

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

von

Verena Lisa Buchecker

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

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

von

Verena Lisa Buchecker

aus Rosenheim

München 2021

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

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

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

Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

Meiner Tante Mau

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Epilepsien	3
1.1.	Definition und Bedeutung	3
1.2.	Klassifizierung	4
1.3.	Tiermodelle in der Epilepsieforschung	6
1.3.1.	Intrahippocampales Kainat-Modell.....	7
1.3.2.	(Lithium-) Pilocarpin-Modell	9
1.3.3.	Kindling-Modell	9
2.	Belastungseinschätzung in Tierversuchen	11
2.1.	Ethische Betrachtung von Tierversuchen.....	11
2.2.	Stress und Belastung.....	13
3.	Verhaltensuntersuchungen	15
3.1.	Heimkäfigverhalten	15
3.2.	Wühlverhalten.....	16
3.3.	<i>Social-Interaction-Test</i>	17
3.4.	<i>Open-Field-Test</i>	18
3.5.	<i>Black-and-White-Box-Test</i>	19
3.6.	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	20
3.7.	<i>Saccharin-Präferenz-Test</i>	21
3.8.	<i>Grimace Scale</i>	22
3.9.	<i>Irwin Score</i>	22
4.	Corticosteron.....	23
5.	Sexualzyklus.....	25
6.	(Patho-) physiologische Parameter.....	26
6.1.	Erfassung physiologischer Parameter	26
6.2.	Herzfrequenz und Herzratenvariabilität.....	27
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	31
IV.	MATERIAL UND METHODEN	33
1.	Versuchstiere.....	33
2.	Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell und Telemetriemessungen.....	35
2.1.	Vorversuche	35

2.2.	Elektrodenimplantation und Induktion eines Status epilepticus	36
2.3.	Transmitterimplantation	38
2.4.	Video- und Telemetrieaufzeichnung	39
2.5.	Datenauswertung	40
3.	Verhaltensuntersuchungen	45
3.1.	Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad.....	46
3.2.	<i>Burrowing-Test</i>	47
3.3.	<i>Social-Interaction-Test</i>	47
3.4.	<i>Open-Field-Test</i>	48
3.5.	<i>Black-and-White-Box-Test</i>	48
3.6.	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	49
3.7.	<i>Saccharin-Präferenz-Test</i>	49
3.8.	<i>Grimace Scale</i> und <i>Irwin Score</i>	50
4.	Analyse von Kotproben	51
5.	Bestimmung des Sexualzyklus	51
6.	Auswertung und Statistik	52
V.	ERGEBNISSE.....	53
1.	Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell	53
1.1.	Induktion des Status epilepticus.....	53
1.2.	Chronische Phase	53
2.	Verhaltensuntersuchungen	55
2.1.	Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad.....	55
2.2.	<i>Burrowing-Test</i>	58
2.3.	<i>Social-Interaction-Test</i>	61
2.4.	<i>Open-Field-Test</i>	62
2.5.	<i>Black-and-White-Box-Test</i>	63
2.6.	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	64
2.7.	<i>Saccharin-Präferenz-Test</i>	65
2.8.	<i>Grimace Scale</i> , <i>Irwin Score</i> und Körpergewicht	66
3.	Fäkale Corticosteronmetaboliten	69
4.	Zyklusstand	72
5.	Telemetrie Messungen	73
5.1.	Circadiane Rhythmik der Aktivität	73
5.2.	Herzfrequenz	75
5.3.	Herzratenvariabilität.....	78

6.	Korrelationsanalyse	83
7.	Hauptkomponentenanalyse.....	91
8.	Effektstärke und Forest Plot.....	94
VI.	DISKUSSION.....	99
1.	Identifizierung und Validierung von Parametern zur Belastungseinstufung des chemischen Post-Status-Epilepticus-Modells.....	100
1.1.	Transmitterimplantation und Elektrodenimplantation.....	100
1.2.	Status epilepticus	105
1.3.	Verhaltenstests in der chronischen Phase	109
2.	Schlussfolgerung	112
3.	Limitationen und Ausblick.....	114
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	117
VIII.	SUMMARY.....	119
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	121
X.	ANHANG	149
1.	Geräte.....	149
2.	Software	151
3.	Lösungen, Medikamente und Substanzen.....	151
4.	Modifizierter Irwin Score	155
5.	Effektstärke und Forest Plot.....	160
XI.	DANKSAGUNG	167

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	M	Molare Masse
ANOVA	Varianzanalyse	MEZ	Mitteuropäische Zeit
ap	anterio-posterior	MESZ	Mitteuropäische Sommerzeit
BLA	Basolaterale Amygdala	mg	Milligramm
bpm	Schläge pro Minute	MGS	<i>Mouse Grimace Scale</i>
BWB	Black-and-White-Box	ml	Milliliter
CMS	<i>Composite Measure Scheme</i>	ms	Millisekunde
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon	n	Stichprobenumfang
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
dv	Dorso-ventral	nm	Nanometer
EEG	Elektroenzephalogramm	OF	Open Field
EKG	Elektrokardiogramm	OP	Operation
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	p	Signifikanzniveau
EPM	Elevated-Plus-Maze	PCA	Hauptkomponentenanalyse
FCM	Fäkale Corticosteronmetaboliten	pg/ml	Pikogramm pro Milliliter
GG	Grundgesetz	r	Korrelationskoeffizient
HIP	Hippocampus	RMSSD	<i>root mean square differences of successive R-R intervals</i>
HF/LF	Hoher Frequenzbereich/ niedriger Frequenzbereich	RR-I	Schlag-zu-Schlag-Intervall
HPA-Achse	Hypothalamus- Hypophysen-Nebennieren-Achse	rpm	Umdrehungen pro Minute
HPD	<i>Hippocampal Paroxysmal Discharges</i>	s.c.	Subkutan
HR	Herzfrequenz	SDNN	Standardabweichung der NN-Intervalle
HRV	Herzratenvariabilität	SE	Status epilepticus
HVSW	<i>High Voltage Sharp Wave</i>	SEM	Standardfehler
ILAE	Internationale Liga gegen Epilepsie	SUDEP	Plötzlicher, unerwarteter Tod bei Epilepsiepatienten
i.p.	Intraperitoneal	TierSchG	Tierschutzgesetz
IVETF	<i>International Veterinary Epilepsy Task Force</i>	TierSch-VersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
lat	lateral	TLE	Temporallappenepilepsie

WHO	Weltgesundheitsorganisation	3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem	°C	Grad Celsius

I. EINLEITUNG

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen weltweit (ENGLAND et al. 2012). Laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind derzeit 50 Millionen Menschen erkrankt (WORLD-HEALTH-ORGANIZATION 2018). Aber auch in der Tiermedizin sind vor allem Hunde (KEARSLEY-FLEET et al. 2013), aber auch Katzen (SCHRIEFL et al. 2008) betroffen. Die Epilepsie beschreibt ein Krankheitsbild, welches durch spontane, wiederkehrende epileptische Anfälle charakterisiert ist. Bei Humanpatienten gehen mit der Epilepsie oft auch psychische, soziale und kognitive Begleitscheinungen einher (KANNER 2017). Bis heute ist es nicht möglich den fortlaufenden Prozess der Epileptogenese aufzuhalten (OLIVEIRA et al. 2018). Auch die Arzneimittelresistenz ist eine Herausforderung bei der Therapie von Epilepsien. So zeigt sich bei etwa 30 Prozent aller Patienten keine ausreichende Unterdrückung der Anfälle mit aktuellen Therapieoptionen. In diesem Fall spricht man von pharmakoresistenten Epilepsien.

Das Ziel der Epilepsieforschung ist es daher, alle pathophysiologischen Mechanismen der Erkrankung zu verstehen, um neue Therapieoptionen zur Behandlung und Vorbeugung von epileptischen Anfällen und den damit verbundenen Komorbiditäten zu entwickeln. Tiermodelle mit Ratten und Mäuse stellen dabei in der Entwicklung von antiepileptischen Medikamenten immer noch eine Notwendigkeit dar (LOSCHER 2011).

In der EU-Richtlinie 2010/63/EU und ihrer Umsetzung in nationales Recht durch die Tierschutzversuchstierverordnung wird eine prädiktive Belastungseinstufung der Tiermodelle gefordert. Diese soll evidenzbasiert und objektiv erfolgen, durch einfache und robuste Parameter zu überprüfen sein und das 3R-Prinzip berücksichtigen. Das 3R-Prinzip wurde bereits 1959 von Russell und Burch entwickelt und ist die Grundlage der EU-Richtlinie 2010/63/EU (RUSSELL u. BURCH 1959). „*Replace*“ beschreibt das vollständige Ersetzen von Tierversuchen, „*reduce*“ die Reduzierung der in Tierversuchen verwendeten Tiere und „*refine*“ die Verbesserung des Tierversuchs mit allen dazugehörigen Methoden. Das 3R-Prinzip sieht auch vor, Tiermodelle auszuwählen, mit denen die geringste Belastung der Tiere einhergeht. Um die Belastung eines Tiermodells umfangreich bewerten zu können, müssen geeignete Parameter identifiziert und validiert werden. Dies hat sich die Forschergruppe „Severity Assessment in Animal Based Research“ (DFG FOR 2591, www.severity-assessment.de), gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), zur Aufgabe gemacht. Die Parameter sollen sensitiv und zudem einfach zu erfassen sein. Anhand dieser Parameter sollen dann Empfehlungen für Belastungseinstufungen von ausgewählten Tiermodellen entwickelt werden. In der vorliegenden Dissertation wurden

verhaltensbiologische, biochemische sowie physiologische Parameter zu modellspezifischen Zeitpunkten des intrahippocampalen Kainat-Modells in Mäusen erfasst und evaluiert und auf eine mögliche Korrelation untersucht. Anhand dieser Parameter soll eine evidenzbasierte Belastungseinstufung in diesem Epilepsiemodell ermöglicht werden. Um einen modell- und speziesübergreifenden Vergleich der Belastung der Tiere in Epilepsiemodellen durchzuführen, müssen die angewandten Methoden standardisiert werden. Basierend auf diesen modell- und speziesübergreifenden Ergebnissen soll dann eine Empfehlung für die Priorisierung von Epilepsiemodellen ermöglicht werden. Die identifizierten und validierten Parameter sollen zudem dazu dienen, mögliche *Refinement*-Maßnahmen zu evaluieren, um so das Tierwohl im Sinne des 3R-Prinzips zu steigern.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Epilepsien

1.1. Definition und Bedeutung

Die Epilepsie ist eine der am längsten bekannten Krankheiten in der Geschichte der Menschheit (SCHNEBLE 2013). Das Wort „Epilepsie“ ist abgeleitet vom altgriechischen Wort „epilepsis“ und bedeutet übersetzt „Angriff“ oder „Überfall“. Erste Aufzeichnungen mit Hinweisen auf die Epilepsie stammen bereits von alt-ägyptischen Hieroglyphen und babylonischen Lehrbüchern Mitte des ersten vorchristlichen Jahrtausends (SCHNEBLE 2003). In diesen Texten ist meist von einer göttlichen Krankheit oder auch von einer, von Dämonen hervorgerufenen Krankheit die Rede (SCHNEBLE 2003). Erst Mitte des 19. Jahrhunderts, fast 3000 Jahre später, wurde von KUSSMAUL u. TENNER (1857) in Tierexperimenten nachgewiesen, dass das Gehirn Ausgangspunkt für epileptische Aktivität ist (SCHNEBLE 2013). Im Jahr 2005 veröffentlichte die Internationale Liga gegen Epilepsie (*International League Against Epilepsy*, ILAE) konzeptionelle Definitionen für Anfälle und Epilepsien (FISHER et al. 2005):

- Ein epileptischer Anfall ist ein vorübergehendes Auftreten von Symptomen, ausgelöst durch abnormale übermäßige oder synchrone neuronale Aktivität im Gehirn.
- Die Epilepsie ist eine Störung des Gehirns mit dauerhafter Veranlagung, epileptische Anfälle zu erzeugen, die mit neurobiologischen, kognitiven, psychologischen und sozialen Begleiterscheinungen einher gehen können. Die Definition von Epilepsie erfordert das Auftreten von mindestens einem epileptischen Anfall.

Um Anfälle und Epilepsien im klinischen Alltag besser diagnostizieren zu können, wurde diese konzeptionelle Definition im Jahr 2014 durch eine praktische Definition erweitert (FISHER et al. 2014). Im Zuge dieser Erweiterung wurde die Epilepsie nun als Krankheit, und nicht mehr als Störung des Gehirns definiert. Laut ILAE liegt eine Epilepsieerkrankung nun vor, wenn:

- mindestens zwei nicht provozierte Anfälle im Abstand von mehr als 24 Stunden auftreten oder
- ein nicht provoziertes Anfall auftritt, mit der Wahrscheinlichkeit von mehr als 60 %, dass innerhalb der nächsten zehn Jahre weitere Anfälle auftreten oder
- die Diagnose eines epileptischen Syndroms gestellt wird.

Die Epilepsieerkrankung gilt für Patienten als überstanden, wenn sie das geltende Alter des altersabhängigen Epilepsiesyndroms überschritten haben, sie zehn Jahre anfallsfrei geblieben sind oder fünf Jahre lang keine Antiepileptika eingenommen haben (FISHER et al. 2014).

Auch für die Veterinärmedizin definierte die *International Veterinary Epilepsy Taskforce (IVETF)* eine standardisierte Definition und Klassifikation der Epilepsie (BERENDT et al. 2015). Ein Tier ist dann an Epilepsie erkrankt, wenn mindestens zwei nicht provozierte epileptische Anfälle mit einem Abstand von mehr als 24 Stunden auftreten. Die Epilepsie wird wie auch von der ILAE als Krankheit des Gehirns bezeichnet, charakterisiert durch eine dauerhafte Veranlagung, epileptische Anfälle zu generieren.

Bei Menschen ist die Epilepsie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen (PITKANEN u. LUKASIUK 2009). Derzeit leiden etwa 50 Millionen Menschen an Epilepsie. Etwa 80 Prozent davon stammen aus niedrig entwickelten Ländern (WHO et al. 2005). Jedes Jahr werden etwa fünf Millionen Neudiagnosen gestellt. In hochentwickelten Ländern liegt die Zahl der Neuerkrankten jedes Jahr bei etwa 49 von 100.000 Einwohnern. In niedrig entwickelten Ländern ist die Zahl mit etwa 139 von 100.000 Einwohnern fast dreimal so hoch. Die Ursachen können unter anderem an der medizinischen Infrastruktur oder an einem erhöhten Risiko für endemische Erkrankungen in diesen Ländern liegen (WHO et al. 2005) (<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>).

Epilepsie und epileptische Anfälle sind auch beim Kleintier eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen (CHANDLER 2006). Die Prävalenz der Epilepsie beim Hund liegt bei 0,6 bis 0,75 Prozent (KEARSLEY-FLEET et al. 2013; HESKE et al. 2014). Einige Hundrassen zeigen hierbei eine genetische Prädisposition mit Prävalenzen von bis zu 17 Prozent (HULSMAYER et al. 2015). Bei Katzen in Klinikpopulationen wird die Prävalenz mit 2,1 Prozent angegeben (SCHRIEFL et al. 2008).

1.2. Klassifizierung

Das Krankheitsbild der Epilepsie ist sehr heterogen (PITKANEN et al. 2015). Daher ist für eine individuelle Therapie eine Klassifizierung nötig. Erste Vorschläge für eine Klassifizierung wurden in den 1960er Jahren durch Henri Gastaut (GASTAUT 1964) formuliert. Die ersten Klassifizierungen durch die ILAE erfolgten in den Jahren 1981 und 1985 (ILAE 1981, 1985). Seitdem wurden, durch immer neue Erkenntnisse, laufend Anpassungen vorgenommen. Zuletzt wurde die Klassifizierung der Anfälle und Epilepsien im Jahr 2017 überarbeitet (FISHER et al. 2017; SCHEFFER et al. 2017). Die Klassifikation der Epilepsien findet auf drei Ebenen statt (Abbildung 1). Vor der Diagnose einer Epilepsie müssen allerdings andere mögliche Ursachen ausgeschlossen werden. Mögliche Differentialdiagnosen können unter

anderem konvulsive Synkopen oder Bewegungsstörungen sein (SCHEFFER et al. 2017). Sofern andere Ursachen ausgeschlossen werden können, erfolgt als erste Stufe die Klassifikation der Anfallsformen. Anfälle werden in Anfälle mit fokalem, generalisiertem oder unbekanntem Beginn eingeteilt (SCHEFFER et al. 2017). Die Anfallsformen können noch weitergehend klassifiziert werden (FISHER et al. 2017):

- Fokaler Beginn: bewusst oder nicht bewusst erlebt; motorischer oder nichtmotorischer Beginn; Übergang von fokal zu bilateral tonisch-klonisch
- Generalisierter Beginn: motorisch oder nichtmotorisch (Absence)
- Unbekannter Beginn: motorisch, nichtmotorisch (Absence) oder nicht klassifiziert durch unzureichende Information

Die zweite Stufe ist die Klassifizierung der Art der Epilepsie. Diese Stufe setzt eine Diagnose der Epilepsie nach oben beschriebenen Bedingungen voraus. Die Einteilung in die vier Kategorien der Epilepsie, „fokal“, „generalisiert“, „kombiniert generalisiert und fokal“ und „unklassifiziert“, erfolgt anhand klinischer Befunde und wird durch EEG-Messungen gestützt (SCHEFFER et al. 2017). Im dritten und letzten Schritt steht die Diagnose des Epilepsiesyndroms. Häufig erfolgt die Diagnose anhand der erhobenen Daten in Zusammenhang mit altersabhängigen Faktoren, wie dem Alter bei Beginn, anfallsauslösenden Faktoren und tageszeitlicher Variation (SCHEFFER et al. 2017).

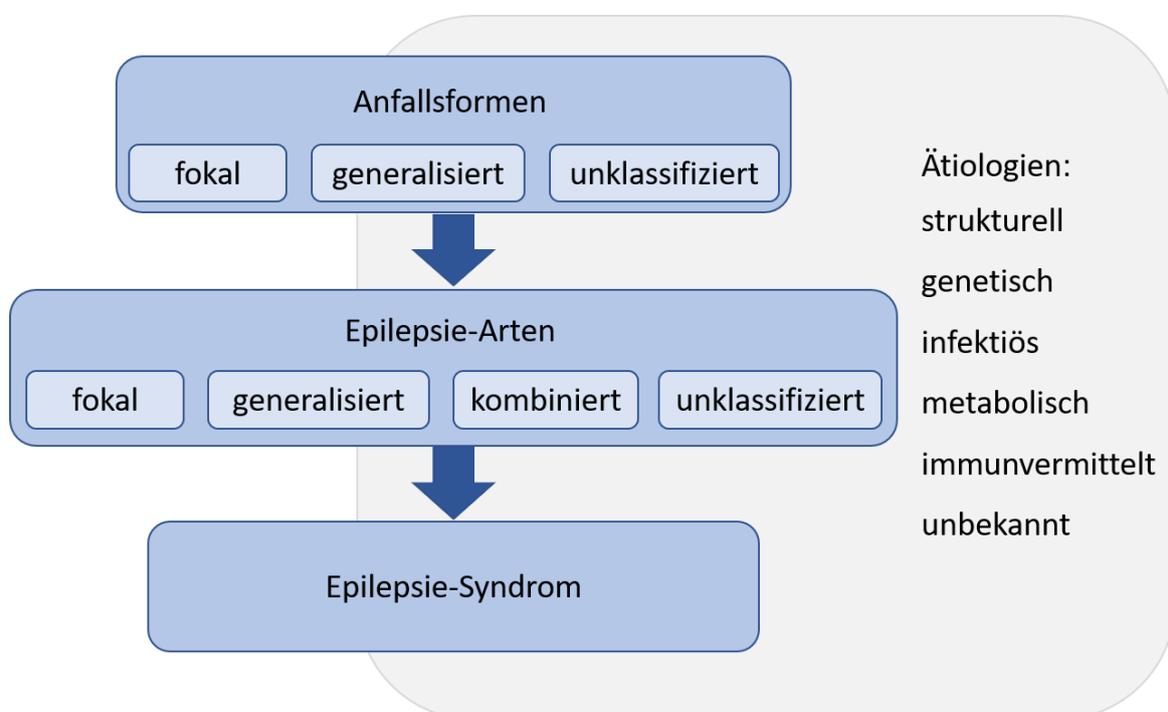


Abbildung 1: Epilepsieklassifikation nach ILAE 2017 (<http://dgfe.org/home/index,selid,7080.html>)

Zusätzlich sollte auf jeder der drei Ebenen immer die individuelle Ätiologie der Epilepsie geklärt und berücksichtigt werden (SCHEFFER et al. 2017):

- Strukturell: Auffälligkeiten in der strukturellen Bildgebung, z.B. nach einem Schlaganfall, einem Trauma oder einer Infektion
- Genetisch: genetische Mutationen, z.B. in einem der Kaliumkanalgene KCNQ2 oder KCNQ3 oder des SCN1A-Gens beim Dravet-Syndrom
- Infektiös: direkte Folge einer bekannten Infektion, wie z.B. Tuberkulose, HIV oder zerebrale Malaria
- Metabolisch: direkte Folge einer bekannten oder angenommenen metabolischen Störung, wie z.B. Porphyrurie, Urämie oder eine Störung des Aminosäurestoffwechsels
- Immun vermittelt: direkte Folge einer autoimmun-vermittelten Entzündung des zentralen Nervensystems
- Unbekannte Ätiologie

Auch in der Tiermedizin teilt die IVETF epileptische Anfälle in fokale und generalisierte Anfälle ein. Ein fokaler Anfall kann sich zudem zu einem generalisierten Anfall entwickeln (BERENDT et al. 2015). Des Weiteren erfolgt eine Einteilung nach der Ätiologie. Hier wird zwischen der idiopathischen und der strukturellen Epilepsie unterschieden. Die idiopathische Epilepsie kann weiter unterteilt werden in die genetische Epilepsie, die Epilepsie mit Verdacht auf einen genetischen Ursprung oder die Epilepsie unbekannter Genese (BERENDT et al. 2015). Bei Hunden ist die idiopathische Epilepsie die am häufigsten diagnostizierte Form (CHANDLER 2006). Die strukturelle Epilepsie wird durch Hirninsulte durch Infektionen oder Traumata ausgelöst (BERENDT et al. 2015).

1.3. Tiermodelle in der Epilepsieforschung

Seit der Beschreibung des ersten Tiermodells in der Epilepsieforschung, dem Elektroschock-Anfallsmodell bei Katzen, bilden Tiermodelle die Grundlage zur Entwicklung neuer Therapieansätze und zur Erforschung der Epileptogenese. Mit Hilfe dieses ersten Modells wurden Arzneimittel auf antikonvulsive Eigenschaften überprüft (PUTNAM u. MERRITT 1937). Bis heute ist es jedoch nicht möglich den fortlaufenden Prozess der Epileptogenese aufzuhalten (OLIVEIRA et al. 2018). Auch die Arzneimittelresistenz ist eine Herausforderung bei der Therapie der Epilepsie. So kann bei etwa 30 Prozent aller Humanpatienten keine ausreichende Unterdrückung der Anfälle mit den aktuellen Therapieansätzen erreicht werden (POTSCHKA u. BRODIE 2012). Zudem sind weiterhin noch nicht alle Pathomechanismen der Epileptogenese und der pharmakoresistenten Epilepsie aufgeklärt. Aufgrund dessen sind geeignete Tiermodelle in der Epilepsieforschung weiterhin unerlässlich

(KANDRATAVICIUS et al. 2014). Bis zu den 1980er Jahren wurden Versuche in Tiermodellen mit verschiedenen Spezies durchgeführt. Heutzutage werden, aufgrund der kurzen Reproduktionszeit und dem einfachen *Handling* der Tiere, vorwiegend Mäuse und Ratten verwendet (GRONE u. BARABAN 2015). Des Weiteren beruhen die Anforderungen an ein Tiermodell in der Epilepsieforschung im Wesentlichen auf drei Eigenschaften (GRONE u. BARABAN 2015): die Ähnlichkeit von Tiermodellen in Bezug auf die Verhaltensweise (*Face validity*), die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen (*Construct validity*) und die Ansprechbarkeit auf die Behandlung (*Predictive validity*). Chronische Epilepsiemodelle, wie das Pilocarpin-Modell, ähneln der Temporallappenepilepsie des Menschen hier am meisten. Es muss immer abgewogen werden, welches Tiermodell sich im Hinblick auf die *Face validity*, *Construct validity* und die *Predictive validity* am besten für die jeweilige Fragestellung der Studie eignet. In der aktuellen Epilepsieforschung werden derzeit vorwiegend chronische Modelle verwendet (GORTER et al. 2015).

