische Dichte in der CA1-Region des dorsalen Hippocampus. Bei der AM-Kindling-Gruppe wurde eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression im Vergleich zu ihrer Sham-Gruppe und zu der naiven Gruppe festgestellt (Naiv n=12 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=12 Tiere, AM gekindelt n=13 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). (D) Optische Dichte in der CA3-Region des dorsalen Hippocampus (Naiv n=12 Tiere, AM Sham n=15 Tiere, HIP Sham n=12 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern dargestellt. Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere.

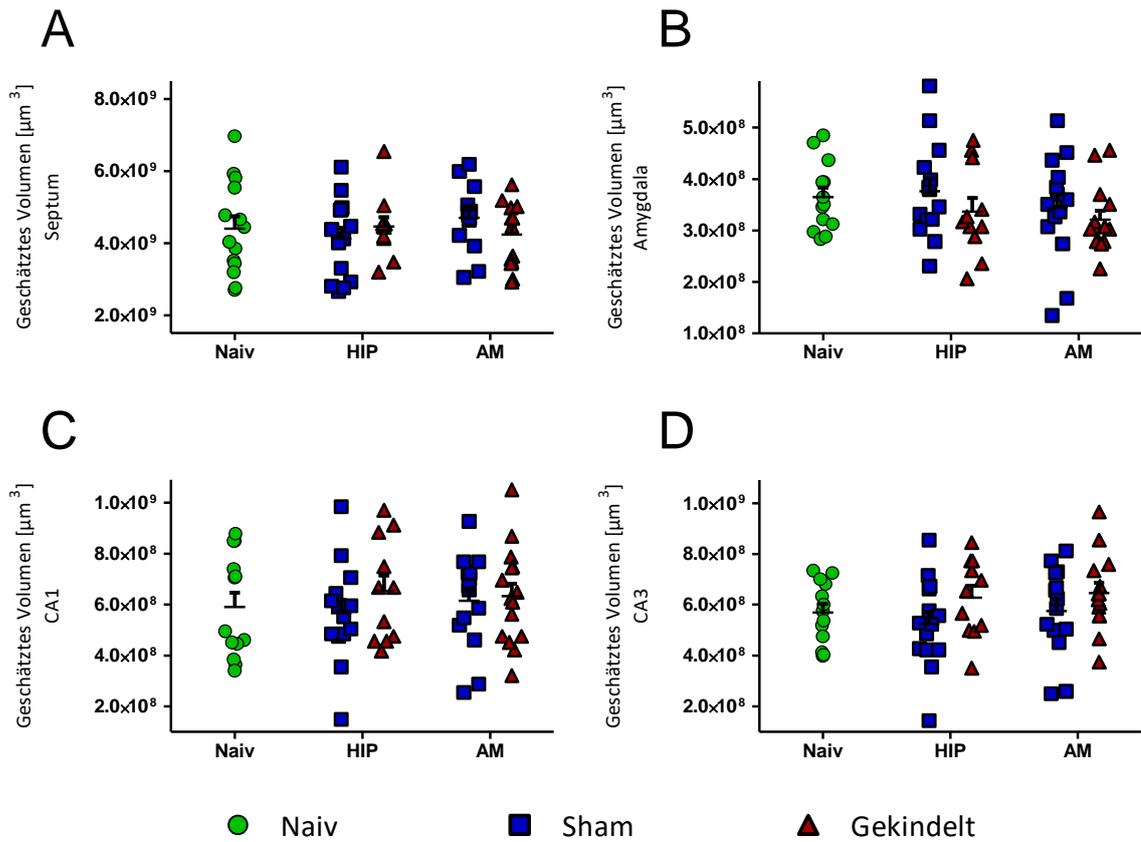


Abb. 36: Geschätztes Volumen der verschiedenen Hirnregionen, bestimmt mit der Cavalieri-Methode. (A) Geschätztes Volumen des Septums. (B) Geschätztes Volumen der Amygdala. (C) Geschätztes Volumen der CA1-Region des Hippocampus. (D) Geschätztes Volumen der CA3-Region des Hippocampus (Naiv n=14 Tiere, AM Sham n=14 Tiere, HIP Sham n=14 Tiere, AM gekindelt n=14 Tiere, HIP gekindelt n=11 Tiere). Die Abbildung zeigt den SEM, den Mittelwert und die Werte der einzelnen Tiere.

3. Korrelationsmatrix und Hauptkomponentenanalyse

3.1. Korrelationsmatrix

Alle Parameter, die während des Projektes beurteilt wurden, konnten in einer Korrelationsmatrix nach Spearman zusammengestellt und zusammenhängend betrachtet werden. Die Korrelationsmatrix gibt die lineare Kausalität zweier Parameter an, die dann durch den Korrelationskoeffizienten wiedergegeben wird. Der Korrelationskoeffizient kann einen positiven linearen Zusammenhang durch einen Wert zwischen 0 und 1 angeben, oder einen negativen linearen Zusammenhang zweier Parameter durch einen Wert zwischen -1 und 0. Wenn der Wert genau bei 0 liegt, ist keine Korrelation im Sinne eines linearen Zusammenhangs gegeben. Die verschiedenen Korrelationskoeffizienten werden in der *Heatmap* durch Farben ausgedrückt, wobei blau eine negative Korrelation und rot eine positive Korrelation angibt. Je intensiver die Farbe ist, desto stärker ist der lineare Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ausgeprägt. Abb. 37 zeigt die Abkürzungen der in der Korrelationsmatrix verwendeten Parameter.

Abb. 37: Abkürzungen der in der Korrelationsmatrix verwendeten Parameter.

Parameter	Einheit	Test	Bedeutung
NB_postOP_1	Score 1-6	Nestbaurverhalten	Nestkomplexität einen Tag nach der Elektrodenimplantation.
NB_earlyphase	Score 1-6	Nestbaurverhalten	Nestkomplexität in der frühen Kindlingphase (1.Stimulationswoche), am fünften Tag nach Erhalt von neuem Nestmaterial.
NB_latephase	Score 1-6	Nestbaurverhalten	Nestkomplexität in der späten Kindlingphase (5.Stimulationswoche), am fünften Tag nach Erhalt von neuem Nestmaterial.

Irwin_earlyphase	Score 1-33	Irwin Score	Irwin Score an einem Tag in der frühen Kindlingphase (1.Stimulationswoche), fünfter Stimulationstag.
Irwin_latephase	Score 1-33	Irwin Score	Irwin Score an einem Tag in der späten Kindlingphase (5.Stimulationswoche), fünfter Stimulationstag.
Weight_gain	g	Gewichtszunahme	Differenz des Gewichts des ersten und letzten Tages der Studie.
BUR_post_op_120	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der zweiten Woche nach der OP, Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten.
BUR_post_op_night	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der zweiten Woche nach der OP, Evaluation der gebuddelten Menge über Nacht.
BUR_early_120	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der frühen Kindlingphase (1.Stimulationswoche), Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten
BUR_early_night	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der frühen Kindlingphase (1.Stimulationswoche), Evaluation der gebuddelten Menge über Nacht.
BUR_late_120	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der

			späten Kindlingphase (5.Stimulationswoche), Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten.
BUR_late_night	g	Wühlverhalten	Wühlverhalten in der späten Kindlingphase (5.Stimulationswoche), Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten.
OF_distance	cm	Open field	Gesamte zurückgelegte Strecke.
OF_rearing	Anzahl	Open field	Häufigkeit des Aufrichteverhaltens (<i>Rearings</i>) im Open Field. <i>Rearing</i> beschreibt eine vertikale Aufrichtung der Tiere um mehr als 45%.
OF_immobility	sek	Open field	Zeit, die die Tiere in Immobilität verbrachten.
OF_wall	sek	Open field	Zeit, die die Tiere in Thigmotaxis im Randbereich der Arena verbrachten.
OF_center	sek	Open field	Zeit, die die Tiere in der Zentrumsregion des Open Field verbrachten.
OF_velocity	cm/sek	Open field	Durchschnittliche Geschwindigkeit der Tiere während des gesamten Open Field Tests.
BWB_WB	sek	Black-white box	Zeit, die die Tiere in der weißen Box verbrachten.

BWB_LT	sek	Black-white box	Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in das schwarze Kompartiment vom weißen Kompartiment aus, in welches das Tier zu Testbeginn gesetzt wurde.
BWB_streching	Anzahl	Black-white box	Anzahl der Streckverhaltenspositionen (<i>Stretching</i>) der Tiere. <i>Stretching</i> wurde definiert als Hinüberstrecken des Tieres aus dem schwarzen ins weiße Kompartiment.
EPM_stretching	Anzahl	Elevated plus maze	Anzahl der Streckverhaltenspositionen (<i>Stretching</i>) der Tiere. <i>Stretching</i> wurde definiert als Hinüberstrecken des Tieres von einem geschlossenen Arm aus in einen offenen Arm.
EPM_headdip	Anzahl	Elevated plus maze	Anzahl der <i>Head dips</i> . <i>Head dip</i> wurde definiert als Herunterschauen des Tieres vom Elevated plus maze.
EPM_closedarms	sek	Elevated plus maze	Zeit, die die Tiere in den geschlossenen Armen verbrachten.
EPM_openarms	sek	Elevated plus maze	Zeit, die die Tiere in den offenen Armen verbrachten.

EPM_open1.3	sek	Elevated plus maze	Zeit, die die Tiere in dem vorderen Drittel der offenen Armen verbrachten.
Social_int_passive	sek	Social Interaction	Passive soziale Interaktion der Tierpaare. Passive soziale Interaktion wurde definiert als nebeneinander sitzen oder liegen.
Social_Int_active	sek	Social Interaction	Aktive soziale Interaktion der Tierpaare. Aktive soziale Interaktion wurde definiert als beschnüffeln, Pflegeverhalten, über-/untereinander krabbeln.
SP_percentage	%	Saccharin Präferenz	Die Saccharin-Präferenz wurde an zwei Tagen im Vergleich zu Wasser getestet. Die absolute aufgenommene Menge an Saccharinlösung wurde berechnet und der aufgenommene Anteil in Prozent dargestellt.
Cort_Feces_early_kindling	ng/g	Corticosteron	Fäkale

			Corticosteronmetaboliten wurden vor der Elektrodenimplantation analysiert, um einen Basalwert für jedes Tier zu erhalten. In der frühen Kindlingphase (1.Stimulationswoche) wurden wieder die fäkalen Corticosteronmetaboliten analysiert und die Differenz zwischen den zwei Zeitpunkten berechnet.
Cort_Feces_late_kindling	ng/g	Corticosteron	Fäkale Corticosteronmetaboliten wurden vor der Elektrodenimplantation analysiert, um einen Basalwert für jedes Tier zu erhalten. In der späten Kindlingphase (5.Stimulationswoche) wurden wieder die fäkalen Corticosteronmetaboliten analysiert und die Differenz zwischen den zwei Zeitpunkten berechnet.
Cort_Serum	ng/ml	Corticosteron	Corticosteron im Blutserum am Ende der Studie.
X5HT1A_sept	OD	Optische Dichte	Intensität des immunhistochemischen Signals der 5-HT _{1A} - Rezeptorfärbung im Septum.
X5HT1A_CA1	OD	Optische Dichte	Intensität des

			immunhistochemischen Signals der 5-HT _{1A} - Rezeptorfärbung in der Pyramidenzellschicht der CA1-Region des Hippocampus.
X5HT1A_CA3	OD	Optische Dichte	Intensität des immunhistochemischen Signals der 5-HT _{1A} - Rezeptorfärbung in der Pyramidenzellschicht der CA3-Region des Hippocampus.
X5HT1A_AM	OD	Optische Dichte	Intensität des immunhistochemischen Signals der 5-HT _{1A} - Rezeptorfärbung in der Amygdala.
Init.ADT	µA	Kindling	Initiale Nachentladungsschwelle (<i>initial after discharge duration</i>) am ersten Stimulationstag.
Init.SD	sek	Kindling	Initiale Anfallsdauer (<i>seizure duration</i>) am ersten Stimulationstag.
Total.SD	sek	Kindling	Totale Anfallsdauer, kumulativer Wert aller Stimulationstage.
Mean.SD	sek	Kindling	Durchschnittliche Anfallsdauer der Anfälle aller Stimulationstage.

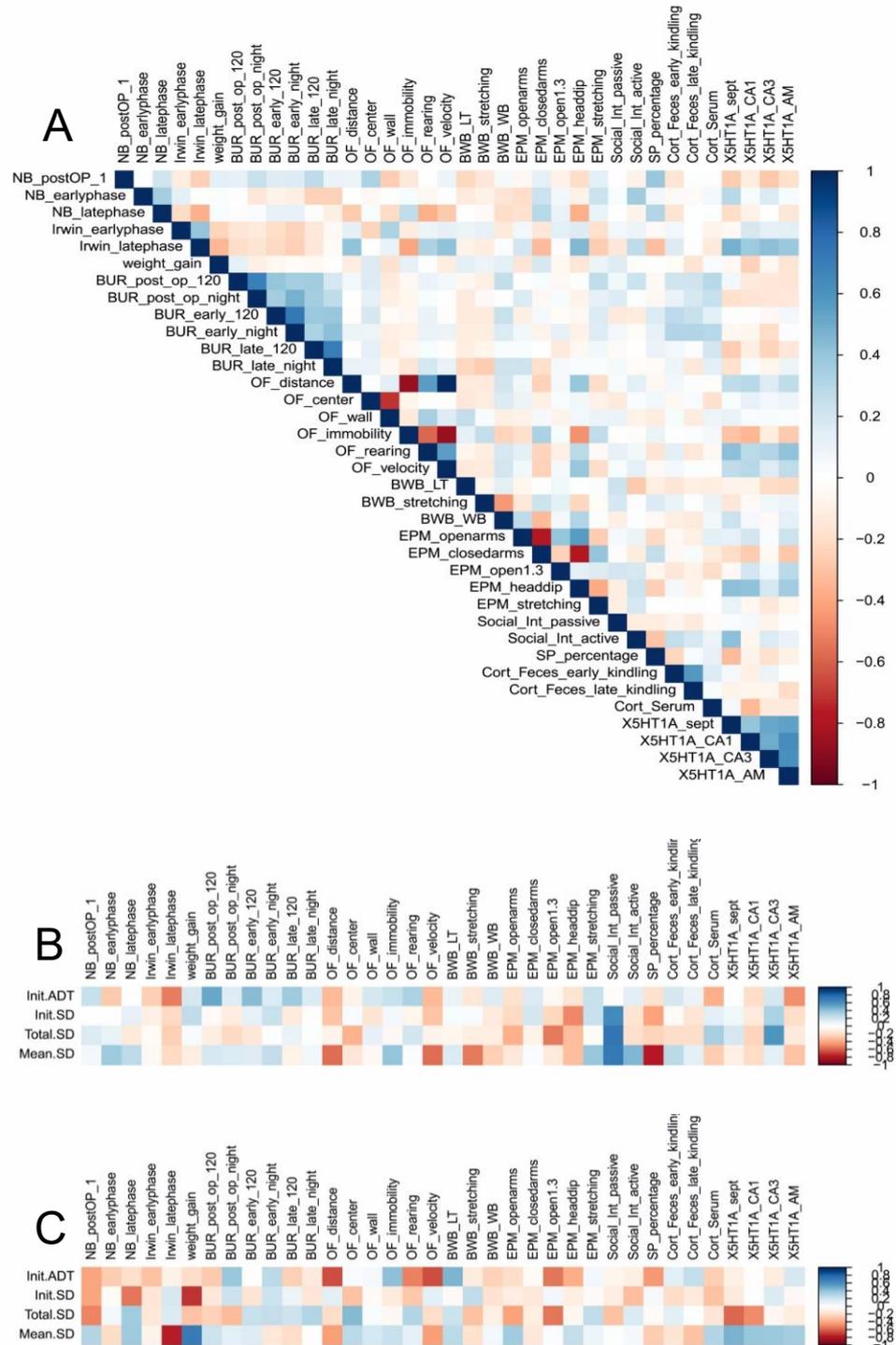


Abb. 38: Korrelationsmatrix aller untersuchten Parameter. Die Heatmap zeigt die Korrelationen nach Spearman. (A) Korrelationsmatrix aller untersuchten Parameter. (B) Korrelationsmatrix der Kindling-Parameter und allen anderen Parametern der AM-Kindling-Gruppe. (C) Korrelationsmatrix der Kindling-Parameter und allen anderen Parametern der HIP-Kindling-Gruppe.

Zwischen Parametern, die in demselben Verhaltenstest betrachtet wurden, zeigte sich häufig eine starke Korrelation. So korrelierte die zurückgelegte Strecke im *Open Field* negativ mit der Zeit im *Open Field*, die in Immobilität verbracht wurde. Die zurückgelegte Strecke im *Open Field* korrelierte auch mit der Geschwindigkeit im *Open Field*, hier als negative Korrelation. Diese Zusammenhänge, die ein und denselben Test betreffen, sind zwar in ihrer Aussage bezüglich der Identifizierung geeigneter Parameter zur Belastungsbeurteilung nicht von großem Interesse. Dennoch bestätigen gerade diese Korrelationen die Validität der Korrelationsmatrix. Im Folgenden werden die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Parametern der unterschiedlichen Tests beschrieben und in Klammern die Werte angegeben. Es wurden dabei Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,4 für positive Korrelationen und von höchstens -0,4 für negative Korrelationen berücksichtigt. Alle berücksichtigten Korrelationen sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Parameter, die positiv miteinander korrelieren:

- **Irwin_latephase** und **OF_distance** (0,42)
- **Irwin_latephase** und **OF_velocity** (0,42)
- **Irwin_latephase** und **EPM_headdips** (0,45)
- **5HT1A_sept** und **Irwin_latephase** (0,48)
- **5HT1A_CA3** und **Irwin_latephase** (0,43)
- **5HT1A_sept** und **OF_rearing** (0,42)
- **5HT1A_AM** und **OF_rearing** (0,42)
- **5HT1A_sept** und **EPM_headdips** (0,43)
- **5HT1A_CA1** und **EPM_headdips** (0,41)
- **5HT1A_sept** und **Social_Int_active** (0,43)

Parameter, die negativ miteinander korrelieren:

- **Irwin_latephase** und **OF_immobility** (-0,4)
- **EPM_headdips** und **OF_immobility** (-0,5)

Anschließend wurden die Parameter betrachtet, die sich auf den Kindling-Prozess beziehen. Es konnten in der AM-Kindling-Gruppe folgende Korrelationen festgestellt werden:

Parameter, die positiv miteinander korrelieren:

- **Initial.ADT** und **BUR_post_op_120** (0,51)
- **Initial.SD** und **Social_Int_passive** (0,64)
- **Total.SD** und **Social_Int_passive** (0,75)
- **Mean.SD** und **Social_Int_passive** (0,72)
- **Total.SD** und **5HT1A_CA3** (0,6)

Parameter, die negativ miteinander korrelieren:

- **Initial.ADT** und **Irwin_latephase** (-0,52)
- **Mean.SD** und **OF_distance** (-0,57)
- **Mean.SD** und **OF_velocity** (-0,57)
- **Mean.SD** und **BWB_stretching** (-0,53)
- **Total_SD** und **EPM_open1.3** (-0,53)
- **Mean.SD** und **SP_percentage** (-0,77)

Es konnten in der HIP-Kindling-Gruppe folgende Korrelationen festgestellt werden:

Parameter, die positiv miteinander korrelieren:

- **Mean.SD** und **Weight_gain** (0,71)

Parameter, die negativ miteinander korrelieren:

- **Initial.SD** und **NB_latephase** (-0,54)
- **Mean.SD** und **Irwin_latephase** (-0,76)
- **Initial.SD** und **Weight_gain** (-0,72)
- **Initial.ADT** und **OF_distance** (-0,65)
- **Initial.ADT** und **OF_velocity** (-0,65)
- **Initial.ADT** und **EPM_open1.3** (-0,54)
- **Total_SD** und **EPM_open1.3** (-0,54)
- **Total_SD** und **5HT1A_sept** (-0,59)

3.2. Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse wurde durchgeführt, um die große Menge an Daten zu strukturieren und zu illustrieren. Außerdem konnte so die Varianz des gesamten Datensatzes erklärt und visualisiert werden. So ließen sich mit Hilfe dieser Darstellung geeignete Parameter zur Belastungseinstufung aus der umfassenden Untersuchungsreihe selektieren. In Abb. 39 A ist die Darstellung der Hauptkomponentenanalyse aller fünf Gruppen gezeigt. Durch die beiden Hauptkomponenten (*principal components*, PC) lassen sich 28,1% der Varianz der Daten darstellen. PC1 auf der x-Achse stellt dabei 16,5% dar, PC2 auf der y-Achse 11,6%. Entlang PC1 konnte eine signifikante Separierung zwischen den fünf Gruppen festgestellt werden ($F(4,65)=11,7$, $p < 0,0001$). In dem anschließend durchgeführten Tukey-Post-hoc-Test wurde dabei ein Unterschied zwischen den AM-gekündelten Tieren und den naiven Tieren beobachtet ($p < 0,0001$). Zudem konnte ein Unterschied zwischen den AM-gekündelten Tieren und den AM-Sham Tieren ($p < 0,0001$), ein Unterschied zwischen den HIP-gekündelten Tieren und den naiven Tieren ($p = 0,0372$), sowie ein Unterschied zwischen den HIP-gekündelten Tieren und den HIP-Sham Tieren ($p = 0,0081$) festgestellt werden. Entlang PC2 gab es keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Vier der ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 beitragen, wurden im *Open-Field-Test* betrachtet. Drei weitere wurden in der 5-HT_{1A}-Färbung gemessen, zwei wurden im *Elevated-Plus-Maze-Test* beobachtet und ein Parameter bei der Aufnahme des *Irwin Scores*. In der Darstellung der Abb. 39 B zeigt eine größere Entfernung vom Kreuzungspunkt der beiden Achsen einen entsprechend größeren Einfluss auf die jeweilige Komponente.

In zwei weiteren Hauptkomponentenanalysen wurde der Fokus auf die beiden unterschiedlichen Lokalisationen der implantierten Elektroden gelegt. Bei der Hauptkomponentenanalyse, die für die AM-Kindling-Gruppe und ihre Kontrollgruppen durchgeführt wurde, erklären die beiden Hauptkomponenten 30,7% der Varianz der Daten. PC1 trägt dazu mit 18,2% auf der x-Achse bei, PC2 mit 12,5% auf der y-Achse. Auch hier konnte wieder eine Separierung der Gruppen entlang PC1 gesehen werden ($F(2,41)=30,7$, $p < 0,0001$). Entlang PC2 zeigte sich keine Separierung der Gruppen. Entlang PC1 wurde im Tukey-Post-hoc-Test ein Unterschied zwischen der AM-Kindling-Gruppe und ihrer Sham-Gruppe festgestellt ($p < 0,0001$), ebenso wurde ein Unterschied zwischen der AM-Kindling-Gruppe und der naiven Gruppe gezeigt ($p < 0,0001$). Vier der ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 beitragen, wurden im *Open-Field-Test* aufgenommen, drei weitere im *Elevated-Plus-Maze-Test*, zwei in der 5-HT_{1A}-Färbung und ein Parameter im *Irwin Score* (Abb. 40 B).

Bei der Hauptkomponentenanalyse, die für die HIP-Kindling-Gruppe und ihre Kontrollgruppen durchgeführt wurde, erklären die beiden Hauptkomponenten 29,3% der Varianz der Daten, wobei PC1 mit 16,5% dazu beiträgt und PC2 mit 12,8%. Eine Differenzierung der Gruppen konnte diesmal sowohl entlang PC1 ($F(2,38)=6,8$, $p=0,0029$) als auch entlang PC2 ($F(2,38)=3,2$, $p=0,0499$) festgestellt werden. Der Vergleich der Gruppen untereinander mit Hilfe des Tukey-Post-hoc-Tests ergab einen Unterschied zwischen der HIP-Kindling-Gruppe und ihrer Sham-Gruppe entlang PC1 ($p=0,0026$) und einen Unterschied zwischen der HIP-Kindling-Gruppe und der naiven Gruppe entlang PC2 ($p=0,0390$). Vier der ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 beitragen, wurden im *Open-Field-Test* beobachtet, drei in der 5-HT_{1A}-Färbung, einer bei der Auswertung der fäkalen Corticosteronmetaboliten, einer im *Elevated-Plus-Maze-Test* und einer im *Irwin Score*. Für PC2 ergaben sich als erste zehn erklärende Parameter sechsmal Parameter, die im *Burrowing-Test* aufgenommen wurden, zwei aus dem *Elevated-Plus-Maze-Test*, einer aus dem *Open-Field-Test* und einer aus dem *Saccharin-Präferenz-Test*.

Die ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 für die Hauptkomponentenanalyse aller fünf Versuchsgruppen beitrugen, waren:

1. **EPM_headdip**
2. **OF_immobility**
3. **5HT1A_CA1**
4. **OF_velocity**
5. **OF_distance**
6. **5HT1A_sept**
7. **EPM_closedarms**
8. **Irwin_latephase**
9. **OF_rearing**
10. **5HT1A_BLA**

Die ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 für die Hauptkomponentenanalyse der AM-Kindling-Gruppe und ihrer Kontrollgruppen beitragen, waren:

1. **EPM_headdip**
2. **5HT1A_CA1**
3. **EPM_closedarms**
4. **OF_immobility**
5. **5HT1A_sept**
6. **EPM_openarms**
7. **OF_rearing**
8. **Irwin_latephase**
9. **OF_velocity**
10. **OF_distance**

Die ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC1 für die Hauptkomponentenanalyse der HIP-Kindling-Gruppe und ihrer Kontrollgruppen beitragen, waren:

1. **OF_velocity**
2. **OF_distance**
3. **Irwin_latephase**
4. **OF_immobility**
5. **5HT1A_sept**
6. **5HT1A_CA1**
7. **5HT1A_CA3**
8. **Cort_Feces_late_kindling**
9. **OF_rearing**
10. **EPM_headdip**

Die ersten zehn Parameter, die zur Darstellung von PC2 für die Hauptkomponentenanalyse der HIP-Kindling-Gruppe und ihrer Kontrollgruppen beitrugen, waren:

1. **BUR_late_120**
2. **BUR_late_night**
3. **BUR_early_night**
4. **BUR_post_op_night**
5. **BUR_early_120**
6. **BUR_post_op_120**
7. **EPM_openarms**
8. **SP_percentage**
9. **OF_wall**
10. **EPM_closedarms**

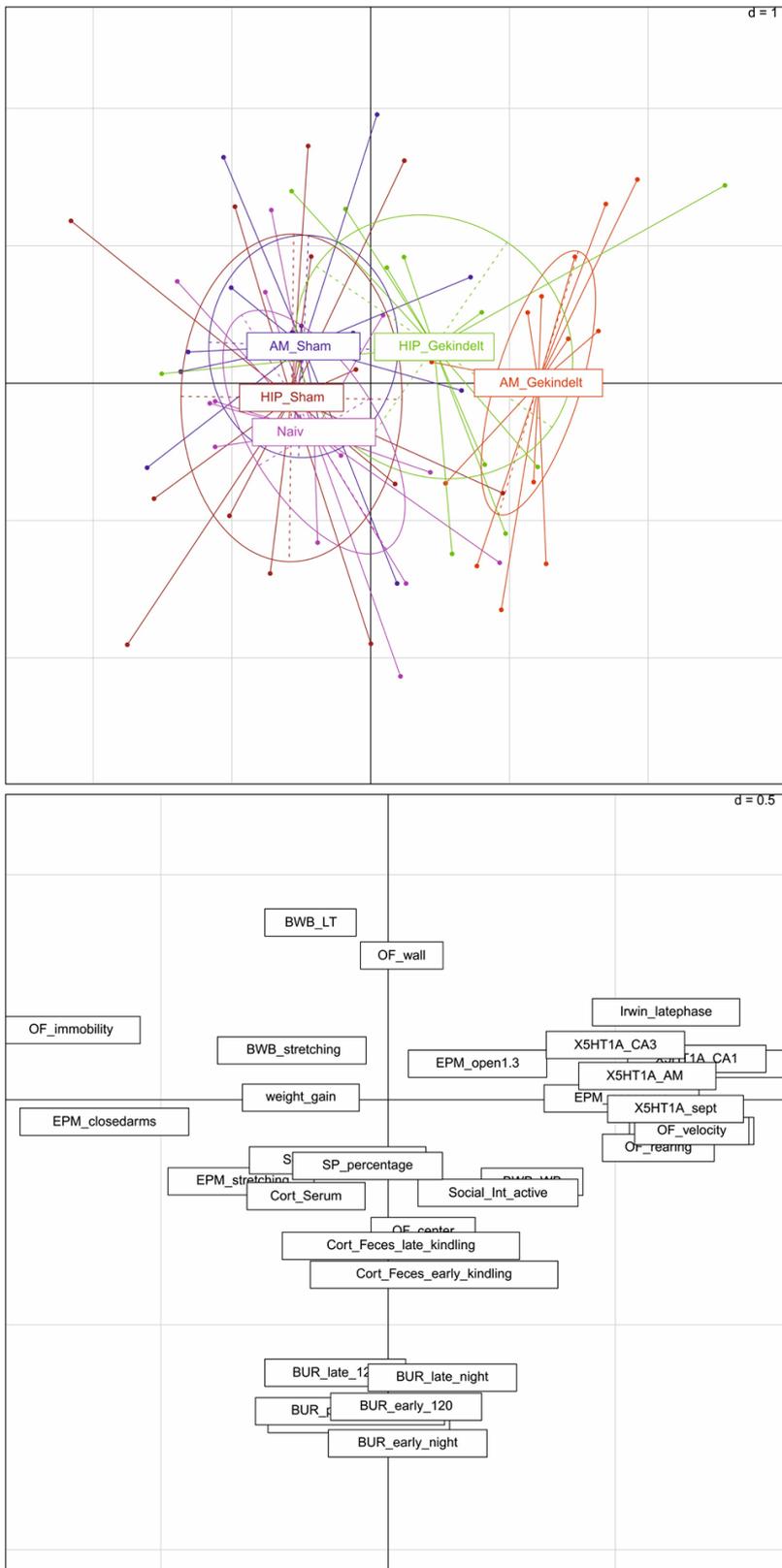


Abb. 39: Hauptkomponentenanalyse (PCA). (A) Separierung der fünf Versuchsgruppen. Die Kindling-Gruppen unterscheiden sich signifikant von den jeweiligen Sham-Gruppen und der naiven Gruppe. Jeder Punkt stellt den individuellen Datensatz eines einzelnen Tiers dar. (B) Die Gewichtung der einzelnen Parameter in der PCA. Eine größere Entfernung vom Kreuzungspunkt der beiden Achsen zeigt einen entsprechend größeren Einfluss auf die jeweilige Komponente.

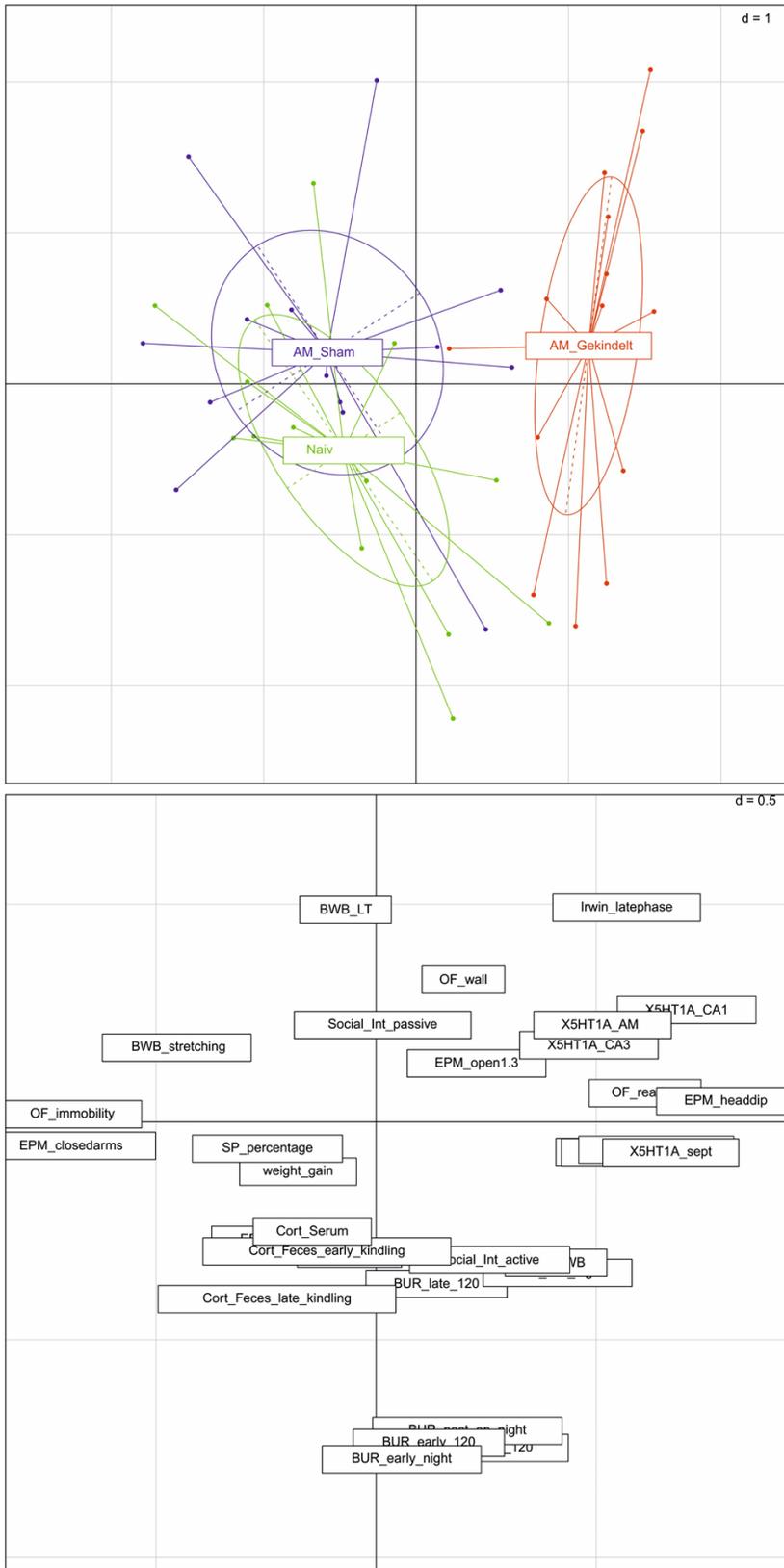


Abb. 40: Hauptkomponentenanalyse (PCA). (A) Separierung der AM-implantierten Versuchsgruppen und der naiven Gruppe. Die AM-Kindling-Gruppe unterscheidet sich signifikant von ihrer Sham-Gruppe und der naiven Gruppe. Jeder Punkt stellt den individuellen Datensatz eines einzelnen Tiers dar. (B) Die Gewichtung der einzelnen Parameter in der PCA. Eine größere Entfernung vom Kreuzungspunkt der beiden Achsen zeigt einen entsprechend größeren Einfluss auf die jeweilige Komponente.

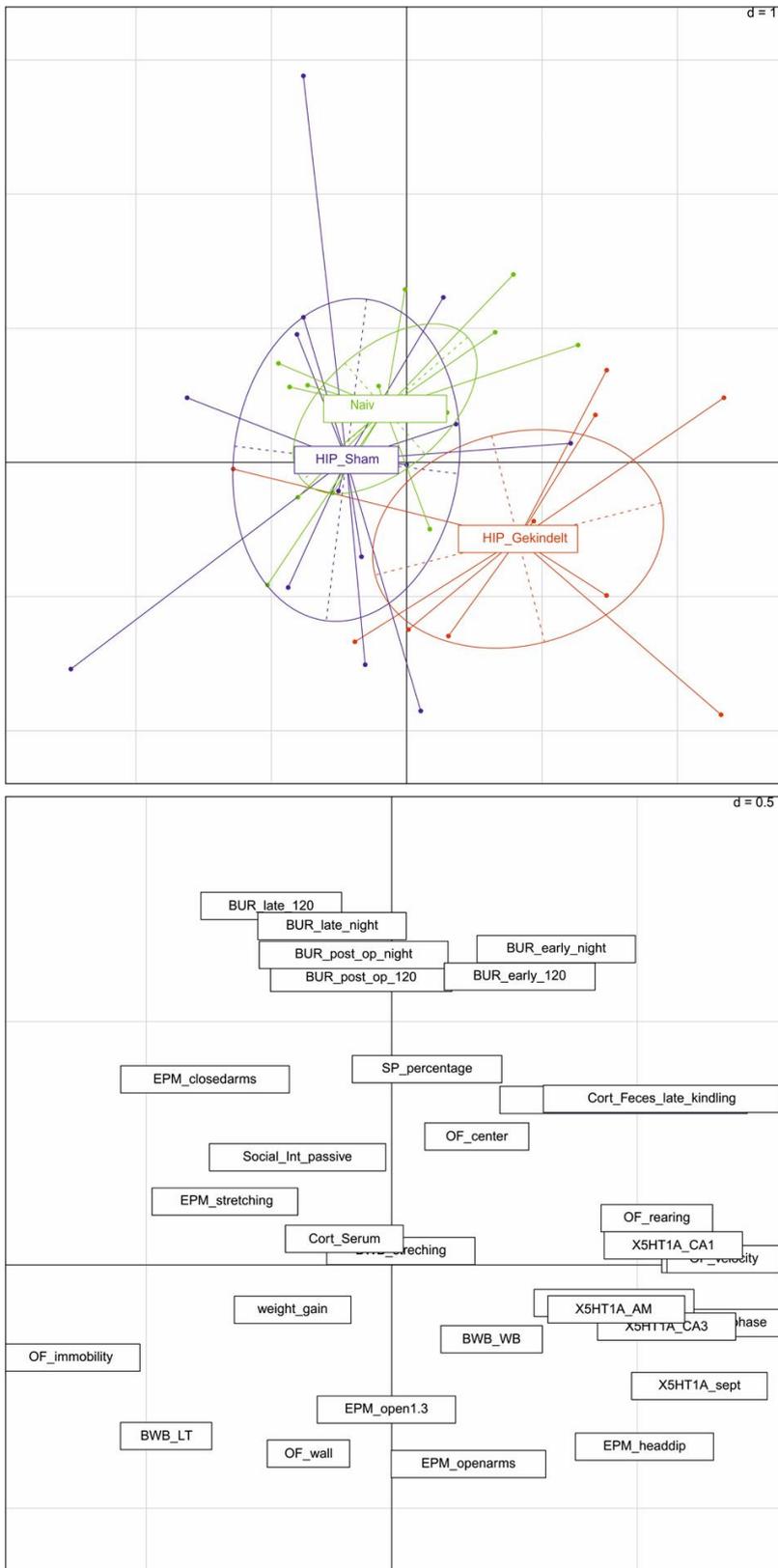


Abb. 41: Hauptkomponentenanalyse (PCA). (A) Separierung der HIP-implantierten Versuchsgruppen und der naiven Gruppe. Die HIP-Kindling-Gruppe unterscheidet sich signifikant von ihrer Sham-Gruppe und der naiven Gruppe. Jeder Punkt stellt den individuellen Datensatz eines einzelnen Tiers dar. (B) Die Gewichtung der einzelnen Parameter in der PCA. Eine größere Entfernung vom Kreuzungspunkt der beiden Achsen zeigt einen entsprechend größeren Einfluss auf die jeweilige Komponente.

VI. DISKUSSION

1. Nestbauverhalten bei Ratten

Um Belastungen bei Versuchstieren richtig einzuschätzen, ist es von essentieller Bedeutung, mit Hilfe geeigneter Parameter eine Aussage über die Belastung der Tiere im jeweiligen Versuch treffen zu können. Das Nestbauverhalten bei Ratten könnte analog zum Nestbauverhalten bei Mäusen ein geeigneter Parameter sein. Bei Mäusen wurde die Beurteilung der Nestkomplexität bereits vorgeschlagen, um eine etwaige Belastung eines Tieres festzustellen (JIRKOF, 2014). Besonders bei der Beurteilung der Belastung durch Schmerzen hat sich die Betrachtung der Nestkomplexität schon bewährt (JIRKOF et al., 2012; GASKILL et al., 2013; JIRKOF et al., 2013a). Auch die Belastung von sozialem Distress kann sich auf das Nestbauverhalten auswirken (OTABI et al., 2016). Eine reduzierte Nestkomplexität kann bei Mäusen gut festgestellt werden, da naive Mäuse zuverlässig und geschlechtsunabhängig komplexe Nester bauen. Bei Ratten dagegen stellt sich die Situation etwas anders dar: das Nestbauverhalten von Ratten wurde häufig nur bei weiblichen Ratten im Kontext maternalen Verhaltens untersucht (MOUSSAOUI et al., 2016; SUN et al., 2018). In der vorliegenden Studie wurde dagegen die Nestkomplexität beider Geschlechter systematisch miteinander verglichen. Bei den weiblichen Ratten vom Züchter Envigo an der LMU wurde eine höhere Nestkomplexität als bei den männlichen Ratten von Envigo an der LMU beobachtet. Im Gegensatz dazu bauten die männlichen Ratten von Charles River an der MHH komplexere Nester als die entsprechenden weiblichen Ratten. Es konnte somit kein konsistenter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren festgestellt werden. Dies wurde in einer anderen Studie bestätigt (HAGEMANN & SCHMIDT, 2018). Somit scheint das Nestbauverhalten nicht mit dem Nestbau der Muttertiere für ihren Nachwuchs assoziiert zu sein, sondern wird auch von männlichen Tieren und nicht graviden weiblichen Tieren gezeigt. Unterschiede im Nestbauverhalten zwischen den Geschlechtern sollten bei Studienplanung und Dateninterpretation deshalb immer erwartet und berücksichtigt werden. Dabei muss hier zwischen der Tätigkeit des Nestbauverhaltens und dem konkreten Bau eines komplexen Nests unterschieden werden. Denn die männlichen wie auch weiblichen Tiere zeigten zwar ein Nestbauverhalten, also mindestens eine Manipulation und Ortsveränderung des Nestmaterials bis zur Bildung eines Nestbereichs. Allerdings zeigten die Ratten fast aller Versuchsgruppen keinen komplexen Nestbau. Mehr noch, sie bauten nach der Definition des entwickelten Score-Systems noch nicht einmal Nester. Erst ab dem Score 3 wird von einem Nest gesprochen, Score 2 dagegen beschreibt nur einen „Nestbereich“. Allein die Gruppe der weiblichen Ratten von Envigo an der LMU erreichte den Score 3, also ein Nest per definitionem. Somit

scheint die Motivation, überhaupt komplexe Nester zu bauen, bei dem Großteil der Tiere des hier untersuchten Stammes nicht besonders ausgeprägt zu sein. Bei weiblichen Ratten des Züchters Envigo dagegen wurde das Nestbauverhalten schon erfolgreich beurteilt, um eine Belastung in verschiedenen Epilepsiemodellen einzuschätzen (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Die dort eingesetzten Ratten stellten in der aktuellen Studie die einzige Gruppe dar, die überhaupt Nester bauten. Nur wenn solche Nester einer gewissen Komplexität errichtet werden, kann später der negative Einfluss von Stressoren auf das Nestbauverhalten erkannt werden.

VAN LOO UND BAUMANS (2004) stellten die Hypothese auf, dass das Nestbauverhalten bei Ratten nicht genetisch veranlagt sei, sondern erst erlernt werden müsse. Demnach würden Tiere, die bereits Erfahrungen mit dem entsprechenden Nestmaterial gesammelt hätten, komplexere Nester bauen als Tiere, denen ein angebotenes Nestmaterial bis dahin unbekannt ist. Diese Theorie wurde in der vorliegenden Studie insofern widerlegt, dass die männlichen Tiere von Envigo an der LMU, denen das dort angebotene Material auch vom Züchter schon bekannt war, keine besseren Nester errichteten als die Tiere von Charles River. Des Weiteren wurde an der MHH der Einfluss der Erfahrung mit einem Nestmaterial bei Tieren mit dem gleichen genetischen Hintergrund untersucht. Dazu wurden die Tiere von Charles River mit der selbst aufgezogenen F1-Generation mit Elterntieren von Charles River untersucht. Die an der MHH aufgezogenen Tiere erhielten von klein auf das Nestmaterial Enviro Dri®, die Tiere von Charles River kannten dieses Nestmaterial bis zum Beginn der Studie nicht. Die männlichen Tiere von Charles River bauten sogar komplexere Nester als die anderen Gruppen, auch komplexere Nester als die Tiere der F1-Generation. Somit scheint das Nestbauverhalten nicht erst erlernt werden zu müssen, sondern eher ein spontanes Verhalten zu sein. Doch auch hier sei noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich hier fast ausschließlich um das Errichten von Nestbereichen bis zum Score 2 handelte. Eine Studie aus dem Jahr 1927 stellt die Hypothese auf, dass das Vorhandensein von Nestbauverhalten davon abhängt, ob Ratten als Jungtiere die Manipulation fester Gegenstände erlernt hätten oder nicht (EIBL-EIBESFELDT, 1955). Die Ratten in der Aufzucht beim Züchter Charles River erhalten statt Nestmaterial konventionellen Zellstoff. Somit kennen sie zwar das in dieser Studie verwendete Nestmaterial Enviro Dri® nicht, hatten aber doch die Möglichkeit, das Bearbeiten eines Materials zu erlernen. Damit wäre zu erklären, warum die Tiere von Charles River keine weniger komplexen Nester errichteten als die F1-Generation mit vorhandener Erfahrung mit dem Nestmaterial Enviro Dri®.