Grundsätzlich wird in der tierexperimentellen Forschung zwischen Epilepsiemodellen und Modellen für epileptische Anfälle unterschieden (LOSCHER 2011). Während chronische Epilepsiemodelle durch spontane, wiederkehrende Anfälle gekennzeichnet sind, wird bei Anfallsmodellen akut ein epileptischer Anfall induziert. Der Anfall wird dabei chemisch, z.B. durch Pentylentetrazol, oder elektrisch (*maximal elektroshock seizure*, MES) ausgelöst (LOSCHER 2011). Die spontanen Anfälle der chronischen Modelle werden häufig durch einen elektrisch oder chemisch induzierten Status epilepticus ausgelöst oder sind in transgenen Tieren genetisch bedingt. Chronische Modelle mit spontanen Anfällen werden zur Erforschung der pharmakoresistenten Epilepsie und der Behandlung mit neuen Antiepileptika verwendet. Akute Modelle hingegen zur Auswahl neuer potenzieller Antiepileptika (LOSCHER 2011).

1.3.1. Intrahippocampales Kainat-Modell

Die Kainsäure ((2S,3S,4S)-3-(Carboxymethyl)-4-(prop-1-en-2-yl)pyrrolidin-2-Carbonsäure) ist ein Agonist der ionotropen Glutamatrezeptoren vom Kainat-Subtyp. Sie wurde ursprünglich aus der roten Meeresalge (*Giginea simplex*) in tropischen und subtropischen Gewässern isoliert (TAKEMOTO 1978; WELZEL et al. 2020). Seit NADLER et al. (1978) entdeckten, dass Kainat epileptische Anfälle und neurodegenerative Veränderungen im Hippocampus auslösen kann, die einer Hippocampalsklerose bei der Temporallappenepilepsie beim Menschen ähneln, findet das Modell immer häufiger Anwendung (DUDEK 2006). Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems und ist für die Überführung von Erinnerungen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis zuständig. Er trägt damit zur Gedächtnisfunktion und zu Lernprozessen bei (NISSINEN et al. 2000).

Das intrahippocampale Kainat-Modell gehört zu den chronischen Epilepsie-Modellen. Es wurde erstmals 1982 von FERKANY et al. (1982) nach einer intrahippocampalen Injektion in Mäusen beschrieben. Im intrahippocampalen Kainat-Modell in Mäusen erfolgt die Induktion des Status epilepticus durch eine intrahippocampale Injektion der Kainsäure in die CA1-Region des rechten Hippocampus (GROTICKE et al. 2008). Neben der intrahippocampalen Applikation in der Maus sind auch eine intraperitoneale (BRANDT et al. 2003) und intramygdaloide (WELZEL et al. 2020) Applikationen in Maus und Ratte beschrieben

Die Induktion des Status epilepticus erfolgt meist im Zuge des operativen Eingriffs der Elektrodenimplantation zur Aufzeichnung des EEGs (RIBAN et al. 2002; GROTICKE et al. 2008). Vor der Implantation der Elektrode wird mit Hilfe einer Mikroinjektionskanüle Kainsäure in die CA1-Region des rechten dorsalen Hippocampus injiziert. Nach dem Erwachen aus der Narkose stellt sich bei den Tieren ein mehrstündiger, nicht-convulsiver Status epilepticus ein. Der weitere Verlauf im Kainat-Modell in Mäusen ist sowohl geschlechtsspezifisch, als auch zum Teil stammspezifisch. So ist in weiblichen Mäusen, unabhängig vom Stamm, bereits ab dem ersten Tag nach Ende des Status epilepticus eine elektrographische Anfallsaktivität zu erkennen (TWELE et al. 2016b). Bei weiblichen Tieren wird daher oft auch schon eine oder zwei Wochen nach dem Status epilepticus von einer chronischen Phase gesprochen (LOSCHER et al. 2017). Bei männlichen Mäusen hingegen ist je nach Stamm eine Latenzphase zwischen zwei Tagen und zwei Wochen beschrieben, in der keine Anfallsaktivität detektierbar ist (RIBAN et al. 2002; ARABADZISZ et al. 2005; TWELE et al. 2016b).

Die chronische Phase im intrahippocampalen Kainat-Modell in Mäusen ist durch eine hochfrequente elektrographische epileptiforme Aktivität und vereinzelt auftretende generalisierte Anfälle gekennzeichnet. Bei den Anfallsformen lassen sich dabei *High Voltage Sharp Waves* (HVSWS) und *Hippocampal Paroxysmal Discharges* (HPD) unterscheiden (TWELE et al. 2016a). HVSWS sind durch eine höhere Amplitude und eine niedrigere Frequenz gekennzeichnet, HPDs durch eine niedrigere Amplitude und höhere Frequenz (siehe IV 2.5). Wie Twele und Kollegen in verschiedenen Studien beschreiben (TWELE et al. 2016a; TWELE et al. 2016b), sind HVSWS bei weiblichen Mäusen die vorherrschenden Anfallsaktivitäten, HPDs treten lediglich vereinzelt auf. Bei männlichen Mäusen hingegen können auch frequent HPDs detektiert werden (TWELE et al. 2016b).

In einem früheren Protokoll von RIBAN et al. (2002) wurden HVSWS aufgrund fehlender Verhaltensänderungen nicht als elektrographische Anfallsaktivität, sondern nur als prä- oder interiktale Aktivität eingeordnet. HPDs galten hier als die typischen Anfälle in diesem Modell (RIBAN et al. 2002; MAROSO et al. 2011). Im Gegensatz dazu klassifizieren neuere Studien HVSWS nun meistens auch als elektrographische Anfälle (TWELE et al. 2016b).

1.3.2. (Lithium-) Pilocarpin-Modell

Ein weiteres häufig verwendetes Post-SE-Modell ist das Pilocarpin-Modell. Das Pilocarpin-Modell bei Ratten und Mäusen wurde erstmals von Turski und Kollegen beschrieben (TURSKI et al. 1983; TURSKI et al. 1984). Pilocarpin ist ein Parasympathomimetikum und wirkt als Agonist am muskarinergen Acetylcholinrezeptor M1 (HAMILTON et al. 1997). Das Pilocarpin-Modell findet sowohl bei Mäusen, als auch bei Ratten Anwendung.

Im Pilocarpin-Modell wird der Status epilepticus durch die einmalige systemische Applikation von Pilocarpin ausgelöst. Eine Prämedikation mit dem Antagonisten Lithium-Methylscopolamin zwölf Stunden vor der Pilocarpin-Applikation hebt die periphere cholinerge Wirkung von Pilocarpin auf und potenziert die konvulsive Aktivität (BRANDT et al. 2016). So kann eine geringere Dosis an Pilocarpin eingesetzt werden, was nachweislich die Mortalität in diesem Modell senkt (WOLF et al. 2016). Die hohe Mortalität von bis zu 60 Prozent in diesem Modell ist einerseits durch perakute Todesfälle während des Status epilepticus und andererseits durch das hochgradig gestörte Allgemeinbefinden der Tiere nach dem Status epilepticus bedingt.

Im Gegensatz zum Kainat-Modell ist im Pilocarpin-Modell eine klare Latenzphase erkennbar, in der keine Anfälle auftreten. Diese Latenzphase mündet in eine chronische Phase, die durch spontane wiederkehrende Anfälle gekennzeichnet ist (CURIA et al. 2008).

1.3.3. Kindling-Modell

Ein weiteres häufig verwendetes Modell der Temporallappenepilepsie (TLE) ist das Kindling-Modell (RUSSELL u. BURCH 1959; KANDRATAVICIUS et al. 2014). Die Tiere werden in diesem Modell täglich elektrisch stimuliert, um Anfälle zu induzieren. Hierfür werden den Tieren zuvor Tiefenstimulationselektroden in die gewünschten Zielregionen, wie etwa die Amygdala oder den Hippocampus, implantiert. Über diese Elektroden werden dann kontrolliert Anfälle durch elektrische Stimulation induziert. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe wurden die beiden Lokalisationen und mögliche Auswirkungen miteinander verglichen (BOLDT et al. 2021).

Beim Kindling-Modell kommt es zum sogenannten „Kindling-Effekt“, einer progressiven Erhöhung der Erregbarkeit des Gehirns (SATO et al. 1990). Tiere zeigen bei den ersten Stimulationen meist nur fokale Anfälle. Die fokalen Anfälle gehen später in generalisierte Anfälle über (GODDARD 1983). Die Anzahl der Stimulationen bis zum Auftreten generalisierter Anfälle, kann dabei auch von der Lokalisation der implantierten Tiefenstimulationselektrode abhängen (BOLDT et al. 2021). Da bei den Kindling-Modellen,

im Gegensatz zu Epilepsieerkrankungen bei Humanpatienten, keine spontanen Anfälle auftreten, ergeben sich allerdings diverse Limitationen des Modells für die humane TLE (LOSCHER 2017). Ein Vorteil ist allerdings die hohe Reproduzierbarkeit der molekularen Veränderungen neuronaler Schaltkreise. Das Modell eignet sich daher zur Untersuchung der Epileptogenese-Mechanismen (KANDRATAVICIUS et al. 2014). Ein weiterer wichtiger Vorteil ist eine niedrigere Mortalitätsrate beim Kindling-Modell bei Ratten im Vergleich zu Post-SE-Modellen (LIDSTER et al. 2016).

Weitere Kindling-Modelle sind das chemische Kindling und das korneale Kindling. Korneales Kindling beschreibt wiederholte bilaterale transkorneale elektrische Stimulationen. Beim chemischen Kindling werden Chemokonvulsiva, wie z.B. Pentylenetetrazol wiederholt injiziert. Das Kindling-Modell dient als Modell für primär generalisierte Anfälle (LOSCHER 2011).

2. Belastungseinschätzung in Tierversuchen

2.1. Ethische Betrachtung von Tierversuchen

Im Jahr 2019 wurden in Deutschland rund zwei Millionen Wirbeltiere und Kopffüßer in Tierversuchen eingesetzt. Mäuse stellen dabei mit 65 Prozent den größten Anteil dar (<https://www.bmel.de/DE/themen/tiere/tierschutz/versuchstierzahlen2019.html>) und sind insgesamt die am häufigsten verwendeten Labortiere (BAUMANS 2005). In Relation mit allen verwendeten Tieren machen diese Zahlen jedoch nur 0,26 Prozent aus. 99,15 Prozent aller Versuchstiere werden hingegen für die Produktion von Lebensmitteln verwendet. Siebenundvierzig Prozent der verwendeten Versuchstiere wurden für die Grundlagenforschung eingesetzt. Die Grundlagenforschung bringt immer neues medizinisches und naturwissenschaftliches Wissen. Trotzdem wird die Verwendung von Versuchstieren in der biomedizinischen Forschung stetig diskutiert. Um diese Tiere besonders zu schützen, wurden daher Gesetze erlassen. So wurde im Jahr 2002 der Tierschutz als Staatsziel in Artikel 20a im Grundgesetz verankert, um den Tierschutz verfassungsrechtlich abzusichern. Da der Tierschutz nun als Grundrecht der Forschungsfreiheit gleichgestellt ist (BORCHERS u. LUY 2009), ist es notwendig, Tierversuche eingehend zu prüfen. Jeder Wissenschaftler ist seither in der Pflicht, sicherzustellen und darzulegen, dass der Nutzen des Versuchs die Schmerzen, Leiden und Schäden der Tiere übersteigt (BAUMANS et al. 1994)

Für die Versuchstierkunde im Speziellen umfassen die Gesetze vor allem das Tierschutzgesetz (TierSchG), die Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV) und die EU-Richtlinie 2010/63. § 1 des TierSchG richtet sich somit an die „Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf“ (TIERSCHG). Damit liegt die Verantwortung beim Menschen, die Tiere zu schützen. In § 1 heißt es zudem, „[...] es ist verboten, einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zuzufügen“ (§ 1, TierSchG, 2006). Eine genaue Definition des vernünftigen Grundes wird hier jedoch nicht angegeben. Für Tierversuche muss dieser „vernünftige Grund“ jedoch belegt werden. Daher ist in jedem Tierversuchsantrag zu bestätigen, dass keine Alternativmethoden zur Verfügung stehen, um das Versuchsziel ohne Versuchstiere zu erreichen. Ist der Tierversuch jedoch unerlässlich, so muss zusätzlich begründet werden, ob der Tierversuch in Bezug auf die „Schmerzen, Leiden und Schäden“, die dem Tier widerfahren könnten, „ethisch vertretbar“ ist (§ 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG). Bei der Abwägung der „ethischen Vertretbarkeit“ spielt die Ethik eine wichtige Rolle (URSULA WOLF 2012). Auf der einen Seite steht das Interesse des Menschen, auf der anderen das Interesse und Wohlbefinden der Tiere. So stellt sich die Frage, ob für neue Erkenntnisse in der Forschung das Tierwohl beeinträchtigt werden

darf. Die ethische Betrachtung unterliegt in diesem Zusammenhang drei philosophischen Auffassungen. Die anthropozentrische Auffassung sieht allein den Menschen im Mittelpunkt. Andere nicht-menschliche Geschöpfe gelten hier nur als Objekte. Die pathozentrische Auffassung sieht in der Leidensfähigkeit eines Lebewesens das Gebot zu besonderem Schutz (URSULA WOLF 2012). Der Biozentrismus sieht alle Lebewesen als Mitglied einer moralischen Gesellschaft (URSULA WOLF 2012).

Letztendlich liegt das Wohlbefinden der Tiere somit in der Entscheidungsbefugnis des Menschen. Gesetzliche Rahmenbedingungen für diese Entscheidungsbefugnis gibt die EU-Richtlinie 2010/63/EU „Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ (EUROPEAN-UNION 2010). Diese Richtlinie basiert dabei auf der Umsetzung des Prinzips der „3R“. Das 3R-Prinzip wurde erstmals von William Russell und Fox Burch beschrieben (RUSSELL u. BURCH 1959). Oberstes Ziel ist es, Tierversuche durch alternative Methoden zu ersetzen (*Replacement*). Ist dies nicht möglich, müssen die für den Tierversuch verwendeten Tierzahlen auf ein Minimum reduziert werden (*Reduction*). Dies erfolgt durch statistische Optimierung und die Auswahl geeigneter Tiermodelle. Zusätzlich muss die Durchführung des Tierversuches in Bezug auf Haltungsbedingungen und angewandte Methoden und im Sinne des Tierwohls optimiert werden (*Refinement*) (SYKES et al. 2012).

Die Richtlinie 2010/63/EU fordert außerdem eine Belastungseinschätzung der Tierversuche in folgende vier Schweregrade: „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“ (Schweregrad 1), „mittel“ (Schweregrad 2) oder „schwer“ (Schweregrad 3). Tierversuche, in denen die Belastung der Tiere mit „schwer“ eingestuft wird, dürfen laut Richtlinie allerdings nicht durchgeführt werden, wenn die angewandten Verfahren, die starke Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste verursachen, zudem lang anhalten und nicht gelindert werden können. Für die Einordnung eines Modells in einen der genannten Schweregrade hat die Europäische Kommission zusätzlich das „Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung)“ veröffentlicht. Das Dokument über „Beispiele zur Veranschaulichung des Prozesses der Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung), der täglichen Bewertung und der Bewertung des tatsächlichen Schweregrads“ dient ebenfalls als Hilfestellung zur Dokumentation des Schweregrads (EUROPEAN-UNION 2010).

Im Jahr 2013 wurde das 3R-Prinzip durch die Tierschutzversuchstier-Verordnung (TierSchVersV) in deutsches Recht umgesetzt (TIERSCHUTZ-VERSUCHSTIERVERORDNUNG 2013). So sieht § 31 vor, dass in jedem Antrag wissenschaftlich begründet dargelegt werden muss, in welchen Schweregrad der Versuch eingestuft wird (§ 31 Abs. 1 Nr. 2b; TierSchVersV). Diese Einstufung sollte evidenzbasiert und modellspezifisch erfolgen (LIDSTER et al. 2016). Die Umsetzung des 3R-Prinzips ist essenziell und muss auch im

täglichen Einsatz stattfinden. Jede Methodik sollte daher stets kritisch überdacht werden, um immer bessere Methoden zu identifizieren und validieren.

2.2. Stress und Belastung

Nur wenn es keine adäquate Alternative gibt, dürfen Tierversuche durchgeführt werden. Um die Belastung der Versuchstiere bewerten zu können, müssen Wissenschaftler, die mit Tieren arbeiten, jederzeit in der Lage sein, das Wohlbefinden und den Gemütszustand des Tieres zu erkennen und zu beurteilen (BAUMANS et al. 1994). Die Einschätzung des Gemütszustandes eines Tieres stellt dabei immer nur eine Annäherung und nie eine Erfassung des affektiven Zustands dar (BAUMANS 2005). Um verschiedene Methoden zur Belastungseinstufung anwenden zu können, ist es wichtig alle physiologischen Hintergründe von Reaktionen auf Stress zu verstehen.

Im Körper sind auf physiologischer Ebene zwei Systeme für die Anpassung der Körperfunktionen auf Stress verantwortlich, das autonome Nervensystem und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse). Das autonome Nervensystem bzw. der Sympathikus reagiert unter anderem mit einer Erhöhung von Körpertemperatur, Blutdruck, Herzfrequenz und Blutglukose (HERCK 1994). Die HPA-Achse wird durch die Ausschüttung verschiedener Hormone, wie Corticosteron, Adrenalin, Adrenocorticotropin (ACTH), oder Insulin aktiviert (HERCK 1994).

Als Stressoren gelten sowohl Umwelteinflüsse, als auch Reize, die eine Imbalance der Homöostase im Organismus auslösen können (MOSTL u. PALME 2002). Homöostase beschreibt die selbstregulierte Aufrechterhaltung von dynamischen Systemen, wie beispielsweise des Hormonhaushaltes. Allostase bezeichnet den Mechanismus die Homöostase des Körpers auch bei äußerer Beeinflussung durch Stressoren aufrechtzuerhalten (MCEWEN 1998). Die Belastung, die auf ein Tier einwirkt, hängt vor allem von der Vorhersehbarkeit des Stressors ab. Es kann hier zwischen physischen (systemischen) und psychischen (emotionalen) Stressoren unterschieden werden. Diese beiden Stressoren können sich auch in der Intensität, der Dauer und der Kontrollierbarkeit unterscheiden. Akute Stressreaktionen können beispielsweise notwendig sein, das Überleben der Art zu sichern. Dauert die Stressreaktion jedoch länger an, kann dies zu chronischem Stress führen. Weiterhin kann bei Stress zwischen positivem Stress (Eustress) und negativem Stress (Distress) unterschieden werden (SELYE 1975). Eustress dient der Erfüllung von Zielen. Distress hingegen kann zu einer frustrierenden Situation des Scheiterns führen (SELYE 1975). Um die Situation zu bewältigen, werden nahezu alle verfügbaren Ressourcen aufgebraucht. Distress stellt daher eine über dem normalen Stressniveau liegende Belastung

für das Tier dar (BAUMANS et al. 1994). Die dauerhafte Belastung des Tieres beeinträchtigt dessen Wohlbefinden und ist daher im Sinne des 3R-Prinzips zu vermeiden.

3. Verhaltensuntersuchungen

3.1. Heimkäfigverhalten

Die Aktivität der Tiere im Heimkäfig kann durch die Beurteilung des Nestbauverhaltens und des Nestverschmutzungsgrads ermittelt werden (JIRKOF 2014). Im Gegensatz zu Ratten zeigen Mäuse von Natur aus eine hohe Nestbauaktivität (LISK et al. 1969). Für kleine Nagetiere ist der Nestbau einerseits wichtig zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, andererseits für die Reproduktion und zum Schutz vor Raubtieren (DEACON 2006a). Jede Änderung dieses Verhaltens kann daher auf Veränderungen der Tiere oder ihrer Umwelt hindeuten (GASKILL et al. 2013). Als Nestmaterial dienen häufig *Nestlets*, 5 x 5 cm große gepresste Baumwollquadrate. Zur Beurteilung des Nestbaus mit den *Nestlets* als Nestmaterial wurden verschiedene fünf- oder sechs-stufige Scores verwendet. So beschreibt DEACON (2006a) das Nestbauverhalten mit fünf Scores:

- Score 1: Die Nestlets sind fast unberührt (mehr als 90 % sind intakt).
- Score 2: Die Nestlets sind zum Teil bearbeitet (50 – 90 % sind intakt).
- Score 3: Der Großteil der Nestlets ist bearbeitet, aber meist noch kein identifizierbares Nest: weniger als 50 % sind intakt, aber weniger als 90 % des Materials befindet sich in einem Viertel des Käfiges
- Score 4: Ein identifizierbares, aber noch flaches Nest: mehr als 90 % der Nestlets sind bearbeitet, das Material befindet sich in einem Viertel des Käfiges, weniger als 50 % der Wände des Nests sind höher als eine zusammengerollte Maus
- Score 5: Ein (nahezu) perfektes Nest: mehr als 90 % der Nestlets sind bearbeitet, das Nest ist ein Krater, mehr als 50 % der Wände des Nests sind höher als eine Maus

In verschiedenen Tiermodellen wurde das Nestbauverhalten bereits als Indikator für das Wohlbefinden von Mäusen verwendet (JIRKOF 2014). So zeigten beispielsweise Mäuse postoperativ ein reduziertes Nestbauverhalten, je weniger Schmerzmedikation die Tiere erhielten (JIRKOF et al. 2013a). Auch Mäuse mit Läsionen im Hippocampus und im präfrontalen Cortex zeigten ein reduziertes Nestbauverhalten (DEACON et al. 2002; DEACON et al. 2003).

Zusätzlich zur Nestkomplexität kann auch der Nestverschmutzungsgrad beurteilt werden. VAN LOO u. BAUMANS (2004) beschreiben mit dem *Level of Soiling*, ob und wie stark ein Nest mit Kot oder Urin verschmutzt ist. Mit Hilfe eines dreistufigen Scores wird der Nestverschmutzungsgrad von nicht verschmutzt bis stark verschmutzt bewertet.

3.2. Wühlverhalten

Bei Mäusen gilt das Wühlverhalten, ebenso wie das Nestbauverhalten, als Wohlfühlverhalten und gehört zu den Verhaltensweisen, die bei Stress oder anderen belastenden Situationen als erstes reduziert oder eingestellt werden (JIRKOF 2014). Bei Menschen spricht man bei solchen Aktivitäten, die nach einer Beeinträchtigung als erstes eingestellt werden, von „Aktivitäten des täglichen Lebens“ (*activity of daily living*, ADL) (MARTIN et al. 2017). Ein spontanes Wühlverhalten wird bei Mäusen daher als Indikator für das Wohlbefinden der Tiere vorgeschlagen (JIRKOF 2014). Mäuse wühlen dabei mit fast jedem angebotenen Substrat, wie mit Einstreu, Futterpellets oder kleinen Tonkugeln (DEACON et al. 2005). Das Wühlverhalten ist dabei jedoch vom „Hoarding“ (DEACON 2006b) und vom „Digging“ mit frischem Einstreu (DEACON 2006d) abzugrenzen. Um das Wühlverhalten der Mäuse zu evaluieren, wird der *Burrowing-Test* durchgeführt. Nach der Bestimmung eines Basalwertes kann der Test mehrfach wiederholt werden, wobei eine Pause von mindestens 48 Stunden empfohlen wird, um einen Leistungsabfall zu verhindern (DEACON 2012). Bei Mäusen wurde das Wühlverhalten mit Hilfe des *Burrowing Tests* als erstes von Deacon und Kollegen im Jahr 2001 beschrieben (DEACON et al. 2001). Mäuse zeigten in dieser Studie ein reduziertes Wühlverhalten nachdem sie mit der Prionenkrankheit Scrapie infiziert wurden. Auch in anderen Tiermodellen gab reduziertes Wühlverhalten Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere. So wurde der *Burrowing-Test* nach einer Laparotomie mit verschiedenen Schmerzmedikationen und bei Colitis durchgeführt (JIRKOF et al. 2010; JIRKOF et al. 2013b). Zusätzlich konnte ein reduziertes Wühlverhalten als Folge von Läsionen im Hippocampus und im präfrontalen Cortex detektiert werden (DEACON et al. 2002; DEACON et al. 2003).

In unserer Arbeitsgruppe wurde der *Burrowing-Test* als Indikator für das Wohlbefinden auch im Kindling-Modell in Mäusen untersucht. So zeigten gekindelte Mäuse mit Stimulation des Hippocampus ein signifikant reduziertes Wühlverhalten sowohl in der frühen, als auch in der späten Kindlingphase. Gekindelte Mäuse mit Stimulation der Amygdala zeigten hingegen ein gesteigertes Wühlverhalten in der späten Kindlingphase (BOLDT et al. 2021).