Andererseits errichteten die weiblichen Ratten von Envigo an der LMU komplexere Nester als die Tiere von Charles River, denen das zur Verfügung gestellte Nestmaterial unbekannt war. Die weiblichen Tiere von Envigo erstellten an der LMU schon in den ersten vier Tagen nach der Ankunft Nester des Scores 3 im Median, wohingegen die Vergleichsgruppe, also

die weiblichen Tiere von Charles River an der LMU noch nicht einmal den Score 2 im Median erreichten. Dies geht konform mit der Hypothese von van Loo und Baumans (BAUMANS, 2004). Doch bei den Überlegungen zu der Frage, wie wichtig die Erfahrung mit einem Nestmaterial für das Nestbauverhalten ist, darf die Beachtung weiterer Faktoren nicht vernachlässigt werden. Ein solcher Faktor ist die Umgebungstemperatur, die einen Einfluss auf das Nestbauverhalten haben kann (KINDER, 1927). Während die Raumtemperatur an der LMU und an der MHH gleich war, gab es jedoch Unterschiede in der Luftwechselrate. In den Tierräumen der LMU war die Luftwechselrate höher als an der MHH, was eine Rolle im Temperaturempfinden der Tiere gespielt haben könnte. Weiterhin hat die Handhabung (*Handling*) mit den Tieren einen bedeutenden Einfluss auf emotionales Verhalten von Ratten (PRITCHARD et al., 2013) und könnte einen positiven sowie auch einen negativen Einfluss auf das Nestbauverhalten nehmen. Mit den Ratten an der LMU wurden nur zum wöchentlichen Käfigwechsel hantiert, wohingegen die Ratten an der MHH täglich während des Erstellens der Nestfotos aus den Käfigen genommen wurden. Dies könnte sich auf die Nestbauaktivität ausgewirkt haben. Es wird deutlich, dass viele Faktoren zusätzlich zu jenen, auf die in dieser Studie das Hauptaugenmerk gelegt wurde, einen Einfluss auf die Nestbauaktivität haben können. All diese Einflussfaktoren sollten beachtet werden, wenn das Nestbauverhalten von Ratten untersucht wird. Von besonderer Bedeutung ist dies, wenn das Nestbauverhalten als Parameter zur Belastungsbeurteilung von Ratten eingesetzt werden soll, denn nur wenn zuverlässig komplexe Nester unter Ausgangsbedingungen errichtet werden, können nach möglicherweise belastenden Interventionen aussagekräftige Resultate erzielt werden.

Eine weitere Auffälligkeit, die sich jedoch nicht auf die Tiere bezog, war die große Variabilität zwischen den Beurteilern (*inter-rater-variability*), die bei der Auswertung aller Ergebnisse deutlich wurde. Am größten war die Variabilität zwischen den Beurteilern bei der Bewertung nach dem von van Loo und Baumans (BAUMANS, 2004) vorgeschlagenen Nestscore, da dieser einen sehr großen individuellen Interpretationsspielraum zuließ. Das daraufhin im Rahmen der aktuellen Studie entwickelte modifizierte und detailliertere Score-System führte zu einer Verminderung der Variabilität zwischen den Beurteilern. Allerdings war die Variabilität immer noch recht groß, von den verschiedenen Beurteilern wurden teilweise unterschiedliche signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen erkannt. Qualitative Score-Systeme führen generell immer zu einer gewissen Variabilität zwischen den Beurteilern. Auch in der Humanmedizin werden Score-Systeme in der Notfallmedizin und als diagnostische Hilfestellung angewendet. Der meist genutzte Score für Traumata ist die *Glasgow-Koma-Skala*, die den klinischen Zustand von Menschen mit Schädel-Hirn-Verletzungen beurteilt (LACKNER et al., 2002). Es wurde untersucht, wie korrekt der Score von verschiedenen Personengruppen angewendet wurde. Dabei wurde festgestellt, dass

die Variabilität innerhalb einer Gruppe abnahm und die Korrektheit zunahm, je erfahrener die Gruppe mit der Durchführung des Scores und je höher der medizinische Ausbildungsstand war (LACKNER et al., 2002). Auch in Bezug auf Score-Systeme in der Anwendung bei Tieren sollten möglichst erfahrene Personen als Beurteiler eingesetzt werden. Sie sollten einerseits allgemein im Umgang mit der jeweiligen Spezies erfahren sein, um ein Grundverständnis für diese voraussetzen zu können. Weiterhin sollten sie Erfahrung im Umgang mit dem jeweiligen speziellen Score-System vorweisen können. Diese Erfahrung und Übung wurde in der vorliegenden Studie durch die Absolvierung eines Trainingssets erworben, das jeder Beurteiler vor Beginn der eigentlichen Bewertung der Nestkomplexität erfolgreich abschließen musste. Um der dennoch auftretenden Variabilität zwischen verschiedenen Beurteilern gerecht zu werden, sollte, wie hier geschehen, eine Bewertung stets von mehreren Personen durchgeführt werden. So kann schlussendlich ein Mittelwert aus den Ergebnissen aller Beurteiler gebildet werden, um zu einem aussagekräftigen Endergebnis zu kommen.

2. Kindling-Modell bei Mäusen

Durch die gesetzliche Vorgabe der EU-Richtlinie 2010/63 und ihrer Umsetzung in nationales Recht durch die Tierschutzversuchstierverordnung wird eine Belastungseinstufung von Tiermodellen vorausgesetzt. Weiterhin muss nach der prädiktiven Einschätzung der Belastung die tatsächliche Belastung eines jeden Tieres dokumentiert werden. Somit bildet die Belastungseinstufung die Grundlage für die Einschätzung und Prüfung der ethischen Vertretbarkeit eines Tierversuches. Diese umfassende Belastungseinstufung sollte auf evidenzbasierten Daten beruhen. Um solche Daten generieren zu können, müssen geeignete Parameter identifiziert und selektiert werden, anhand derer die Belastung von Tieren in Tiermodellen eingestuft werden kann. Die Identifikation und Validierung geeigneter Parameter für Belastungsbeurteilungen hat sich die Forschergruppe "Severity Assessment in Animal Based Research" (FOR 2591) zur Aufgabe gemacht. Es werden Parameter in unterschiedlichen Tiermodellen und bei verschiedenen Spezies identifiziert und validiert. Im Rahmen der Forschergruppe wurden in der vorliegenden Studie Parameter im Kindling-Modell bei Mäusen identifiziert, mit Hilfe derer die Belastung der Tiere eingestuft werden kann. Die hier selektierten Parameter können mit Parametern, die in anderen Tiermodellen bei Mäusen als geeignet identifiziert werden, modellübergreifend verglichen werden. Außerdem wird somit eine speziesspezifische Validierung der in Rattenmodellen selektierten Parametern zur Belastungseinstufung möglich.

Epilepsiemodelle wie das Kindling-Modell, sind von enormer Bedeutung. Bei 30% der behandelten Epilepsiepatienten immer noch keine Anfallsfreiheit herbeigeführt werden kann (POTSCHKA & BRODIE, 2012). Vor allem die Modulation der Epileptogenese wäre ein Meilenstein im Kampf gegen die Epilepsie, mit dem man direkt über neuronale Netzwerke in die Entstehung der Epilepsie eingreifen könnte (PITKANEN et al., 2015). Denn bis jetzt ist es nur möglich, einen Schritt weiter anzusetzen, also die Anfallsfrequenz, -dauer und -stärke zu reduzieren. Deshalb ist die Forschung mit Hilfe solcher Epilepsiemodelle unerlässlich, um einen Fortschritt in diesem Bereich erzielen zu können. Das Kindling-Modell gilt als valides Modell zur Untersuchung der Epileptogenese-Mechanismen, das molekulare und zelluläre Veränderungen zuverlässig reproduziert (KANDRATAVICIUS et al., 2014). Weiterhin ist das Kindling-Modell geeignet, Zusammenhänge einer Arzneimittelresistenz bei Temporallappenepilepsie zu ermitteln (LÖSCHER et al., 2013). Es ist bisher noch nicht möglich, antiepileptische Therapeutika vollständig durch *in vitro* Methoden zu entwickeln und zu prüfen. Epilepsiemodelle sind dementsprechend aktuell unersetzlich, was es umso wichtiger macht, die Belastung in den jeweiligen Epilepsiemodellen anhand valider Parameter einfach überprüfen zu können. Nur so kann sichergestellt werden, dass neben zielorientierter Forschung auch tiergerechte

Forschung mit der minimalst möglichen Belastung für das einzelne Tier betrieben wird. Außerdem kann durch die Kenntnis über die prädiktiv erwartete Belastung bei unterschiedlichen Epilepsiemodellen das Modell ausgewählt werden, das im Sinne des 3-R-Prinzips und unter Berücksichtigung der jeweiligen Fragestellung am geeignetsten ist. Die Identifizierung und Validierung geeigneter Parameter zur Einschätzung einer Belastung sowohl auf physischer als auch auf psychischer Ebene der Tiere wurde in der vorliegenden Studie umfassend anhand verhaltensbezogener Parameter und biochemischer Parameter durchgeführt.

2.1. Belastung von Mäusen durch die Elektrodenimplantation in Amygdala oder Hippocampus

Zwei Tiergruppen wurde eine Tiefenstimulationselektrode in eine Zielregion des Gehirns implantiert, einer dieser Sham-Gruppen in die rechte Amygdala, der zweiten Sham-Gruppe in den rechten dorsalen Hippocampus in die CA1-Region. Mit diesen Tieren wurde genauso hantiert wie mit den Kindling-Gruppen, mit Ausnahme der elektrischen Stimulationen. So konnten die Auswirkungen, die allein durch die Elektrodenimplantation und das Hantieren (*Handling*) entstanden, untersucht werden. Weiterhin wurden die beiden Sham-Gruppen miteinander verglichen, um die Auswirkungen der Elektrodenimplantation in unterschiedliche Zielregionen erkennen zu können. In der Humanmedizin werden erfolgreich Elektroden zur tiefen Hirnstimulation (*deep brain stimulation*) implantiert, um damit Menschen mit Parkinson, essentiellen Tremor, Dystonie, Tourette-Syndrom oder auch Epilepsie zu therapieren (AUM & TIERNEY, 2018). Diese Elektrodenimplantationen sind jedoch nicht äquivalent mit den in dieser Studie durchgeführten Implantationen. In Humanpatienten sind die Zielregionen unterschiedlich, abhängig vom jeweiligen Therapieziel (AUM & TIERNEY, 2018). Außerdem sind die in der Humanmedizin verwendeten Elektroden im Verhältnis zur Größe des menschlichen Gehirns um ein Vielfaches kleiner als die in Mäusen verwendeten Tiefenstimulationselektroden. Weitere Faktoren tragen dazu bei, dass die Belastung durch eine Elektrodenimplantation beim Menschen keinesfalls mit der Belastung durch die Elektrodenimplantation bei Mäusen verglichen werden kann.

Um nun die Belastung von Mäusen durch die Elektrodenimplantation beurteilen zu können, wurde zunächst das Heimkäfigverhalten betrachtet. Im Heimkäfig sind die Tiere ungestört und befinden sich in einem ihnen vertrauten Umfeld, dessen Beobachtung wertvolle Informationen liefern kann. Das Nestbauverhalten, ein Wohlfühlverhalten der Tiere, war an

den ersten beiden Tagen nach der Operation reduziert. JIRKOF et al. (2013a) beschreiben, dass das Nestbauverhalten von Mäusen durch Schmerzen beeinträchtigt sein kann. Deshalb könnte das am dritten Tag nach der Operation nicht mehr reduzierte Nestbauverhalten eine Bestätigung für die Wirkung der postoperativen Analgesie sein, die die Tiere 24 Stunden nach der Implantation erneut erhielten. Andererseits ist zu beachten, dass das reduzierte Nestbauverhalten -zumindest am Tag direkt nach der Operation- auch durch die Nachschlafphase nach der Operation zustande gekommen sein kann. In dieser waren die Tiere nicht aktiv und hatten damit auch nicht die Möglichkeit, ein Nestbauverhalten zu zeigen. In der gesamten folgenden Erholungszeit nach der Operation und auch während der Kindlingphase blieb das Nestbauverhalten unverändert. Die in den Zielregionen über längere Zeit platzierte Elektrode hatte demnach keine Auswirkungen auf die Nestkomplexität und damit auf einen Parameter des Wohlfühlverhaltens. Dabei spielte es keine Rolle, in welcher der beiden Zielregionen die Elektrode lokalisiert war. Auch das tägliche intensive Hantieren (*Handling*) mit der Sham-Gruppen wirkte sich nicht negativ auf das Nestbauverhalten aus. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass das Hantieren (*Handling*) mit Stress für Mäuse verbunden sein kann (LEIDINGER et al., 2017). Distress wiederum kann auch zu reduziertem Nestbauverhalten führen (JIRKOF, 2014). Das unveränderte Nestbauverhalten ist somit ein Hinweis darauf, dass die Tiere durch das Hantieren nicht außerordentlich stark gestresst und in ihrem Wohlbefinden beeinträchtigt waren. Als weiterer Parameter des Heimkäfigverhaltens wurde das Wühlverhalten untersucht, welches sich auch als Wohlfühlverhalten einordnen lässt (JIRKOF, 2014). Das Wühlverhalten wurde in der zweiten Woche nach der Elektrodenimplantation untersucht, um die Auswirkungen der Operation auf das Wühlverhalten erkennen zu können. Da zu diesem Zeitpunkt das Kindling noch nicht parallel zu dem Verhaltenstest stattfand, durchliefen die Sham- und Kindling-Gruppen auch noch nicht die damit verbundene Handhabung (*Handling*). Somit konnte eine Aussage allein über den Einfluss der Implantation, aber ohne den Einfluss des Hantierens (*Handlings*), getroffen werden. Das Wühlverhalten war zu diesem Zeitpunkt bei allen implantierten Tieren unverändert. Dies deckt sich mit den Resultaten bei der Beobachtung des Nestbauverhaltens in der Erholungsphase nach der OP und deutet wieder auf ein nicht beeinträchtigtes Wohlbefinden hin. Weiterhin kann ein reduziertes Wühlverhalten auf Schmerzempfinden hinweisen (JIRKOF et al., 2013b). Deshalb deuten die Ergebnisse des *Burrowing-Tests* darauf hin, dass die Tiere sich zu diesem Zeitpunkt in keinem solchen Schmerzzustand befanden. In den beiden *Burrowing-Tests*, die in der frühen und der späten Kindlingphase durchgeführt wurden, zeigten die Tiere beider Sham-Gruppen keine Veränderungen des Wühlverhalten. Dies weist erneut darauf hin, dass das Wohlbefinden der Tiere während des gesamten Versuchs nicht übermäßig beeinträchtigt war und die Elektrodenimplantation keinen langfristigen Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere nahm.

Im *Social-Interaction-Test* wurde untersucht, wie die Tiere miteinander interagierten. Anhand der sozialen Interaktion können Rückschlüsse auf ein depressions-ähnliches Verhalten gezogen werden. Denn Depressionen kommen häufig in Kombination mit sozialem Rückzug und somit verminderter sozialer Interaktion vor (BEERY & KAUFER, 2015). Die beiden Sham-Gruppen zeigten beide keine veränderte soziale Interaktion im Vergleich zu den naiven Kontrolltieren. Auch in den weiteren Untersuchungen zum angst-assoziierten Verhalten der Tiere zeigten die beiden Sham-Gruppen keine Unterschiede zur naiven Kontrollgruppe, genauso wie auch in der Untersuchung zum anhedonie-assoziierten Verhalten keine Veränderungen bei den beiden Sham-Gruppen festgestellt wurden. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Elektrodenimplantation und das Hantieren mit den Tieren nicht zu depressions-ähnlichem Verhalten führen, bei dem beispielsweise die Anhedonie ein Symptom sein kann. Jedoch muss beachtet werden, dass Anhedonie nur ein Aspekt in einer klinischen Erscheinung einer Depression ist und es viele weitere Faktoren gibt, die eine Depression ausmachen (MAHAR et al., 2014). Da die Tiere der Sham-Gruppen täglich in die Hand genommen und fixiert wurden, mit den Tieren der naiven Kontrollgruppe dagegen nur zum wöchentlichen Käfigwechsel und wiegen hantiert wurde, ist es bemerkenswert, dass sich zwischen diesen Kontrollgruppen trotzdem kein Unterschied zeigt. Es lässt sich daraus ableiten, dass die Tiere sich einerseits nicht ans Hantieren (*Handling*) gewöhnen. Andererseits impliziert dies auch, dass intensiveres und längeres Hantieren (*Handling*) nicht mit mehr Stress für das Tier gleichzusetzen ist. Die Quantität des Hantierens (*Handlings*) scheint bei Mäusen somit keinen Einfluss auf angst-assoziiertes Verhalten zu haben. Dass die Qualität des Hantierens (*Handlings*) sehr wohl Auswirkungen auf das angst-assoziierte Verhalten in Tests wie dem *Elevated-Plus-Maze-Test* haben kann, berichtet eine Studie aus dem Jahr 2015 (GHOSAL et al., 2015). Dort wurden verschiedene Methoden zum Hantieren (*Handling*) untersucht, das sogenannte „*Cup-Handling*“, bei dem die Maus auf der schalenförmig gekrümmten Handfläche transportiert wird, und das „*Tail-Handling*“, bei dem die Maus an der Schwanzwurzel gehalten wird. Es stellte sich heraus, dass die Tiere, die mit der schonenden „*Cup-Handling*“- Methode angefasst wurden, weniger angst-assoziiertes Verhalten zeigten als die Tiere, die das „*Tail-Handling*“ erfahren hatten. Ein ähnlicher Ansatz wurde in einer Studie verfolgt, die sich mit Klickertraining befasst hat (LEIDINGER et al., 2017). Auch dort konnte beobachtet werden, dass die Methode des Hantierens (*Handlings*) einen Einfluss auf das mit Stress assoziierte Verhalten, wie Defäkation und Vokalisation während des Hantierens und auf depressions-ähnliches Verhalten im *Morris-Water-Maze-Test* hat. Da die Häufigkeit und Dauer des Hantierens (*Handlings*) einer Maus, wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, keinen Einfluss auf das angst-assoziierte Verhalten oder das Wohlfühlverhalten hat, die Qualität des Hantierens (*Handlings*), also die Wahl der Methode dagegen schon, kann eine Empfehlung diesbezüglich erfolgen: statt Mäuse länger und

häufiger in der Hand zu halten, um sie an die intensive Handhabung durch den Menschen zu gewöhnen, oder kürzer mit ihnen zu hantieren, um ihnen jeden möglichen Stress zu ersparen, sollte besser die Methode des Hantierens (*Handlings*) im Rahmen des 3-R-Prinzips und der Möglichkeiten für das entsprechende Modell genau durchdacht werden.

Die Auswertung biochemischer Parameter unterstützt die Aussagen, die durch die umfassenden Verhaltensuntersuchungen erreicht werden konnten. Die fäkalen Corticosteronmetaboliten der beiden Sham-Gruppen wiesen zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zu den eigenen Basalwerten oder den Werten der naiven Kontrollgruppe auf. Auch die Corticosteronkonzentration im Serum war unverändert. Mit den Corticosteronwerten des Serums lässt sich der akute Stresslevel der Tiere gut bestimmen, was allerdings auch wieder den Nachteil des Einflusses durch das Hantieren (*Handling*) mit sich zieht (TOUMA et al., 2003). Denn die Corticosteronkonzentration im Serum spiegelt die Ausschüttung des Corticosterons der letzten 15 bis 30 Minuten wieder (TOUMA et al., 2003). Da die Serumwerte der Sham-Tiere unverändert waren, wird hiermit die Empfehlung zum Hantieren (*Handling*) unterstützt. Interessant ist in diesem Kontext, dass Ratten anders als Mäuse auf regelmäßiges Hantieren reagieren, es kommt bei Ratten innerhalb kurzer Zeit zur Adaption ans Hantieren und an die Fixation. Im Kindling-Modell bei Ratten konnte beobachtet werden, dass die naive Kontrollgruppe eine höhere Corticosteronkonzentration im Serum aufwies als die elektrodenimplantierte Sham-Gruppe und die Kindling-Gruppe (MÖLLER et al., 2018). Auch in diesem Modell wurden die Tiere der Sham-Gruppe genauso *gehandelt* und fixiert wie die Kindling-Gruppe. Die naive Gruppe war an das Hantieren (*Handling*) dagegen nicht gewöhnt, dementsprechend stellte das Hantieren (*Handling*) vor der Blutentnahme eine Stresssituation dar (MÖLLER et al., 2018). Als biochemische Stressantwort wirkt der Corticotropin freisetzende Faktor (*corticotropin releasing factor*, CRF) aus dem Hypothalamus auf die Hypophyse. Diese erzielt durch die Freisetzung von adrenocorticotrophem Hormon (ACTH) eine Wirkung auf die Nebennierenrinde, die die Ausschüttung von Corticosteron auslöst (ENGELHARDT, 2005). Somit kam es bei den naiven Tieren des Ratten-Kindling-Modells zu den beschriebenen erhöhten Corticosteronkonzentrationen (MÖLLER et al., 2018). Dieser Unterschied zwischen Ratten und Mäusen macht deutlich, dass modellspezifische Belastungseinstufungen auch immer speziesspezifisch durchgeführt werden müssen. Nur so ist es möglich, Stresszustände zu identifizieren und eine geeignete Methodik zum Erkennen derselben zu entwickeln.

Die Konzentration der fäkalen Corticosteronmetaboliten bieten einen Einblick in den Stresszustand über einen längeren Zeitraum und zu verschiedenen Zeitpunkten. Es ist beschrieben, dass durch Hirnläsionen, besonders durch die teilweise Zerstörung der Amygdala, das Feedback-System nicht mehr auf die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) wirkt und Corticosteronlevel dadurch reduziert sein

können (TRIPATHI et al. 2017). Dadurch ist die individuell benötigte Anpassung an mit Stress verbundene Situationen nicht mehr möglich. Dies kann zu verstärktem angst-assoziierten Verhalten führen. Da beide Sham-Gruppen keine Veränderungen im angst-assoziierten Verhalten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass auch der Feedback-Mechanismus nicht beeinträchtigt wurde und die Konzentration der Corticosteronmetaboliten im Kot als auch die Corticosteronwerte im Serum als Abbild der Stresssituation der Tiere interpretiert werden können. Die verschiedenen Score-Systeme wie der *Irwin Score* und auch der *Grimace-Scale* fügen sich in das Bild der schon beschriebenen Verhaltensuntersuchungen und Untersuchungen der biochemischen Parameter mit ein. So spricht der *Grimace-Scale*, der bei den Sham-Tieren an den ersten beiden Tagen nach der Operation über dem Wert der naiven Tiere liegt, für einen gewissen Schmerzzustand nach der Operation. Dieser hat sich am dritten Tag nach der Operation allerdings wieder vollständig gelegt. Der *Irwin Score* zeigte selbst nach der Operation keine signifikant erhöhten Werte im Vergleich zu den naiven Tieren an, was dafür spricht, dass das zentrale sowie das autonome Nervensystem durch die Elektrodenimplantation nicht übermäßig aktiviert wurde.

Die Auswertung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression ergibt keine Unterschiede der beiden Sham-Gruppen im Vergleich zu den naiven Tieren. Somit bestätigt dieses Resultat auf zellulärer Ebene die Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen und der biochemischen Untersuchungen. Serotonin ist im zentralen Nervensystem in emotionale Prozesse und in die Schmerzbewertung involviert (KRIEGEBAUM et al., 2010). Eine Veränderung der optischen Dichte der 5-HT_{1A}-Rezeptoren hätte somit auf Veränderungen des emotionalen Befindens hinweisen können. Solche Abweichungen wurden jedoch in keiner der untersuchten Regionen festgestellt, weshalb sich auch aus diesem molekularen Parameter keine Belastung für die Tiere durch die Elektrodenimplantation ableiten lässt.

Aufgrund der Betrachtung von Nestbauverhalten und Score-Systemen nach der Elektrodenimplantation kann beurteilt werden, dass die Operation eine geringe Belastung für die Tiere darstellt, die sich wenige Tage nach dem Eingriff beschränkt. Alle weiteren Verhaltensuntersuchungen und auch die biochemischen Parameter implizieren keine weitere Belastung für die Tiere. Durch die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wird bestätigt, was die einzelnen Verhaltensuntersuchungen und biochemischen Parameter erkennen lassen. Die naive Gruppe und die Sham-Gruppen unterscheiden sich in keinem der Hauptkomponenten (*principal components*) voneinander. Sie werden aufgrund der Resultate der umfassenden Verhaltensuntersuchungen und der Untersuchungen biochemischer Parameter nicht als unterschiedlich belastet eingestuft. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden unterschiedlichen Lokalisationen der implantierten Elektrode. Diese Einstufung der Belastung, die für Sham- und naive Tiere

übereinstimmend ist, kann nur als Orientierung dienen und muss selbstverständlich immer für jede Studie individuell überprüft werden. Die Belastung der Tiere kann von den unterschiedlichsten Faktoren wie dem angesprochenen Hantieren, der postoperativen Versorgung, Haltungsbedingungen, u.a. abhängen.

2.2. Belastung von Mäusen durch Stimulation von Amygdala oder Hippocampus im Kindling-Modell

Im Kindling-Modell werden die Tiere einmal täglich stimuliert, um Anfälle auszulösen. Da die Tiere keine spontanen Anfälle zeigen, ist es somit möglich, die gesamte Anfallsdauer und -stärke genau zu beobachten, wodurch Parameter der Anfallsaktivität genau erfasst und dokumentiert werden können. Im Laufe des Kindling-Prozesses kommt es zu Veränderungen auf molekularer und zellulärer Ebene (SUTULA, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass Schaltkreise des gesamten Zentralnervensystems beeinflusst und strukturell sowie funktionell umgestaltet werden könnten (SUTULA, 2004). Diese langfristigen Veränderungen könnten verhaltensphysiologische Ausprägungen mit sich bringen, die eine Belastung für die Tiere im entsprechenden Tiermodell darstellen. Die Temporallappenepilepsie, für die das Kindling ein valides Tiermodell ist, geht bei Humanpatienten mit neuropsychiatrischen Komorbiditäten wie Depressionen einher (GANZ et al., 2003). Deshalb ist es essentiell, mögliche Belastungen für Tiere im Kindling-Modell evidenzbasiert auf Grundlage klinischer Parameter wie dem Allgemeinzustand zu bewerten, aber weiterführend auch den emotionalen Zustand der Tiere einzuschätzen. In der vorliegenden Studie wurden die Anfälle durch Stimulation zweier unterschiedlicher Zielregionen ausgelöst. Die HIP-Kindling-Gruppe zeigte schon nach durchschnittlich zwei Stimulationstagen generalisierte Anfälle, brauchte also weniger Zeit zum Erreichen des ersten generalisierten Anfalls als die AM-Kindling-Gruppe, die durchschnittlich neun Tage brauchte. Diese kurze Zeit bis zum Erreichen generalisierter Anfälle bei den Hippocampus-gekindelten Tieren widerspricht den Beobachtungen von GODDARD et al. (1969). In der beschriebenen Studie wurden die verschiedensten Hirnregionen von Ratten stimuliert und auf die Sensitivität gegenüber elektrischen Stimuli überprüft. Der Hippocampus wurde dabei als eher weniger empfindlich beschrieben, die Tiere zeigten erst nach über drei Wochen generalisierte Anfälle. Allerdings wurden die Elektroden dabei innerhalb des Hippocampus in den *Gyrus dentatus* implantiert, und nicht, wie in der vorliegenden Studie in das *Cornu ammonis* (CA1-Region). Dies könnte die Unterschiede in der Sensitivität erklären. Auch speziesspezifische Unterschiede können zu diesen unterschiedlichen Beobachtungen

beigetragen haben. Die Beobachtungen von GODDARD et al. (1969) in Bezug auf die Sensitivität der Amygdala auf elektrische Reize beim Kindling stimmen mit den hier gemachten Beobachtungen überein. Die Ratten brauchten mit durchschnittlich 15 Tagen bis zum Eintreten von generalisierten Anfällen nur etwas länger als die hier verwendeten Mäuse, diese leichte Abweichung kann mit speziesspezifischen Unterschieden erklärt werden. Es konnte bei dem Vergleich des Kindlingverlaufs von Hippocampus- und Amygdala-gekindelten Mäusen festgestellt werden, dass der Anstieg der Anfallsdauer der Amygdala-gekindelten Tiere stärker ausgeprägt war als der der Hippocampus-gekindelten Tiere. Dies zeigte sich sowohl bei Betrachtung der Dauer der motorischen Anfälle als auch in der Länge der Nachentladungsdauer. Dabei muss bedacht werden, dass die Amygdala-gekindelten Tiere an so gut wie jedem Wochentag während der gesamten Kindlingphase stimuliert wurden. Die Hippocampus-gekindelten Tiere dagegen pausierten nach ihrem - wie beschrieben schon sehr früh auftretendem- ersten generalisierten Anfall, bis alle anderen Tiere der Kindling-Gruppen auch generalisierte Anfälle zeigten. Dieses Verfahren war notwendig, damit alle gekindelten Tiere zum Beginn der verschiedenen Verhaltenstests die gleiche Anzahl an generalisierten Anfällen durchlebt hatten. Dies trug dazu bei, dass die Daten der beiden Kindling-Gruppen von den verschiedenen Verhaltenstests direkt verglichen werden konnten. Der potentielle Einfluss des Pausierens auf den Kindlingverlauf konnte jedoch nicht vermieden werden. Somit erfuhren die Hippocampus-gekindelten Tiere eine Unterbrechung des Kindlings, die je nach individuellem Erreichen generalisierter Anfälle mindestens sechs Stimulationstage lang war. Da vor dem Pausieren der Hippocampus-gekindelten Tiere noch kein Unterschied zwischen den Kindling-Gruppen in der Anfallsdauer erkennbar war, könnte diese nach der Unterbrechung auftretende Differenz auf die geringere Anzahl der Stimulationstage zurückzuführen sein. Doch auch die kumulative Nachentladungsdauer bis zum Erreichen des ersten generalisierten Anfalls war bei den Hippocampus-gekindelten Tieren deutlich kürzer als bei den Amygdala-gekindelten Tieren. Die Hippocampus-gekindelten Tiere erreichten zum Teil schon bei der ersten Stimulation einen generalisierten Anfall. Somit scheint die hier gekindelte Zielregion im Hippocampus deutlich sensitiver gegenüber den elektrischen Stimulationen zu sein als die Amygdala.

Um nun die Auswirkungen der wiederholten Anfälle auf Verhaltensparameter und biochemische Parameter zu untersuchen, wurde eine umfassende Reihe an Tests im Laufe der Kindlingphase durchgeführt. Die Nestkomplexität war, wie auch schon bei den beiden Sham-Gruppen beobachtet, an den ersten beiden Tagen nach der Elektrodenimplantation verringert. Dies könnte wie schon beschrieben auf eine geringe Belastung durch die Operation hindeuten. Während der gesamten Kindlingphase dagegen blieb das Nestbauverhalten unverändert. Im Rattenmodell konnte im Gegensatz dazu eine reduzierte

Nestkomplexität im Zusammenhang mit dem Kindling festgestellt werden (MÖLLER et al., 2018). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Nestbauverhalten bei Ratten einer nicht so starken Motivation unterliegt wie der bei Mäusen, und bei möglicherweise eingeschränktem Wohlbefinden bei Ratten deshalb früher eingestellt wird als bei Mäusen. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass der Parameter der Nestbauaktivität bei Ratten als Parameter zur Belastungseinschätzung nicht die gleiche Validität aufweisen könnte wie es bei Mäusen der Fall ist (SCHWABE et al., 2019). In einem Kindling-Modell mit C57BL/6-Wildtyp-Mäusen und Del(Hspa1b-Hspa1a)¹Dix-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund, einem *Hsp70-Knock-Out* Mausstamm, wurde eine reduzierte Nestkomplexität nach wiederholten Stimulationen bei den *Knock-Out*-Tieren festgestellt, nicht jedoch bei den Wildtyp-Mäusen (MÖLLER et al., 2017). Die in der vorliegenden Studie verwendeten Mäuse des NMRI-Stamms waren, wie auch die C57BL/6-Mäuse, keine gentechnisch veränderten Tiere. Es ist somit vorstellbar, dass transgene Mäuse eine gesteigerte Sensitivität gegenüber des Kindlings aufweisen, die sich durch Auswirkungen auf die Nestkomplexität zeigt. Dass die Nestkomplexität einen validen Parameter zur Beurteilung von Schmerzzuständen und Distress bei Mäusen darstellt, wurde bereits belegt (JIRKOF et al., 2013a; JIRKOF, 2014; HÄGER et al., 2015; OTABI et al., 2016, 2017). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die wiederholten Anfälle in der vorliegenden Studie wahrscheinlich keine Schmerz- oder Distresszustände verursachten. Als weiterer Parameter des Wohlfühlverhaltens wurde das Wühlverhalten zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Dieses kann, ähnlich wie das Nestbauverhalten, bei Mäusen als hochmotiviert verankertes Verhalten als Indikatorverhalten für das Wohlbefinden angesehen werden, das bei Schmerzen oder in Stresssituationen teilweise oder vollständig eingestellt wird (JIRKOF et al., 2013b; JIRKOF, 2014). Bei den Hippocampus-gekindelten Tieren zeigte sich sowohl in der frühen Kindlingphase, eine Woche nach Beginn der Stimulationen, als auch in der späten Kindlingphase, nach Erreichen von 13 generalisierten Anfällen, ein reduziertes Wühlverhalten. Eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens ist damit nicht auszuschließen. Die Amygdala-gekindelten Tiere zeigten erst in der späten Kindlingphase eine Veränderung des Wühlverhaltens, allerdings zeigte sich bei ihnen das Wühlverhalten in dieser Phase gesteigert im Vergleich zu ihren Basalwerten. Es scheint demnach bei den Amygdala-gekindelten Tieren in der späten Kindlingphase ein Drang zu gesteigertem Wühlverhalten vorzuliegen. Um diesen Drang zu erklären, muss zuerst auf die Lokalisation der Elektrode bei dieser Kindling-Gruppe eingegangen werden. Die Amygdala ist an der Entwicklung und Ausprägung von emotionalem Verhalten beteiligt (GALLAGHER & CHIBA, 1996). Bei Stimulation der Amygdala durch elektrische Impulse kommt es bei humanen Epilepsiepatienten unter anderem zu Angstzuständen, Halluzinationen und depressionsartigen Gefühlslagen (GLOOR et al., 1982). Die vollständige Entfernung der Amygdala hat einen dementsprechend gegenteiligen Effekt. Dies untersuchten Klüver und

Bucy, die feststellten, dass die Resektion der Amygdala bei Makaken zum Schwund von Aggressivität und Angst führt (NAHM, 1997). Dieses Merkmal zeigen auch Menschen bei der zuerst „*Temporallappensyndrom*“ (*Temporal lobe syndrom*), später „*Klüver-Bucy-Syndrom*“ genannten Störung, die durch starke Schädigung der Temporallappen mitsamt Amygdala zustande kommt. Dabei kommt es zu verschiedenen weiteren Symptomen, unter anderem *Hypermetamorphose*, was einen verstärkten Erkundungsdrang beschreibt, bei dem Reize mehr Beachtung finden als das normale Maß es annehmen ließe (GOSCINSKI et al., 1997; NAHM, 1997). Der Amygdala-Kindling-Gruppe der vorliegenden Studie wurde eine Stimulationselektrode in die Amygdala implantiert, wodurch diese gleichzeitig läsiert wurde. Zusätzlich könnten stimulationsbedingte Veränderungen auf zellulärer Ebene zum Funktionsverlust der Amygdala geführt haben. Dadurch hervorgerufen könnte eine gesteigerte Neigung zur Erkundung vorgelegen haben, die gemeinsam mit dem Verlust der Furcht vor dem unbekanntem Objekt, der *Burrowing-Röhre*, zu einem vermehrten Wühlverhalten geführt haben könnte. Diese Verhaltensänderungen sind also lokalisationspezifisch und können somit die Belastung im Amygdala-Kindling-Modell bei Mäusen reflektieren.

Auch im *Social-Interaction-Test* konnten Unterschiede im Verhalten der beiden Kindling-Gruppen festgestellt werden. Die Amygdala-gekündelten Tiere zeigten keine Veränderung der sozialen Interaktion im Vergleich mit den Kontrollgruppen. Mit Hilfe des *Social-Interaction-Tests* können Verhaltensmerkmale wie sozialer Rückzug als Hinweis auf depressionsähnliches Verhalten erkannt werden (BEERY & KAUFER, 2015). Bei den Amygdala-gekündelten Tieren konnte ein derartiges Verhalten nicht beobachtet werden, weshalb aufgrund der Ergebnisse dieses Tests kein Anzeichen für depressionsähnliches Verhalten und damit eine mögliche Belastung durch die wiederholten Anfälle vorliegt. Die Hippocampus-gekündelten Tiere dagegen zeigten eine gesteigerte soziale Interaktion im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen. Dies könnte ein Ausdruck des „*social buffering*“ sein, das zur effizienteren Bewältigung von Distress bei sozialen Tieren beobachtet werden kann (KIKUSUI et al., 2006). Der *Social-Interaction-Test* wurde in der frühen Kindlingphase durchgeführt, als die Amygdala-gekündelten Tiere gerade erst ihren ersten generalisierten Anfall gezeigt hatten, während die Hippocampus-implantierten Tiere bereits einige Tage zuvor generalisierte Anfälle erlebt hatten. Deshalb ist es denkbar, dass die Hippocampus-gekündelten Tiere durch die Auswirkungen der generalisierten Anfälle Auswirkungen auf psychischer Ebene durch beginnende neuronale Veränderungen erfahren haben. Auf diese Form des Distress könnte das *social buffering* positiven Einfluss nehmen, weshalb dieses Verhalten möglicherweise instinktiv gezeigt wurde. Da auch das Wühlverhalten in der frühen Kindlingphase bei den Hippocampus-gekündelten Tieren im Vergleich zu ihren Basalwerten reduziert war, sich bei den Amygdala-gekündelten Tieren

dagegen keine Veränderung des Wühlverhaltens in dieser Phase feststellen ließ, lässt sich ein Zusammenhang mit den schon früher erlebten generalisierten Anfällen der Hippocampus-gekündelten Tiere herstellen. Aufgrund der Anzeichen einer Belastung im *Burrowing-Test* und im *Social-Interaction-Test*, die sich allerdings nicht in der Nestkomplexität widerspiegeln, kann somit von einer geringen Belastung der Hippocampus-gekündelten Tiere in der frühen Kindlingphase ausgegangen werden.

Im *Open-Field-Test* zeigte sich eine gesteigerte lokomotorische Aktivität der gekündelten Tiere. In einem Maus-Modell für idiopathische Epilepsie, den EL-Mäusen, ist so eine gesteigerte lokomotorische Aktivität auch bekannt (SUEMARU et al., 2018). Normalerweise zeigen Nager ein besonders aktives und exploratives Verhalten, wenn sie sich das erste Mal in einer unbekanntem Umgebung befinden. Dieses Verhalten legt sich dann schnell, sobald sie an das neue Umfeld habituiert sind. EL-Mäuse sind gentechnisch veränderte Mäuse, die als Modell der idiopathischen Epilepsie genutzt werden. Bei ihnen wurde eine erhöhte explorative Aktivität festgestellt und es zeigte sich, dass sie unfähig sind, sich an eine neue Umgebung zu gewöhnen (DRAGE & HEINRICHS, 2005). Auch gekündelte Ratten zeigten im *Open-Field-Test* 24 Stunden nach dem mindestens fünften generalisierten Anfall eine gesteigerte Aktivität (MURPHY & BURNHAM, 2003). Dieses Verhalten wurde nach einer zweiwöchigen Pause des Kindlings nicht mehr festgestellt. Als anschließend wieder gekündelt wurde, zeigte sich auch das hyperaktive Verhalten erneut (MURPHY & BURNHAM, 2003). Aufgrund dieser Beobachtungen kann von einem direkten Zusammenhang zwischen den Anfällen und der gesteigerten lokomotorischen Aktivität ausgegangen werden. Da die Aktivität in Kindling-Studien sowohl bei Amygdala-gekündelten Tieren gesteigert war (MURPHY & BURNHAM, 2003) als auch bei Hippocampus-gekündelten Tieren (HANNESSON et al., 2001), scheint dieses Merkmal nicht von der stimulierten Region abzuhängen, was sich auch in der vorliegenden Studie bestätigte, da beide Kindling-Gruppen eine gesteigerte lokomotorische Aktivität zeigten. Postiktale Hyperaktivität konnte durch die Gabe eines GABA_A-Rezeptor-Agonisten unterdrückt werden (DRAGE & HEINRICHS, 2005). Auch dies spricht für einen Zusammenhang mit den Anfällen, der wahrscheinlich auf einer Dysbalance zwischen dem inhibierenden Neurotransmitter GABA und dem exzitatorischen Effekt von Glutamat beruht. Die gesteigerte lokomotorische Aktivität der gekündelten Tiere zeigte sich in der vorliegenden Studie auch im *Black-and-White-Box-Test*, der üblicherweise Informationen über das angst-assoziierte Verhalten von Labornagern liefert. Doch hier konnte beobachtet werden, dass die gekündelten Tiere sich permanent von einem Kompartiment ins andere bewegten. Dadurch konnte keine Aussage bezüglich des angst-assoziierten Verhaltens gemacht werden, die Ergebnisse des *Open-Field-Tests* zur lokomotorischen Aktivität wurden jedoch unterstützt. Das *Elevated-Plus-Maze* war wahrscheinlich aufgrund seiner

Form besser geeignet, um Auskünfte zum angst-assoziierten Verhalten zu erlangen. Durch die langen Arme des Apparatus konnten die Tiere eine weitere Strecke innerhalb eines Kompartiments zurücklegen und waren damit trotz vermehrter Aktivität nicht gezwungen, sehr schnell von einem Kompartiment in das andere zu wechseln. So konnte hier festgestellt werden, dass die gekindelten Tiere weniger angst-assoziiertes Verhalten zeigten als die Kontrollgruppen, die AM-Kindling-Gruppe zeigte ein reduziertes angst-assoziiertes Verhalten im Vergleich zu der AM-Sham-Gruppe. Bei diesem reduzierten angst-assoziierten Verhalten der Amygdala-gekündelten Tiere könnte wieder die durch Elektrodenimplantation läsionierte Amygdala eine Rolle spielen. Wie schon erwähnt, führt die Entfernung der Amygdala zum Verlust von angst-assoziiertem Verhalten (NAHM, 1997). Auch in weiteren Studien konnte beobachtet werden, dass bei Läsionierung der Amygdala weniger angst-assoziiertes Verhalten gezeigt wird. Dies ergab beispielsweise eine Studie, in der die Amygdala mit Hilfe von Kobaltchlorid chemisch läsioniert wurde, und in der daraus resultierende Veränderungen im angst-assoziierten Verhalten im *Open-Elevated-Plus-Maze* untersucht wurden (SORREGOTTI et al., 2018). Weiterhin zeigen Tiere mit Läsionen der Amygdala weniger Erstarrungsverhalten (*Freezing*) als Kontrolltiere, wenn sie in ein Umfeld zurückkehren, in dem sie zuvor unangenehme Erfahrungen gemacht haben (VAZDARJANOVA et al., 2001). Somit decken sich die Erkenntnisse dieser Studien mit der vorliegenden Studie insofern, dass die Läsionierung der Amygdala auch hier zu reduziertem angst-assoziierten Verhalten geführt hat. Das angst-assoziierte Verhalten zeigte sich zwar in einem Gesamtunterschied der Kindling-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen vermindert, jedoch zeigen bei der genaueren Betrachtung, also dementsprechend der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen, nur die Amygdala-gekündelten Tiere dieses Ergebnis. Somit ergibt sich daraus jedoch auch, dass die Hippocampus-gekündelten Tiere kein verstärktes angst-assoziiertes Verhalten zeigten, was auf eine mögliche Einschränkung des emotionalen Wohlbefindens hätte hindeuten können. Bei den Amygdala-gekündelten Tieren ließ sich zwar mit der Reduktion des angst-assoziierten Verhaltens eine Änderung desselben feststellen, diese weist jedoch nicht eindeutig auf eine Belastung der Tiere durch eine Beeinträchtigung im emotionalen Bereich hin. In einem Amygdala-Kindling-Modell bei Ratten wurde diesen auch eine Tiefenstimulationselektrode in die rechte Amygdala implantiert (MÖLLER et al., 2018). In dieser Studie wurde die Amygdala durch die Elektrodenimplantation jedoch nur in geringem Ausmaß läsioniert, außerdem wurde die Stimulationselektrode in die basolaterale Amygdala (BLA) implantiert. Die gekündelten Ratten zeigten daraufhin ein gesteigertes angst-assoziiertes Verhalten (MÖLLER et al., 2018). In der vorliegenden Studie dagegen befand sich die Elektrode in der gesamten Amygdala, da es aufgrund der Größe der Elektrode nicht möglich war, allein in den basolateralen Teil der Amygdala zu implantieren.