3.3. *Social-Interaction-Test*

Mäuse und Ratten leben in der freien Wildbahn in sozialen Verbänden, um sich gegenseitig Schutz vor Fressfeinden zu gewährleisten (MACDONALD et al. 1999; BERRY et al. 2012). Die Einzelhaltung in vielen Studien entspricht somit nicht den natürlichen Bedürfnissen der Tiere. Folgen von reduziertem oder fehlendem sozialen Kontakt können ein reduziertes Lernverhalten oder eine erhöhte Aggressivität sein (VALZELLI 1973). Ebenso wurde bei sozialer Isolation eine erhöhte Herzfrequenz dokumentiert (CARNEVALI et al. 2017). Im *Social-Interaction-Test* wird die Zeit erfasst, in der die Tiere in direktem sozialen Kontakt stehen (BEERY u. KAUFER 2015). Es ist wichtig, Tiere mit gleichem Geschlecht, gleichem Gewicht und gleichem Alter miteinander zu testen, um ein mögliches Dominanzverhalten zu vermeiden (FILE u. SETH 2003). Die soziale Interaktion wird dabei immer von beiden Interaktionspartnern beeinflusst. Die Qualität der Interaktion wird hierbei in aktives (gegenseitiges Putzen) und passives Verhalten (reiner Körperkontakt) differenziert (FILE et al. 2004). Der *Social-Interaction-Test* als Verhaltenstest zur Untersuchung des Sozialverhaltens von Ratten wurde bereits im Jahr 1978 beschrieben (FILE u. HYDE 1978). Dabei wurden männliche Ratten paarweise in eine Arena platziert. Durch Veränderungen der Lichtintensität konnte beobachtet werden, dass eine erhöhte Lichtintensität die soziale Interaktion reduzierte. Die Untersuchung des Sozialverhaltens eignet sich auch, um angst-assoziiertes Verhalten zu untersuchen (BERRY et al. 2012). Veränderungen im sozialen Verhalten der Tiere können neben angst- und depressions-assoziiertem Verhalten auch ein Hinweis für autismus-ähnliches Verhalten sein (MARIN et al. 2008). Autismus wird auch als mögliche Komorbidität bei Epilepsiepatienten beschrieben (CANITANO 2007). Dabei wird vermutet, dass die veränderten Strukturen des Temporallappens bei chronischen Epilepsieerkrankungen die Ursache für ein verändertes soziales Verhalten sind. Ratten mit spontanen Anfällen können daher ein reduziertes soziales Verhalten gegenüber Artgenossen zeigen (MARIN et al. 2008). So zeigten Ratten im Pilocarpin-Modell eine verringerte soziale Interaktion in der chronischen Phase (DI LIBERTO et al. 2018; KOSKA et al. 2019). Und auch im elektrischen Post-SE-Modell konnte ein reduziertes Sozialverhalten erfasst werden (SEIFFERT et al. 2019). Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse mit generalisierten Anfällen im Kindling-Modell eine erhöhte soziale Interaktion (BOLDT et al. 2021).

3.4. *Open-Field-Test*

Der *Open-Field-Test* zur Untersuchung der Lokomotion und des angst-assoziierten Verhaltens in einem offenen Feld bei Ratten wurde erstmals im Jahr 1934 von Hall erläutert (HALL 1934). Die Ausführungen des *Open Fields* können sich in der Form der Arena (rund, rechteckig oder quadratisch), der Lichtgestaltung (Intensität, Farbe) und der Zeitspanne (2 bis 20 Minuten) unterscheiden (PRUT u. BELZUNG 2003). Zum Testen des Erinnerungsvermögens können den Tieren im *Open-Field* auch unbekannte Gegenstände im *Novel-Object-Recognition-Test* gezeigt werden (LUEPTOW 2017). Die Tiere werden dabei einzeln in die Arena gesetzt und ihr spontanes Verhalten innerhalb eines zuvor festgelegten Zeitraums beobachtet (CRAWLEY 2007). Der Test beruht auf dem Prinzip, dass Nagetiere sich als Beutetiere vermehrt im Wandbereich des Open Fields aufhalten (PRUT u. BELZUNG 2003). Die Tendenz der Tiere im Wandbereich zu bleiben wird als Thigmotaxis bezeichnet und ist ein Hinweis auf angst-assoziiertes Verhalten (SIMON et al. 1994). Eine erhöhte Aufenthaltsdauer im Wandbereich wird dabei als Indikator für angst-assoziiertes Verhalten genutzt (KATZ et al. 1981). Weiter können im *Open-Field-Test* zur Untersuchung der Lokomotion die zurückgelegte Strecke der Tiere, sowie die Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Bereichen erfasst werden. Ein weiterer Parameter der häufig im Open-Field untersucht wird, ist das Aufrichteverhalten der Tiere (*Rearing*). Ein vermehrtes Aufrichten ist ein Hinweis auf eine erhöhte Risikobereitschaft (KATZ et al. 1981).

Der Open-Field-Test wurde auch schon in einigen Epilepsiemodellen verwendet. So konnte eine hyperlokomotorische Aktivität bei Ratten im Pilocarpin-Modell (WOLF et al. 2016; KOSKA et al. 2019) und auch im elektrischen Post-SE-Modell (VAN DIJK et al. 2018; SEIFFERT et al. 2019) erfasst werden. Die erhöhte Aktivität zeigte sich vor allem durch eine signifikant reduzierte Zeit, die die Tiere in Immobilität verbrachten. Auch im Kindling-Modell zeigten Mäuse mit Stimulation des Hippocampus und der Amygdala eine reduzierte Zeit in Immobilität (BOLDT et al. 2021). Im Kainat-Modell in Mäusen und auch im Amygdala-Kindling-Modell in Ratten konnten im Open Field hingegen keine Veränderungen bezüglich der Aktivität und Lokomotion erfasst werden (GROTICKE et al. 2008; MÖLLER et al. 2018).

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

Die *Black-and-White-Box* oder auch *Light-and-Dark-Box* zur Untersuchung von angst-assoziiertem Verhalten in Mäusen und Ratten wurde 1980 zum ersten Mal von CRAWLEY u. GOODWIN (1980) beschrieben. Der Test diente in dieser Studie der Untersuchung des Explorationsverhaltens nach Behandlung von Mäusen mit Anxiolytika. Die Tiere hatten hier fünf Minuten lang die Möglichkeit eine Box mit einer hellen und einer dunklen Kammer zu erkunden. Der Test beruht hierbei auf dem Konflikt der Tiere zwischen dem spontanen Explorationsverhalten in unbekanntem Gebiet und der instinktiven Aversion von Nagern gegen offene und helle Bereiche (BOURIN u. HASCOET 2003). Die Apparatur besteht aus einem kleinen, dunklen Kompartiment und einem etwa doppelt so großen, helleren Kompartiment. Beide Kompartimente sind über einen Steg miteinander verbunden (CRAWLEY u. GOODWIN 1980). Es wird empfohlen diesen Test nur einmal pro Tier über einen kurzen Zeitraum durchzuführen, um das spontane Angstverhalten der Tiere in einer neuen Umgebung zu beobachten. Mit zunehmender Zeit macht sich das Tier mit der Umgebung vertraut (HOLTER et al. 2015). Eine verlängerte Aufenthaltsdauer in der dunklen Box bzw. eine verkürzte Aufenthaltsdauer in der hellen Box wird als verstärktes angst-assoziiertes Verhalten gewertet, ein entgegengesetztes Verhalten als anxiolytisch (WEISS et al. 2000).

Vor der Durchführung des *Black-and-White-Box-Tests* sollte die lokomotorische Aktivität der Tiere in einem *Open Field* bestimmt werden. Eine Hyperaktivität der Tiere könnte sonst fälschlicherweise als gesteigertes Explorationsverhalten verstanden werden und so die Ergebnisse der *Black-and-White-Box* verfälschen (CAMPOS et al. 2013). In Epilepsiemodellen beispielsweise können die Tiere eine Hyperaktivität entwickeln (WULSIN et al. 2018). SANCHEZ (1997) untersuchte mit Hilfe der *Black-and-White-Box* den Einfluss von verschiedenen Stressoren auf das angst-assoziierte Verhalten.

Auch in verschiedenen Epilepsiemodellen wurde bereits das angst-assoziierte Verhalten mittels der *Black-and-White-Box* untersucht. Im Pilocarpin-Modell in Ratten konnte ein geringeres angst-assoziiertes Verhalten erfasst werden (DI LIBERTO et al. 2018). Im Pilocarpin-Modell in Mäusen zeigten die Tiere mit epileptischen Anfällen signifikant weniger Übertritte zwischen den beiden Kompartimenten (GROTICKE et al. 2007). Im Kainat-Modell in Mäusen konnte hingegen kein verändertes Verhalten erfasst werden (GROTICKE et al. 2008). Im Amygdala-Kindling-Modell in Ratten MÖLLER et al. (2018) wurde bei Tieren mit generalisierten Anfällen eine reduzierte Aufenthaltsdauer in der weißen Box festgestellt.

3.6. *Elevated-Plus-Maze-Test*

Das *Elevated-Plus-Maze* (EPM) als Test für angst-assoziiertes Verhalten wurde erstmals im Jahre 1984 beschrieben (HANDLEY u. MITHANI 1984). PELLOW et al. (1985) entwickelte den Test dann weiter, um verschiedene Wirkstoffe auf anxiolytische und anxiogene Effekte zu untersuchen. Der Test basiert dabei auf dem natürlichen Konflikt der Tiere zwischen Explorationsverhalten in unbekanntem Gebieten und der Angst vor ungeschützten Erhöhungen ohne Rückzugsmöglichkeit vor Feinden (FILE et al. 2004). Der plusförmige Aufbau des *Elevated-Plus-Maze* besteht aus je zwei sich gegenüberliegenden Armen. Die zwei geschlossenen Arme sind dabei seitlich mit einer Wand versehen, wohingegen die beiden offenen Arme keine seitliche Begrenzung besitzen. Der Aufbau ist zusätzlich durch einen Sockel erhöht (PELLOW et al. 1985). Es wird empfohlen auch diesen Test nur einmal pro Tier durchzuführen, um ausschließlich das spontane Angstverhalten der Tiere in der neuen Umgebung messen zu können (FILE et al. 2004). Die Parameter, die beim *Elevated-Plus-Maze* von Bedeutung sind und daher immer erfasst werden, sind die Zeit in den geschlossenen und offenen Armen (WALF u. FRYE 2007). Tiere mit einem erhöhten angst-assoziierten Verhalten halten sich vermehrt in den geschlossenen Armen auf. Tiere mit einem risikofreudigen Verhalten halten sich hingegen vermehrt in den offenen Armen auf (FILE et al. 2004). Um die Sensitivität des *Elevated-Plus-Maze* zu erhöhen, wurden zusätzliche Parameter, wie das *Stretching* oder *Head Dips* aufgenommen (BLANCHARD u. BLANCHARD 1989). *Stretching* beschreibt eine gestreckte Körperhaltung vor der Exploration der neuen Umgebung, *Head Dips* das Herunterbeugen des Tieres von den offenen Armen. Beide Parameter gelten als Kriterien der Risikobereitschaft (BLANCHARD u. BLANCHARD 1989).

Im intrahippocampalen Kainat-Modell wurde angst-assoziiertes Verhalten mittels dem *Elevated-Plus-Maze* untersucht. Hier konnte jedoch kein verändertes Verhalten detektiert werden (GROTICKE et al. 2008). Im Pilocarpin-Modell in der Maus konnte hingegen gezeigt werden, dass Tiere mit epileptischen Anfällen ein erhöhtes angst-assoziiertes Verhalten zeigten (MOTO et al. 2018). Auch im elektrischen Post-SE-Modell bei Ratten konnte in der chronischen Phase eine erhöhte Aufenthaltsdauer in den offenen Armen beobachtet werden (BRANDT et al. 2006; VAN DIJK et al. 2018).

3.7. **Saccharin-Präferenz-Test**

Anhedonie ist die Unfähigkeit, Freude oder Lust über angenehme Dinge zu empfinden. Sie ist ein häufiges Symptom bei psychischen Erkrankungen, wie bei Depressionen (KRÜGER 2000; LIU et al. 2018). Depressionen sind eine der häufigsten Komorbiditäten bei Epilepsieerkrankungen bei Menschen (KEEZER et al. 2016; KANNER 2017). Als Ursache für die, mit der Epilepsie assoziierte Depression, wird unter anderem eine Dysregulation von Neurotransmittern, wie GABA, Glutamat oder Serotonin (KANNER 2003), oder eine hippocampale Dysfunktion (GILLIAM et al. 2007) diskutiert. Da man die Emotionen oder den affektiven Status von Nagetieren nicht ermitteln kann, lässt sich die Anhedonie nicht direkt bei Tieren diagnostizieren. Der *Saccharin-Präferenz-Test* wurde für Mäuse entwickelt, um einen Hinweis auf anhedonie-assoziiertes Verhalten der Tiere zu erlangen (KLEIN et al. 2015a). Der *Saccharin-* oder auch *Sucrose-Präferenz-Test* basiert auf der natürlichen Präferenz von Nagetieren für süße Lösungen, wie Saccharin- oder Sucrose-Lösungen, gegenüber reinem Wasser. Ein anhedonie-assoziiertes Verhalten zeigt sich folglich durch eine reduzierte oder gar fehlende Präferenz für die süße Lösung. Bei der Wahl der süßen Lösung muss zudem auch auf den Brennwert geachtet werden. Saccharin ist ein synthetischer Süßstoff und hat nahezu keinen Brennwert. Sucrose hingegen ist der normale Haushaltszucker und hat einen Brennwert von etwa 4 kcal pro Gramm. Um den Konsum unabhängig von der Energiezufuhr zu testen, wird das kalorienarme Saccharin empfohlen (MAZARATI et al. 2007).

Stressbelastung kann die Reaktion auf positive und belohnende Reize, wie das Angebot einer süßen Lösung, einschränken (PIJLMAN et al. 2003). Ein transienter Abfall der Saccharin-Präferenz wurde schon als Folge von physischen und emotionalen Stresssituationen bei Ratten beschrieben (PLAZNIK et al. 1989; PIJLMAN et al. 2003). Auch in Epilepsiemodellen wurde der Saccharin-Präferenz-Test bereits zur Untersuchung von anhedonie-assoziiertem Verhalten bei Labornagern durchgeführt. KLEIN et al. (2015a) untersuchte den Saccharin- und Sucrose-Präferenz-Test in zwei Status-Epilepticus-Modellen bei Mäusen, dem Kainat- und dem Pilocarpin-Modell, und stufte die reduzierte Aufnahme bei beiden Modellen als anhedonie-assoziiertes Verhalten ein. Auch INOSTROZA et al. (2012) untersuchte den Saccharin-Konsum im Lithium-Pilocarpin-Modell und im Kainat-Modell bei Ratten. Ein reduzierter Saccharin-Konsum konnte hier nur in den epileptischen Tieren des Pilocarpin-Modells detektiert werden.

3.8. **Grimace Scale**

Bei Tieren ist die Beurteilung von Schmerzen oft schwierig, da sie ihre Empfindungen nicht verbal mitteilen können. Menschen und Tiere sind jedoch in der Lage über Veränderung der Mimik non-verbal zu kommunizieren. Bereits Darwin erkannte spezifische Änderungen der Gesichtsmimik im Zusammenhang mit Schmerzen (DARWIN 1872). Langford und Kollegen (LANGFORD et al. 2010) nutzten die Erkennung von Schmerzzuständen anhand der Gesichtsmimik und entwickelten den *Mouse Grimace Scale* (MGS). Im MGS werden die folgenden fünf Parameter beurteilt:

- Lidöffnung der Augen
- Wölbung der Nase
- Wölbung der Wangen
- Stellung der Ohren
- Stellung der Tasthaare (Vibrissen)

Jeder einzelne dieser fünf Parameter wird mit einem Score von null (nicht vorhanden), eins (schwach ausgeprägt) oder zwei (deutlich ausgeprägt) bewertet. Der MGS wurde bereits in vielen Studien und unterschiedlichen Modellen zur Schmerzbeurteilung angewandt und als Parameter zur Schmerzerkennung validiert (LEACH et al. 2012; FALLER et al. 2015; MILLER et al. 2016; AKINTOLA et al. 2017). Der *Grimace Scale* wurde mittlerweile auch für verschiedene Tierarten, wie etwa Ratten, Kaninchen, Schafe oder Pferde modifiziert und wird auch bei diesen Tieren zur Schmerzerkennung verwendet (SOTOCINAL et al. 2011; KEATING et al. 2012; DALLA COSTA et al. 2014; HÄGER et al. 2017).

3.9. **Irwin Score**

Der *Irwin Score* ist eine systematische und quantitative Methode zur Beurteilung des Verhaltens und des physiologischen Zustandes der Maus (IRWIN 1968). Er wird zudem genutzt, um Einflüsse verschiedener Testsubstanzen auf das autonome und zentrale Nervensystem zu untersuchen (ROUX et al. 2005; FONCK et al. 2015). Der Score erfasst verschiedene Parameter und beginnt mit der Adspektion der Tiere im Heimkäfig. Anschließend erfolgt die Untersuchung während des *Handlings* der Tiere. Der *Irwin Score* wurde bereits in verschiedenen Epilepsiemodellen (KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019; BOLDT et al. 2021), unter anderem auch im Zusammenhang mit dem Kainat-Modell (GROTICKE et al. 2008) eingesetzt. In der vorliegenden Studie diente der *Irwin Score* in einer modifizierten Version dazu, den Allgemeinzustand der Tiere und mögliche neurologische Defizite zu erfassen. Daher wurden nur Parameter untersucht, deren Analyse nicht

mit zusätzlichem Stress für die Tiere verbunden sind. Die modifizierte Version des *Irwin Scores* ist in Anhang 4 zu finden.

4. Corticosteron

Bei Nagetieren ist das Steroidhormon Corticosteron das wichtigste Glucocorticoid. Es wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde gebildet (SPACKMAN u. RILEY 1978; VON ENGELHARDT et al. 2015). Corticosteron wird als Endprodukt der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse) ausgeschüttet. Durch zahlreiche Funktionen und Reaktionen, unter anderem auch durch Stressreaktionen, wird die Freisetzung des Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) aus dem Nucleus paraventricularis des Hypothalamus induziert (LIGHTMAN 2008). CRH wird anschließend über das hypophysäre Portalvenensystem zur Hypophyse transportiert. Es aktiviert dort die basophilen Zellen und fördert so die Freisetzung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen (LIGHTMAN 2008). Die Freisetzung von ACTH wird zudem durch Adrenalin, welches im Nebennierenmark gebildet wird, gefördert. ACTH gelangt über die Blutbahn zur Nebenniere und fördert hier die Synthese von Glucocorticoiden in der Nebennierenrinde. Nach der Synthese und Freisetzung bindet Corticosteron an Glucocorticoid-Rezeptoren im Hippocampus und hemmt somit durch negative Rückkopplung die Ausschüttung von CRH im Hypothalamus (BELDA et al. 2015).

Durch Stress kommt es zu einer vermehrten Sezernierung von Glucocorticoiden aus der Nebennierenrinde. Diese lösen durch die Kopplung an Rezeptoren Stressreaktionen im Körper aus. Diese führen unter anderem zur Erhöhung des Energiestoffwechsels und der Herzaktivität (KORTE et al. 1993; SAPOLSKY et al. 2000; MOSTL u. PALME 2002). Hält der Stress über einen längeren Zeitraum an, kommt es zur Degeneration und Atrophie von Hippocampusarealen und dadurch zum Ausfall der negativen Rückkopplung (MAHAR et al. 2014). Durch die resultierende Dysfunktion der HPA-Achse kann es zu verschiedenen Veränderungen im Verhalten kommen (MAHAR et al. 2014).

Aber auch ohne Stressor erfolgt physiologisch eine pulsatile Sezernierung der genannten Hormone. Die Ausschüttung von CRH, ACTH und den Glucocorticoidhormonen erfolgt in einem zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus (SCORRANO et al. 2015). Während bei Menschen die Konzentrationen am Morgen am höchsten sind und im Laufe des Tages abfallen (PASCHKE 2019), ist der Verlauf bei Nagetieren durch den inversen Tag-Nacht-Rhythmus verschoben. Die Konzentrationen der Glucocorticoide sind bei Nagetieren am Morgen am niedrigsten und steigen im Laufe des Tages an, bis sie zu Beginn der Dunkelphase ihre Höchstwerte erreichen (SCORRANO et al. 2015).

Corticosteron und seine Metaboliten können unter anderem im Blut, in Exkreten oder in verschiedenen anderen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (MOSTL u. PALME 2002).

Die Messung der Corticosteronkonzentration im Serum stellt eine häufig genutzte Methode dar, um Informationen über das Stresslevel der Tiere zu erhalten. Veränderte Werte sind bereits 15 bis 30 Minuten nach Stressexposition messbar (BELDA et al. 2015). Durch die schnelle Anpassung muss jedoch eine mögliche Beeinflussung der Serumwerte durch das *Handling* der Tiere vor und während der Blutentnahme berücksichtigt werden. Ein regelmäßiges *Handling* der Tiere und die Gewöhnung an den Experimentator kann zur Reduzierung des Stresslevels führen (DEUTSCH-FELDMAN et al. 2015). Auch die Tageszeit spielt durch den zirkadianen Rhythmus eine wichtige Rolle bei der Erfassung der Serumwerte (SCORRANO et al. 2015).

Die Bestimmung der fäkalen Corticosteron-Metaboliten (FCM) stellt im Vergleich zur Serumanalyse eine nicht-invasive Methode dar (TOUMA et al. 2003). Anhand der Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten lässt sich der akute bis mittelfristige Corticosteron-Spiegel erheben (THANOS et al. 2009). Diese Methode kann daher ohne zusätzlichen Stress zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt werden. Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten sind jedoch nach Stressexposition nicht direkt, sondern erst mit einer Verzögerung nachweisbar. Abhängig vom zirkadianen Rhythmus, beträgt die Verzögerung während der Ruhephase etwa zehn Stunden. Durch eine schnellere Darmpassage beträgt sie während der Aktivphase hingegen nur etwa vier Stunden (TOUMA et al. 2003).

5. Sexualzyklus

Der Begriff Sexualzyklus beschreibt alle wiederkehrenden morphologischen und hormonellen Veränderungen eines weiblichen Organismus, die zum Erhalt der Fortpflanzung dienen. Weibliche Mäuse sind polyöstrisch und erreichen ihre Geschlechtsreife mit etwa 28 bis 49 Tagen (WOLFENSOHN u. LLOYD 2008). Ein Zyklus dauert bei Mäusen in der Regel vier bis fünf Tage. Dieser kann in vier verschiedene Phase unterteilt werden (AJAYI u. AKHIGBE 2020):

- Proöstrus: weniger als 24 Stunden
- Östrus: 12 bis 48 Stunden
- Metöstrus: 8 bis 24 Stunden
- Diöstrus: 48 bis 72 Stunden

Die Regulation des Zyklus erfolgt durch die Geschlechtshormone Estradiol, Progesteron und luteinisierendes Hormon. Da diese Sexualhormone Einfluss auf die HPA-Achse haben, dient die Bestimmung des Zyklus als Parameter für die Funktionalität der HPA-Achse (GOLDMAN et al. 2007). Auch in Bezug auf die Untersuchung mit Hilfe der verschiedenen Verhaltenstests, stellt die Zyklusbestimmung eine essentielle Untersuchung dar, da die jeweilige Phase Auswirkungen auf verschiedenen Verhaltensparameter, wie die soziale Interaktion (CHARI et al. 2020) oder das Verhalten im Elevated-Plus-Maze (MARCONDES et al. 2001) haben kann.

Der Zyklusstand einer Maus kann mit Hilfe verschiedener Methoden festgestellt werden (AJAYI u. AKHIGBE 2020). Eine häufig verwendete und akkurate Methode hierfür ist die Bestimmung mittels Vaginalzytologie (CORA et al. 2015; GONZALEZ 2016). Im Proöstrus sind vorwiegend runde und kernhaltige Zellen und vereinzelte verhornte Epithelzellen zu finden. Der Östrus ist gekennzeichnet durch kernlose und verhornte Epithelzellen. Im Metöstrus sind nur mehr wenige verhornte Epithelzellen zu finden. Zudem sind vereinzelt Leukozyten detektierbar. Im Diöstrus hingegen treten hauptsächlich Leukozyten auf. Die visuelle Betrachtung der Vulva stellt eine einfache, schnelle und nicht invasive Methode zur Zyklusbestimmung dar (CHAMPLIN et al. 1973; BYERS et al. 2012). Auch die Untersuchung von Proteinen im Urin kann zur Bestimmung der Zyklusphase herangezogen werden (ACHIRAMAN et al. 2011). Eine weitere Methode ist die Feststellung mit Hilfe des elektrischen Widerstandes (RAMOS et al. 2001). Durch die vermehrt auftretenden verhornten Epithelzellen ist der elektrische Widerstand im Östrus erhöht, im Vergleich zu den anderen Phasen des Zyklus.

6. (Patho-) physiologische Parameter

6.1. Erfassung physiologischer Parameter

Neben Veränderungen in verhaltensbiologischen und biochemischen Parametern kann Stress auch Veränderungen in der Herzfrequenz, der Herzratenvariabilität und der Aktivität hervorrufen (ARRAS et al. 2007). Bei Versuchstieren ist die Erfassung dieser Parameter mit konventionellen Methoden, ohne zusätzlichen Stress zu verursachen, kaum möglich (CESAROVIC et al. 2010; CESAROVIC et al. 2011). In den letzten Jahren wurden daher vermehrt Telemetriesysteme verwendet, um diese Parameter zu erheben (CESAROVIC et al. 2011). Das Wort „Telemetrie“ ist abgeleitet aus den altgriechischen Wörtern „tele“ und „metron“ und bedeutet übertragen „Fernmessung“. Maurey berichtete bereits im Jahr 1869 über erste telemetrische Untersuchungen in Tauben (MACKAY 1968). Seitdem wurde die Telemetrie in der Forschung stetig weiterentwickelt und Ende der 1960er Jahre wurden erste Systeme für kleine Labortiere entwickelt (KRAMER et al. 2001). Im Rahmen der präklinischen Forschung werden Radiotelemetriesysteme zur Erfassung von physiologischen Parametern wie des EEGs, des Elektrokardiogramms (EKG), des Blutdrucks, der Körpertemperatur oder der Aktivität genutzt (CESAROVIC et al. 2011). Zur Erfassung der physiologischen Parameter werden Transmitter in der Regel subkutan oder intraperitoneal implantiert. Während konventionelle Methoden eine Fixierung oder gar eine Anästhesie der Tiere voraussetzen, um Kabel oder Sensoren anzubringen, ermöglicht die Radiotelemetrie die Erhebung der Daten in freibeweglichen Mäusen (CESAROVIC et al. 2011). Die Fixierung oder Anästhesie der Tiere hat nachweislich einen Einfluss auf physiologische Parameter (GROSS u. LUFT 2003; CESAROVIC et al. 2010). Aufgrund dessen wird die Datenerhebung mittels Telemetrie als eine *Refinement*-Methode im Sinne des 3R-Prinzips diskutiert (LUNDT et al. 2016). Speziell für Versuche mit langfristigen Aufzeichnungen wird die Radiotelemetrie als mögliche Alternative erwähnt (LIDSTER et al. 2016). Die Implantation der Transmitter wird aber auch aufgrund des invasiven Eingriffs, des Volumens und des Gewichts des Implantates im Vergleich zur Maus als belastender Eingriff beschrieben (LEON et al. 2004). KUMSTEL et al. (2020) diskutierte kürzlich den invasiven Eingriff in Bezug auf Distress und den fehlenden Vorteil des Transmitters bei der Belastungseinstufung. Dies ist auch in Einklang mit den Ergebnissen aus Studien in Ratten in unserer Arbeitsgruppe (KOSKA et al. 2019). Eine Alternative zur Telemetrie wiederum, könnte die Erfassung von Parametern, wie der Körpertemperatur oder der Atemfrequenz, mittels langwelliger Infrarot-Kamerasysteme sein (CZAPLIK et al. 2017).

6.2. Herzfrequenz und Herzratenvariabilität

Herzschläge entstehen physiologisch über den Sinusknoten im rechten Vorhof des Herzens. Über das autonome Nervensystem kann der Sinusrhythmus des Herzens reflexbasiert angepasst und dadurch die Herzfrequenz verändert werden. Das autonome Nervensystem setzt sich aus dem Sympathikus und dem Parasympathikus zusammen. Der Sympathikus kann über Adrenalin und Noradrenalin die Herzfrequenz erhöhen, während der Parasympathikus in der Lage ist, mittels Acetylcholin die Herzfrequenz zu senken (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Die Anpassungsfähigkeit des Herzens, die Herzfrequenz von Schlag zu Schlag verändern zu können, bezeichnet man als Herzratenvariabilität (*Heart rate variability*, HRV). Im Normalzustand herrscht ein Gleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus, wobei die Ruhefrequenz durch den erhöhten Einfluss des Parasympathikus konstant bleibt (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996). Veränderungen der HRV entstehen daher primär durch einen reduzierten Vagustonus. Das Gleichgewicht verschiebt sich dann in Richtung Sympathikus (THAYER u. STERNBERG 2006). Eine reduzierte HRV stellt damit ein ebenso reduziertes Anpassungsvermögen des Herzens dar. Die reduzierte HRV kann einen Prädispositionsfaktor für erhöhte Morbiditäten und Mortalitäten in Zusammenhang mit verschiedenen Herzerkrankungen, wie etwa der kongestiven Herzinsuffizienz darstellen (LIAO et al. 2002; THIREAU et al. 2008).

Mäuse sind nachtaktive Tiere. Daher unterliegt die Herzfrequenz circadianen Schwankungen. Bei Mäusen ist die Herzfrequenz in der Aktivphase höher als in der Ruhephase (LI et al. 1999; STEIN et al. 2006). Die circadiane Rhythmik des Herzens kann durch langanhaltenden Stress gestört werden (SGOIFO et al. 2002) und dadurch eine Angleichung der Herzfrequenz während der Aktiv- und der Ruhephase bedingen.

Patienten mit Epilepsie haben oftmals Veränderungen des autonomen Nervensystems, die sich durch eine reduzierte HRV oder Herzrhythmusstörungen äußern (SEVCENCU u. STRUIJK 2010). BAYSAL-KIRAC et al. (2017) stellten bei Patienten mit einer pharmakoresistenten Epilepsie niedrigere SDNN-, RMSSD- und pNN_x-Werte fest. Die Veränderungen der Herzleistung und -funktion durch die Epilepsie, können auch Ursache für *Sudden unexpected Death in Epilepsy* (SUDEP) sein (SEVCENCU u. STRUIJK 2010; BAYSAL-KIRAC et al. 2017). SUDEP trifft häufig in Schlafphasen auf, sodass der circadiane Rhythmus hierbei eine mögliche Rolle spielen könnte. (RONKAINEN et al. 2005). Bei Patienten mit Temporallappenepilepsie wurde bereits festgestellt, dass der circadiane Rhythmus der HRV fast vollkommen verschwunden ist (RONKAINEN et al. 2005).

Mit der Herzratenvariabilität lässt sich die Anpassungsfähigkeit des vegetativen Nervensystems an verschiedene Stressoren beurteilen. Parameter der HRV werden auch bei Stress

und Schmerzen herangezogen, um die Belastung der Tiere zu beurteilen (ARRAS et al. 2007; KORESH et al. 2016). Die Validität der HRV konnte in diesen Modellen bestätigt werden (ARRAS et al. 2007; KORESH et al. 2016; PARK et al. 2017). Bei langanhaltendem oder wiederholtem Stress, kann die autonome Stressantwort jedoch auch angepasst werden (SGOIFO et al. 2002).

Die Bestimmung der HRV-Parameter beruht auf dem EKG. Das EKG stellt den Summenvektor der Herzerregung im zeitlichen Verlauf graphisch dar (SILBERNAGL u. DESPOPOULOS 2012). Das EKG setzt sich aus folgenden Abschnitten zusammen:

- P-Welle = Ausbreitung der Erregung in den Vorhöfen
- QRS-Komplex = Depolarisation der Hauptkammern
- T-Welle = Repolarisation

Im EKG wird jeder Herzschlag als R-Zacke dargestellt. Als Herzfrequenz werden alle Herzschläge in einer Minute (*beats per minute*, bpm) bezeichnet. Die Herzfrequenz einer Maus liegt physiologisch bei 310 bis 840 bpm (ERHARDT et al. 2012). Das Intervall zwischen zwei R-Zacken, also zwischen zwei Herzschlägen, wird als Schlag-zu-Schlag-Intervall (RR-Intervall oder NN-Intervall) bezeichnet und in Millisekunden angegeben. Das RR-Intervall wird zur Berechnung der HRV Parameter verwendet (ARRAS et al. 2007).

Die HRV kann durch zeitbasierte und frequenzbasierte Methoden erfasst werden. Zeitbasierte Parameter sind:

- SDNN: Standardabweichung der RR-Intervalle
- RMSSD: Quadratwurzel des Mittelwerts aller Quadrate der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle
- NNx: Anzahl der Paare aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die mehr als x Millisekunden auseinander liegen
- pNNx: Prozentanteil aller aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die sich um mehr als x Millisekunden unterscheiden

Der x-Wert bei der Analyse von NNx und pNNx wird abhängig von der zu untersuchenden Spezies angepasst und liegt beim Menschen bei 50 Millisekunden, bei der Ratte bei 9 Millisekunden und bei der Maus bei 6 Millisekunden (THIREAU et al. 2008). Die Parameter RMSSD und pNN6 sind ein Maß für die kurzfristigen Anpassungen des Parasympathikus (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY 1996; SHAFFER u. GINSBERG 2017).

Unter frequenzbasierten Parametern versteht man das Verhältnis aus *Low Frequency* und *High Frequency* (LF/HF) (KORESH et al. 2016). Die *High Frequency* stellt dabei die parasympathische Aktivität dar. Das Verhältnis zwischen *Low Frequency* und *High Frequency* spiegelt die Gesamtvariabilität wider.

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Tiermodelle spielen in der Forschung und speziell in der Epilepsieforschung immer noch eine große Rolle (LÖSCHER u. BRANDT 2010). Mit Hilfe von Epilepsiemodellen können Pathomechanismen der Epileptogenese, der pharmakoresistenten Epilepsie und der Komorbiditäten untersucht werden. Zudem können neue Wirkstoffe identifiziert werden (ROGAWSKI 2006). Für die Erforschung der Temporallappenepilepsie stellen Tiermodelle an Mäusen und Ratten aktuell die, am häufigsten verwendeten Methoden, dar (LIDSTER et al. 2016). Aber auch in anderen Tiermodellen der neurologischen Forschung oder auch bei genetisch veränderten Tieren können Anfälle als Nebeneffekte auftreten (WOLFENSOHN et al. 2013). Bei der Auswahl des richtigen Tiermodells für eine spezifische Fragestellung, muss neben den wissenschaftlichen Anforderungen auch der Tierschutz beachtet werden. Jede Prozedur im Zusammenhang mit dem jeweiligen Tiermodell kann mit Schmerzen, Leiden oder Schäden einhergehen und zu einer Belastung der Versuchstiere führen. Mäuse sind, wie Ratten, Beutetiere und versuchen daher stets ihre Schmerzen und Leiden vor Feinden zu verbergen (ARRAS et al. 2007; JIRKOF et al. 2010). Aufgrund dessen ist die objektive Belastungseinstufung dieser Tierarten erschwert. Sie erfordert daher die Identifikation und Validierung von robusten und sensitiven Parametern. Diese Parameter sollen dabei auch einfach in den Laboralltag zu integrieren und ohne größeren Aufwand durchführbar sein. Diese Parameter dienen dann als Grundlage für eine evidenzbasierte und sensitive Belastungseinstufung. Diese evidenzbasierte Belastungseinschätzung ist Voraussetzung für die ethische Betrachtung von Tiermodellen im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben. Zusätzlich dient die evidenzbasierte Belastungseinschätzung der Priorisierung von Tiermodellen. Durch die Auswahl eines geeigneten Modells und zusätzlicher Refinement-Maßnahmen, lässt sich die Belastung der Tiere minimieren. In mehreren Epilepsiemodellen bei Ratten und im Kindling-Modell bei Mäusen in unserer Arbeitsgruppe wurden bereits verschiedene Parameter zur Belastungseinstufung vorgeschlagen (MÖLLER et al. 2018; KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019; BOLDT et al. 2021). Diese umfassen verhaltensbiologische, biochemische und (patho-) physiologische Parameter, die zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Parameter in einem intrahippocampalen Kainat-Modell in Mäusen weiter umfassend untersucht. Die Daten verschiedener Parameter von Kainat-injizierten Tieren wurden mit einer transmitter- und elektrodenimplantierten Sham-Gruppe, einer transmitterimplantierten Telemetrie-Gruppe und einer naiven Gruppe verglichen. Zusätzlich zur Identifikation und Validierung von Parametern für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung, soll eine Einschätzung der Belastung der verschiedenen versuchsbedingten Prozeduren, wie der Elektroden- und der Transmitterimplantation und der Anfälle

ermöglicht und eine Empfehlung für eine Belastungseinstufung des gesamten Tiermodells formuliert werden. Der zunehmende Einsatz von Telemetrie-Transmittern wird oft als *Refinement*-Methode diskutiert und soll ebenfalls in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, geeignete Parameter für eine evidenz-basierte Belastungseinstufung zu identifizieren und zu validieren. Mit Hilfe dieser Parameter soll zudem eine Aussage über die modellspezifische Belastung des intrahippocampalen Kainat-Modells in Mäusen ermöglicht werden. Anhand dieser Belastungseinschätzung soll künftig eine transparente Empfehlung für die Priorisierung der Tiermodelle erarbeitet werden. Damit soll zudem auch die Belastung der Versuchstiere in der Epilepsieforschung reduziert werden. In der vorliegenden Studie sollen weiterhin folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Welcher der betrachteten Parameter eignet sich für eine Einschätzung der Belastung im Kainat-Modell bei Mäusen?
- Welchen Einfluss haben der Status epilepticus und die wiederkehrenden elektrographischen Anfälle auf biochemische, verhaltensbiologische und (patho-)physiologische Parameter?
- Welchen Einfluss hat die Transmitterimplantation auf verhaltensbiologische Parameter?
- Stellt die Verwendung der Telemetrie-Transmitter eine *Refinement*-Maßnahme gegenüber herkömmlichen Methoden dar?
- Welchen Einfluss hat die Elektrodenimplantation auf die verschiedenen Parameter?
- Welche der untersuchten Parameter korrelieren miteinander?
- Welche Unterschiede gibt es beim Vergleich zwischen dem Kainat-Modell in Mäusen und dem chemischen und elektrischen Post-Status-Epilepticus Modell in Ratten?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchstiere

Für Vorversuche und für die Etablierung des Kainat-Modells wurden 36 weibliche NMRI-Mäuse verwendet (30 Tiere: Charles River, Sulzfeld, Deutschland; 6 Tiere: Envigo, Horst, Niederlande). Für die eigentliche Studie zur Belastungseinstufung im Kainat-Modell wurden weitere 36 Tiere (bei Ankunft 4 – 5 Wochen alt, 20 - 22 g, Envigo, Horst, Niederlande) verwendet. Nach Ankunft wurden die Tiere einzeln in Makrolon Typ III Käfigen (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) unter kontrollierten Umweltbedingungen und einem zwölf Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus (Hellphase von 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ bzw. 5:00 bis 17:00 Uhr MEZ) gehalten. Die Raumtemperatur von 22 ± 2 °C und die Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 10\%$ wurden mit Hilfe eines Belüftungssystems konstant gehalten. Die Heimkäfige der Tiere waren mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) ausgestattet. Als zusätzliches Enrichment erhielten die Tiere jeweils zwei Nestlets (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland) und ein Maushaus (Zoonlab, Castrop-Rauxel, Deutschland). Futter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Einmal wöchentlich erhielten alle Tiere einen frischen Käfig und neue Wasserflaschen.

Nach der Ankunft hatten die Tiere zehn Tage Zeit lang sich an die neuen Haltungsbedingungen zu gewöhnen. In dieser Zeit wurden die Tiere täglich von Montag bis Freitag aus dem Käfig genommen, um sie an das *Handling* durch den Experimentator und die zuständigen Tierpfleger zu gewöhnen. Auch im weiteren Verlauf der Studie wurden die Tiere im Rahmen der täglichen Kontrolle regelmäßig gehandelt, um *Handling*-assoziierten Stress möglichst zu reduzieren. Das Versuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ ROB-55.2-2532.Vet_02-17-68) und unter Beachtung des Tierschutzgesetzes, der EU-Richtlinie 2010/63/EU und der ARRIVE-Guidelines (KILKENNY et al. 2010) durchgeführt und dokumentiert. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich erfasst und anhand des, von der Regierung von Oberbayern genehmigten Score-Sheets bewertet. Zusätzlich wurden die Tiere in der postoperativen Phase täglich und danach wöchentlich gewogen. Ab dem Zeitpunkt der Operation bzw. der Induktion des Status epilepticus, bis zum Ende der Studie wurden zusätzlich der *Grimace Scale* und der modifizierte *Irwin Score* (siehe XI. Anhang 4) erfasst. Die Einteilung in die jeweiligen Gruppen erfolgte durch stratifizierte Randomisierung. Die gewählte Menge in der Basalmessung des *Burrowing-Tests*

diente dabei als zugrundeliegender Faktor. Die Reihenfolge der Tiere in den einzelnen Verhaltensuntersuchungen erfolgte durch geblockte Randomisierung. Alle Randomisierungen erfolgten mit Hilfe der Software R in Version 4.0.3 (TEAM 2013). Die Einteilung der Tiere erfolgte in vier Versuchsgruppen:

- Eine naive Gruppe (n = 8)
- Eine transmitterimplantierte Gruppe (Telemetrie-Gruppe, n = 8)
- Eine elektroden- und transmitterimplantierte Sham-Gruppe (Sham-Gruppe, n = 8)
- Eine elektroden- und transmitterimplantierte Gruppe, bei der ein Status epilepticus induziert wurde (Kainat-Gruppe, n = 12)

Die Tiere der naiven Gruppe wurden weder mit einem Telemetrietransmitter, noch mit einer Elektrode implantiert. Den Tieren der Telemetrie-Gruppe wurde ein Telemetrietransmitter implantiert, den Tieren der Sham- und Kainat-Gruppe wurde eine Elektrode und ein Telemetriesender implantiert. Zusätzlich wurde den Tieren der Kainat-Gruppe intrahippocampal Kainsäure und den Tieren der Sham-Gruppe Vehikellösung (0,9-prozentige Kochsalzlösung) injiziert. Die Zuteilung der HD-X02-Transmitter erfolgte ebenfalls durch Randomisierung. Ein Tier der Kainat-Gruppe verstarb während des operativen Eingriffs.

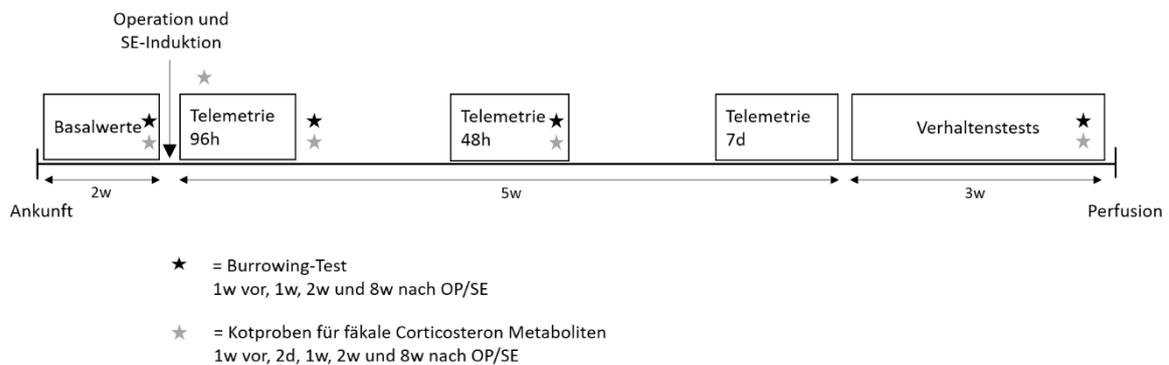


Abbildung 2: Schema des Studiendesigns mit zeitlichem Verlauf des chemischen Post-Status-Epilepticus-Modells.

Nach Abschluss der Versuche wurden die Tiere durch eine Pentobarbital-Injektion (600 mg/kg i.p., Narcoren®, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland), verdünnt in 0,9-prozentiger Kochsalzlösung, euthanasiert. Zur Analgesie vor Eröffnung des Brustkorbes im Rahmen der Perfusion erhielten die Tiere mindestens 30 Minuten vor der Euthanasie Metamizol (100 mg/kg p.o., Vetalgin®, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland), verdünnt in 0,2-prozentiger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin ≥

98%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Zur Perfusionsfixation der Tiere wurde das Gefäßsystem zunächst mit einer phosphatgepufferten 0,9-prozentigen Kochsalzlösung und zur Fixation anschließend mit einer 4-prozentigen Paraformaldehydlösung gespült. Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und für 24 Stunden in einer 4-prozentigen Paraformaldehydlösung (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufbewahrt. Im Anschluss wurden sie bis zum Absinken in eine 30-prozentige Saccharose-Lösung gelegt. Zuletzt wurden die Gehirne mit Hilfe von Isopentan (2-Methylbutan, Honeywell, Offenbach, Deutschland) und flüssigem Stickstoff (Linde AG Gases Division, Pullach, Deutschland) in einem Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium, Sakre Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingebettet und bei -80 °C aufbewahrt.

2. Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell und Telemetriemessungen

2.1. Vorversuche

In Vorversuchen wurde zunächst die Lokalisation der Injektions- bzw. Implantationsstelle ermittelt. Im Anschluss erfolgte die Etablierung des eigentlichen Kainat-Modells mit Fokus auf der Überprüfung der Dosis der Kainsäure. Zielregion war die CA1-Region des rechten dorsalen Hippocampus (GOUDER et al. 2003; KRALIC et al. 2005). Als Orientierung für die korrekte Lokalisation dienten neben dem „Mouse Brain Atlas“ (PAXINOS u. FRANKLIN 2019) auch die in unserem Institut für weibliche NMRI Mäuse verwendeten Koordinaten von BOLDT et al. (2021) und die bereits im Kainat-Modell verwendeten Koordinaten von GROTTICKE et al. (2008) und TWELE et al. (2016b). Letztere Veröffentlichungen dienten ebenso als Orientierung zur Überprüfung der Dosierung. Die ermittelten Koordinaten für die Injektions- bzw. Implantationsstelle lagen bezogen auf Bregma: anteriorposterior + 1,8, lateral + 1,6 und dorsoventral + 1,7.

In weiteren Vorversuchen wurde auch die Dosierung des Chloralhydrats (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angepasst, um eine adäquate Anästhesie der Tiere zu gewährleisten. Orientierung hierfür war ebenso die Studie im Kindling-Modell aus unserer Arbeitsgruppe (BOLDT et al. 2021). So wurde die Dosierung stufenweise von ursprünglich 400 mg/kg in 20 mg/kg-Stufen auf letztendlich 500 mg/kg erhöht.

2.2. Elektrodenimplantation und Induktion eines Status epilepticus

Dreißig Minuten vor der Operation wurde den Tieren zur analgetischen Versorgung Meloxicam (5 mg/kg s.c., Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) appliziert. Im Anschluss wurden die Tiere durch eine intraperitoneale (i.p.) Applikation von Chloralhydrat (500 mg/kg, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gelöst in 10 ml 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung (B. Braun Vet Care GmbH, Melsungen, Deutschland) narkotisiert. Die Narkosetiefe wurde während der Operation regelmäßig mithilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurden die Tiere in einem Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) fixiert. Um die Augen vor Austrocknung zu schtzen, wurde eine Bepanthen-Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Anschließend wurde das Operationsfeld rasiert und desinfiziert. Für eine zusätzliche lokale Anästhesie wurde Bupivacain (8 mg/kg, Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 %, Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland), 1:2 verdünnt mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung, im Bereich des Hautschnittes s.c. appliziert. Während der gesamten Operation wurden die Tiere auf Wrmepads gelagert und die Körpertemperatur mit Hilfe eines Thermometers (Acorn Temp JKT Thermocouple Thermometer, Oakton Instruments, Vernon Hills, IL, USA) in regelmäßigen Abständen kontrolliert und notiert. Um eine exakte Implantation durchzuführen, ist es notwendig, dass die beiden Kreuzungspunkte der Knochennhte, Bregma (rostral) und Lambda (kaudal), auf einer Ebene liegen (Abbildung 3). Um dies zu erreichen, wurde die Oberkieferhalterung des Stereotakten auf -0,1 mm eingestellt. Nach Eröffnung der Haut wurden die genauen Koordinaten für die Lokalisation der Injektion bzw. Elektrodenimplantation in die CA1-Region des rechten dorsalen Hippocampus eingestellt und markiert. Die in den Vorversuchen ermittelten Koordinaten betragen relativ zu Bregma: anteriorposterior + 1,8, lateral + 1,6 und dorsoventral + 1,7. Nach Bestimmung der exakten Position wurden vier Löcher in die Schädeldecke gebohrt, eines für die Injektion bzw. Implantation und weitere drei für Fixationsschrauben (Abbildung 3). Jeweils eine der Schrauben wurde rostral, lateral und kaudal der Implantationsstelle im Knochen befestigt.

Die intrahippocampale Injektion wurde mit Hilfe einer 0,5 µl Mikroinjektionskanüle (SGE Analytical Science, über VWR International GmbH, Ismaning, Deutschland) durchgeführt. Mit der eingespannten Spritze wurde Bregma als Bezugspunkt anvisiert und die Koordinaten für die korrekte Injektionslokalisierung berechnet. Nun wurde die Spritze anhand der berechneten Koordinaten durch das Bohrloch abgesenkt und 50 nl Kainat-Stammlösung (entspricht 0,21 µg Kainat) ber die Dauer von 60 Sekunden gleichmäßig appliziert. Die zuvor angesetzte 20 mM Kainat-Stammlösung (5 mg Kainat gelöst in 1173 µl 0,9-prozentiger Kochsalzlösung) wurde in Kunststoffröhrchen (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

zu je 50 µl aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. An jedem Operationstag wurde ein Röhrchen aufgetaut und der Inhalt vor der Entnahme gut durchmischt. Nach Applikation wurde die Spritze weitere zwei Minuten in der Position belassen, um einen Reflux zu verhindern. Nach dem Entfernen wurde die Spritze mehrmals mit einer Methanolösung und Aqua demineralisata gespült.