Diese kindling-assoziierten Verhaltensänderungen machen deutlich, dass die Lokalisation der Elektrode und implantationsbedingte Läsionen der Gehirnstrukturen im Kindling-Modell je nach Ausmaß der Läsion unterschiedliche Folgen haben können. Daraus können sich wiederum Folgen in Bezug auf die Belastung der Tiere ergeben, die bei der Planung einer solchen Studie berücksichtigt werden sollten.

Eine Belastung der Tiere könnte sich auch durch anhedonie-assoziiertes Verhalten zeigen. Anhedonie wird bei Humanpatienten als ein Symptom von Depressionen als häufigste Komorbidität der Temporallappenepilepsie beschrieben (KRÜGER, 2000). Bei Nagern wird anhedonie-assoziiertes Verhalten durch die reduzierte Präferenz einer süßen Lösung gegenüber Leitungswasser identifiziert. Die Validität des Tests wurde in verschiedenen Studien bestätigt (PINEDA et al., 2010; SANKAR & MAZARATI, 2012; KLEIN et al., 2015). In beiden Kindling-Gruppen der vorliegenden Studie wurde ein reduzierter Saccharinkonsum im Vergleich zu den naiven Tieren festgestellt. Der *Saccharin-Präferenz-Test* eignet sich besonders gut, um sensitiv Veränderungen auf emotionaler Ebene von Nagern zu detektieren, da der Test im Heimkäfig durchgeführt wird und dadurch keine zusätzlichen stressbehafteten Transporte in andere Räume oder Hantieren (*Handling*) mit den Tieren nötig ist. Denn jeder zusätzliche Stress für das Tier ist ein potentieller Faktor, der die Ergebnisse eines Tests beeinflussen könnte. In Studien mit Ratten wurde der *Saccharin-Präferenz-Test* schon als geeigneter Parameter zur Belastungsbeurteilung vorgeschlagen (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Im elektrischen (SEIFFERT et al., 2019) und chemischen (KOSKA et al., 2019) Post-Status-Epilepticus (*SE*)-Modell in Ratten wurde ein reduzierter Saccharinkonsum beobachtet. Der *Saccharin-Präferenz-Test* bei Ratten im Kindling-Modell liefert in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse. Im *Rapid*-Kindling-Modell bei Ratten, bei dem 84 Stimulationen kurz nacheinander durchgeführt wurden, wurde ein reduzierter Saccharinkonsum festgestellt (MAZARATI et al., 2007). In einer weiteren Studie zeigten einmal täglich gekindelte Ratten keinen veränderten Saccharinkonsum (MÖLLER et al., 2018). Die einmal täglich gekindelten Mäuse der vorliegenden Studie zeigten einen reduzierten Saccharinkonsum, was eine niedrigere Toleranzgrenze bis zur Ausprägung von anhedonie-assoziiertem Verhalten bei Mäusen impliziert. Somit deutet das auf eine Belastung der gekindelten Tiere hin. Wie sich Anfälle in anderen chronischen Epilepsiemodellen wie beispielsweise Post-Status-Epilepticus-Modellen in Mäusen auf das Präferenzverhalten auswirken, sollte in anschließenden Studien weiterführend untersucht werden.

Um auch anhand biochemischer Parameter eine Aussage zum Stresslevel der Tiere treffen zu können, wurden Corticosteronmetaboliten im Kot und die Corticosteronkonzentration im Serum betrachtet. Die bei den Kindling-Gruppen festgestellten erhöhten Werte der fäkalen Corticosteronmetaboliten in der frühen Kindlingphase könnten ein erhöhtes Stresslevel

repräsentieren und ein Hinweis auf eine Belastung während dieser Phase sein. Diese Interpretation kann allerdings nicht uneingeschränkt gelten, da anfallsbezogene Vorgänge im Körper beachtet werden müssen. Durch die induzierten Anfälle selbst wird die Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (*HPA-Achse*) aktiviert, wodurch die GABAerge Kontrolle über die CRH (*Corticotropin-Releasing-Hormon*)-Neurone verloren geht (O'TOOLE et al., 2014). Daraus ergibt sich eine erhöhte Corticosteronkonzentration, die in direktem Zusammenhang mit den Anfällen steht. Dieses Phänomen wurde bisher in Status-Epilepticus-Tiermodellen und in humanen Epilepsiepatienten beobachtet (O'TOOLE et al., 2014). Im Unterschied zum hier durchgeführten Kindling-Modell kommt es bei Post-Status-Epilepticus-Modellen zu spontanen, wiederkehrenden Anfällen. Die Konzentration der fäkalen Corticosteronmetaboliten war bei den beiden Kindling-Gruppen der vorliegenden Studie in der späten Kindlingphase nicht mehr erhöht, auch die Corticosteronwerte im Serum unterschieden sich in dieser Phase nicht zwischen den Versuchsgruppen. Dies könnte durch den genannten modellspezifischen Unterschied zustande gekommen sein, eventuell wurde die HPA-Achse nur durch die initialen Stimulationen kurzzeitig aktiviert. Die Corticosteronlevel in der späten Kindlingphase offenbaren einen speziesspezifischen Unterschied zwischen Ratten und Mäusen im Kindling-Modell. So wurde im Kindling-Modell bei Ratten eine erhöhte Corticosteronkonzentration im Serum bei den naiven Tieren festgestellt (MÖLLER et al., 2018). Da die naive Gruppe in dieser Studie mit der Handhabung (*Handling*) nicht vertraut war, die Sham- und Kindling-Gruppen dagegen schon, zeigte die naive Gruppe die erhöhte biochemische Stressantwort. In der vorliegenden Studie waren die naiven Mäuse genauso wenig mit der Handhabung (*Handling*) vertraut. Trotzdem zeigten sich keine Unterschiede in der Konzentration der fäkalen Corticosteronmetaboliten und im Serumcorticosteron. Das bestärkt die schon im vorigen Abschnitt beschriebene Beobachtung, dass die Häufigkeit des Hantierens (*Handlings*) sich nicht auf das Stresslevel von Mäusen auswirkt, es kommt zu keiner Gewöhnung an das Hantieren (*Handling*). Der *Irwin Score* als Score-System für die Aktivierung des autonomen und zentralen Nervensystems zeigte im späteren Verlauf des Kindlings erhöhte Werte bei den gekindelten Tieren. Trotz der signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen ist zu beachten, dass es sich hierbei um Scores bis zu durchschnittlichen Summen von 1,5 handelt, die Skala des *Irwin Scores* aber bis zu einem Summenscore von 58 ausgerichtet ist. Mit traditionellen Beurteilungsbögen, die nur auf die Betrachtung des Allgemeinzustandes anhand klinischer Parameter ausgerichtet sind, wurden die eher geringen neurologischen Auffälligkeiten der gekindelten Tiere nicht erfasst.

Weiterhin wurde die Expression von 5-HT_{1A}-Rezeptoren in verschiedenen Gehirnregionen der Tiere untersucht. Der Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) hat

wichtige Funktionen im peripheren wie auch im zentralen Nervensystem. Zentral beeinflusst Serotonin emotionale Prozesse und ist auch in die Schmerzbewertung involviert. Deshalb könnten Informationen über die Expression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren in Verbindung mit Untersuchungen von Verhaltensparametern zur Belastungseinstufung bedeutende Hinweise zu belastungsbedingten Veränderungen auf zellulärer Ebene liefern. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren zeigte, dass eine erhöhte Expression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei den Amygdala-gekündelten Tieren im Septum, in der Amygdala und in der CA1-Region des Hippocampus vorzufinden war. Dieses Ergebnis deckt sich auf den ersten Blick mit Resultaten einer Studie, bei der im μ PET-Scan ein erhöhtes 5-HT_{1A}-Rezeptor-Bindungspotenzial im Septum epileptischer Ratten nachgewiesen wurde (DI LIBERTO et al., 2018). Allerdings konnte in dieser Studie nicht unterschieden werden, ob das 5-HT_{1A}-Rezeptor-Bindungspotenzial erhöht war, weil mehr 5-HT_{1A}-Rezeptoren vorhanden waren, oder weil sich im Extrazellulärraum eine geringere Konzentration an Serotonin befand und deshalb mehr 5-HT_{1A}-Rezeptoren zur Anlagerung des kompetitiv bindenden *Tracers* frei waren. Somit sind die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten ein aussagekräftiger, da hier spezifisch die 5-HT_{1A}-Rezeptoren untersucht wurden. Bei Ratten in einem Post-Status-Epilepticus-Modell wurden reduzierte Serotoninkonzentrationen im Hippocampus festgestellt, die mit depressionsähnlichem Verhalten in Zusammenhang gebracht werden konnten (MAZARATI et al., 2008). Es scheint somit ein Zusammenhang zwischen depressionsähnlichem Verhalten in Tiermodellen der Epilepsie und der Serotoninkonzentration in bestimmten Gehirnregionen vorhanden zu sein. Bei Betrachtung von Studien, die sich auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor fokussieren, gibt es weitere Hinweise, die diesen Zusammenhang unterstützen. So wurde bei 5-HT_{1A}-Knockout-Mäusen ein gesteigertes angst-assoziiertes Verhalten beobachtet (HEISLER et al., 1998). Dagegen werden bei Aktivierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch Agonisten anxiolytische Effekte hervorgerufen (LUCKI et al., 1994; DE VRY, 1995). Bei den in der vorliegenden Studie betrachteten Amygdala-gekündelten Mäusen konnte eine erhöhte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression festgestellt werden. Außerdem konnte bei ihnen im *Elevated-Plus-Maze* ein reduziertes angst-assoziiertes Verhalten festgestellt werden. Bei den Hippocampus-gekündelten Tieren dagegen wurde keine Veränderung der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression beobachtet. Die erwähnte Studie von MAZARATI et al. (2008) beschreibt jedoch depressionsähnliches Verhalten bei epileptischen Tieren und damit einhergehend eine reduzierte Serotoninkonzentration im Hippocampus. Da es sich in jener Studie um ein Pilocarpin-Modell -ein Post-Status-Epilepticus-Modell- handelt, ist die direkte Vergleichbarkeit zum Kindling-Modell nicht gegeben. Außerdem handelt es sich in jener Studie bei der verwendeten Spezies um Ratten, die speziesspezifische Unterschiede zu Mäusen aufweisen können. Deshalb sollte zukünftig ein chemisch induziertes Post-Status-Epilepticus-Modell bei Mäusen durchgeführt werden, um herauszufinden, wie die

Expression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei diesen verändert ist. Die Überexpression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren bei den Amygdala-gekündelten Mäusen gibt jedoch keinen eindeutigen Hinweis auf eine Belastung der Tiere, weshalb die 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression in einem weiteren Epilepsiemodell bei Mäusen untersucht werden sollte. Weiterhin ist es auffällig, dass die gesteigerte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression nicht nur in der implantierten Region, der Amygdala, sondern ebenfalls im Septum und in der CA1-Region des Hippocampus festgestellt wurde. 5-HT_{1A}-Heterorezeptoren sind postsynaptisch in verschiedenen Hirnregionen lokalisiert, darunter Hippocampus, Amygdala und Septum (ALTIERI et al., 2013). Bei Depressionen konnte eine reduzierte 5-HT_{1A}-Rezeptordichte in verschiedenen Hirnregionen festgestellt werden (SARGENT et al., 2000; LUNDBERG et al., 2007). Eine Veränderung konnte in mehreren Hirnregionen nachgewiesen werden, was auf eine neuronale Vernetzung zwischen den genannten Regionen hindeutet. Netzwerke zwischen der basolateralen Amygdala und dem dorsalen Hippocampus sind beispielsweise entscheidend für das kontextuelle emotionale Gedächtnis (GIRARDEAU et al., 2017). Der Hippocampus erhält Afferenzen aus dem olfaktorischen Kortex, dem Neocortex und aus der Amygdala (HÖHNE, 2017). Efferenzen des Hippocampus werden über den Fornix unter anderem an das Septum und die Amygdala abgegeben (HÖHNE, 2017). So wird deutlich, dass die in der vorliegenden Studie betrachteten Hirnregionen Amygdala, Hippocampus und Septum in Verbindung zueinander stehen und jeweils Informationen der anderen Regionen erhalten. Modulationen des serotonergen Systems könnten nicht nur eine Hirnregion betreffen, sondern über neuronale Netzwerke könnten immer verschiedene Areale beeinflusst werden. Somit besteht die Möglichkeit, dass die Läsionierung der Amygdala durch die Elektrodenimplantation und die darauffolgende Stimulation dieser Region zusätzlich zum Verlust von Angstgefühlen auch zur Überexpression von 5-HT_{1A}-Rezeptoren geführt haben könnte.

Um nun Parameter zu selektieren, die für die Einstufung einer Belastung bei Mäusen im Tiermodell geeignet sind, wurden mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) diejenigen Parameter betrachtet, die dabei zur Differenzierung der Gruppen beigetragen haben. Es wurde eine Differenzierung der Kindling-Gruppen von den jeweiligen Sham-Gruppen und der naiven Gruppe festgestellt. Drei der ersten zehn Parameter, anhand derer sich diese Differenzierung ausbildet, sind Parameter, die in der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung beurteilt wurden. Zwei weitere Parameter der ersten zehn wurden im *Elevated-Plus-Maze-Test* beobachtet. Diese Parameter geben somit eine Verhaltensänderung im angst-assoziierten Verhalten wieder, die möglicherweise durch die Läsionierung der Zielregion durch Implantation und Stimulation verursacht sein könnte. Drei weitere der ersten zehn Parameter wurden im *Open-Field-Test* aufgenommen und ergeben sich damit aus der gesteigerten Aktivität der gekündelten Tiere. Bei der separaten

Betrachtung der Gruppen mit den unterschiedlichen Elektrodenlokalisationen spielen bei den Amygdala-implantierten Tieren ebenfalls die 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung, der *Elevated-Plus-Maze-Test* und der *Open-Field-Test* eine große Rolle bei der Abgrenzung der Kindling-Gruppe von der Sham-Gruppe und der naiven Gruppe. Bei den Hippocampus-implantierten Tieren hängt die Differenzierung der Kindling-Gruppe von den beiden Kontrollgruppen mit sechs Parametern vom *Burrowing-Test* ab, außerdem mit einem Parameter aus dem *Saccharin-Präferenz-Test*, mit einem Parameter jeweils vom *Irwin Score* und von den fäkalen Corticosteronmetaboliten. Entlang der zweiten Hauptkomponentenachse sind hier die gleichen Tests wie bei den Amygdala-implantierten Tieren von Bedeutung.

Die Parameter des Wühlverhaltens, die zu einer Differenzierung der Hippocampus-Kindling-Gruppe von den Kontrollgruppen beigetragen haben, konnten mit Hilfe der PCA somit als geeignet für die Beurteilung einer Belastung selektiert werden, ebenso der Parameter des Präferenzverhaltens im *Saccharin-Präferenz-Test*, Parameter des *Open-Field-Tests* und der *Irwin Score*. Die Tiere zeigten erst in der Phase generalisierter Anfälle Zeichen einer Belastung, wie sich an den unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Kindling-Gruppen im Wühlverhalten und in der sozialen Interaktion erkennen ließ. Bei der Durchführung des *Burrowing-Tests* im Kindling-Modell sollte allerdings bei Mäusen beachtet werden, dass durch die Implantation der Elektrode, anders als bei Ratten, die Amygdala läsiert wird und die zusätzliche Stimulation der Amygdala zu gesteigertem Wühlverhalten führen könnte. Auch das reduzierte angst-assoziierte Verhalten der Amygdala-gekindelten Tiere könnte sich aus der Lokalisation der Stimulationselektrode ergeben. Es kommt damit zu Verhaltensänderungen, die auch in zukünftigen Studien lokalisationsspezifisch im dem Amygdala-Kindling-Modell bei Mäusen bei der Studienplanung beachtet werden sollten. Um die bei beiden Kindling-Gruppen auftretende Hyperaktivität zu minimieren, könnte im Sinne eines *Refinements* versucht werden, sie zu reduzieren. Es wurde beschrieben, dass ein größeres Angebot an Beschäftigungsmaterial im Heimkäfig diese Hyperaktivität bei epileptischen Tieren vermindern kann (SUEMARU et al., 2018).

Aufgrund der Anzeichen einer Belastung der gekindelten Tiere durch die wiederholten Anfälle, die sich allerdings nur in einigen Parametern zeigten, wird für das Amygdala-Kindling-Modell und das Hippocampus-Kindling-Modell in Mäusen eine Einstufung als für die Tiere gering belastend empfohlen. Da das Kindling-Modell ein chronisches Epilepsiemodell ist, in dem die Tiere über einen längeren Zeitraum generalisierte Anfälle erleben, wird durch diese andauernde geringe Belastung insgesamt eine Einstufung als mittelgradig belastend vorgeschlagen.

Die in diesem Tiermodell selektierten Parameter sollen als Orientierung und Hilfe zur Einschätzung der Belastung bei Mäusen dienen. Es wurde deutlich, wie ausschlaggebend

die Wahl der Elektrodenlokalisierung in diesem Modell ist, da es zu lokalisationsbezogenen Verhaltensänderungen der Tiere kommen kann. Durch die umfassende Betrachtung verhaltensbezogener und biochemischer Parameter konnte eine erhöhte Sensitivität der Überwachung der Tiere erzielt werden, da die Tiere bei der traditionellen Erfassung klinischer Scores keine Veränderungen zeigten. Die Bedeutung der Identifizierung geeigneter Parameter zur Einschätzung einer Belastung, um darauf aufbauend eine evidenzbasierte Belastungseinstufung durchführen zu können, wird somit umso deutlicher. Bei jeder Studienplanung sollte dennoch immer bedacht werden, dass sich die Belastung von Tieren in einem Projekt aus vielen Aspekten zusammensetzt und eine Belastungseinstufung deshalb nie universell sein kann und individuell projektspezifisch angepasst werden muss.

VII. AUSBLICK UND LIMITATIONEN

1. Nestbauverhalten bei Ratten

Bei der Evaluierung des Nestbauverhaltens bei Ratten wurden verschiedene essentielle Einflussfaktoren wie das Geschlecht, die verschiedenen Standorte und verschiedene Aufzuchtbedingungen herangezogen, um die grundsätzliche Motivation zum Nestbau und Einflussfaktoren auf diese Motivation zu testen. Da es Hinweise darauf gab, dass Umwelt- und Haltungsbedingungen einen Einfluss auf das Nestbauverhalten haben, und sich dagegen keine konsistenten geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigten, sollte in zukünftigen Studien mit diesem Wissen angesetzt werden. Es sollten verschiedene Faktoren der Haltungsbedingungen weiter hinsichtlich ihres Einflusses auf das Nestbauverhalten untersucht werden. In der vorliegenden Studie waren zwar viele Faktoren der Tierhaltung an den beiden Standorten einheitlich gestaltet, allerdings war eine vollständige Harmonisierung aufgrund baulicher standortspezifischer Gegebenheiten und Vorgaben der zuständigen Aufsichtsbehörden nicht möglich. Dies limitiert die Aussagekraft der beobachteten Unterschiede zwischen den Standorten. Gleichzeitig wird so die allgemeine Situation der Vergleichbarkeit von Studien in Bezug auf Umwelt- und Haltungsbedingungen an verschiedenen Forschungsstandorten deutlich. Das bedeutet keinesfalls, dass ein Parameter wie die Nestkomplexität als Indikatorverhalten für das Wohlbefinden von Ratten keine Aussagekraft hätte, denn die Beurteilung der Nestkomplexität zur Einschätzung einer Belastung wurde in verschiedenen Studien schon validiert (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). In diesen Studien wurde eine hohe Nestkomplexität in den Basalwerten erreicht, wodurch Veränderungen im Nestbauverhalten im Verlauf der Studie sensitiv erfasst werden konnten. Die Untersuchungen zur Motivation zum Nestbau bei Ratten und möglichen Einflussfaktoren sollten weiter fortgeführt werden, damit es möglich wird, negative Einflüsse auf das Nestbauverhalten zu minimieren. Darauf aufbauend könnte mit der Beurteilung der Nestkomplexität ein wertvoller Parameter zur Belastungseinschätzung von Ratten erhalten werden.

2. Kindling-Modell bei Mäusen

Durch die vorliegende Studie konnten Parameter zur Belastungseinstufung in Mausmodellen selektiert werden. Im Rahmen der Forschergruppe FOR 2591 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) werden verschiedene Tiermodelle und unterschiedliche Spezies untersucht, um Parameter zur Belastungseinstufung zu identifizieren und zu validieren. Die in dem aktuellen Mausmodell selektierten Parameter sollen zukünftig modellübergreifend wie auch speziesübergreifend mit Parametern verglichen werden, die in anderen Tiermodellen als geeignet identifiziert wurden. In der Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Studie durchgeführt wurde, konnten schon umfassende Daten über Verhaltensparameter und biochemische Parameter in Rattenmodellen erhoben werden (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Perspektivisch soll eine speziespezifische Validierung mit den in der aktuellen Studie generierten Daten erfolgen. Außerdem wird ein weiteres Mausmodell für chronische Epilepsie durchgeführt (Kainat-Modell bei Mäusen), dessen Datensätze modellübergreifend mit denen des hier vorliegenden Kindling-Mausmodells verglichen werden können. Dazu kann ein auf geeigneten Parametern basierendes Scoring-System (*composite measure scheme*, CMS) dienen. Dieses System ermöglicht es, basierend auf den Parametern, die zur größten Varianz im Datensatz führen, die für eine Studie verwendeten Tiere in verschiedene Belastungsgrade einzustufen. Diese Belastungsgrade gehen dabei aus den verschiedenen Clustern, die sich aus dem Datensatz ergeben, hervor. Der höchste Schweregrad orientiert sich stets an den Daten des Tieres, das in der Studie die höchste Belastung erfuhr, aber nicht zwingend an der höchsten Belastung, die laut EU-Richtlinie 2010/63 von einem Tier erfahren werden kann.

Einen weiteren Aspekt stellt die histologische Auswertung dar. Diese kann mit Aussagen über die Expression des 5-HT_{1A}-Rezeptor die der Verhaltensparameter unterstützen und Informationen auf zellulärer Ebene liefern, wenn ein Zusammenhang zu den Verhaltensparametern darstellbar ist. Deshalb werden perspektivisch die Gehirne von Ratten, die schon zur Parameterselektion zur Belastungseinstufung in Epilepsiemodellen verwendet wurden, ebenfalls hinsichtlich der Auswirkungen auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor histologisch untersucht.

Bei Tiermodellen, die bei Mäusen durchgeführt werden, muss beachtet werden, dass die Analyse biochemischer Parameter eventuell aufgrund der limitierten Blutmenge nicht derart allumfassend wie bei Ratten durchgeführt werden kann. In der vorliegenden Studie wurde die Corticosteronkonzentration im Serum bestimmt, da Veränderungen im Corticosteronspiegel als Parameter für den Stresslevel der Tiere von Bedeutung sind.

Trotzdem ist die Information zum Stresslevel der Tiere nur bedingt aussagekräftig, da nicht zwischen EU- und Distress unterschieden werden kann. Es wurde einmalig final am Ende des Projekts Blut entnommen, was die mögliche zu entnehmende Blutmenge natürlich insgesamt einschränkte. Andererseits hätte eine Blutentnahme im Laufe der Studie auch nicht zu einer ausreichenden Blutmenge geführt, um gegebenenfalls zusätzliche Parameter auszuwerten. Stattdessen hätte die zusätzliche Blutentnahme die Tiere in einen Stresszustand versetzt, der so vermieden werden konnte. Eine weitere Limitation dieser Studie offenbarte sich bei der Bewertung des Schmerzgesichts der Tiere nach der Operation, dem *Grimace Scale*. Denn selbstverständlich müssen alle Tests verblindet ausgewertet werden, was bedeutet, dass die Gruppenzugehörigkeit des einzelnen Tieres für den Auswertenden nicht ersichtlich sein darf. Bei dem *Grimace Scale* war dies nicht möglich, da jedes Tier für den Betrachter durch die deutlich sichtbar fixierte Elektrode als offensichtlich operiert identifiziert werden konnte. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse des *Grimace Scale* bedacht werden. Allerdings zeigte sich bei der verblindeten Beurteilung der Nestkomplexität ein mit dem *Grimace Scale* kompatibles Ergebnis, sodass trotzdem von einer gewissen Aussagekraft des *Grimace Scale* ausgegangen werden kann. Einen anderen einschränkenden Faktor dieser Studie stellte das Geschlecht der verwendeten Tiere dar. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Die physiologischen Schwankungen des Hormonspiegels während des weiblichen Zyklus können einen Einfluss auf verschiedene Parameter wie die Aktivität der Tiere haben, außerdem zeigen weibliche Mäuse generell eine geringere Aktivität als männliche Mäuse (AGUIAR et al., 2018). Andererseits kann so von der Robustheit der identifizierten Parameter zur Belastungseinschätzung ausgegangen werden, wenn trotz zyklusbedingter hormoneller Schwankungen signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen erzielt wurden. Um Informationen über den Zyklusstand der Tiere zu gewinnen, wurde am Ende der Studie mit Hilfe eines Ohm-Meters bestimmt, ob die Tiere sich zu diesem Zeitpunkt im Östrus befanden oder nicht. In zukünftigen Studien wäre es sinnvoll, den Zyklusstand in regelmäßigen Abständen zu bestimmen und die Ergebnisse der Verhaltenstests mit einem möglichen zyklusbedingten Einfluss abzugleichen. Die Belastungseinstufung im Kindling-Modell wurde hier bei NMRI-Mäusen durchgeführt, einem häufig verwendeten Auszuchtstamm. Der genetische Hintergrund kann einen Einfluss auf die Sensitivität für das Entwickeln von Anfällen haben, was bei der Auswahl des Stammes und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss (LOSCHER et al., 2017). Selbst die Haltungsbedingungen können Auswirkungen auf die Resultate einer Studie haben, beispielsweise kann die Gruppenhaltung der Tiere die Variabilität von Studienergebnissen bis zu 37% erhöhen (PRENDERGAST et al., 2014). Diese Einflussfaktoren sollten bei der Planung zukünftiger Studien bedacht werden und die Einschätzung der Belastung für Mäuse im Kindling-Modell immer an das jeweilige Projekt angepasst werden. Zu dieser

individuellen Belastungseinschätzung gibt die vorliegende Studie eine evidenzbasierte Empfehlung und Vorschläge, mit Hilfe welcher Parameter die Belastung der Tiere zuverlässig und sensitiv evaluiert werden kann.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsien sind bei Hunden und Katzen eine der bedeutendsten neurologischen Erkrankungen. Dabei spricht ein Teil der Patienten nicht auf ihre Therapie an. Auch in der Humanmedizin sind Epilepsien mit 50.000 erkrankten Menschen weltweit von größter Bedeutung. Somit besteht Handlungsbedarf in der Entwicklung neuer therapeutischer Optionen. Für diese Weiterentwicklung werden adäquate Tiermodelle benötigt. Der Einsatz in solchen Tiermodellen kann für die Tiere eine Belastung darstellen, die nach der Forderung der EU-Richtlinie 63/2010 und ihrer nationalen Umsetzung in die Tierschutzversuchstierverordnung eingestuft werden muss. Um eine Belastung in einem Tiermodell zu erkennen, müssen Parameter identifiziert und validiert werden, anhand derer eine objektive Belastungseinstufung einfach und zuverlässig möglich ist. Eine geeignete Methodik für die evidenzbasierte Belastungseinstufung wird von der Forschergruppe FOR 2591, einer von der DFG geförderten Forschergruppe, implementiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Rahmen der Forschergruppe mit der Identifizierung und Validierung geeigneter Parameter zur Belastungseinstufung im elektrischen Kindling-Modell bei Mäusen. Es wurden in den Zielregionen des Gehirns Stimulationselektroden implantiert, um darüber einmal täglich Anfälle auslösen zu können. Um die Belastung durch die Stimulation unterschiedlicher Zielregionen vergleichen zu können, wurde den Tieren die Elektrode entweder in die Amygdala oder in den dorsalen Hippocampus implantiert. Die in dem Modell auftretende Belastung wurde anhand umfassender Untersuchungen des Verhaltens und anhand biochemischer Parameter ermittelt. Es wurden Untersuchungen zur lokomotorischen Aktivität der Tiere (*Open-Field*), zum angst-assoziierten Verhalten (*Elevated-Plus-Maze*, *Black-and-White-Box*), zum anhedonie-assoziierten Verhalten (*Saccharin-Präferenz-Test*), zum Wohlfühlverhalten (*Burrowing-Test*, Nestbauverhalten) und zur sozialen Interaktion (*Social-Interaction-Test*) analysiert. Zusätzlich wurden biochemische Parameter (Corticosteronmetaboliten im Kot und Corticosteronkonzentration im Serum) erfasst. Anschließend wurde eine 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung durchgeführt und die 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression in ausgewählten Gehirnregionen untersucht, um Informationen über eine mögliche Modulation des serotonergen Systems durch die Elektrodenimplantation und die wiederholten Anfälle zu erhalten. Um Korrelationen zwischen Parametern der einzelnen Tests zu erkennen, wurde eine Korrelationsmatrix erstellt. Bei Auswertung der einzelnen Untersuchungen wurde eine gesteigerte lokomotorische Aktivität bei den gekindelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt, des Weiteren wurde ein gesteigertes anhedonie-assoziiertes Verhalten beobachtet. Das Wühlverhalten als Parameter des Wohlfühlverhaltens war zudem bei den

Hippocampus-Kindling-Tieren während der Kindlingphase reduziert, während es bei den Amygdala-Kindling-Tieren im Vergleich zu Ihren eigenen Basalwerten gesteigert war. Das Nestbauverhalten als weiterer Parameter des Wohlfühlverhaltens war während des gesamten Kindling-Prozesses unverändert. Bei den Amygdala-gekindelten Tieren konnte ein reduziertes angst-assoziiertes Verhalten festgestellt werden. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergab eine gesteigerte 5-HT_{1A}-Rezeptor-Expression bei den Amygdala-gekindelten Tieren im Vergleich zu ihrer elektrodenimplantierten Kontrollgruppe und der naiven Gruppe. Im Anschluss an die Auswertung der einzelnen Untersuchungen wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, um die großen Datensätze zu illustrieren und die Varianz zwischen den Gruppen darzustellen. In der Hauptkomponentenanalyse ist eine signifikante Differenzierung der Kindling-Gruppen von den elektrodenimplantierten Kontrollgruppen sowie von den naiven Gruppe erkennbar. Somit können mit Hilfe dieser Darstellung geeignete Parameter zur Belastungseinschätzung identifiziert werden. Für die Differenzierung sind bei den Amygdala-gekindelten Tieren vor allem Parameter des angst-assoziierten Verhaltens und der lokomotorischen Aktivität verantwortlich, außerdem Parameter der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Färbung. Verhaltensänderungen, die anhand von Parametern des angst-assoziierten Verhaltens erkannt wurden, könnten bei den Amygdala-gekindelten Tieren durch implantationsbedingte Läsionen in der Amygdala auftreten. Somit können diese Parameter lokalisationspezifisch Merkmale des Amygdala-Kindling-Modells bei Mäusen wiedergeben. Bei den Hippocampus-gekindelten Tieren tragen zusätzlich zu Parametern der lokomotorischen Aktivität auch Parameter des Wühlverhaltens sowie des anhedonie-assoziierten Verhaltens und der Irwin Score zur Differenzierung von den Kontrollgruppen bei. Mit Hilfe dieser Parameter konnten Belastungen der Tiere erkannt werden, weshalb sie zur Einstufung einer Belastung in Mausmodellen selektiert wurden. Die hier selektierten Parameter werden modell- und speziesübergreifend weiterführend verglichen und validiert.

IX. SUMMARY

Epilepsy is one of the most important neurological diseases in dogs and cats. However, some patients do not respond to their therapy. Epilepsies are also of great importance in human medicine, with 50,000 people suffering from the disease worldwide. Therefore there is a need for the development of new therapeutic options. Adequate animal models are needed for this further development. The use of such animal models can be a burden for the animals, which must be classified according to the requirements of the EU Directive 63/2010 and its national implementation in the Animal Welfare Experimental Animal Regulation. In order to detect a distress in an animal model, parameters must be identified and validated which allow an objective distress classification in a simple and reliable way. A suitable methodology for evidence-based stress classification is implemented by the Research Unit FOR 2591, a research group funded by the DFG. Within the research group, the present work is concerned with the identification and validation of suitable parameters for stress classification in the electrical kindling model in mice. Stimulation electrodes were implanted in the target regions of the brain to trigger seizures once a day. In order to compare the exposure to stimulation of different target regions, the electrodes were implanted either in the amygdala or in the dorsal hippocampus. The exposure occurring in the model was determined on the basis of comprehensive behavioural studies and biochemical parameters. Studies on the locomotor activity of the animals (open field), anxiety-associated behaviour (elevated-plus maze, black-and-white-box), anhedonia-associated behaviour (saccharin preference test), well-being behaviour (burrowing test, nest-building behaviour) and social interaction (social interaction test) were analysed. Additionally, biochemical parameters (corticosterone metabolites in faeces and corticosterone concentration in serum) were recorded. Subsequently, a 5-HT_{1A} receptor staining was performed and the 5-HT_{1A} receptor expression was examined in selected brain regions to obtain information on a possible modulation of the serotonergic system by electrode implantation and repeated attacks. A correlation matrix was created to identify correlations between parameters of the individual tests. In the evaluation of the individual tests, an increased locomotor activity was found in kindled animals compared to their control groups. Furthermore, an increased anhedonia-associated behaviour was observed. Moreover, the burrowing behaviour as a parameter of well-being was reduced in the hippocampus kindling animals during the kindling phase, whereas it was increased in the amygdala kindling animals as compared to their own basal values. The nestbuilding behaviour as a further parameter of well-being was unchanged during the entire kindling process. A reduced anxiety-associated behaviour was observed in the amygdala kindled animals. Evaluation of the immunohistochemical staining revealed an increased 5-HT_{1A} receptor expression in the amygdala-kindled animals as compared to their electrode-

implanted control group and the naive group. Following the evaluation of the individual studies, a principal component analysis was performed to illustrate the large data sets and to show the variance between the groups. In the principal component analysis a significant differentiation of the kindling groups from the electrode-implanted control groups as well as from the naive group is evident. Thus, suitable parameters for exposure assessment can be identified with the help of this presentation. In the amygdala kindled animals, parameters of anxiety-associated behaviour and locomotor activity are mainly responsible for the differentiation, as well as parameters of the 5-HT_{1A}-receptor staining. Behavioural changes detected by the anxiety-associated behaviour parameters could be caused by implantation-related lesions in the amygdala in the amygdala kindled animals. Thus, these parameters may reflect localization-specific features of the amygdala kindling model in mice. In the hippocampus kindled animals, parameters of the burrowing behaviour as well as the anhedonia-associated behaviour and the Irwin Score contribute to the differentiation from the control groups in addition to parameters of locomotor activity. These parameters were used to identify stress in the animals, which is why they were selected to classify severity in mouse models. The parameters selected here are further compared and validated across models and species.

X. LITERATURVERZEICHNIS

Aggleton JP (1992) The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction. Wiley-Liss

Aguiar AS, Jr., Speck AE, Amaral IM, Canas PM, Cunha RA. The exercise sex gap and the impact of the estrous cycle on exercise performance in mice. *Sci Rep* 2018; 8: 10742.

Albertoni P. Untersuchungen über die Wirkung einiger Arzneimittel auf die Erregbarkeit des Grosshirns nebst Beiträgen zur Therapie der Epilepsie. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1882; 15: 248-88.

Alper K, Schwartz KA, Kolts RL, Khan A. Seizure incidence in psychopharmacological clinical trials: an analysis of Food and Drug Administration (FDA) summary basis of approval reports. *Biological psychiatry* 2007; 62: 345-54.

Altieri SC, Garcia-Garcia AL, Leonardo ED, Andrews AM. Rethinking 5-HT_{1A} receptors: emerging modes of inhibitory feedback of relevance to emotion-related behavior. *ACS Chem Neurosci* 2013; 4: 72-83.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21: 205-35.

Association AP (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub

Aum DJ, Tierney TS. Deep brain stimulation: foundations and future trends. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2018; 23: 162-82.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-152.

Batten SR, Matveeva EA, Whiteheart SW, Vanaman TC, Gerhardt GA, Slevin JT. Linking kindling to increased glutamate release in the dentate gyrus of the hippocampus through the STXBP5/tomosyn-1 gene. *Brain Behav* 2017; 7: e00795.

Baumans PLPVLV. The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Laboratory Animals* 2004; 17-24.

Beery AK, Kaufer D. Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. *Neurobiol Stress* 2015; 1: 116-27.

Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. Selecting Female Mice in Estrus and Checking Plugs. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016

Belda X, Fuentes S, Daviu N, Nadal R, Armario A. Stress-induced sensitization: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and beyond. *Stress* 2015; 18: 269-79.

Belle MA (2004) Zuchtdaten zu Körpergewicht, Fruchtbarkeit und Aufzuchtleistung der Schleißeheimer Mäusestämme zwischen 1990 und 2001. *Imu*

Benato L, Rooney NJ, Murrell JC. Pain and analgesia in pet rabbits within the veterinary environment: a review. *Vet Anaesth Analg* 2019; 46: 151-62.

Berendt M, Gram L. Epilepsy and seizure classification in 63 dogs: a reappraisal of veterinary epilepsy terminology. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 14-20.

Berendt M, Farquhar RG, Mandigers PJ, Pakozdy A, Bhatti SF, De Risio L, Fischer A, Long S, Matiasek K, Munana K, Patterson EE, Penderis J, Platt S, Podell M, Potschka H, Pumarola MB, Rusbridge C, Stein VM, Tipold A, Volk HA. International veterinary epilepsy task force consensus report on epilepsy definition, classification and terminology in companion animals. *BMC Vet Res* 2015; 11: 182.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 2009; 60: 355-66.

Bertram E. The relevance of kindling for human epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48 Suppl 2: 65-74.

Bickel S. Alles Zucker–oder was? Zuckermymthen. *Biologie in unserer Zeit* 2018; 48: 310-7.

Blier P, Pineyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C. Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 861: 204-16.

Blumer K. Ethische Aspekte zu Tierversuchen und das Solidaritätsprinzip. Tierversuche in der Forschung, eine Broschüre der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) 2016: 27-9.

Borgmann M, Holtkamp M, Adli M, Behr J. Depression und Epilepsie. *Der Nervenarzt* 2016; 87: 724-30.

Borta A, Schwarting RK. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. *Physiol Behav* 2005; 84: 387-96.

Bourin M, Hascoet M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 55-65.

Bower ES, Wetherell JL, Mon T, Lenze EJ. Treating Anxiety Disorders in Older Adults: Current Treatments and Future Directions. *Harv Rev Psychiatry* 2015; 23: 329-42.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 2012; 7: e35538.

Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz J Psychiatry* 2013; 35 Suppl 2: S101-11.

Cannon WB. The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *The American Journal of Psychology* 1914;

Cavalleri GL, Weale ME, Shianna KV, Singh R, Lynch JM, Grinton B, Szoeki C, Murphy K, Kinirons P, O'Rourke D, Ge D, Depondt C, Claeys KG, Pandolfo M, Gumbs C, Walley N, McNamara J, Mulley JC, Linney KN, Sheffield LJ, Radtke RA, Tate SK, Chisoe SL, Gibson RA, Hosford D, Stanton A, Graves TD, Hanna MG, Eriksson K, Kantanen AM, Kalviainen R, O'Brien TJ, Sander JW, Duncan JS, Scheffer IE, Berkovic SF, Wood NW, Doherty CP, Delanty N, Sisodiya SM, Goldstein DB. Multicentre search for genetic susceptibility loci in sporadic epilepsy syndrome and seizure types: a case-control study. *Lancet Neurol* 2007; 6: 970-80.

Chandler K. Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders? *Vet J* 2006; 172: 207-17.

Chen SD, Wang YL, Liang SF, Shaw FZ. Rapid Amygdala Kindling Causes Motor Seizure and Comorbidity of Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Rats. *Front Behav Neurosci* 2016; 10: 129.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32: 777-85.

Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 13: 167-70.

Crawley JN. Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosci Biobehav Rev* 1985; 9: 37-44.

Cutler M, Rodgers R, Jackson J. Behavioural effects in mice of subchronic buspirone, ondansetron and tianeptine. I. Social interactions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1997; 56: 287-93.

Datta S, Samanta D, Tiwary B, Chaudhuri AG, Chakrabarti N. Sex and estrous cycle dependent changes in locomotor activity, anxiety and memory performance in aged mice after exposure of light at night. *Behav Brain Res* 2019; 365: 198-209.

de Angelis L, File SE. Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1979; 64: 127-9.

De Vry J. 5-HT_{1A} receptor agonists: recent developments and controversial issues. *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 121: 1-26.

Deacon R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp* 2012: e2607.

Deacon RM, Raley JM, Perry VH, Rawlins JN. Burrowing into prion disease. *Neuroreport*

2001; 12: 2053-7.

Deacon RM, Croucher A, Rawlins JN. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 2002; 132: 203-13.

Deacon RM, Penny C, Rawlins JN. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav Brain Res* 2003; 139: 139-55.

Deacon RM, Reisel D, Perry VH, Nicholas J, Rawlins P. Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice. *Behav Brain Res* 2005; 157: 99-105.

Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006a; 1: 1117-9.

Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc* 2006b; 1: 118-21.

Deacon RM. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. *Behav Brain Res* 2009; 200: 128-33.

Di Liberto V, van Dijk RM, Brendel M, Waldron AM, Moller C, Koska I, Seiffert I, Gualtieri F, Gildehaus FJ, von Ungern-Sternberg B, Lindner M, Ziegler S, Palme R, Hellweg R, Gass P, Bartenstein P, Potschka H. Imaging correlates of behavioral impairments: An experimental PET study in the rat pilocarpine epilepsy model. *Neurobiol Dis* 2018; 118: 9-21.

Dlugos DJ, Sammel MD, Strom BL, Farrar JT. Response to first drug trial predicts outcome in childhood temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2001; 57: 2259-64.

Drage MG, Heinrichs SC. Phenotyping the untouchables: environmental enhancement of behavioral and physiological activation in seizure-prone EI mice. *Epilepsy Behav* 2005; 6: 35-42.

Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Holt D, Greer PJ, Huang Y, Gautier C, Mathis C. PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression. *Biol Psychiatry* 1999; 46: 1375-87.

Eibl-Eibesfeldt I. Angeborenes und Erworbenes im Nestbauverhalten der Wanderratte. *Naturwissenschaften* 1955; 42: 633-4.

Ekambaram G, Sampath Kumar SK, Joseph LD. Comparative Study on the Estimation of Estrous Cycle in Mice by Visual and Vaginal Lavage Method. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2017; 11: AC05-AC7.

El-Nour H, Lundeberg L, Abdel-Magid N, Lonne-Rahm SB, Azmitia EC, Nordlind K. Serotonergic mechanisms in human allergic contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 2007; 87: 390-6.

Engel J, Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001; 42: 796-803.

Engelhardt B. *Physiologie der Haustiere*. Enke Verlag 2005; 2. Auflage: 655.

Exner C, Bode H-J, Blumer K, Giese C. *Tierversuche in der Forschung*. Deutsche Forschungsgemeinschaft 2004;

Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res* 2018; 139: 73-9.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 1978; 62: 19-24.

File SE, Tucker JC. Prenatal treatment with clomipramine: effects on the behaviour of male and female adolescent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1984; 82: 221-4.

File SE, Seth P. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 35-53.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-2.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Jr., Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshe SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014; 55: 475-82.

Fisher RS, Cross JH, French JA, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Zuberi SM. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017a; 58: 522-30.