Die anschließende Implantation der bipolaren, mit Teflon ummantelten Tiefenelektrode erfolgte nach dem gleichen Verfahren. Die Koordinaten wurden relativ zu Bregma bestimmt und die Elektrode anhand der berechneten Koordinaten implantiert. Mit Hilfe von kaltpolymerisierendem Kunststoff (Paladur®, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) wurde die Elektrode anschließend mit den Fixationsschrauben verbunden und ummantelt. Zuletzt wurden die Wundränder aufgefrischt und mit resorbierbaren Nahtmaterial (Surgicryl Monofilament USP 5/0 EP 1, SMI AG, St. Vith, Belgien) verschlossen. Für die Aufwachphase wurden die Tiere in frische, erwärmte Käfige gesetzt. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Tiere 24 Stunden nach der ersten Applikation erneut 5 mg /kg Meloxicam s.c. Zur Überwachung des SE und der weiteren postoperativen Phase erfolgte im Anschluss an die Operation über einen Zeitraum von 96 Stunden ein Video- und EEG-Monitoring (Abschnitt IV.2.4). Die Tiere der Sham-Gruppe erhielten abweichend vom oben beschriebenen Protokoll eine intrahippocampale Injektion von 50 nl 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung.

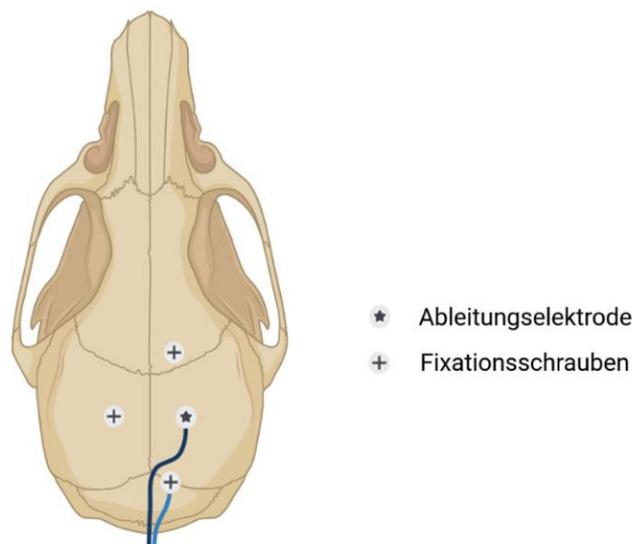


Abbildung 3: Mausschädel mit Abbildungen der Position der Kainatinjektion und Elektrodenimplantation sowie der Fixationsschrauben. Erstellt mit BioRender.com

2.3. Transmitterimplantation

Zur Aufzeichnung des Elektrokardiogramms (EKG) und des EEGs wurde den Tieren im Rahmen der Elektrodenimplantation zusätzlich ein Telemetrietransmitter (HD-X02, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA; Volumen: 1,7 cc, Gewicht: 2,2 g) implantiert (Abbildung 4). Die beiden orangenen Kabel dienen der Aufzeichnung des EKGs, die zwei blauen Kabel der Aufzeichnung des EEGs. Das Referenzkabel war jeweils durch einen weißen Streifen gekennzeichnet.

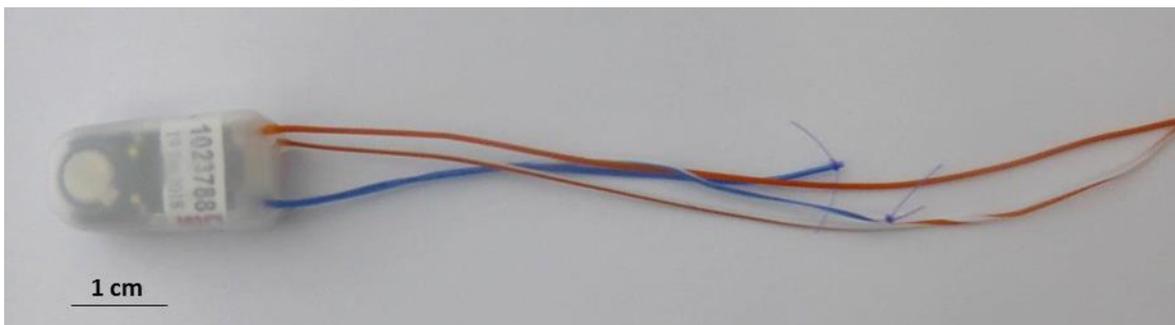


Abbildung 4: ‚HD-X 02‘-Telemetrie-Transmitter der Firma DSI (Data Sciences International, St. Paul, MN, USA); Foto mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ines Koska.

Aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Tiere im Stereotaxten fand die Implantation des Telemetrietransmitters am nicht fixierten Tier statt. Nach Einleitung der Narkose wurde der Operationsbereich rasiert und desinfiziert. Als lokale Anästhesie wurde Bupivacain (8 mg/kg, Bupivacain 0,5 %, Jenapharm®, mibe GmbH, Brehna, Deutschland), 1:2 verdünnt mit 0,9-prozentiger Kochsalzlösung, in den entsprechenden Hautarealen subkutan appliziert. Ein ca. 2 cm großer Hautschnitt erfolgte kaudal des linken Schulterblattes und ventral der Wirbelsäule. Mit einer abgerundeten Schere wurde nun parallel zur Wirbelsäule mit minimalinvasivem Verfahren eine subkutane Tasche präpariert. Um das Einführen des Transmitters zu erleichtern wurde die Tasche mit 0,9-prozentiger isotonischer Natriumchlorid-Lösung (B. Braun, Berlin) gespült. Anschließend wurden die EKG-Kabel implantiert. Mit Hilfe eines stumpfen Trokars (Surgery Kit, Data Sciences International, MN, USA) wurden subkutan zwei Tunnel präpariert. Das negative orange Kabel wurde ventral der rechten Schulter im Pektoralismuskel, das positive orange Kabel wurde links des Xyphoids fixiert. Hierfür wurde die Haut an den genannten Stellen eröffnet und die Kabel mit einer Pinzette durch die subkutanen Tunnel geführt. Zur Fixation wurden die Kabel mit Hilfe einer Kanüle (20Gx1 HS-Einmal Injektionskanülen, Henry Schein®, Melville, USA) im jeweiligen Muskel platziert und mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (Daclon USP 5/0 EP 1, Monofilament black nylon, SMI AG, St. Vith, Belgien) dauerhaft fixiert. Die beiden Hautschnitte wurden

mit resorbierbaren Nahtmaterial (Surgicryl Monofilament USP 5/0 EP 1, SMI AG, St. Vith, Belgien) verschlossen. Die Platzierung der Kabel für die EEG-Ableitung erfolgte im Stereotakten. Wie zuvor beschrieben, wurde erneut ein subkutaner Tunnel in der Medianen nach kranial präpariert. Die Haut wurde am kaudalen Ohregrund eröffnet und beide blauen Kabel durch den Tunnel geführt. Im Anschluss erfolgte die Injektion und Elektrodenimplantation, wie in Abschnitt IV.2.2 beschrieben. Vor Absenken der Tiefenelektrode wurde das positive Kabel an der Elektrode fixiert, das negative an der kaudalen Fixationsschraube. Beide Kabel wurden zudem mit Paladur® fixiert und isoliert. Die Wundränder kaudal des Schulterblattes wurden am Ende des Eingriffes aufgefrischt und mit resorbierbaren Nahtmaterial und Gewebekleber (Surgibond® Gewebekleber, SMI AG, St. Vith, Belgien) verschlossen.

2.4. Video- und Telemetrieaufzeichnung

Mit den HD-X02 Transmittern wurde sowohl das EKG, das EEG als auch die Aktivität der Tiere aufgezeichnet. Durch das kabellose Telemetriesystem konnte die Aufzeichnung in den Heimkäfigen in der Tierhaltung durchgeführt werden. Die Heimkäfige wurden auf speziellen Receiver-Platten (RPC-1, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) in einem Metallregal platziert. Zuvor wurde jede Receiver-Platte einem Transmitter randomisiert zugeordnet. Um gegenseitige Störsignale zu verhindern, hatten die Receiver-Platten einen Abstand von ca. 30 – 40 cm zueinander. Mittels eines Magneten konnten die Transmitter in den Tieren sowohl aktiviert, als auch wieder deaktiviert werden. Ob der Transmitter aktiviert war, zeigte ein spezieller Radio durch einen hohen Ton. Über Radiowellen wurde das Signal des Transmitters an die Receiver-Platten gesendet. In den Platten wurde dieses Signal nun in ein digitales Signal umgewandelt und an die Matrix (MX 2.0, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) weitergeleitet. Von dort wurden die gesammelten Signale der Tiere über einen Switch (Cisco Small Business Switch, Data Science International, St. Paul, MN, USA) an den Aufzeichnungscomputer weitergeleitet, auf dem die Signale mit Hilfe der Software Ponemah® (Ponemah Software 5.20, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) aufgezeichnet und gespeichert wurden. Zusätzlich zur Aufzeichnung direkt nach der Operation bzw. SE-Induktion über 96 Stunden wurden die Tiere zwei Wochen nach dem SE für 48 Stunden aufgezeichnet. In der chronischen Phase, vier Wochen nach dem SE, wurden die Parameter der Tiere der Telemetrie- und Sham-Gruppe wiederum über einen Zeitraum von 48 Stunden erfasst. Für eine Anfallsdetektion wurden die Tiere der Kainat-Gruppe zu diesem Zeitpunkt hingegen für sieben Tage aufgenommen. Zu allen drei Zeitpunkten wurden die Tiere zusätzlich mit einer Videokamera (Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) überwacht.

2.5. Datenauswertung

Die telemetrisch aufgezeichneten Daten des EKGs, der Aktivität und des EEGs wurden einzeln analysiert. Die Analyse der EKG-Daten erfolgte mit Hilfe der Software Ponemah® (Ponemah Software 6.41, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA). Mit Hilfe des EKG-Analyse-Moduls dieser Software konnte eine automatisierte Erkennung der R-Zacken des EKGs durchgeführt werden. Alle R-Zacken wurden im Rahmen dieser Erkennung mit einer Markierung versehen und nummeriert (Abbildung 5). Wenn einzelne R-Zacken mit der Voreinstellung der Software nicht erkannt wurden, konnten die Einstellungen individuell für die einzelnen Tiere angepasst und geändert werden (Abbildung 6).

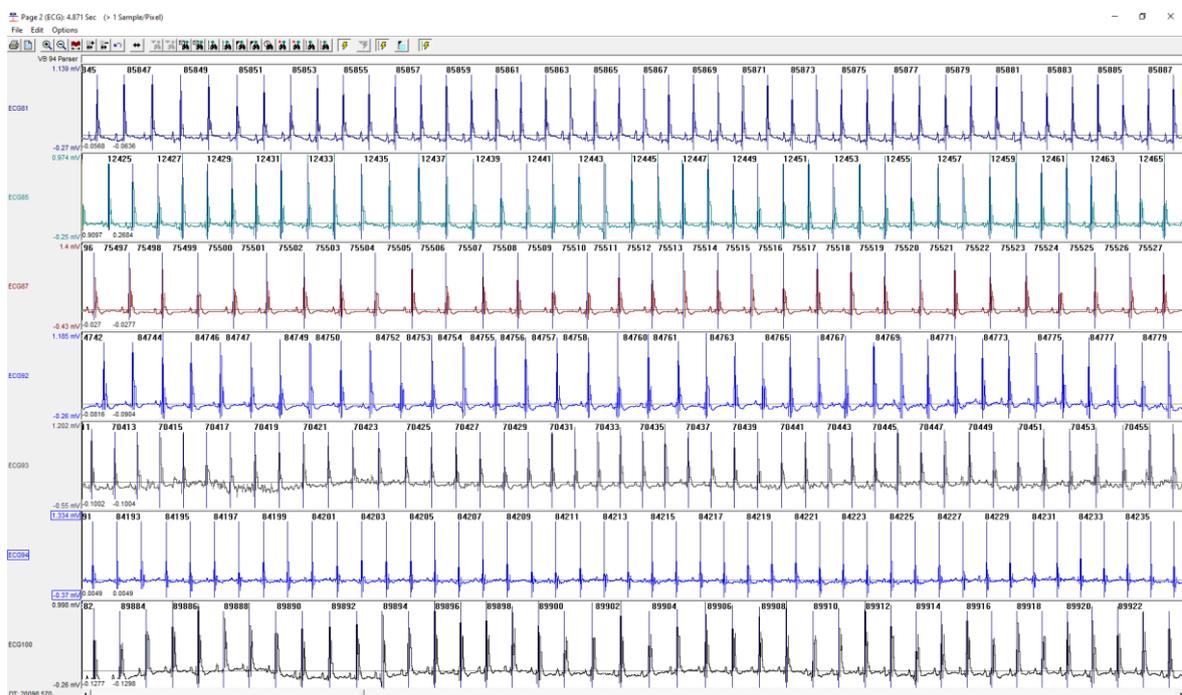


Abbildung 5: R-Zacken-Detektion mit Hilfe des EKG-Analyse Moduls in Ponemah® 6.41.

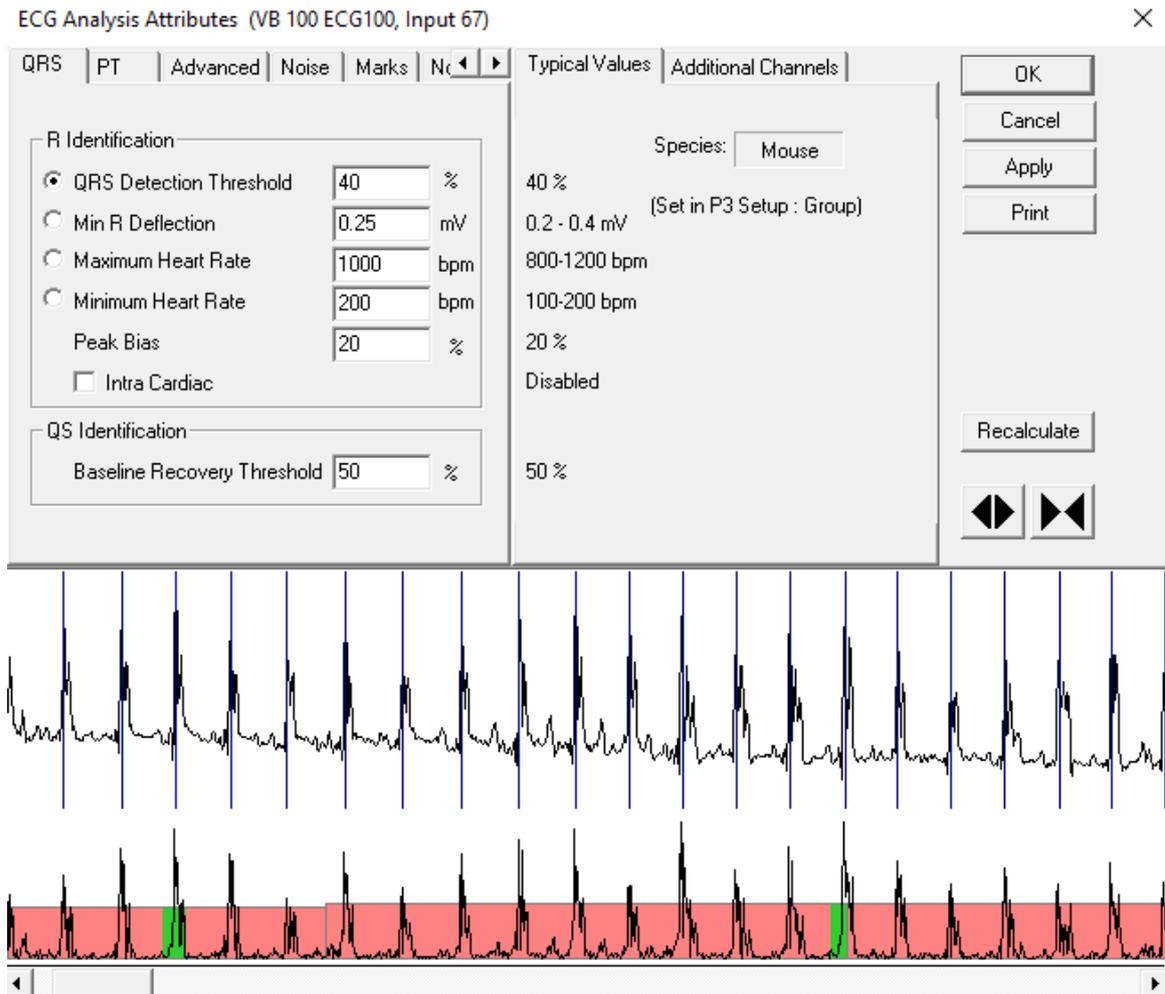


Abbildung 6: Einstellungen für die individuelle R-Zacken-Detektion in der Analysesoftware.

Größere Regionen, in denen durch den Störfilter des EKG-Analyse-Moduls keine R-Zacken detektiert werden konnten, wurden ebenfalls markiert (*bad data mark*) und von der Analyse exkludiert (Abbildung 7).

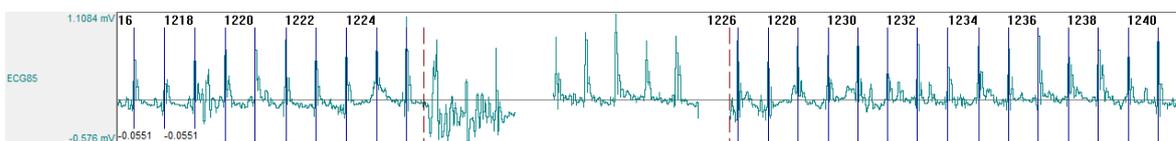


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der *bad data mark* (rote unterbrochene Linie).

Da die automatisierte R-Zacken-Detektion nur bedingt zuverlässig war, wurden anschließend alle Markierungen manuell überprüft und die Einstellungen des Moduls, falls nötig, angepasst. Zuletzt wurde ein Zeitintervall (*Logging Rate*) von fünf Minuten bestimmt. Somit wurden für alle Parameter Durchschnittswerte über 5-Minuten-Zeitintervalle exportiert. Folgende Parameter wurden basierend auf dem EKG bestimmt:

- Mittlere Herzfrequenz (HF) in *Beats per Minute* (bpm)
- Mittleres RR-Intervall in ms
- SDNN: Standardabweichung der RR-Intervalle in ms, als Wert für die Gesamtvariabilität des autonomen Nervensystems

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

- RMSSD (*Root Mean Square of successive Differences*): Quadratwurzel des Mittelwerts aller Quadrate der Differenzen aufeinanderfolgender RR-Intervalle in ms, als Wert für kurzfristige Änderungen der RR-Intervalle und somit für die Erholungsfähigkeit des Herzens

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

- pNN6: Prozentanteil aller aufeinanderfolgender RR-Intervalle, die sich um mehr als sechs Millisekunden unterscheiden. pNN6 gilt in Zusammenhang mit RMSSD als Maß für die parasympathische Aktivität des Herzens.

$$pNN6 = \frac{NN6}{N-1} \times 100 \%$$

Die Aktivität der Tiere im Heimkäfig (ATA2) wurde ebenfalls telemetrisch erfasst und in Anzahl pro Minute (*counts per minute*, cpm) gemessen. Die Aktivität ergibt sich aus der Änderung der Distanz des Transmitters zu den Antennen der Receiver-Platten. Somit wird jeder Positionswechsel des Transmitters zur Receiver-Platte erfasst. Die Daten wurden automatisch mit der Software Ponemah® (Ponemah Software 6.41, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA) analysiert und exportiert.

Die Auswertung der telemetrisch aufgezeichneten EEG-Daten erfolgte mit einem Analysemodul (*Spike Train Detector*) der Software NeuroScore® (NeuroScore® Software 3.3.1, Data Sciences International, St. Paul, MN, USA, Abbildung 8).

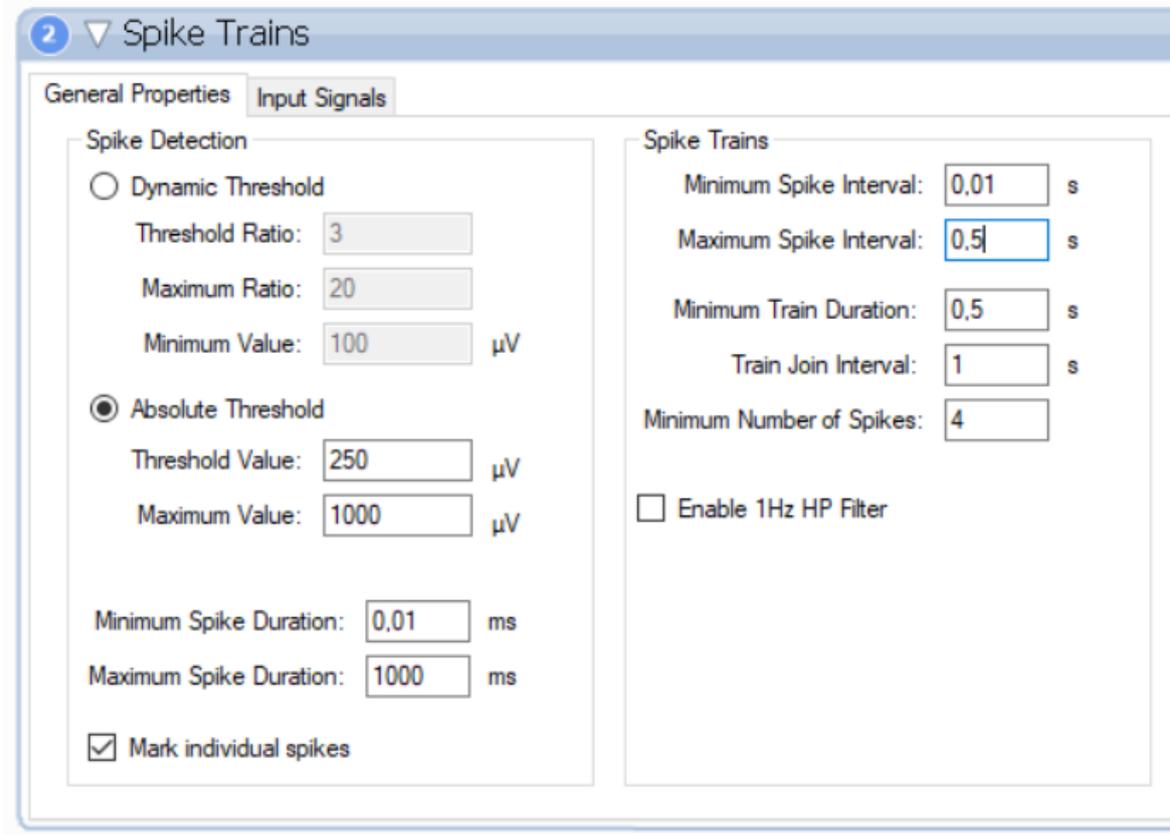


Abbildung 8: Beispielhafte Einstellungen im EEG-Analyse Moduls in NeuroScore® 3.3.1. Diese wurden für jedes Tier individuell angepasst.

Für jedes Tier konnten die Voreinstellungen zur Erfassung der *High-voltage sharp waves* (HVSWs) und *hippocampal paroxysmal discharges* (HPDs) individuell angepasst und geändert werden. HVSWs und HPDs sind definiert in Anlehnung an frühere Studien von RIBAN et al. (2002) und angepasst von TWELE et al. (2016a) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Definitionen von *High-voltage sharp waves* (HVSW) und *Hippocampal paroxysmal discharges* (HPD) nach TWELE et al. (2016a)

	High-voltage sharp waves (HVSW)	Hippocampal paroxysmal discharges (HPD)
Frequenz	≥ 2 Hertz	≥ 5 Sekunden mit ≥ 5 Hertz → ≥ 25 Spikes in 5 Sekunden
Amplitude	≥ 3-mal Baseline	≥ 2-mal Baseline
Dauer	≥ 5 Sekunden	5 – 20 Sekunden (short HPDs) > 20 Sekunden (long (HPDs)
Interevent Intervall	≥ 3 Sekunden	≥ 3 Sekunden

Zusätzlich wurden spontan auftretende motorische Anfälle erfasst und die Anfallsschwere entsprechend eines modifizierten Scores nach RACINE (1972) beurteilt. Die einzelnen Stadien sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht der Krampfstadien, modifiziert nach RACINE (1972).

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

3. Verhaltensuntersuchungen

Die Verhaltensuntersuchungen wurden, mit Ausnahme des *Burrowing-Tests*, immer zwischen 7:00 und 13:00 Uhr durchgeführt. Der *Burrowing-Tests* begann stets zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase und endete zu Beginn der darauffolgenden Hellphase. Einzelne Untersuchungen, wie der *Burrowing-Test* und die Beurteilung des Heimkäfigverhaltens, wurden im Verlauf der Studie zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Ein Zeitpunkt vor der Operation bzw. Induktion des SE diente bei diesen Untersuchungen als Basalwert. Die weiteren Verhaltensuntersuchungen *Social-Interaction-Test*, *Open-Field-Test*, *Black-and-White-Box-Test*, *Elevated-Plus-Maze-Test* und *Saccharin-Präferenz-Test* wurden einmalig in der chronischen Phase durchgeführt. Die Beurteilung des Heimkäfigverhaltens (Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad), der *Burrowing-Test* sowie der *Saccharin-Präferenz-Test* erfolgten im Heimkäfig im Tierhaltungsraum. Die Verhaltensuntersuchungen *Social-Interaction-Test*, *Open-Field-Test*, *Black-and-White-Box-Test* und *Elevated-Plus-Maze-Test* fanden hingegen in einem speziellen, schallisolierten Verhaltensraum statt. Die jeweilige Versuchsanordnung wurde hier in der Mitte des Raumes platziert und mit Hilfe eines schwarzen Vorhanges von der restlichen Umgebung abgegrenzt. Durch vier bewegliche und dimmbare Lampen (SpotLight Outdoor, Philips Lighting, Eindhoven, Niederlande) konnte das Licht für jeden Versuch individuell eingestellt und die Lichtintensität mit einem Luxmeter (Voltcraft MS 1300, Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland) kontrolliert werden. Alle Versuche, die in diesem Verhaltensraum durchgeführt wurden, wurden per Video (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet und manuell oder mit einer speziellen Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) analysiert. Um sich an die neue Umgebung zu adaptieren, wurden die Tiere mindestens 30 Minuten vor dem Start der jeweiligen Untersuchung in den Verhaltensraum gebracht. Nach jedem Durchgang wurde die jeweilige Verhaltensapparatur mit 0,1-prozentiger Essigsäure gereinigt, um mögliche Gerüche des vorherigen Tieres zu neutralisieren und dadurch Verfälschungen der Ergebnisse zu vermeiden. Die Reihenfolge der Tiere wurde für jeden Verhaltenstest randomisiert.