Fisher RS, Cross JH, D'Souza C, French JA, Haut SR, Higurashi N, Hirsch E, Jansen FE, Lagae L, Moshe SL, Peltola J, Roulet Perez E, Scheffer IE, Schulze-Bonhage A, Somerville E, Sperling M, Yacubian EM, Zuberi SM. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia* 2017b; 58: 531-42.

Flecknell P. Replacement, reduction, refinement. ALTEX-alternatives to Animal Experimentation 2002; 19: 73-8.

Flury A (2017) *Der moralische Status der Tiere: Henry Salt, Peter Singer und Tom Regan.* Verlag Herder GmbH

Frazer A, Maayani S, Wolfe BB. Subtypes of receptors for serotonin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30: 307-48.

Gallagher M, Chiba AA. The amygdala and emotion. *Curr Opin Neurobiol* 1996; 6: 221-7.

Ganz R, Schmutz M, Krämer G. Epilepsie und Depression: Neue Perspektiven zur Pathophysiologie und Behandlung einer herausfordernden Komorbidität. *Aktuelle Neurologie* 2003; 30: 317-9.

Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED. 5-HT(1A) [corrected] receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231: 623-36.

Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp* 2013: 51012.

Gastaut H. Certain Basic Concepts Concerning the Treatment of the Epilepsies. *Br J Clin Pract* 1964; 18: 463-8.

Geba GP, Ptak W, Anderson GM, Paliwal V, Ratzlaff RE, Levin J, Askenase PW. Delayed-type hypersensitivity in mast cell-deficient mice: dependence on platelets for expression of contact sensitivity. *J Immunol* 1996; 157: 557-65.

Gharib A, Sayyahi Z, Komaki A, Barkley V, Sarihi A, Mirnajafi-Zadeh J. The role of 5-HT_{1A} receptors of hippocampal CA1 region in anticonvulsant effects of low-frequency stimulation in amygdala kindled rats. *Physiol Behav* 2018; 196: 119-25.

Ghosal S, Nunley A, Mahbod P, Lewis AG, Smith EP, Tong J, D'Alessio DA, Herman JP. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav* 2015; 150: 31-7.

Girardeau G, Inema I, Buzsaki G. Reactivations of emotional memory in the hippocampus-amygdala system during sleep. *Nat Neurosci* 2017; 20: 1634-42.

Gitler D, Takagishi Y, Feng J, Ren Y, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Greengard P, Augustine GJ. Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci* 2004; 24: 11368-80.

Gloor P, Olivier A, Quesney LF, Andermann F, Horowitz S. The role of the limbic system in experiential phenomena of temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 1982; 12: 129-44.

Goddard GV. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 1967; 214: 1020-1.

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.

Goebel A, Stock M, Deacon R, Sprotte G, Vincent A. Intravenous immunoglobulin response and evidence for pathogenic antibodies in a case of complex regional pain syndrome 1. *Ann Neurol* 2005; 57: 463-4.

Goodnick PJ, Goldstein BJ. Selective serotonin reuptake inhibitors in affective disorders--II. Efficacy and quality of life. *J Psychopharmacol* 1998; 12: S21-54.

Gorter JA, van Vliet EA, Lopes da Silva FH. Which insights have we gained from the kindling and post-status epilepticus models? *J Neurosci Methods* 2016; 260: 96-108.

Goscinski I, Kwiatkowski S, Polak J, Orłowiejska M, Partyk A. The Kluver-Bucy syndrome. *J Neurosurg Sci* 1997; 41: 269-72.

Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 717-28.

Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 148: 164-70.

Gundersen H, Jensen E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy* 1987; 147: 229-63.

Gutknecht L, Kriegebaum C, Waider J, Schmitt A, Lesch KP. Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2 knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009; 19: 266-82.

Hagemann E, Schmidt G (2018) Ratte und maus: versuchstiere in der forschung. Walter de Gruyter GmbH & Co KG

Häger C, Keubler LM, Biernot S, Dietrich J, Buchheister S, Buettner M, Bleich A. Time to Integrate to Nest Test Evaluation in a Mouse DSS-Colitis Model. *PLoS One* 2015; 10: e0143824.

Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology* 1934; 18: 385.

Hamon M, Bourgoïn S, Hery F, Simonnet G. Activation of tryptophan hydroxylase by

adenosine triphosphate, magnesium, and calcium. *Mol Pharmacol* 1978; 14: 99-110.

Han H, Du W, Zhou B, Zhang W, Xu G, Niu R, Sun Z. Effects of chronic fluoride exposure on object recognition memory and mRNA expression of SNARE complex in hippocampus of male mice. *Biol Trace Elem Res* 2014; 158: 58-64.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 327: 1-5.

Hannesson DK, Howland J, Pollock M, Mohapel P, Wallace AE, Corcoran ME. Dorsal hippocampal kindling produces a selective and enduring disruption of hippocampally mediated behavior. *J Neurosci* 2001; 21: 4443-50.

Harikrishnan VS, Hansen AK, Abelson KS, Sorensen DB. A comparison of various methods of blood sampling in mice and rats: Effects on animal welfare. *Lab Anim* 2018; 52: 253-64.

Hattiangady B, Rao MS, Shetty AK. Chronic temporal lobe epilepsy is associated with severely declined dentate neurogenesis in the adult hippocampus. *Neurobiology of disease* 2004; 17: 473-90.

Hauptmann A. Luminal bei epilepsie. *Munch Med Wochenschr* 1912; 59: 1907-9.

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 15049-54.

Helfer V, Deransart C, Marescaux C, Depaulis A. Amygdala kindling in the rat: anxiogenic-like consequences. *Neuroscience* 1996; 73: 971-8.

Hernandez EJ, Williams PA, Dudek FE. Effects of fluoxetine and TFMPP on spontaneous seizures in rats with pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsia* 2002; 43: 1337-45.

Heske L, Nodtvedt A, Jaderlund KH, Berendt M, Egenvall A. A cohort study of epilepsy among 665,000 insured dogs: incidence, mortality and survival after diagnosis. *Vet J* 2014;

202: 471-6.

Hirt A, Maisack C, Moritz J (2003) Tierschutzgesetz: Kommentar

Höffe O (2013) Einführung in die utilitaristische Ethik: Klassische und zeitgenössische Texte. UTB

Höhne T (2017) Untersuchung struktureller Veränderungen des Hippocampus über den Zeitraum von einem Jahr bei Patienten mit Depression im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen mittels struktureller MRT Bildgebung. Imu

Holter SM, Einicke J, Sperling B, Zimprich A, Garrett L, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, Wurst W. Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2015; 5: 291-309.

Huang H, Zhou H, Wang N. Recent Advances in Epilepsy Management. *Cell Biochem Biophys* 2015; 73: 7-10.

Huang W, Calvo M, Karu K, Olausen HR, Bathgate G, Okuse K, Bennett DL, Rice AS. A clinically relevant rodent model of the HIV antiretroviral drug stavudine induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 2013; 154: 560-75.

ILAE. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1981; 22: 489-501.

ILAE. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 1985; 26: 268-78.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13: 222-57.

Jackson JC, Cross RJ, Walker RF, Markesbery WR, Brooks WH, Roszman TL. Influence

of serotonin on the immune response. *Immunology* 1985; 54: 505-12.

Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Fleischmann T, Arras M. Individual housing of female mice: influence on postsurgical behaviour and recovery. *Lab Anim* 2012; 46: 325-34.

Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim* 2013a; 47: 153-61.

Jirkof P, Leucht K, Cesarovic N, Caj M, Nicholls F, Rogler G, Arras M, Hausmann M. Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Lab Anim* 2013b; 47: 274-83.

Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 2014; 234: 139-46.

Jones BJ, Blackburn TP. The medical benefit of 5-HT research. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 71: 555-68.

Kale R. Global Campaign Against Epilepsy: the treatment gap. *Epilepsia* 2002; 43 Suppl 6: 31-3.

Kandratavicius L, Balista PA, Lopes-Aguiar C, Ruggiero RN, Umeoka EH, Garcia-Cairasco N, Bueno-Junior LS, Leite JP. Animal models of epilepsy: use and limitations. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2014; 10: 1693-705.

Kant I (2016) *Metaphysische Anfangsgründe der Tugendlehre: Metaphysik der Sitten*. Zweiter Teil. Felix Meiner Verlag

Kearsley-Fleet L, O'Neill DG, Volk HA, Church DB, Brodbelt DC. Prevalence and risk factors for canine epilepsy of unknown origin in the UK. *Vet Rec* 2013; 172: 338.

Kikusui T, Winslow JT, Mori Y. Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 2215-28.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010; 1: 94-9.

Kinder EF. A study of the nest-building activity of the albino rat. *The Journal of experimental zoologie* 1927; Vol.47 No.2

Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem* 2007; 282: 4233-7.

Klein S, Bankstahl JP, Loscher W, Bankstahl M. Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2015; 263: 263-71.

Klüver H, Bucy PC. "Psychic blindness" and other symptoms following bilateral temporal lobectomy in Rhesus monkeys. *American Journal of Physiology* 1937;

Knowles K. Idiopathic epilepsy. *Clin Tech Small Anim Pract* 1998; 13: 144-51.

Kong Q, Qin C. Analysis of Current Laboratory Animal Science Policies and Administration in China. *ILAR Journal* 2010; 51: E1-E10.

Koska I, van Dijk RM, Seiffert I, Di Liberto V, Moller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019;

Krall RL, Penry JK, Kupferberg HJ, Swinyard EA. Antiepileptic drug development: I. History and a program for progress. *Epilepsia* 1978; 19: 393-408.

Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. [Serotonin now: Part 1. Neurobiology and developmental genetics]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2010; 78: 319-31.

Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem* 2002; 2: 507-28.

Krüger A. Alexithymie und Anhedonie bei psychosomatischen Patienten: eine klinische Untersuchung. 2000;

Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 2000; 342: 314-9.

Lackner CK, Ruppert M, Lazarovici M, Stolpe E. Anwenderperformanz und-variabilität der Glasgow-Koma-Skala. *Notfall & Rettungsmedizin* 2002; 5: 173-85.

Lacombe VA. Seizures in horses: diagnosis and classification. *Vet Med (Auckl)* 2015; 6: 301-8.

Lanfume L, Hamon M. 5-HT₁ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004; 3: 1-10.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010; 7: 447-9.

Larisch R. Untersuchungen des Serotonergen Systems und der Serotonin 5HT_{2A}-Rezeptoren mit [¹⁸F] Altanserin und PET: ein Beitrag zur Neurobiologie der Depression. 2003;

Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science* 2004; 86: 261-89.

Le Fevre M, Kolt GS, Matheny J. Eustress, distress and their interpretation in primary and secondary occupational stress management interventions: which way first? *Journal of Managerial Psychology* 2006; 21: 547-65.

Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell PA. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 2012; 7: e35656.

LeDoux JE. Emotion and the amygdala. 1992;

Leidinger C, Herrmann F, Thone-Reineke C, Baumgart N, Baumgart J. Introducing Clicker Training as a Cognitive Enrichment for Laboratory Mice. *J Vis Exp* 2017;

Li C, Silva J, Ozturk E, Dezsi G, O'Brien TJ, Renoir T, Jones NC. Chronic fluoxetine treatment accelerates kindling epileptogenesis in mice independently of 5-HT_{2A} receptors. *Epilepsia* 2018; 59: e114-e9.

Licht BG, Licht MH, Harper KM, Lin S, Curtin JJ, Hyson LL, Willard K. Clinical presentations of naturally occurring canine seizures: similarities to human seizures. *Epilepsy Behav* 2002; 3: 460-70.

Lidster K, Jefferys JG, Blumcke I, Crunelli V, Flecknell P, Frenguelli BG, Gray WP, Kaminski R, Pitkanen A, Ragan I, Shah M, Simonato M, Trevelyan A, Volk H, Walker M, Yates N, Prescott MJ. Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *J Neurosci Methods* 2016; 260: 2-25.

Lindemann G, Lüdtko N, Matsuzaki H (2010) Die Stellung des Tieres in der Entwicklung der Tierschutzgesetzgebung in Deutschland, Japan und den USA

Lisk RD, Pretlow RA, 3rd, Friedman SM. Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). *Anim Behav* 1969; 17: 730-7.

Liu H, Yuan TF. Physical Interaction Is Required in Social Buffering Induced by a Familiar Conspecific. *Sci Rep* 2016; 6: 39788.

Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. *Nat Protoc* 2018; 13: 1686-98.

Liu RJ, Lambe EK, Aghajanian GK. Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence on L-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 945-58.

Liu S, Shen Y, Shultz SR, Nguyen A, Hovens C, Adlard PA, Bush AI, Chan J, Kwan P, O'Brien TJ, Jones NC. Accelerated kindling epileptogenesis in Tg4510 tau transgenic mice, but not in tau knockout mice. *Epilepsia* 2017; 58: e136-e41.

Liu XL, Luo L, Mu RH, Liu BB, Geng D, Liu Q, Yi LT. Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. *Sci Rep* 2015; 5: 16024.

Loscher W, Ferland RJ, Ferraro TN. The relevance of inter- and intrasrain differences in mice and rats and their implications for models of seizures and epilepsy. *Epilepsy Behav* 2017; 73: 214-35.

Löscher W, Jackel R, Czuczwar SJ. Is amygdala kindling in rats a model for drug-resistant partial epilepsy? *Exp Neurol* 1986; 93: 211-26.

Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002; 50: 105-23.

Löscher W, Schmidt D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 2002; 50: 3-16.

Löscher W, Leppik IE. Critical re-evaluation of previous preclinical strategies for the discovery and the development of new antiepileptic drugs. *Epilepsy Res* 2002; 50: 17-20.

Löscher W, Brandt C. Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 668-700.

Löscher W, Rogawski MA. How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 2012; 53 Suppl 8: 12-25.

Löscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2013; 12: 757-76.

Löscher W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. *Neurochem Res* 2017; 42: 1873-88.

Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, Gilliam F, Ryvlin P. Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain* 2008; 131: 2765-82.

Lucki I, Singh A, Kreiss DS. Antidepressant-like behavioral effects of serotonin receptor agonists. *Neurosci Biobehav Rev* 1994; 18: 85-95.

Ludwig C, Schmidt A (1868) Das Verhalten der Gase, welche mit dem Blut durch den reizbaren Säugethiermuskel strömen. Physiologisches Institut, Leipzig, Arbeiten aus der Physiologischen Anstalt zu Leipzig

Lukasiuk K, Pitkänen A. SEIZURES| Seizure-Induced Gene Expression. 2009;

Lundberg J, Borg J, Halldin C, Farde L. A PET study on regional coexpression of 5-HT 1A receptors and 5-HTT in the human brain. *Psychopharmacology* 2007; 195: 425-33.

Lupien SJ, de Leon M, de Santi S, Convit A, Tarshish C, Nair NP, Thakur M, McEwen BS, Hauger RL, Meaney MJ. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* 1998; 1: 69-73.

Mahar I, Bambico FR, Mechawar N, Nobrega JN. Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 38: 173-92.

Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, Lad HV, Nolan PM, Ouagazzal AM, Coghill EL, Gale K, Golini E, Jacquot S, Krezel W, Parker A, Riet F, Schneider I, Marazziti D, Auwerx J, Brown SD, Chambon P, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Wurst W. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics* 2008; 34: 243-55.

Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH. Investigations into the preferences of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. *Lab Anim* 1998; 32: 23-35.

Martin LG, Zimmer Z, Lee J. Foundations of Activity of Daily Living Trajectories of Older Americans. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 2017; 72: 129-39.

Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wieskopf JS, Zaloum A, King OD, Mogil JS. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 42-9.

Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, Sankar R. Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav* 2007; 10: 377-83.

Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R. Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain* 2008; 131: 2071-83.

McIntyre DC, Racine R. Kindling mechanisms: current progress on an experimental epilepsy model. *Progress in neurobiology* 1986; 27: 1-12.

McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp* 2012: e4389.

McNamara JO, Byrne MC, Dasheiff RM, Fitz JG. The kindling model of epilepsy: a review. *Prog Neurobiol* 1980; 15: 139-59.

Mendelson III J. Should Animals Have Standing: A Review of Standing under the Animal Welfare Act. *BC Env'tl. Aff. L. Rev.* 1996; 24: 795.

Miller AL, Kitson GL, Skalkoyannis B, Flecknell PA, Leach MC. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl Anim Behav Sci* 2016; 181: 160-5.

Möller C, Wolf F, Russmann V, Keck M, von Rüden E-L, Potschka H. Nestbauverhalten als Parameter für die Einstufung des Schweregrads der Belastung bei Labornagern in einem Anfallsmodell

Poster DVG-Tierschutztagung 2017 2017;

Möller C, Wolf F, van Dijk RM, Di Liberto V, Russmann V, Keck M, Palme R, Hellweg R, Gass P, Otzdorff C, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models

with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia* 2018; 59: 765-77.

Montgomery SA, Fineberg N. Is there a relationship between serotonin receptor subtypes and selectivity of response in specific psychiatric illnesses? *Br J Psychiatry Suppl* 1989: 63-9.

Moto FCO, Arsa'a A, Ngoupaye GT, Taiwe GS, Njapdounke JSK, Kandeda AK, Nkantchoua GCN, Omam Omam JP, Pale S, Kouemou NE, Ayissi Mbomo ER, Pahaye DB, Ojong L, Mairara V, Ngo Bum E. Anxiolytic and Antiepileptic Properties of the Aqueous Extract of *Cissus quadrangularis* (Vitaceae) in Mice Pilocarpine Model of Epilepsy. *Front Pharmacol* 2018; 9: 751.

Moussaoui N, Larauche M, Biraud M, Molet J, Million M, Mayer E, Tache Y. Limited Nesting Stress Alters Maternal Behavior and In Vivo Intestinal Permeability in Male Wistar Pup Rats. *PLoS One* 2016; 11: e0155037.

Murphy P, Burnham WM. The effect of kindled seizures on the locomotory behavior of Long-Evans rats. *Exp Neurol* 2003; 180: 88-92.

Nahm FK. Heinrich Kluver and the temporal lobe syndrome. *J Hist Neurosci* 1997; 6: 193-208.

Nash JR, Sargent PA, Rabiner EA, Hood SD, Argyropoulos SV, Potokar JP, Grasby PM, Nutt DJ. Serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in people with panic disorder: positron emission tomography study. *Br J Psychiatry* 2008; 193: 229-34.

Nirwan N, Vyas P, Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci* 2018; 29: 757-70.

Nozaki T, Ura H, Takumi I, Kobayashi S, Maru E, Morita A. The angiotensin II type I receptor antagonist losartan retards amygdala kindling-induced epileptogenesis. *Brain Res* 2018; 1694: 121-8.

O'Toole KK, Hooper A, Wakefield S, Maguire J. Seizure-induced disinhibition of the HPA axis increases seizure susceptibility. *Epilepsy Res* 2014; 108: 29-43.

Oldendorf WH. The blood-brain barrier. *Exp Eye Res* 1977; 25 Suppl: 177-90.

Ormsbee HS, 3rd, Fondacaro JD. Action of serotonin on the gastrointestinal tract. *Proc Soc Exp Biol Med* 1985; 178: 333-8.

Otabi H, Goto T, Okayama T, Kohari D, Toyoda A. Subchronic and mild social defeat stress alter mouse nest building behavior. *Behav Processes* 2016; 122: 21-5.

Otabi H, Goto T, Okayama T, Kohari D, Toyoda A. The acute social defeat stress and nest-building test paradigm: A potential new method to screen drugs for depressive-like symptoms. *Behav Processes* 2017; 135: 71-5.

Overstreet DH, Friedman E, Mathe AA, Yadid G. The Flinders Sensitive Line rat: a selectively bred putative animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29: 739-59.

Pardridge WM, Oldendorf WH. Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. *Biochim Biophys Acta* 1975; 401: 128-36.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10734-9.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149-67.

Pineda E, Shin D, Sankar R, Mazarati AM. Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms. *Epilepsia* 2010; 51 Suppl 3: 110-4.

Pitkanen A, Halonen T. Prevention of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 253-5.

Pitkanen A, Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 2002; 1: 173-81.

Pitkanen A, Lukasiuk K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic

epilepsy. *Epilepsy Behav* 2009; 14 Suppl 1: 16-25.

Pitkanen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5

Pitkänen A, Amaral DG. Demonstration of projections from the lateral nucleus to the basal nucleus of the amygdala: a PHA-L study in the monkey. *Experimental brain research* 1991; 83: 465-70.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992; 12: 440-53.

Potschka H, Brodie MJ. Pharmacoresistance. *Handb Clin Neurol* 2012; 108: 741-57.

Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 40: 1-5.

Pritchard LM, Van Kempen TA, Zimmerberg B. Behavioral effects of repeated handling differ in rats reared in social isolation and environmental enrichment. *Neurosci Lett* 2013; 536: 47-51.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.

Putnam TJ, Merritt HH. Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivatives. *Science* 1937; 85: 525-6.

R-Studio, Core Team R. R: a language and environment for statistical computing, v3. 3.2. 2016;

Racine R, Paxinos G, Mosher J, Kairiss E. The effects of various lesions and knife-cuts on septal and amygdala kindling in the rat. *Brain research* 1988; 454: 264-74.

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 1972; 32: 281-94.

Radhakrishnan K. Challenges in the management of epilepsy in resource-poor countries. Nat Rev Neurol 2009; 5: 323-30.

Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? Trends Pharmacol Sci 2008; 29: 493-8.

Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. Journal of Applied Physiology 2001; 91: 667-70.

Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. J Biol Chem 1948; 174: 735-41.

Rapport MM, Green A, Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin). J. biol. Chem 1949; 176: 1243-51.

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacol Ther 2001; 92: 179-212.

Reis AR, de Azevedo MS, de Souza MA, Lutz ML, Alves MB, Izquierdo I, Cammarota M, Silveira PP, Lucion AB. Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. Behav Brain Res 2014; 265: 216-28.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. J Comp Neurol 2000; 417: 181-94.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. Neurosci Biobehav Rev 1997; 21: 801-10.

Roughan JV, Flecknell PA. Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. Eur J Pain 2003; 7: 397-406.

Roux S, Sable E, Porsolt RD. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Curr Protoc Pharmacol* 2005; Chapter 10: Unit 10

Russell WMS, Burch RL, Hume CW (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen London

Salzmann E. Zur Bedeutung von Hippocampus und Parahippocampus hinsichtlich normaler und gestörter Gedächtnisfunktionen. *Fortschritte der Neurologie· Psychiatrie* 1992; 60: 163-76.

Sankar R, Mazarati A. Neurobiology of Depression as a Comorbidity of Epilepsy. In: *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies*. th, Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, Olsen RW, Delgado-Escueta AV, eds. Bethesda (MD): 2012:

Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ. Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C] WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Archives of general psychiatry* 2000; 57: 174-80.

Sayin U, Osting S, Hagen J, Rutecki P, Sutula T. Spontaneous seizures and loss of axo-axonic and axo-somatic inhibition induced by repeated brief seizures in kindled rats. *J Neurosci* 2003; 23: 2759-68.

Schedlowski M, Schmidt RE. [Stress and the immune system]. *Naturwissenschaften* 1996; 83: 214-20.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang YH, Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58: 512-21.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshé SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang Y-H, Zuberi SM. ILAE-Klassifikation der Epilepsien: Positionspapier der ILAE-Kommission für Klassifikation und Terminologie. *Zeitschrift für Epileptologie* 2018; 31: 296-306.

Schnorr B, Kressin M. Embryologie der Haustiere. Tierärztliche Praxis-Ausgabe G-Grosstiere Nutztiere 2011; 39: 401.

Schott H. Medizingeschichte(n): Epilepsie – Heilige Krankheit. Dtsch Arztebl International 2004; 101: 43-.

Schriefl S, Steinberg TA, Matiasek K, Ossig A, Fenske N, Fischer A. Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004). J Am Vet Med Assoc 2008; 233: 1591-7.

Schwabe S, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Hager C, Nowakowska M, Riedesel AK, Schonhoff K, Struve B, Wittek J, Potschka H. Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. Lab Anim 2019: 23677219862004.

Schweitzer A (2008) Die Ehrfurcht vor dem Leben: Grundtexte aus fünf Jahrzehnten. CH Beck

Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A. Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. FASEB J 2015; 29: 859-67.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. J Vis Exp 2015: e52434.

Seiffert I, van Dijk RM, Koska I, Di Liberto V, Moller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. Epilepsia 2019; 60: 1539-51.

Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature 1936; 138: 32.

Seyfarth RM, Cheney DL. Meaning and emotion in animal vocalizations. Ann N Y Acad Sci 2003; 1000: 32-55.

Shah B, Pattanayak RD, Sagar R. The study of patient Henry Molaison and what it taught us over past 50 years: Contributions to neuroscience. Journal of Mental Health and Human

Behaviour 2014; 19: 91.

Sherwin CM. Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. *Lab Anim* 1997; 31: 125-32.

Shorvon SD. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: the first 50 years, 1909-1958. *Epilepsia* 2009; 50 Suppl 3: 69-92.

Singer P. Animal liberation: a new ethics for the treatment of animals. *New York Review*, New York 1975;

Singh S, Bermudez-Contreras E, Nazari M, Sutherland RJ, Mohajerani MH. Low-cost solution for rodent home-cage behaviour monitoring. *PLoS One* 2019; 14: e0220751.

Sliepen SHJ, Diaz-Delcastillo M, Koriath J, Olsen RB, Appel CK, Christoph T, Heegaard AM, Rutten K. Cancer-induced Bone Pain Impairs Burrowing Behaviour in Mouse and Rat. *In Vivo* 2019; 33: 1125-32.

Sorregotti T, Cipriano AC, Cruz FC, Mascarenhas DC, Rodgers RJ, Nunes-de-Souza RL. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. *Behav Brain Res* 2018; 338: 159-65.

Spencer SS. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? *The Lancet Neurology* 2002; 1: 375-82.

Sternberg EM, Wedner HJ, Leung MK, Parker CW. Effect of serotonin (5-HT) and other monoamines on murine macrophages: modulation of interferon-gamma induced phagocytosis. *J Immunol* 1987; 138: 4360-5.

Stockard CR, Papanicolaou GN. The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig—with a study of its histological and physiological changes. *American Journal of Anatomy* 1917; 22: 225-83.

Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—

postmortem evidence for decreased serotonin activity. *Journal of Neuroscience* 1998; 18: 7394-401.

Stryer L (1990) *Biochemie*. Spektrum

Suemaru K, Yoshikawa M, Aso H, Watanabe M. Environmental enrichment alleviates cognitive and behavioral impairments in EL mice. *Epilepsy Behav* 2018; 85: 227-33.

Sufka KJ. Conditioned place preference paradigm: a novel approach for analgesic drug assessment against chronic pain. *Pain* 1994; 58: 355-66.

Sun M, Huang P, Wang Y, Chen W. Anticonvulsants lamotrigine and riluzole disrupt maternal behavior in postpartum female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2018; 168: 43-50.

Sutula TP. Mechanisms of epilepsy progression: current theories and perspectives from neuroplasticity in adulthood and development. *Epilepsy Res* 2004; 60: 161-71.

Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanaki MV, Der MG, Fazilat S, Kopylev L, Herscovitch P, Eckelman WC, Theodore WH. PET imaging of 5-HT_{1A} receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60: 749-56.

Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 130: 267-78.

Trindade-Filho EM, de Castro-Neto EF, Carvalho RdA, Lima E, Scorza FA, Amado D, da Graça Naffah-Mazzacoratti M, Cavalheiro EA. Serotonin depletion effects on the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Research* 2008; 82: 194-9.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 2015; 56: 1515-23.

Tripathi SJ, Chakraborty S, Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Inactivation of basolateral amygdala prevents chronic immobilization stress-induced memory

impairment and associated changes in corticosterone levels. *Neurobiol Learn Mem* 2017; 142: 218-29.

Tripathi SJ, Chakraborty S, Srikumar BN, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS. Prevention of chronic immobilization stress-induced enhanced expression of glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex by inactivation of basolateral amygdala. *J Chem Neuroanat* 2019; 95: 134-45.

Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of psychosomatic research* 2002; 53: 865-71.

Tuchscherer M, Manteuffel G. Die wirkung von psychischem stress auf das immunsystem. Ein weiterer grund für tiergerechte haltung (übersichtsreferat). *Archives Animal Breeding* 2000; 43: 547-60.

Turner PV, Baar M, Olfert ED. Laboratory animal medicine—needs and opportunities for Canadian veterinarians. *The Canadian Veterinary Journal* 2009; 50: 257.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9: 315-35.

Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1953; 175: 157-61.

Twele F, Schidlitzki A, Tollner K, Loscher W. The intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy: Lack of electrographic seizure-like events in sham controls. *Epilepsia Open* 2017; 2: 180-7.

Umpierre AD, Remigio GJ, Dahle EJ, Bradford K, Alex AB, Smith MD, West PJ, White HS, Wilcox KS. Impaired cognitive ability and anxiety-like behavior following acute seizures in the Theiler's virus model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2014; 64: 98-106.

Vanhoutte PM, Humphrey PP, Spedding M. X. International Union of Pharmacology recommendations for nomenclature of new receptor subtypes. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 1-

2.

Vazdarjanova A, Cahill L, McGaugh JL. Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 709-18.

Vitalis T, Ansorge MS, Dayer AG. Serotonin homeostasis and serotonin receptors as actors of cortical construction: special attention to the 5-HT_{3A} and 5-HT₆ receptor subtypes. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 93.

Vitalo AG, Gorantla S, Fricchione JG, Scichilone JM, Camacho J, Niemi SM, Denninger JW, Benson H, Yarmush ML, Levine JB. Environmental enrichment with nesting material accelerates wound healing in isolation-reared rats. *Behav Brain Res* 2012; 226: 606-12.

Voikar V, Koks S, Vasar E, Rauvala H. Strain and gender differences in the behavior of mouse lines commonly used in transgenic studies. *Physiol Behav* 2001; 72: 271-81.

Wada JA, Sata M. Generalized convulsive seizures induced by daily electrical stimulation of the amygdala in cats. Correlative electrographic and behavioral features. *Neurology* 1974; 24: 565-74.

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322-8.

Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinckel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G, Bader M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell* 2003; 115: 851-62.

Wang L, Song L, Chen X, Suo J, Ma Y, Shi J, Liu K, Chen G. microRNA-139-5p confers sensitivity to antiepileptic drugs in refractory epilepsy by inhibition of MRP1. *CNS Neurosci Ther* 2019;

Weiskrantz L. Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 1956; 49: 381-91.

Weiss SM, Lightowler S, Stanhope KJ, Kennett GA, Dourish CT. Measurement of anxiety in transgenic mice. *Rev Neurosci* 2000; 11: 59-74.

Welzel L, Schidlitzki A, Twele F, Anjum M, Loscher W. A face-to-face comparison of the intra-amygdala and intrahippocampal kainate mouse models of mesial temporal lobe epilepsy and their utility for testing novel therapies. *Epilepsia* 2020; 61: 157-70.

Westheide W, Rieger R (2007) *Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. 1996. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York

Williams AC. Facial expression of pain: an evolutionary account. *Behav Brain Sci* 2002; 25: 439-55; discussion 55-88.

Williams ACdC, Craig KD. Updating the definition of pain. *Pain* 2016; 157: 2420-3.

Wolfensohn S, Hawkins P, Lilley E, Anthony D, Chambers C, Lane S, Lawton M, Robinson S, Voipio HM, Woodhall G. Reducing suffering in animal models and procedures involving seizures, convulsions and epilepsy. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2013; 67: 9-15.

Wulsin AC, Franco-Villanueva A, Romancheck C, Morano RL, Smith BL, Packard BA, Danzer SC, Herman JP. Functional disruption of stress modulatory circuits in a model of temporal lobe epilepsy. *PLoS One* 2018; 13: e0197955.

Zhou QG, Hu Y, Wu DL, Zhu LJ, Chen C, Jin X, Luo CX, Wu HY, Zhang J, Zhu DY. Hippocampal telomerase is involved in the modulation of depressive behaviors. *J Neurosci* 2011; 31: 12258-69.

Zimmermann R, Hulsmeier V, Sauter-Louis C, Fischer A. Status epilepticus and epileptic seizures in dogs. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 970-6.

XI. ANHANG

1. Geräte

Geräte	Hersteller
Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Cisco Small Business Switch	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Beobachtungsaquarien	Domes Aquaristik, München
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim
EEG-Ableitungs- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München
EEG-Ableitung (Powerlab 4/30 und 8/30, Animal BioAmp)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Ein-Kanal-Verstärker 8/30, Animal BioAmp	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Feinwaage bis 0,005 g	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Gekühlte Mikro-Ultrazentrifuge „SORVALL® RC-M150GX“	Sorvall Products L.P., Newton, Connecticut, USA
Glaspotter	neoLab®, Heidelberg
Kinematica Homogeniser Polytron® PT10-35	Kinematica, Littau, Schweiz
Kleinschüttler „IKA-VIBRAX-VRX“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Luxmeter	(Light meter, MS 1300, Voltcraft®) Conrad Electronic SE, Hirschau
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	Heidolph, Schwabach
Mikro 200 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikro-Ultrazentrifuge M150 GX	Sartorius AG, Göttingen
Mikroskop Hund H 600 Wilo-Prax PL	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikro-Ultrazentrifuge	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
Personal Computer	Diverse
REGLO Quick, Schlauchpumpe mit variabler Drehzahl	Ismatec Laboratoriumstechnik GmbH, IDEX Health & Science, Wertheim-Mondfeld
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stimulatoreinheit (HSE Type 215E12 SV1)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Switchbox (HSE Type 215E12)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Tierkäfige Makrolon Typ III und Wasserflaschen	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Tischzentrifuge „Rotina 35R“	Fa. Hettlich, Tuttlingen
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden

2. Software

Software	Hersteller
EEG Software (Chart 7 für Windows)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EthoVision, Version 8.5, Version 12.0	Noldus, Wageningen, Niederlande
Graph Pad Prism (Version 5.04)	GraphPad, San Diego, CA, USA
Image J (Version 1.51)	Free online Software (https://imagej-nih-gov.emedien.ub.uni-muenchen.de/ij)
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Stereo Investigator Version 2017	MBF Bioscience, Williston, USA

3. Lösungen und Substanzen

Lösungen

Chloralhydrat

- 440 mg Chloralhydrat
- in 10 ml 0,9 prozentiger NaCl-Lösung lösen

8-prozentiges Paraformaldehyd

- 800 ml Aqua dest. auf 60–70 °C erhitzen
- 80 g Paraformaldehyd zugeben
- Tropfenweise 6 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird
- abkühlen lassen
- mit Aqua. dest. auf 1000 ml auffüllen
- anschließend filtrieren

4-prozentiges Paraformaldehyd

- 200 ml 8-prozentiges Paraformaldehyd
- mit 200 ml 0,2 M Phosphatpuffer verdünnen

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

- 45,43 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei)
- 12,48 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- In Aqua dest. Lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9-prozentige Salzlösung (pH 7,6)

- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl zugeben
- Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,15 g Na₂HPO₄
- 0,2 g KH₂PO₄
- mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen

Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (pro Gehirn)

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

Substanzen

Substanz	Hersteller
Albumin Fraktion V (bovines Serumalbumin)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Antiprotease	Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma, Steinheim
Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1 : 200 000)	JENAPHARM®, Mibe GmbH, Jena
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
DAB (Diaminobenzidin)	Merck KGaA, Darmstadt
Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Goat Normal-Serum	Normal Goat Serum, Burlingame, California USA
Meloxicam (Metacam®)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein

Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen
Paladur®	Heraeus Kulzer, Hanau
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pentobarbital (Narcofen®)	Merial GmbH, Hallbergmoos
Streptavidin-FITC	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim
Stickstoff (flüssig)	Linde AG Gases Division, Pullach
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt

Antikörper

ab227165	Abcam, Cambridge, UK
Vector BA-1000	Vector Laboratories, Burlingame, California USA

Verwendete Kits

Corticosterone rat/mouse ELISA, DEV9922	Demeditec, Kiel, Deutschland
VECTASTAIN® ABC Kits (HRP)	Vector Laboratories, Burlingame, California USA

4. Modifizierter Irwin Score

Parameter des modifizierten Irwin Scores:

1. Körperlage (im Käfig)

- 2 flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus
- 1 teilweise konservierter Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen
- 0 normale Haltung
- +1 starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Ophisthotonus)
- +2 Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden

2. Ptosis (Lidschluss)

- 0 Augenlider geöffnet
- +1 Augenlid partiell offen
- +2 Augenlider geschlossen

3. Lokomotorische Aktivität

- 2 Keine Aktivität
- 1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten
- 0 normale Aktivität
- +1 erhöhte, kraftvolle, winklige Bewegungen
- +2 Ruheloser Bewegungstyp

4. Berührungsreaktion

- 2 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion
- 1 nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen)
- 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 (Beißneigung während des Hantierens (*Handlings*))

- 0 Keine
- +1 Leichte
- +2 Deutlich

6. Neugier (auf Zeigen eines Objekts hin)

- 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

- 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 Hantierens (Handlings))

- 0 Kein Harnabsatz
- +1 Vorhanden

10. Kotabsatz (während des Hantierens (Handlings))

- 0 Kein Kotabsatz
- +1 Vorhanden
- 11. Lidreflex
- 0 Normal
- +2 Beeinträchtigt

12. Cornealreflex (falls keine Reaktion auf Lidreflex)

- 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 („freezing“)

14. Beckenhöhe

- 1 abgeflacht
- 0 kaum verändert
- +1 etwas erhöht

15. Schwanzhöhe

- 1 Nachschleifen des Schwanzes beim Gehen
- 0 normale Schwanzposition
- +1 Aufgestellter Schwanz (max. 90 ° Winkel) während Ruhe und Aktivitätsperiode, tw. Schwanzschlagen
- +2 Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)

16. Beinrotation (nach außen)

- 0 nicht vorhanden
- +1 leicht
- +2 deutlich

17. Körpertonus (während des Hantierens (Handlings))

- 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

- 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

- 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 wie 3, aber auch während der Ruheperioden

28. Zittern

0 Keine

+2 Vorhanden

29. Zuckungen

0 Keine

+2 Vorhanden

30. Krämpfe

0 keine

+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. Stereotypen

0 keine

+2 vorhanden

Falls die generelle Konstitution der Tiere abweicht:

33. Körpertemperatur

-1 Temperatur von 2 ° C oder mehr gegen die Kontrolle

0 Temperatur normal

+1-Temperatur um 2 ° C oder mehr erhöht wird

5. R-Skripte

5.1. Kreuzkorrelation

```
# load packages, install if you don't have it yet
library("corrplot")
library("Hmisc")

# set working directory
setwd("your working directory")

# load data
d <- read.csv2("your data.csv", header=T)

# have a look at the data
str(d)

# select only the numerical parameters of interest
d <- d[, :NCOL(d)]

# save data as matrix (the correlation function only works with a matrix)
d <- as.matrix(d)

# run the correlation matrix and save as "cor"
cor <- rcorr(d, type="spearman")

# this object contains both the correlation coefficients as well as the p values
cor$r # correlation coefficients
cor$p # p values

# save the correlation coefficients, round the values to two digits
write.csv2(round(cor$r,2), "r_spearman.csv")
```

```
# save the p values, round the values to two digits
write.csv2(cor$P, "p_spearman.csv")

# create the heatmap of the correlation matrix
corrplot(cor$r, method="color", tl.col="black", tl.cex=0.8)
corrplot(cor$r, method="ellipse", tl.col="black", tl.cex=0.8, type="upper")
```

5.2. Hauptkomponentenanalyse (PCA)

```
# load package, install if you don't have it yet

# To install made4:
# if (!requireNamespace("BiocManager", quietly = TRUE))
#   install.packages("BiocManager")
# BiocManager::install("made4")
# install.packages ("caret")

library("made4")
library("caret")
library("adegraphics")

# set working directory
setwd("your working directory")

# load data
d <- read.csv2("your data.csv", header=T)

# save data again for later under a new name
d2 <- d

# check the data
str(d)

d$groups <- paste(d$, "_", d$, sep="")
```

```
# select groups here

d$groups

d <- d[d[,"groups"] %in% c(""),]

# save group naming to be used in PCA

groups <- d[,"groups"]

# select numeric data only

d <- d[,5:NCOL(d)]

str(d)

d2 <- d

# replace missing values with NA

for(i in 1:ncol(d)){

  d[is.na(d[,i]), i] <- mean(d[,i], na.rm = TRUE)

}

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

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

d <- predict(pre.proc, d)

# use the "ord" function to run the PCA

# save the results in "d_ord" which is an object with all PCA results

d_ord <- ord((d), type="pca")

# create two plots for the PCA

plotarrays(d_ord$ord$l1, classvec=groups, ellipse=1)

#s.label(d_ord$ord$co, ppoints.col= "black",plabels = list(box = list(draw = FALSE), optim =
TRUE),plot = T)

s.label(d_ord$ord$co)
```

```
# create temporary data frame with the loadings of the PCA

temp <- sqrt((d_ord$ord$co[,1:2])^2)

# sort the loadings according to PC1
temp <- temp[order(temp[,1], decreasing = T),]

# show the top 10
temp[1:10,]

# sort the loadings according to PC2
temp <- temp[order(temp[,2], decreasing = T),]

# show the top 10
temp[1:10,]

# show the percentage of variance explained
# cumulative over the first five PCs
cumsum(d_ord$ord$eig * 100/sum(d_ord$ord$eig))[1:5]

# non-cumulative over the first five PCs
(d_ord$ord$eig * 100/sum(d_ord$ord$eig))[1:5]

# add the PC1 and PC2 to your original data sheet

# this allows you to use the PCA data in other tests, such as an ANOVA
d2$PC1 <- d_ord$ord$li$Axis1
d2$PC2 <- d_ord$ord$li$Axis2

# One way anova for PC1:
m1 <- aov(PC1~groups, data=d2)
summary(m1)
TukeyHSD(m1)

# One way anova for PC2:
m1 <- aov(PC2~groups, data=d2)
summary(m1)
TukeyHSD(m1)
```

XII. DANKSAGUNG

Dieses Projekt konnte nur durchgeführt werden, weil viele Menschen mich fortlaufend aktiv unterstützt haben. Ich danke meiner Doktormutter Prof. Dr. Heidrun Potschka für das Vertrauen, das sie mir entgegenbrachte, indem sie mir dieses Projekt anvertraute. Danke für das immer offene Ohr bei Fragen und die gute Betreuung während der gesamten Zeit. Durch die Verantwortung, die ich übernommen habe, durch Diskussionen, durch die Möglichkeit, Dinge auszuprobieren und durch das Ermöglichen von der Teilnahme an Fortbildungen habe ich mich persönlich und fachlich weiterentwickelt. Ein herzliches Danke dafür.

Danke an Dr. Roelof Maarten van Dijk, der mich von Anfang an unterstützt und begleitet hat. Ich habe unglaublich viel von dir gelernt, sowohl bei den *in vivo* Aspekten als auch bei der histologischen Auswertung. Besonders die Statistik hast du mir näher gebracht, ohne deine unzähligen Erklärungen wäre es mir nicht möglich gewesen, die riesigen Datensätze, die im Laufe der Studie entstanden sind, auszuwerten. Bei Problemen und Fragen jeder Art konnte ich immer auf dich zählen. Vielen, vielen Dank Maarten!

Ich danke meinen Mitdotorandinnen Ines Koska, Isabel Seiffert, Nina Miljanovic, Verena Buchecker, Marta Nowakowska und Katharina Aulehner für die schöne Zeit, die ich mit euch verbringen durfte und die hilfsbereite und freundschaftliche Gemeinschaft, die sich zwischen uns entwickelt hat. Durch euch werde ich mich an die Doktorandenzeit immer gerne erinnern!

Danke an Dr. Claudia Pace, du hast mir im *in vivo* Bereich viele Methoden erklärt und gezeigt, außerdem danke für Excel-Tricks und aufmunternde Worte!

Danke an Dr. Fabio Gualtieri, für die umfassende Anleitung und Unterstützung während meines VetResearch-Projektes und die vielen guten Tipps und Erklärungen zur Immunhistochemie!

Danke an die wunderbare technische Unterstützung durch Claudia Siegl, Sarah Driebusch, Anke Bettenbrock, Sieglinde Fischlein, Regina Jaufmann und Andreas Kutschka. Ob Einarbeitung im Labor und an den Mikroskopen, Hilfestellungen beim Vorbereiten von was auch immer, Unterstützung beim Kindling oder Soforthilfe bei Softwareproblemen- ihr wart immer zur Stelle und habt mich unterstützt. An dieser Stelle auch nochmal ein Danke an Sara für die permanente Versorgung mit Lesestoff.

Danke an meine Studentin Katharina Schönhoff für die Unterstützung bei den Auswertungen, bei den Färbungen im Labor und nette Gespräche.

Danke an meine Mutter für die immerwährende Unterstützung und das Vertrauen, das du in mich hast. Danke an meinen Bruder Jonas für hilfreiche Gespräche und gemeinsame Mittagspausen 😊 Danke Niko, für deine unglaubliche Geduld und Unterstützung während aller Phasen dieses Projektes.