3.1. Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad

Zur Untersuchung des Heimkäfigverhaltens wurden die zwei Parameter Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad erfasst. Nach der Eingewöhnungsphase, eine Woche nach Ankunft der Tiere, wurde das Nestbauverhalten der Tiere untersucht. Hierfür wurden die Nester zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie zwischen 7:00 und 9:00 Uhr morgens, also zwei \pm eine Stunde nach Ende der Dunkelphase, fotografiert. Das Nestbauverhalten in der Woche vor der Operation diente als Basalwert. Nach Versuchsende wurden die Fotos von einer verblindeten Person beurteilt. Das verwendete Scoring-System wurde modifiziert nach Deacon (DEACON 2012) und Jirkof und Kollegen (JIRKOF et al. 2013a):

- 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 bearbeitet (50 – 90% des Nestlets sind aufgerissen). Dabei sind <50% des Nestlets intakt und <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 ein Drittel der Höhe des Maushauses.
- Score 5: Ein nahezu perfektes Nest (>90% sind aufgerissen). Das Nest gleicht einem Krater: Mehr als 50% des Umfangs der Nestwand sind höher als ein Drittel der Höhe des Maushauses.
- Score 6: Perfektes Nest (>90% sind aufgerissen). Das Nest gleicht einem Krater: mehr als 90% des Umfangs der Nestwand sind höher als ein Drittel der Höhe des Maushauses.

Einmal wöchentlich, vor dem Umsetzen der Tiere in frische Käfige, wurde zusätzlich der Verschmutzungsgrad des Nestes (*Level of Soiling*) erfasst und ebenfalls nach Versuchsende von einer verblindeten Person beurteilt. War der Nestbereich sauber, also frei von Kot und Urin, wurde der Nestverschmutzungsgrad mit Score 1 bewertet. Leichte Verschmutzungen wurden mit Score 2, starke mit Score 3 bewertet.

3.2. *Burrowing-Test*

Der *Burrowing-Test* dient der Beurteilung des natürlichen Wühlverhaltens von Nagetieren. Der *Burrowing-Test* wurde zu vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Der erste Test wurde vor der Operation bzw. SE-Induktion, nach Eingewöhnung der Tiere durchgeführt (Zeitpunkt 1). Die Ergebnisse des ersten Zeitpunktes dienten als Basalwert. Die weiteren Zeitpunkte waren eine Woche (Zeitpunkt 2) und zwei Wochen (Zeitpunkt 3) nach Operation bzw. SE-Induktion und in der chronischen Phase, acht Wochen nach SE-Induktion (Zeitpunkt 4). Der Test wurde in Anlehnung an das Protokoll von Deacon und Kollegen (DEACON 2006c, 2009; DEACON 2012) durchgeführt. Als Versuchsaapparaturen dienten leere, runde Wasserflaschen (Zoonlab, Deutschland) mit einer Länge von 20 cm und einem um 2 cm erhöhtem Eingang mit einem Durchmesser von 3,5 cm. Diese Flaschen wurden mit je 200 ± 1 g Futterpellets (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gefüllt. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die gefüllten Flaschen zwei Stunden vor Beginn der Dunkelphase in die hintere linke Ecke des Heimkäfigs eines jeden Tieres platziert. Die Flaschenöffnung zeigte dabei zur Käfigmitte. Nach 120 Minuten wurden die in der Flasche verbliebenen Pellets gewogen, um die gebuddelte Menge zu berechnen. Anschließend wurden die Flaschen wieder an dieselbe Position im Käfig gelegt. Am Ende der Dunkelphase wurde erneut das Gewicht der verbliebenen Pellets gewogen.

3.3. *Social-Interaction-Test*

Der *Social-Interaction-Test* dient der Untersuchung des sozialen Verhaltens gegenüber Artgenossen und wurde nach einem Protokoll von Hölter und Kollegen (HOLTER et al. 2015) durchgeführt. Um die soziale Interaktion zu verstärken, sieht das Versuchsprotokoll vor, die Tiere mindestens zwei Wochen vor dem Test einzeln zu halten. Vor dem eigentlichen Test erfolgte eine zweitägige Eingewöhnungsphase an den Verhaltensraum. Hierfür wurden die Tiere einzeln für jeweils zehn Minuten in den Testkäfig (Makrolon Typ III, Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gesetzt. Die Lichtintensität wurde an die Intensität in der Tierhaltung angepasst. Sie betrug zwölf Lux. An allen Tagen wurden die Tiere jeweils 30 Minuten vor Beginn in den Verhaltensraum verbracht, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Für den Testtag wurden Tierpaare gebildet, wobei beide Tiere aus einer Versuchsgruppe stammten (Naiv-Naiv, Telemetrie-Telemetrie, Sham-Sham, Kainat-Kainat) und in etwa das gleiche Gewicht aufwiesen. Jedes Paar wurde wiederum für zehn Minuten in den Testkäfig gesetzt, beobachtet und die Zeit aktiver bzw. passiver sozialer Interaktion erfasst. Es wurde darauf geachtet, dass beide Tiere eines Paares gleichzeitig in den Testkäfig gesetzt wurden. Als aktive Interaktionen galten gegenseitiges Beschnuppern,

Pflegeverhalten und über-/untereinander Krabbeln. Passive Interaktionen waren Nebeneinandersitzen und -liegen. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihren jeweiligen Heimkäfig überführt.

3.4. Open-Field-Test

Im *Open Field*, einer schwarzen zylinderförmigen Arena aus Hartplastik mit einem Durchmesser von 60 cm und einer Höhe von 40 cm, wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere untersucht. Die Lichtintensität wurde in Anlehnung an die Tierhaltungsräume gewählt, um angstassoziiertes Verhalten zu vermeiden und gleichmäßig auf ca. 12 Lux eingestellt. Um einen konstanten Versuchsablauf zu gewährleisten, wurden die Tiere immer mit einem Abstand von 10 cm zur Wand und mit Blickrichtung zur Wand in das *Open Field* eingesetzt. Anschließend wurde das Verhalten der Tiere per Videokamera (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet und verschiedene Parameter wurden mit Hilfe einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande) über einen Zeitraum von zehn Minuten erfasst. Diese Parameter waren die zurückgelegte Strecke, die mittlere Geschwindigkeit, die Zeit und Frequenz, in der sich die Tiere nicht bewegten (Immobilität) und die Zeit im Zentrum und im Wandbereich der Arena. Die Frequenz, wie oft sich die Tiere um mehr als 45° aufrichteten (*Rearing*), wurde manuell durch eine verblindete Person erfasst. Im Anschluss wurden die Tiere in ihre Heimkäfige verbracht.

3.5. Black-and-White-Box-Test

Die *Black-and-White-Box* diente dazu angst-assoziiertes Verhalten der Tiere zu beurteilen. Die Testapparatur bestand aus einem schwarzen (40 x 20 cm) und einem weißen (40 x 40 cm) Kompartiment. Beide Kompartimente waren über einen 10 x 10 cm großen Tunnel miteinander verbunden. Während das schwarze Kompartiment durch einen Deckel geschlossen war, wurde die Lichtintensität in der weißen Box auf 40 Lux eingestellt. Zu Beginn des Tests wurden die Tiere immer in die Mitte des weißen Kompartiments gesetzt, mit Blickrichtung in das gegenüberliegende schwarze Kompartiment. Ein Testdurchlauf betrug fünf Minuten und wurde per Video (CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet. Zunächst wurde die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box erfasst, anschließend alle Übertritte zwischen den Kompartimenten und die jeweilige Aufenthaltsdauer in der schwarzen bzw. weißen Box. Zudem wurde die Frequenz des Streckverhaltens (*Stretching postures*) vom Tunnel in die weiße Box erfasst. Alle genannten Parameter wurden manuell mit EthoVision (Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande)

durch eine verblindete Person gescort. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihre Heimkäfige überführt.

3.6. *Elevated-Plus-Maze-Test*

Das *Elevated-Plus-Maze* diente ebenfalls dazu, angst-assoziiertes Verhalten zu untersuchen. Es entsprach einer erhöhten kreuzförmigen Apparatur aus weißem Hartplastik mit je zwei offenen Armen ohne Seitenwände und zwei geschlossenen Armen mit 12,5 cm hohen Seitenwänden. Alle vier Arme waren jeweils 40 cm lang und trafen sich in der Mitte in einem 10 x 10 cm großen Zentrum. Durch die adjustierbare Beleuchtung im Verhaltensraum wurde eine Lichtintensität von 20 Lux in den geschlossenen Armen, und von 40 Lux in den offenen Armen eingestellt. Zu Testbeginn wurde jedes Tier in das Zentrum des *Elevated-Plus-Maze* gesetzt, immer mit Blickrichtung in denselben offenen Arm. Über fünf Minuten wurde die zurückgelegte Strecke, die mittlere Geschwindigkeit, die Zeit in den geschlossenen und offenen Armen, sowie die Anzahl der *Stretching Postures* (Streckbewegungen aus den geschlossenen in die offenen Arme) und *Head Dips* (Herunterschauen von den offenen Armen) ermittelt. Die Anzahl der *Stretching Postures* und der *Head Dips* wurden manuell von einer verblindeten Person erfasst, die weiteren Parameter mit Hilfe einer Trackingsoftware (EthoVision, Version 8.5, Noldus, Wageningen, Niederlande). Nach jedem Testdurchgang wurden die Tiere wieder in ihre Heimkäfige gebracht.

3.7. *Saccharin-Präferenz-Test*

Der *Saccharin-Präferenz-Test* wurde zur Untersuchung von anhedonie-ähnlichem Verhalten und nach einem Protokoll von Klein und Kollegen (KLEIN et al. 2015a) durchgeführt. Um eine Seitenpräferenz der Tiere in diesem Test auszuschließen, wurden während der gesamten Studie zwei Wasserflaschen (250 ml, rund, Ehret, Labor- und Pharmatechnik, Emmendingen, Deutschland) am Heimkäfig der Tiere angebracht. Der Durchmesser der Tränkenippel betrug einen Millimeter. Der *Saccharin-Präferenz-Test* erstreckte sich über vier Tage. An Tag eins und drei wurden beide Flaschen mit 200 g Leitungswasser befüllt und die Wasseraufnahme der Tiere über 24 Stunden erfasst. An Tag zwei und vier wurde je eine der Flaschen mit 200 g 0,1-prozentiger Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) gefüllt, die andere wiederum mit 200 g Wasser. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Saccharin-Lösung an Tag zwei auf der linken und an Tag vier auf der rechten Käfigseite platziert wurde. Für alle Tage wurde die verbliebene Flüssigkeitsmenge nach 24 Stunden gewogen und somit die konsumierte Menge ermittelt.

3.8. ***Grimace Scale* und *Irwin Score***

Zusätzlich zur täglichen Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere im Rahmen der gesetzlichen Anforderungen, wurde bis zum Ende der Studie zur intensiveren Überwachung der Tiere der *Grimace Scale* und der modifizierte *Irwin Score* erfasst. Mit dem *Irwin Score* werden sowohl das Allgemeinbefinden der Tiere, als auch neurologische Parameter erfasst (Anhang 4). Als Basalwerte dienten die jeweiligen Werte in der Woche vor der Operation bzw. der Induktion des Status epilepticus. Beide Parameter wurden in der Phase direkt nach der Operation bzw. der Induktion des Status epilepticus täglich für 14 Tage erhoben, im Anschluss einmal wöchentlich morgens im Rahmen der wöchentlichen Gewichtskontrolle. Der *Grimace Scale* wurde zehn Minuten nach Betreten des Raumes in einer ruhigen Atmosphäre erhoben, um eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch den Experimentator zu verhindern.

4. Analyse von Kotproben

Im Verlauf der Studie wurden zu fünf verschiedenen Zeitpunkten Kotproben der Tiere gesammelt. Als Basalwert (Zeitpunkt 1) dienten Proben, die nach der Eingewöhnungsphase und in der Woche vor dem operativen Eingriff gesammelt wurden. Anschließend wurden Kotproben aller Gruppen zwei Tage (Zeitpunkt 2) sowie eine (Zeitpunkt 3) und zwei Wochen (Zeitpunkt 4) nach der Operation bzw. SE-Induktion genommen. Der letzte Zeitpunkt (Zeitpunkt 5) lag am Versuchsende, acht Wochen nach der Operation bzw. SE-Induktion. Für alle Zeitpunkte erfolgte die Entnahme der Kotproben immer nach dem ruhigen Umsetzen der Tiere in einen frischen Käfig zwischen 7 und 9 Uhr. Bis zur Extraktion und anschließenden Analyse wurden die Proben bei -20°C gelagert. Zur Extraktion wurden die Kotproben bei 60°C getrocknet und mit einem Spatel zu einem feinen Pulver zermahlen. Im Anschluss wurden je 0,05 Gramm des Pulvers mit einem Milliliter 80-prozentigem Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt und für 30 Minuten auf einem Multi-Vortexer (RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) geschüttelt. Nach diesem Vorgang wurden die Proben für zehn Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*, rpm) zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Die nachfolgende Analyse erfolgte durch den Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme (Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und Experimentelle Endokrinologie des Departments für Biomedizinische Wissenschaften der Veterinärmedizinischen Universität in Wien, Österreich). Fünf Mikroliter des Überstandes wurden mit 495 Mikroliter Essigsäure versetzt und mit Hilfe eines 5α -Pregnan- 3β , 11β , 21 -Triol- 20 -one Enzymimmunoassays (EIA) und nach einem Protokoll von Touma und Kollegen (TOUMA et al. 2003) analysiert.

5. Bestimmung des Sexualzyklus

Am Ende des Versuches wurde der Zyklusstand ermittelt. Die Bestimmung erfolgte nach einem Protokoll von Ramos und Kollegen (RAMOS et al. 2001) mit Hilfe eines Ohmmeters, in Form eines handelsüblichen Multimeters (HEX60-D, Beha-Amprobe, Glottertal, Deutschland). Nach Euthanasie der Tiere wurde das Ende des Kabels für 30 Sekunden ca. 0,5 cm in die Vagina eingeführt und der Widerstand in kOhm ermittelt. Der Widerstand im Östrus ist durch das vermehrte Auftreten von verhornten Zellen, im Gegensatz zu den anderen Phasen des Zyklus, deutlich erhöht.

6. Auswertung und Statistik

Für die statistische Auswertung der ermittelten Daten wurde die Software GraphPad Prism 5 (Version 5.04, GraphPad, San Diego, CA, USA) verwendet. Der Vergleich zwischen zwei Zeitpunkten innerhalb einer Versuchsgruppe wurde mit Hilfe eines gepaarten t-Tests erfasst. Der Vergleich zwischen parametrisch verteilten Daten der vier Versuchsgruppen basiert auf der einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way ANOVA*). Die Gruppenunterschiede wurden anschließend anhand eines Post-hoc-Tests mit einer Bonferroni-Korrektur ermittelt. Bei nichtparametrisch verteilten Datensätzen wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Test als Post-hoc-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit einem p-Wert von $< 0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert inklusive des Standardfehlers (*standard error of the mean*, SEM) angegeben.

Die Auswertung der telemetrischen Daten und der Korrelationsmatrix nach Spearman erfolgte mit Hilfe der Software R in Version 4.0.3 (TEAM 2013). Für die graphische Darstellung der telemetrischen Daten diente das R-Paket „ggplot2“ (WICKHAM 2010). Zur Glättung der Linien wurde die LOESS-Regression im Bereich von 0,15 verwendet. Die Datensätze wurden zusätzlich als Kastengraphen (*box plots*) dargestellt. Die Länge der Whisker betrug hier maximal das 1,5-Fache des Interquartilsabstandes (IQR). Die graphische Darstellung der Korrelationsmatrix in Form einer *Heatmap* erfolgte mit Hilfe des R-Paketes „corrplot“ (WEI u. SIMKO 2016).

Die Analyse und die Grafik der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurden mit dem R-Paket „made4“ erstellt (CULHANE et al. 2005). Vor der Analyse wurden die Daten so zentriert und skaliert, dass die zu berechnenden Variablen einen Mittelwert von null und eine Standardabweichung von eins hatten.

Der Forest Plot wurde ebenfalls mit Hilfe des R-Paketes „ggplot2“ graphisch dargestellt (WICKHAM 2010).

V. ERGEBNISSE

1. Chemisches Post-Status-Epilepticus-Modell

1.1. Induktion des Status epilepticus

Im Anschluss an die Operation und die Injektion der Kainsäure wurde eine telemetrische Aufzeichnung durchgeführt. Die Auswertung ergab, dass bei allen Tieren, die eine Injektion erhalten hatten, ein nicht-convulsiver Status epilepticus ausgelöst wurde. Der Status epilepticus trat im Durchschnitt 7,78 Stunden nach der Injektion ein (Abbildung 9) und dauerte mehrere Stunden. Nach dem Status epilepticus konnte keine klare Latenzperiode festgestellt werden. Bereits im Anschluss an den Status epilepticus zeigten die Tiere elektrographische Aktivitäten. Zwei Tiere befanden sich zum Zeitpunkt des Aufzeichnungsbegins bereits im Status epilepticus. Diese Tiere werden daher in der Abbildung nicht dargestellt.

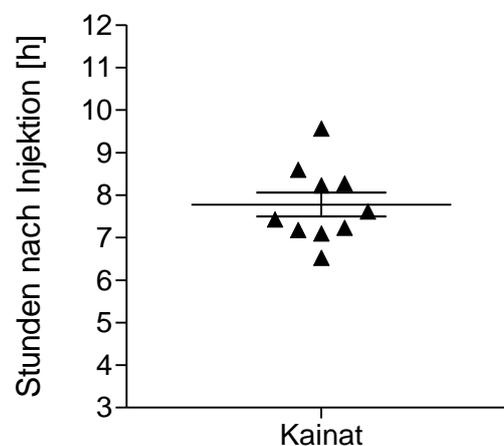


Abbildung 9: Eintritt des Status epilepticus nach Injektion der Kainsäure ($n = 10$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

1.2. Chronische Phase

Während des Video- und EEG-Monitorings vier Wochen nach der Operation bzw. SE-Induktion zeigten alle Tiere der Kainat-Gruppe elektrographische Anfallsaktivitäten in Form

von HVSWs. Von den insgesamt sieben aufgezeichneten Tagen wurden 48 Stunden für die Auswertung herangezogen. Die Anfallsaktivität lag bei 25,9 HVSWs pro Stunde während der Hellphase und 29,3 HVSWs pro Stunde während der Dunkelphase (Abbildung 10). Zwischen der Anfallsaktivität der Hell- und der Dunkelphase konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,0119$).

Sieben der zwölf Tiere zeigten zusätzlich, unabhängig vom EEG-Monitoring, vereinzelt spontane generalisierte Anfälle der Anfallsstärke 5 nach RACINE (1972). Diese traten ab zwei Wochen nach der SE-Induktion auf. Während der ausgewerteten 48 Stunden konnten keine generalisierten Anfälle detektiert werden.

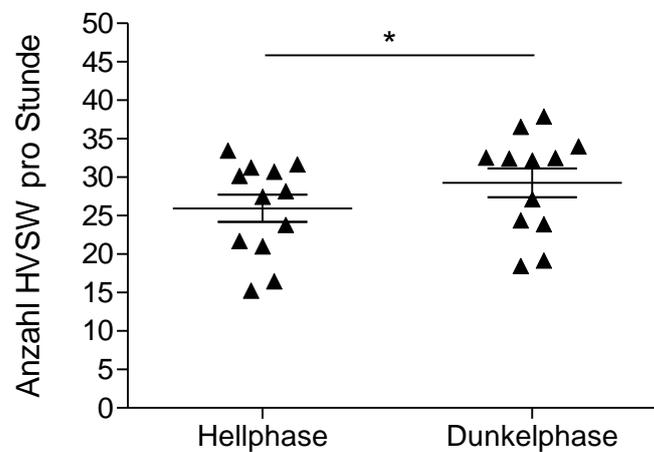


Abbildung 10: Anzahl der HVSWs vier Wochen nach der SE-Induktion während der Hell- und Dunkelphase ($n = 12$). Zwischen den beiden Phasen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

2. Verhaltensuntersuchungen

2.1. Nestbauverhalten und Nestverschmutzungsgrad

Die Bewertung des Nestbauverhaltens erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Studie. Die Auswertung erfolgte anhand von Bildern der Nester, die stets zwischen 7:00 und 9:00 aufgenommen wurden. Als Basalwerte dienten die Nestkomplexitätsdaten aus der Woche vor der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus über sieben Tage hinweg. Zu diesem Zeitpunkt konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 11 A). Nach der Operation bzw. SE-Induktion wurde das Nestbauverhalten über einen Zeitraum von 14 Tagen bewertet. Am Tag der Operation erhielten alle operierten und naiven Tiere einen frischen Käfig. Nur an Tag eins nach der Operation zeigte sich ein signifikant reduziertes Nestbauverhalten der Tiere der Telemetrie- und Kainat-Gruppe im Vergleich zur naiven Gruppe (Abbildung 11 B, für beide Gruppen: $p < 0,05$). Des Weiteren wurde die Nestkomplexität zum Zeitpunkt des EEG-Monitorings beginnend zwei und vier Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus über jeweils sieben Tage und während der Verhaltensuntersuchungen über 21 Tage hinweg gescort. Zu keinem dieser weiteren Zeitpunkte konnte ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 11 C – E). Einmal wöchentlich, vor dem Umsetzen der Tiere in frische Käfige, wurde zudem der Nestverschmutzungsgrad bewertet. Die Auswertung erfolgte ebenfalls anhand von Fotos der Käfige. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 12).

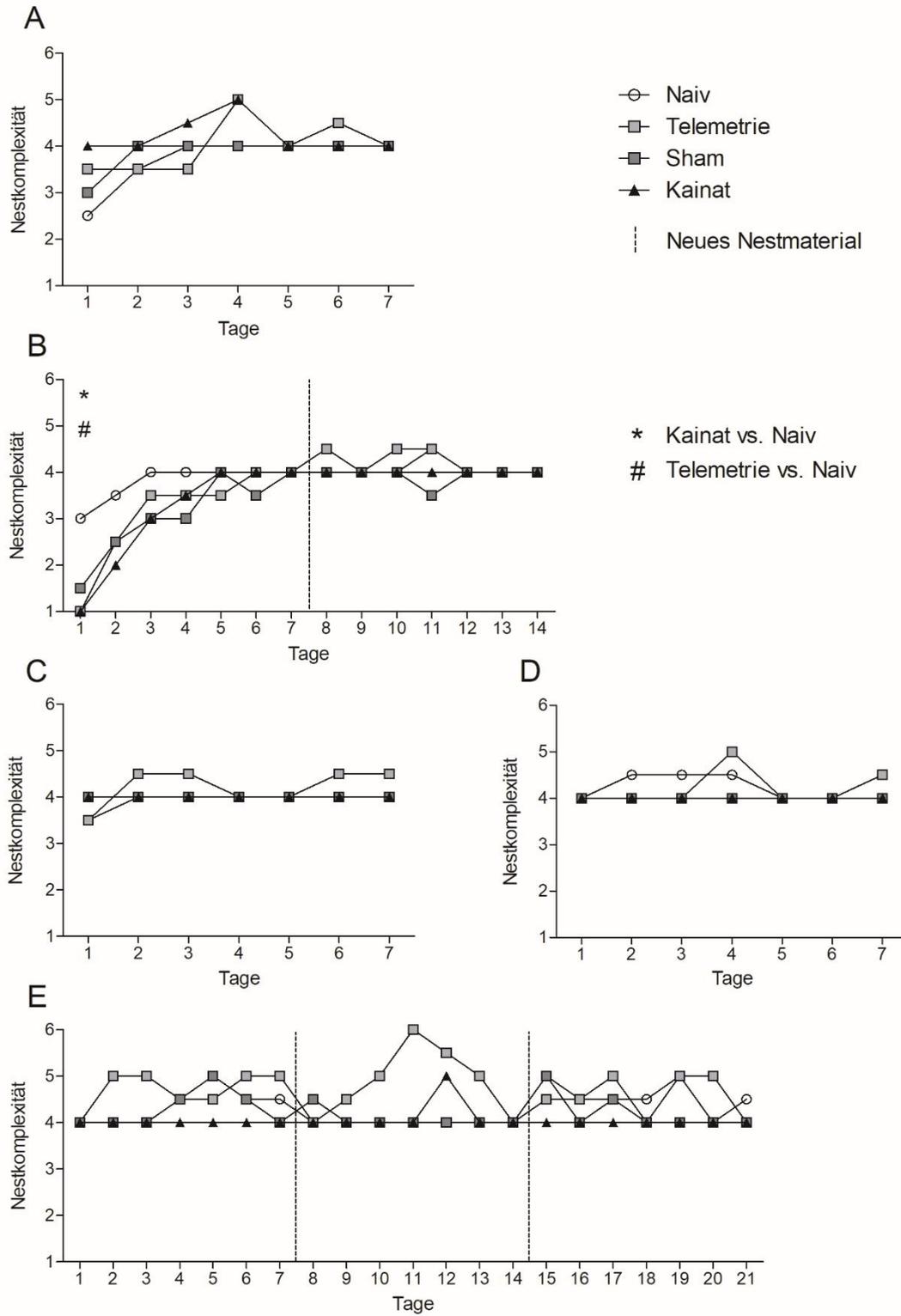


Abbildung 11: Nestkomplexität zu verschiedenen Zeitpunkten im Laufe der Studie. (A) Basalwerte über sieben Tage. (B) Nestkomplexität über 14 Tage nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus. Einen Tag post OP/SE zeigten die Tiere der Telemetrie- und Kainat-Gruppe ein signifikant reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zur naiven Gruppe. Nestkomplexität zum Zeitpunkt des EEG-Monitorings beginnend (C) zwei Wochen post OP/SE, (D) vier Wochen post OP/SE und (E) über 21 Tage.

(E) Nestkomplexität fünf bis sieben Wochen post OP/SE während dem Zeitraum der Verhaltensuntersuchungen. Zu keinem weiteren Zeitpunkt konnte ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$). Die Abbildung zeigt den Median jeder Versuchsgruppe pro Tag.

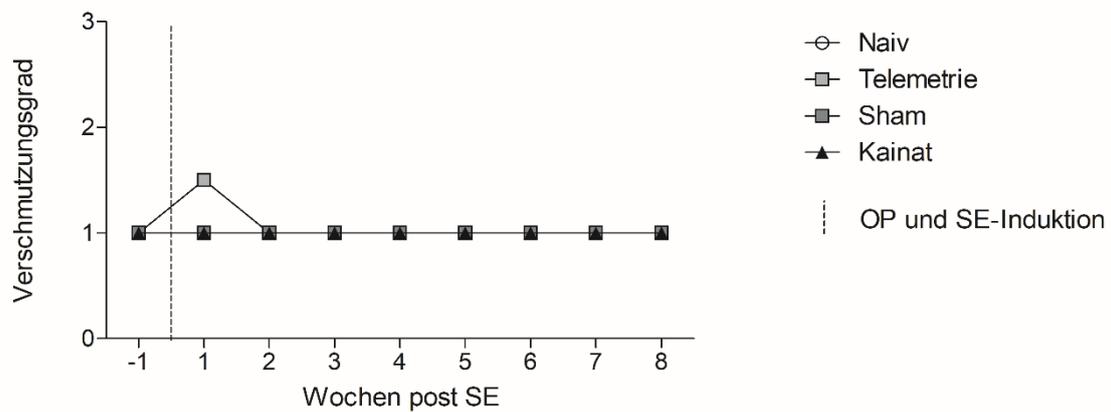


Abbildung 12: Nestverschmutzungsgrad im Verlauf der gesamten Studie. Es wurden keine Unterschiede festgestellt (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildung zeigt den Median jeder Versuchsgruppe.

2.2. *Burrowing-Test*

Zur Evaluation des Wühlverhaltens, wurde der *Burrowing-Test* im Verlauf der Studie zu vier verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt. Ein Test in der Woche vor der Operation bzw. SE-Induktion diente als Basalwert (Zeitpunkt 1). Im weiteren Verlauf wurde der *Burrowing-Test* eine Woche (Zeitpunkt 2) und zwei Wochen (Zeitpunkt 3) nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus durchgeführt, um die Auswirkungen der Operation und des *Status epilepticus* zu beurteilen. Der letzte Test erfolgte acht Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus (Zeitpunkt 4). Zu allen Zeitpunkten wurde die „gebudelte“ Menge zunächst nach 120 Minuten, direkt vor Beginn der Dunkelphase, erfasst und dann erneut direkt nach Ende der Dunkelphase.

Bei Betrachtung des Wühlverhaltens der naiven Gruppe konnten keine Unterschiede zwischen den Zeitpunkten festgestellt werden (Abbildung 13 A und B). Tiere der Telemetrie- und Sham-Gruppe zeigten in der chronischen Phase nach 120 Minuten ein gesteigertes Wühlverhalten im Vergleich zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der Operation (Abbildung 13 C, $F(3,21) = 3,958$, $p = 0,0221$ und Abbildung 13 E, $F(3,21) = 3,404$, $p = 0,0366$). Tiere der Kainat-Gruppe zeigten nach 120 Minuten ebenfalls ein gesteigertes Wühlverhalten in der chronischen Phase im Vergleich zu den Zeitpunkten eine und zwei Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus (Abbildung 13 G, $F(3,33) = 5,103$, $p = 0,0052$).

Beim Vergleich der Versuchsgruppen zu den einzelnen Zeitpunkten konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 14 A, B). Auch zu allen Zeitpunkten nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus wurde kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden (Abbildung 14 C – H).

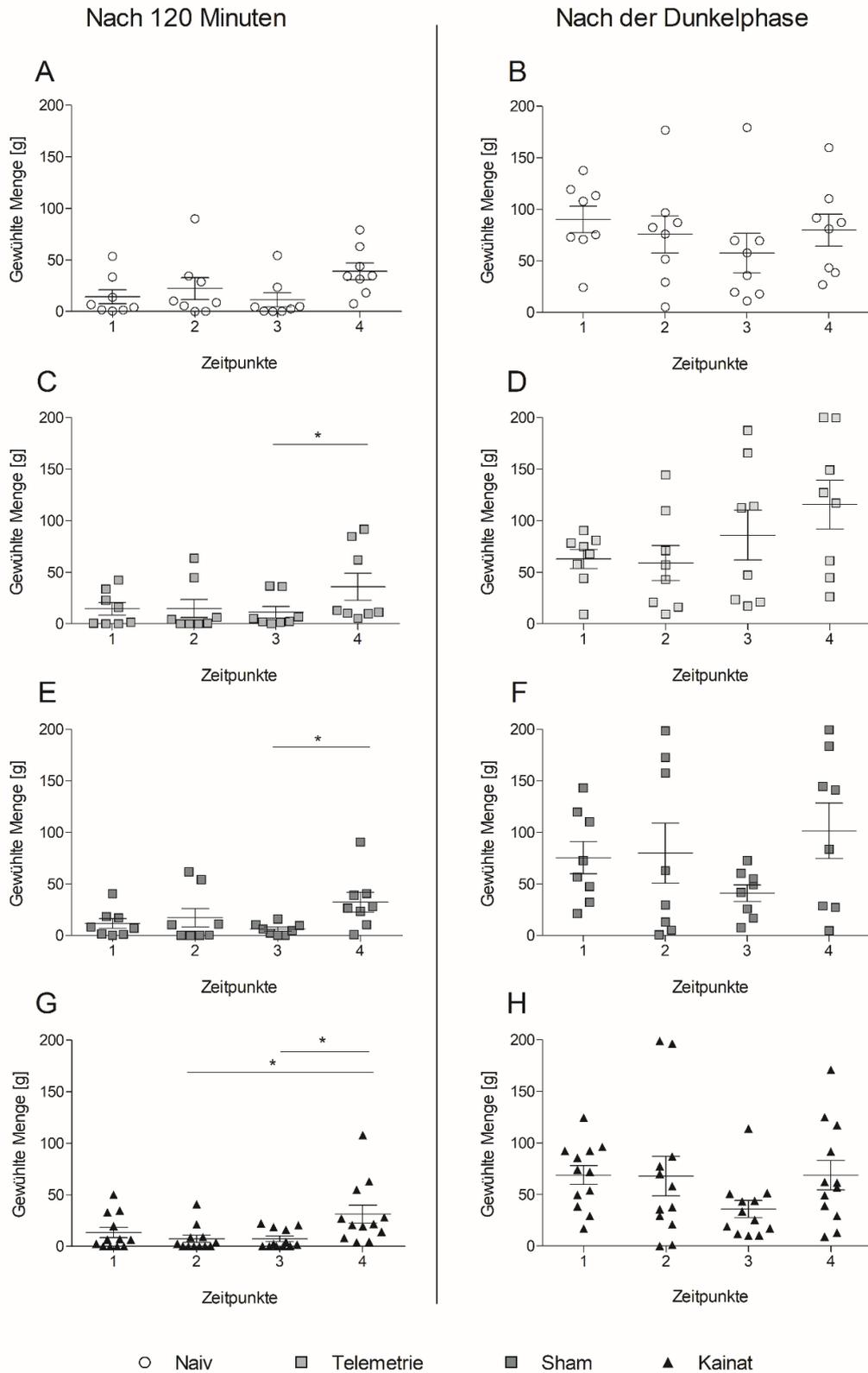


Abbildung 13: Vergleich des Wühlverhaltens nach 120 Minuten und über Nacht der Tiere der naiven Gruppe (A, B), der Telemetrie-Gruppe (C, D), der Sham-Gruppe (E, F) und der Kainat-Gruppe (G, H). Ein gesteigertes Wühlverhalten nach 120 Minuten wurde bei der Telemetrie-, Sham- und Kainat-Gruppe acht Wochen post OP/SE Phase festgestellt (Naiv n = 8, Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet (p < 0,05). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

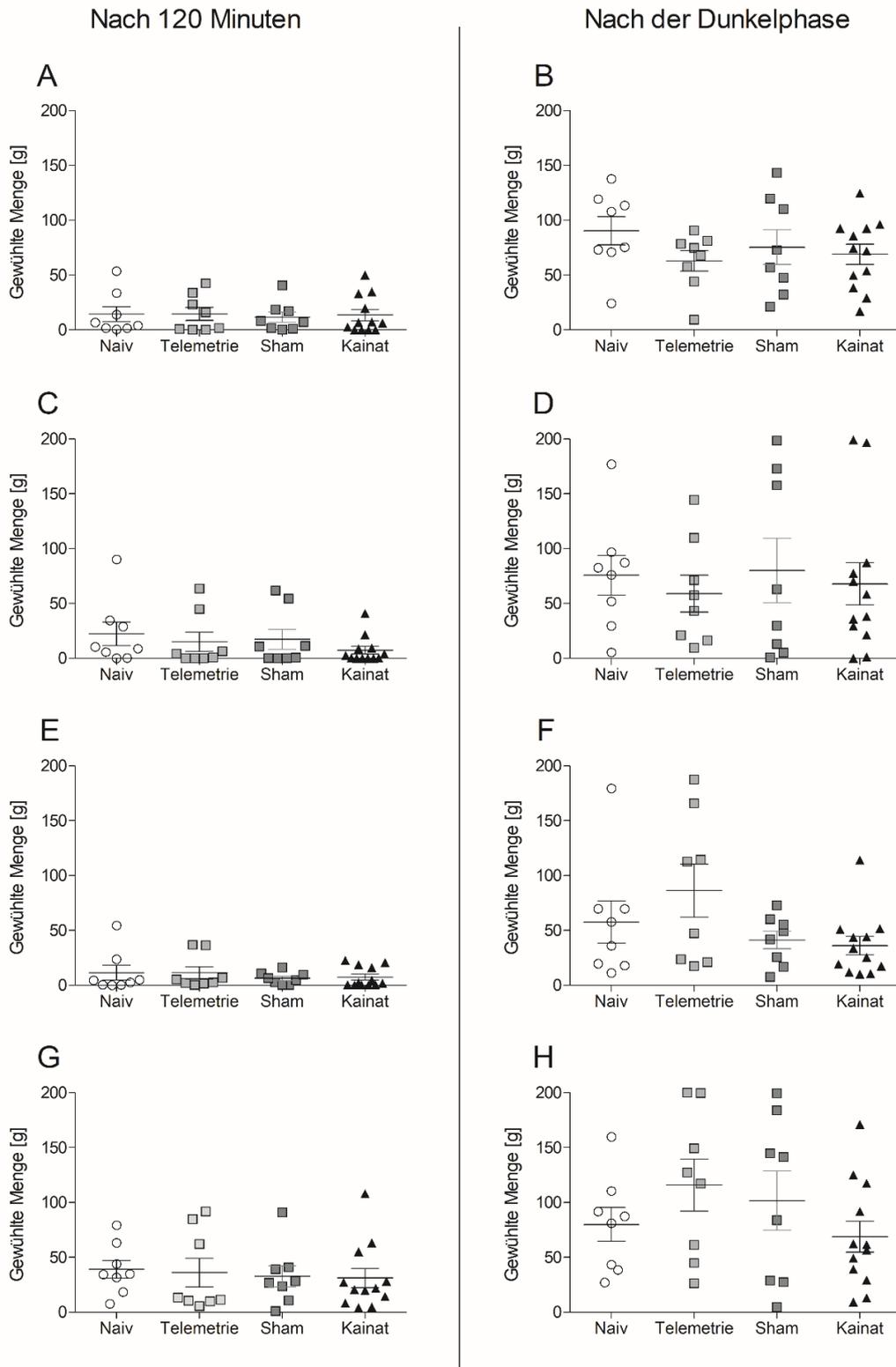


Abbildung 14: Wühlverhalten der Tiere zu den verschiedenen Zeitpunkten. Gewählte Menge nach (A) 120 Minuten und (B) über Nacht zum Zeitpunkt 1. Gewählte Menge nach (C) 120 Minuten und (D) über Nacht zum Zeitpunkt 2. Gewählte Menge nach (E) 120 Minuten und (F) über Nacht zum Zeitpunkt 3. Gewählte Menge nach (G) 120 Minuten und (H) über Nacht zum Zeitpunkt 4. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv n = 8, Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

2.3. Social-Interaction-Test

Der *Social-Interaction-Test* wurde einmalig in der chronischen Phase durchgeführt. Zwei Tiere der gleichen Versuchsgruppe bildeten ein Interaktionspaar. Erfasst wurde die Zeit, in der sich die Tiere in aktiver sozialer Interaktion befanden, wie gegenseitiges Beschnupern oder Putzen. Passive soziale Interaktion zeigte sich unter anderem durch nebeneinanderliegen oder -sitzen, ohne dabei aktiv miteinander zu interagieren. Sowohl bei der passiven, als auch bei der aktiven sozialen Interaktion wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Abbildung 15 A und B).

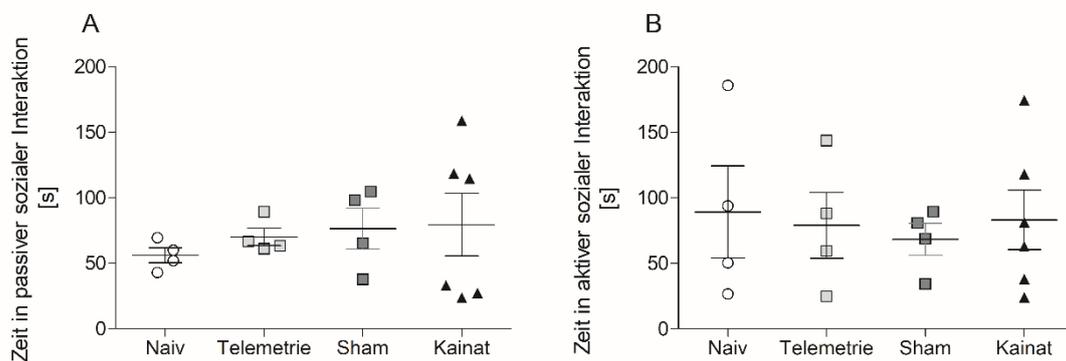


Abbildung 15: Soziale Interaktion. Zeit in (A) passiver und (B) aktiver sozialer Interaktion. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv n = 4 Paare, Telemetrie n = 4 Paare, Sham n = 4 Paare, Kainat n = 6 Paare). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der Tierpaare.

2.4. Open-Field-Test

Die lokomotorische Aktivität der Tiere wurde mit dem *Open-Field-Test* einmalig während der chronischen Phase durchgeführt. Untersucht wurden die zurückgelegte Gesamtstrecke, die durchschnittliche Geschwindigkeit, die Häufigkeit des Aufrichteverhaltens (*Rearing*), die Immobilität und die Zeit in den verschiedenen Zonen des *Open-Fields* (Zentrum, Wandbereich). Ein Testdurchlauf dauerte zehn Minuten. Bei keinem der untersuchten Parameter konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erfasst werden (Abbildung 16).

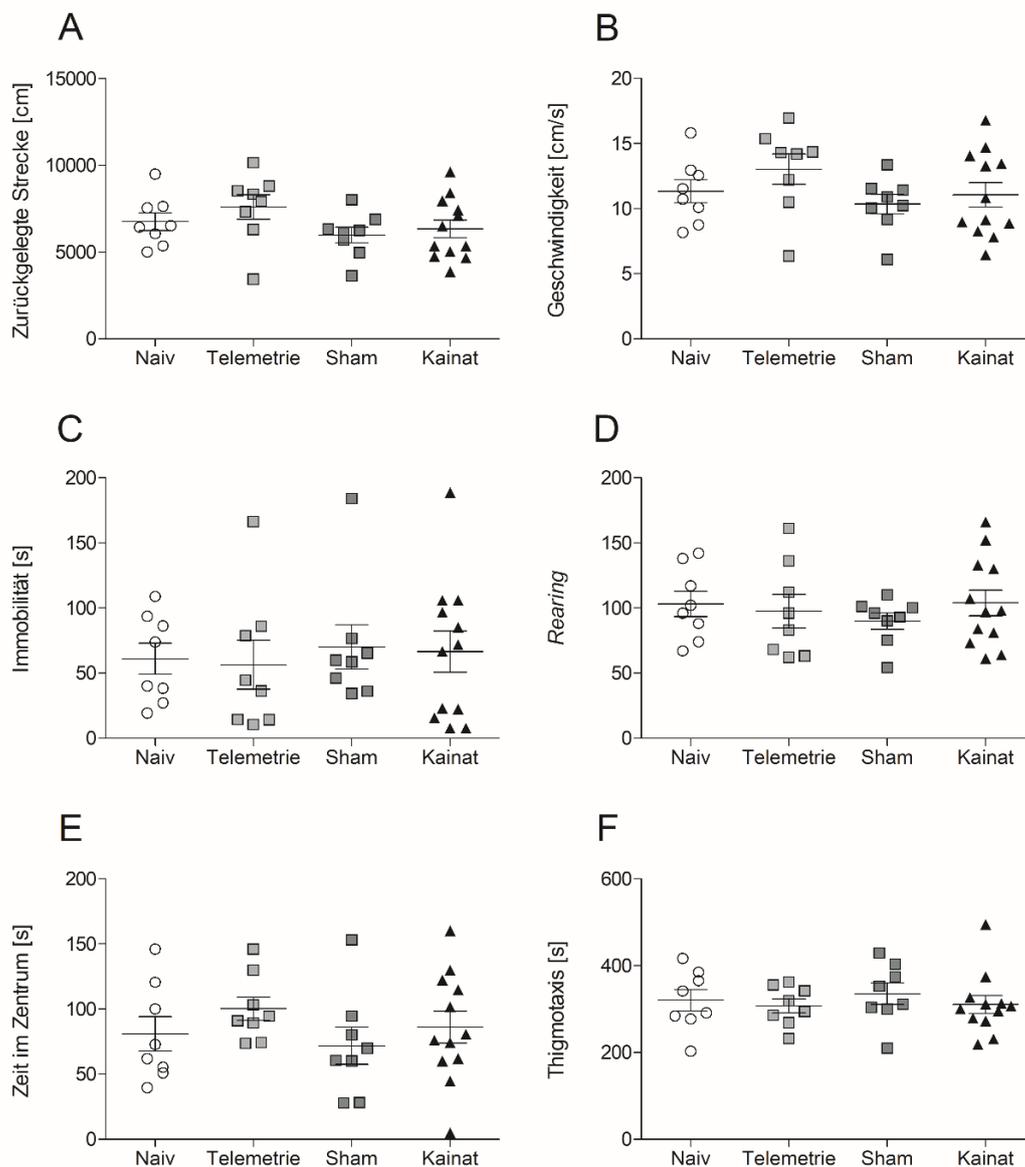


Abbildung 16: Lokomotorisches Verhalten erfasst im Open Field. (A) Zurückgelegte Gesamtstrecke. (B) Durchschnittliche Geschwindigkeit. (C) Zeit, die die Tiere in Immobilität verbrachten. (D) Häufigkeit des Aufrichteverhaltens (*Rearing*). (E) Aufenthaltsdauer im Zentrum. (F) Thigmotaxis. Bei

keinem der untersuchten Parameter wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

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

Mit Hilfe der *Black-and-White-Box* wurde das angst-assoziierte Verhalten der Tiere untersucht. Die Daten folgender Parameter wurden dabei erhoben: die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box, die Anzahl der Übertritte in die weiße Box, die Aufenthaltsdauer in der weißen Box und die Frequenz des Streckverhaltens (*Stretching postures*). Bei keinem der untersuchten Parameter konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 17).

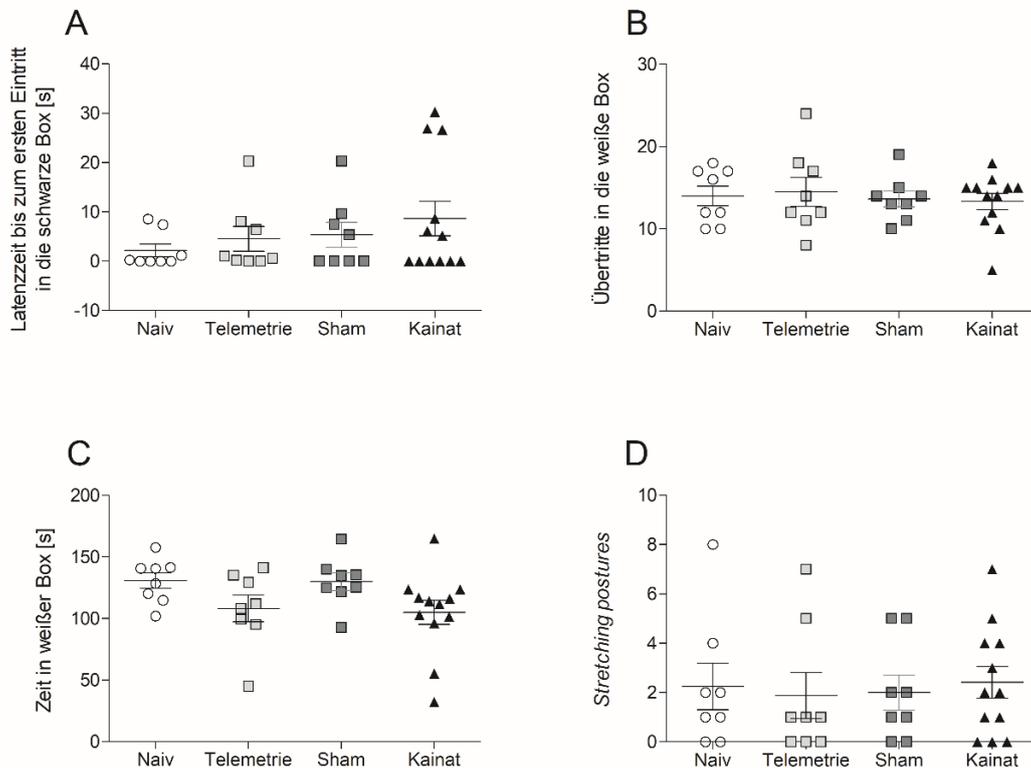


Abbildung 17: Angst-assoziiertes Verhalten in der Black-and-White-Box während der chronischen Phase. (A) Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box. (B) Anzahl der Übertritte in die weiße Box. (C) Gesamte Aufenthaltsdauer in der weißen Box. (D) Frequenz des Streckverhaltens (*Stretching postures*). Bei keinem der untersuchten Parameter wurde ein signifikanter Unterschied

zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

2.6. *Elevated-Plus-Maze-Test*

Der Elevated-Plus-Maze-Test diente ebenfalls der Untersuchung von angst-assoziiertem Verhalten der Tiere. Folgende Parameter wurden getestet: die Zeit in den verschiedenen Zonen (offene Arme, geschlossene Arme), die *Head dips* und die Frequenz des Streckverhaltens (*Stretching postures*). Bei keinem der untersuchten Parameter konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 18 A – D).

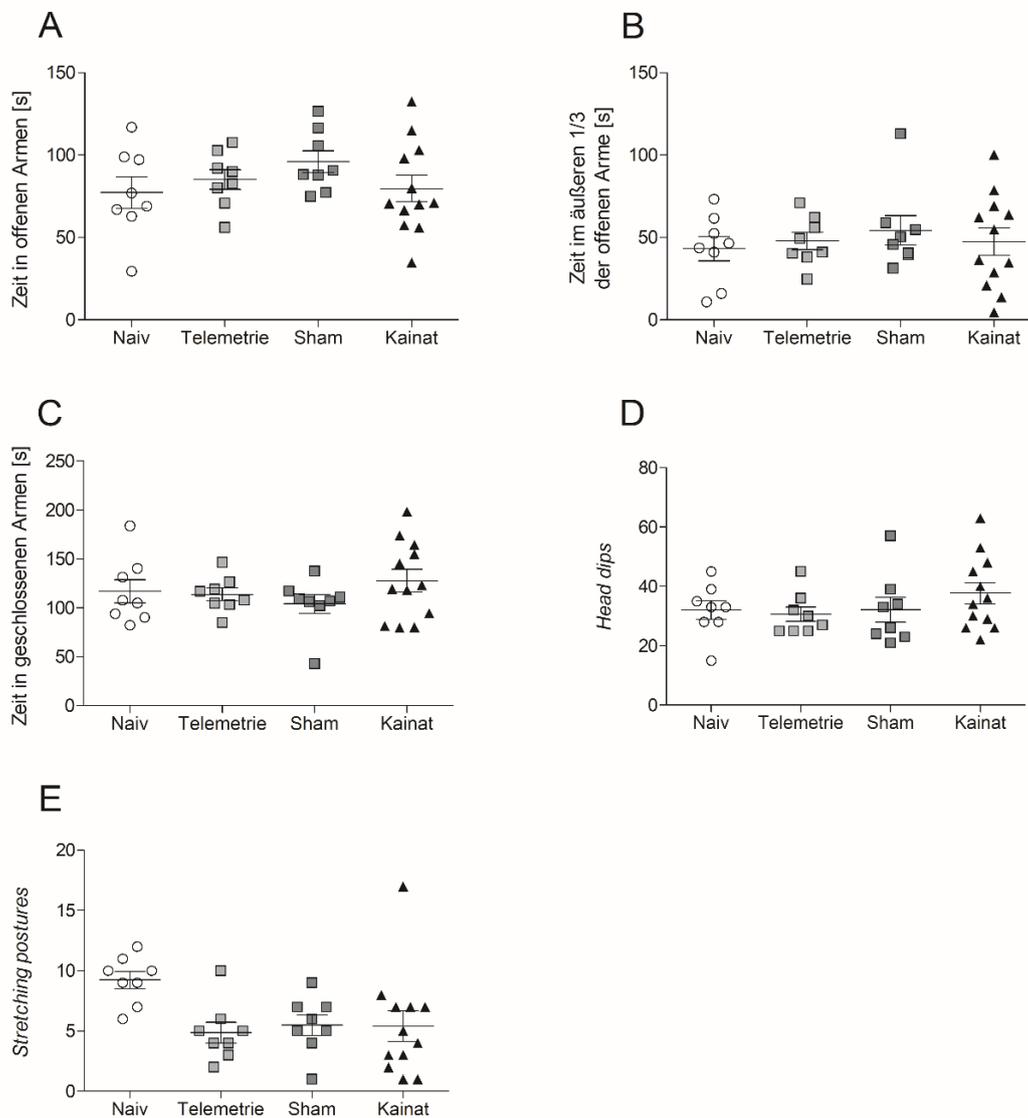


Abbildung 18: Angstassoziiertes Verhalten im Elevated-Plus-Maze während der chronischen Phase. (A) In den offenen Armen verbrachte Zeit. (B) Im äußeren Drittel der offenen Arme verbrachte Zeit. (C) In den geschlossenen Armen verbrachte Zeit. (D) Anzahl der *Head dips*. (E) Frequenz des

Streckverhalten (*Stretching postures*). Bei keinem der untersuchten Parameter wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

2.7. Saccharin-Präferenz-Test

Das anhedonie-assoziierte Verhalten der Tiere wurde in dieser Studie mit dem Saccharin-Präferenz-Test einmalig während der chronischen Phase überprüft. Ein Tier aus der naiven Gruppe musste aufgrund einer ausgelaufenen Flasche exkludiert werden. Es konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 19).

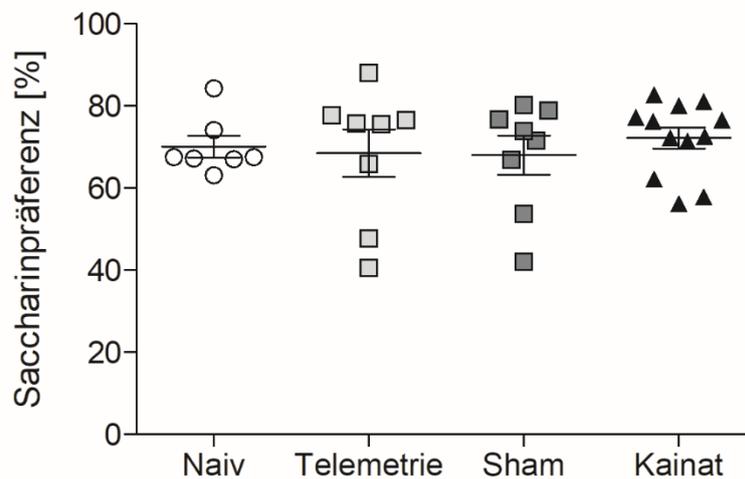


Abbildung 19: Saccharin-Konsum. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Naiv $n = 7$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildung zeigt den Mittelwert, den SEM und die Werte der einzelnen Tiere.

2.8. Grimace Scale, Irwin Score und Körpergewicht

Der *Grimace Scale* wurde über 14 Tage nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus beurteilt. Zur Berechnung des *Grimace Scales* diente für jedes Tier der Durchschnittswert der fünf erhobenen Parameter. Als Basalwerte dienten Daten, die an drei Tagen in der Woche vor der Operation erhoben wurden. In den Basalwerten zeigten die Versuchsgruppen keine Unterschiede (Abbildung 20 A). In der postoperativen bzw. frühen Post-Insult-Phase zeigten alle operierten Tiere einen erhöhten *Grimace Scale*. Die Tiere der Telemetrie- bzw. Sham- Gruppe zeigten am zweiten bzw. dritten Tag nach der Operation wieder Werte der Basalmessung, die Tiere der Kainat-Gruppe am fünften Tag (Abbildung 20 B). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Sham- und Kainat-Gruppe im Vergleich zur naiven Gruppe an Tag eins und zwei (Für beide Tage und Gruppen: $p < 0,05$). An Tag drei und vier war der Unterschied zwischen der Kainat-Gruppe und der naiven Gruppe signifikant (Für beide Tage: $p < 0,05$).

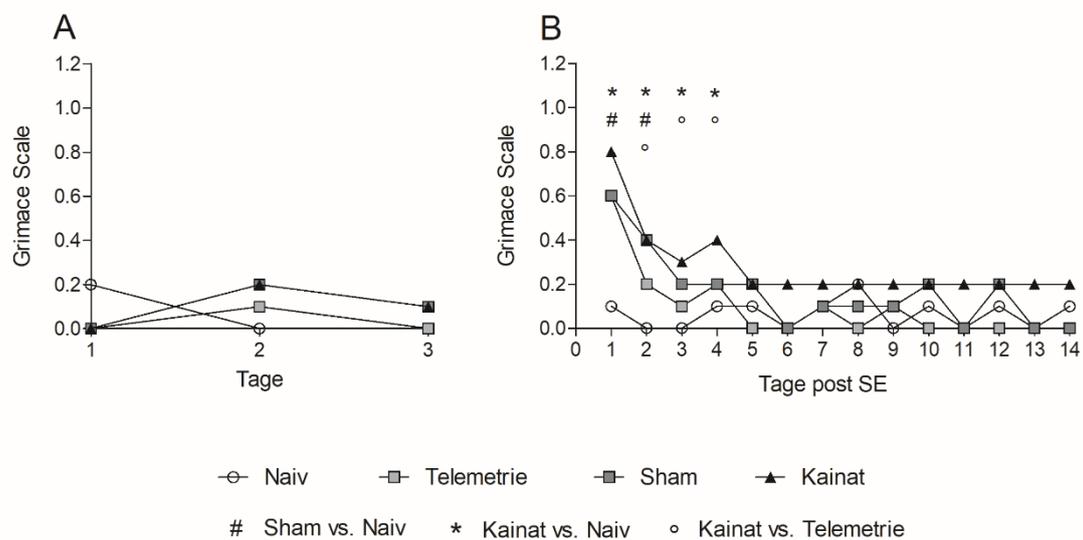


Abbildung 20: Grimace Scale. Basalwerte (A) und 14 Tage nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus (B). Tiere der Telemetrie-Gruppe zeigten am zweiten, Tiere der Sham-Gruppe am dritten und Tiere der Kainat-Gruppe am fünften Tag nach der Operation wieder Werte aus der Basalmessung (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$). Die Abbildungen zeigen jeweils den Median jeder Versuchsgruppe pro Tag.

Der modifizierte *Irwin Score* wurde nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus täglich für 14 Tage erhoben. Im weiteren Verlauf der Studie wurde das Scoring einmal wöchentlich durchgeführt. Als Basalwerte dienten drei Tage in der Woche vor der Operation. In den Basalwerten zeigten die Versuchsgruppen keine Unterschiede (Abbildung 21 A). Sowohl während der 14 Tage nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus (Abbildung 21 B), als auch im weiteren Verlauf der Studie (Abbildung 21 C) konnte bei den Tieren der Kainat-Gruppe ein signifikant erhöhter *Irwin Score* im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen festgestellt werden ($p < 0,05$ für alle Zeiträume). Die Parameter, die zu der Erhöhung des Irwin Scores in der Kainat-Gruppe führten waren: Berührungsreaktion, Schwanzhöhe, Schreckhaftigkeit und Körpertonus.

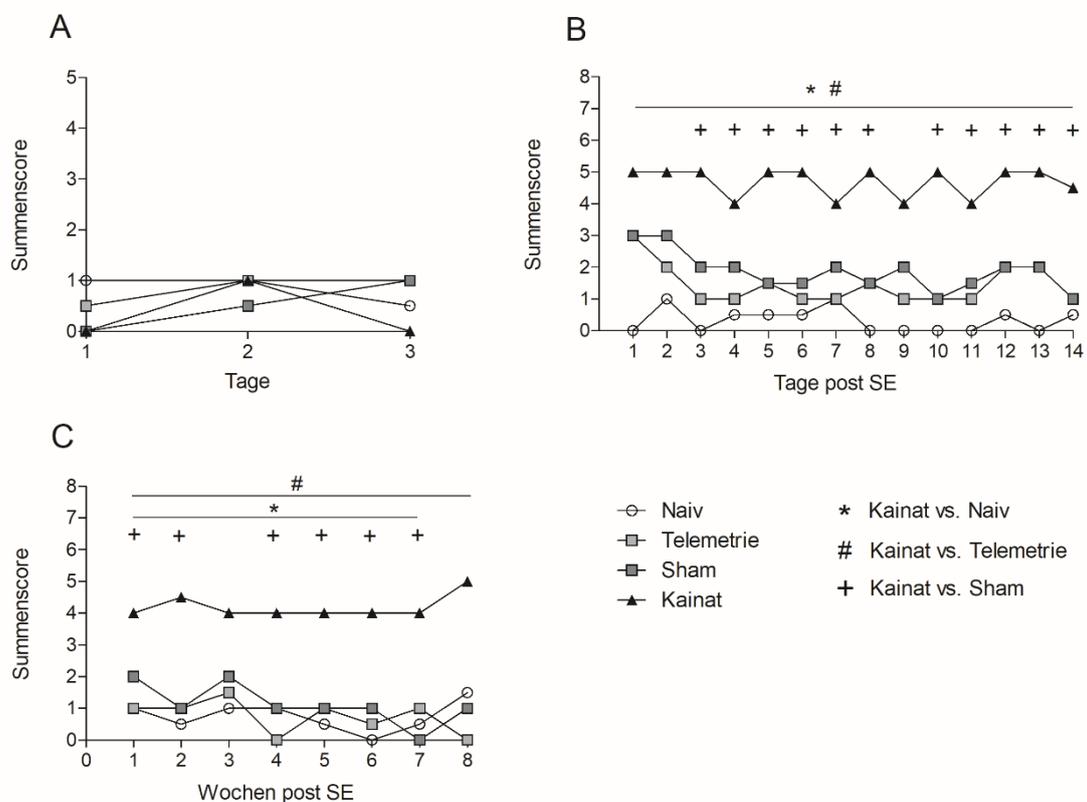


Abbildung 21: Irwin-Score. (A) Basalwert aller Versuchsgruppen über drei Tage. (B) Tägliche Beurteilung nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus über 14 Tage. (C) Irwin Score über den Verlauf der gesamten Studie. Die Tiere der Kainat-Gruppen zeigten für alle Zeitpunkte nach der Operation bzw. SE-Induktion einen erhöhten Irwin Score (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Die Abbildungen zeigen den Median. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

Das Gewicht der Tiere wurde im Verlauf der Studie wöchentlich dokumentiert. Zwischen den Versuchsgruppen wurden keine Unterschiede festgestellt (Abbildung 22). Zu berücksichtigen ist hier das zusätzliche Gewicht des Elektrodenimplantates bei den Tieren der Sham- und Kainat-Gruppe und das Gewicht des Telemetrietransmitters bei allen operierten Versuchsgruppen.

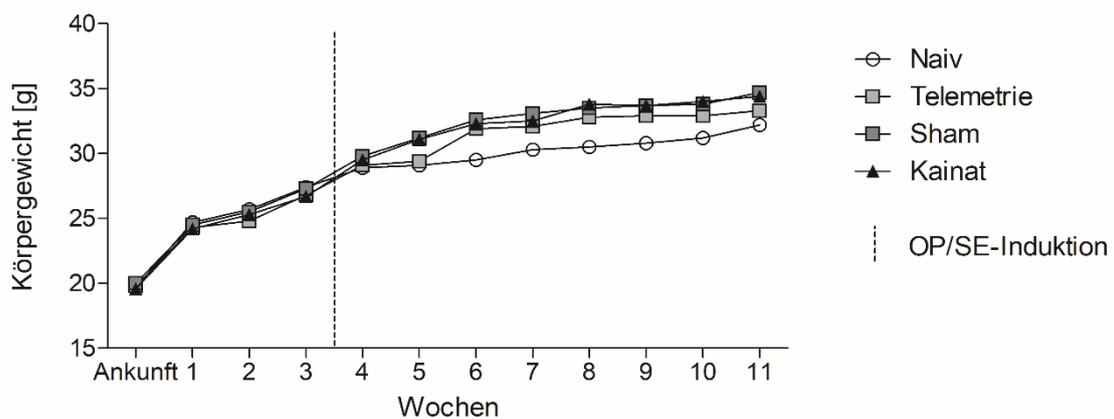


Abbildung 22: Gewichtsverlauf der Tiere über die gesamte Studie. Es wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt (Naiv n = 8 Tiere, Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12). Dargestellt ist der Gruppenmittelwert jeder Versuchsgruppe pro Woche.

3. Fäkale Corticosteronmetaboliten

Die Konzentration der Corticosteronmetaboliten im Kot (FCM) wurde im Verlauf der Studie zu fünf Zeitpunkten erhoben. Als Basalwert (Zeitpunkt 1) diente ein Wert in der Woche vor der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus. Die weiteren Zeitpunkte waren zwei Tage (Zeitpunkt 2), eine Woche (Zeitpunkt 3) und zwei Wochen (Zeitpunkt 4) nach Operation bzw. Induktion des Status epilepticus und acht Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus, am Ende der Studie (Zeitpunkt 5).

Im Vergleich der Versuchsgruppen miteinander konnte bei Betrachtung der Basalwerte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 23 A). Zwei Tage nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus zeigten die Tiere der Sham- und Kainat-Gruppe eine signifikant erhöhte Konzentration an fäkalen Corticosteronmetaboliten im Vergleich zur naiven Gruppe (Abbildung 23 B, $F(3,32) = 7,589$, $p = 0,0006$). Zu den weiteren Zeitpunkten, eine, zwei und acht Wochen nach Operation bzw. Induktion des Status epilepticus konnte wiederum kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 23 C – E).

Im Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Versuchsgruppen zeigte sich bei den Tieren der naiven Gruppe kein Unterschied (Abbildung 24 A). Bei allen operierten Gruppen wurde eine erhöhte Konzentration an fäkalen Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 2 (= zwei Tage post OP/SE) im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten festgestellt (Abbildung 24 B, $F(4,24) = 5,263$, $p = 0,0035$; Abbildung 31 C, $F(4,24) = 20,37$, $p < 0,0001$; Abbildung 31 D, $F(4,36) = 23,98$, $p < 0,0001$). Für zwei Tiere der Kainat-Gruppe und je ein Tier der Sham- und Telemetrie-Gruppe konnte jeweils ein Zeitpunkt, aufgrund einer zu geringen Kotmenge, nicht ausgewertet werden. Diese Tiere wurden aus den entsprechenden Analysen exkludiert.

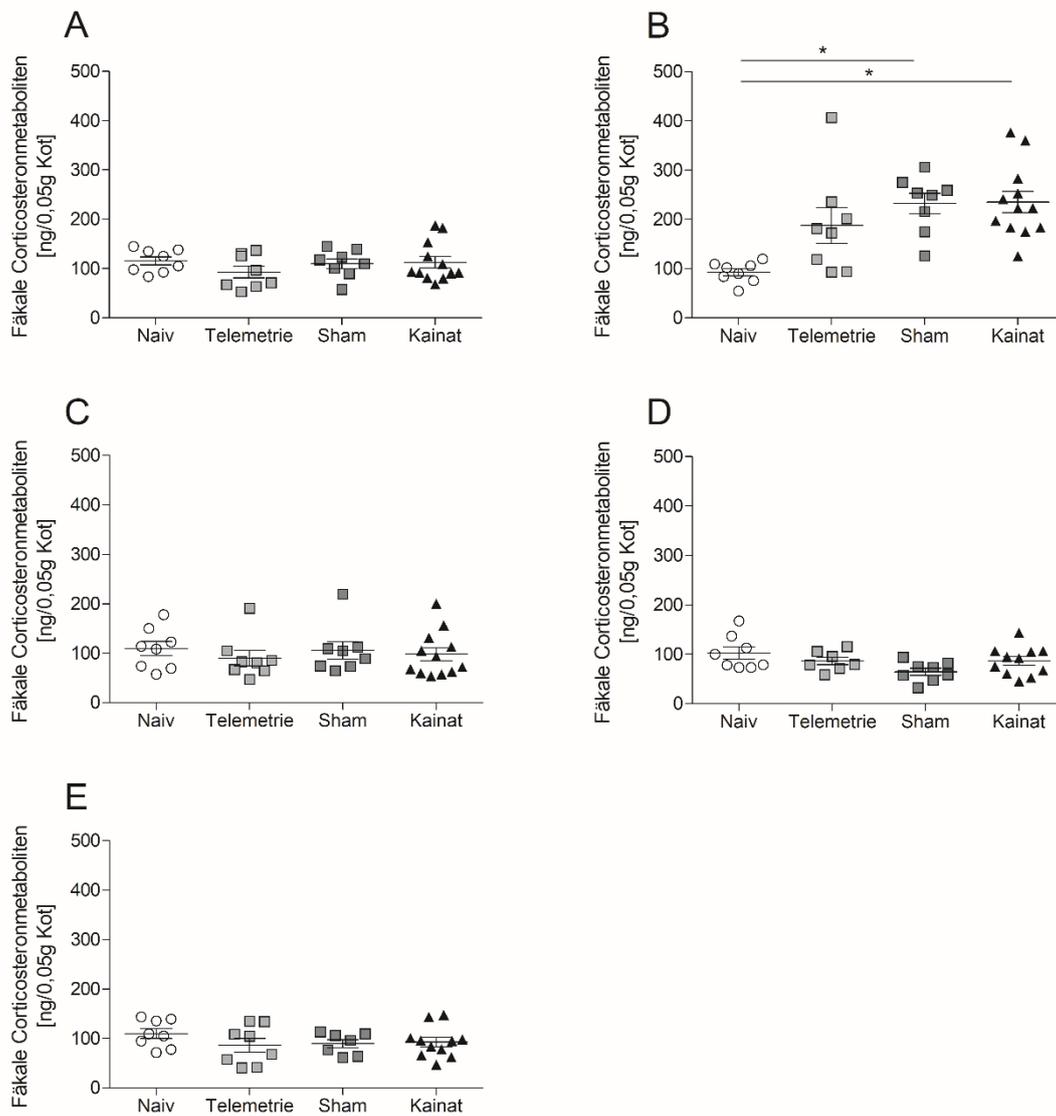


Abbildung 23: Konzentration fäkaler Corticosteronmetaboliten zu (A) Zeitpunkt 1 (= Basalwert), (B) Zeitpunkt 2 (= zwei Tage post OP/SE), (C) Zeitpunkt 3 (= eine Woche post OP/SE), (D) Zeitpunkt 4 (= zwei Wochen post OP/SE) und (E) Zeitpunkt 5 (= acht Wochen post OP/SE). Zwei Tage nach der Operation bzw. SE-Induktion konnte eine signifikante Erhöhung der fäkalen Corticosteronmetaboliten der Sham- und Kainat-Gruppe im Vergleich zur naiven Gruppe festgestellt werden (Naiv n = 8, Telemetrie n = 7, Sham n = 7, Kainat = 10). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert, der SEM und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

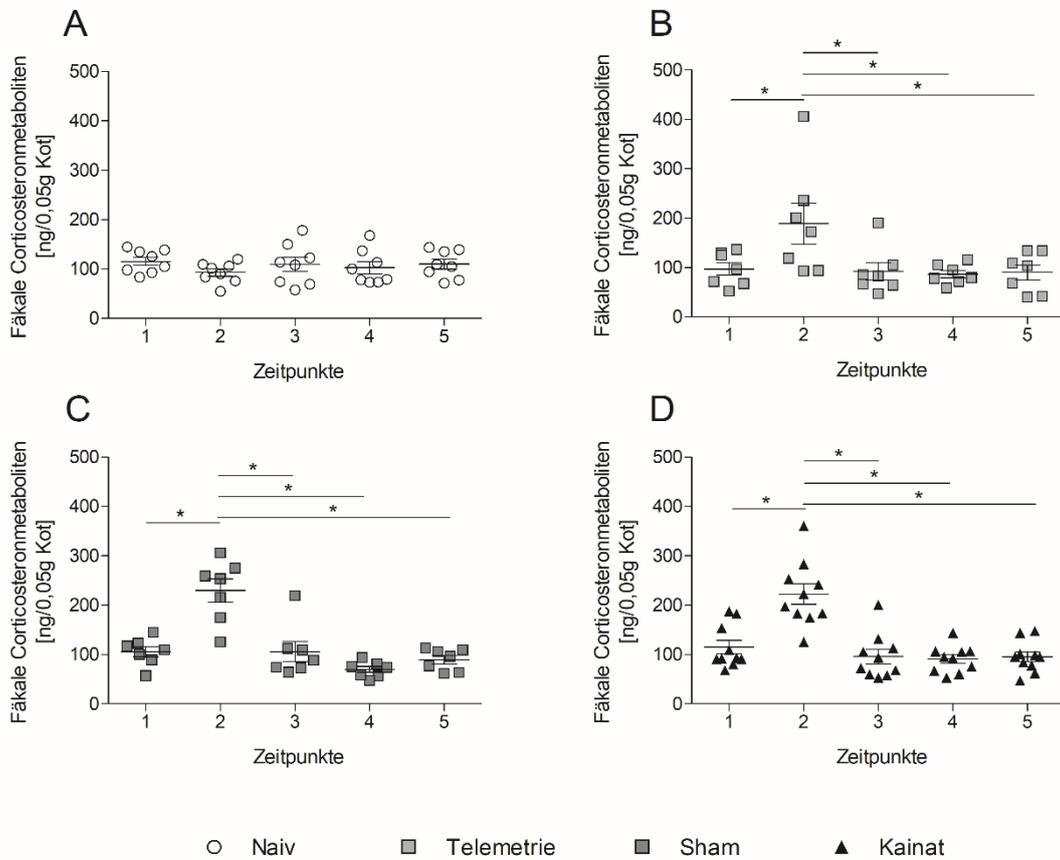


Abbildung 24: Vergleich der Konzentration fäkaler Corticosteronmetaboliten der naiven Gruppe (A), der Telemetrie-Gruppe (B), der Sham-Gruppe (C) und der Kainat-Gruppe (D) zu verschiedenen Zeitpunkten. Tiere der Telemetrie-, Sham- und Kainat-Gruppen zeigten erhöhte Konzentrationen an fäkalen Corticosteronmetaboliten zum Zeitpunkt 2 im Vergleich zu allen anderen Zeitpunkten (Naiv $n = 8$, Telemetrie $n = 7$, Sham $n = 7$, Kainat $n = 10$). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert, der SEM und die Werte der einzelnen Tiere. Signifikante Unterschiede sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4. Zyklusstand

Der Zyklusstand aller Tiere wurde am Tag der Perfusion mit Hilfe eines Ohmmeters ermittelt. Insgesamt befanden sich sechs von 36 Tieren im Östrus, zwei Tiere der naiven Gruppe, zwei Tiere der Telemetrie-Gruppe und zwei Tiere der Sham-Gruppe. In der Kainat-Gruppe befand sich kein Tier im Östrus (Abbildung 25).

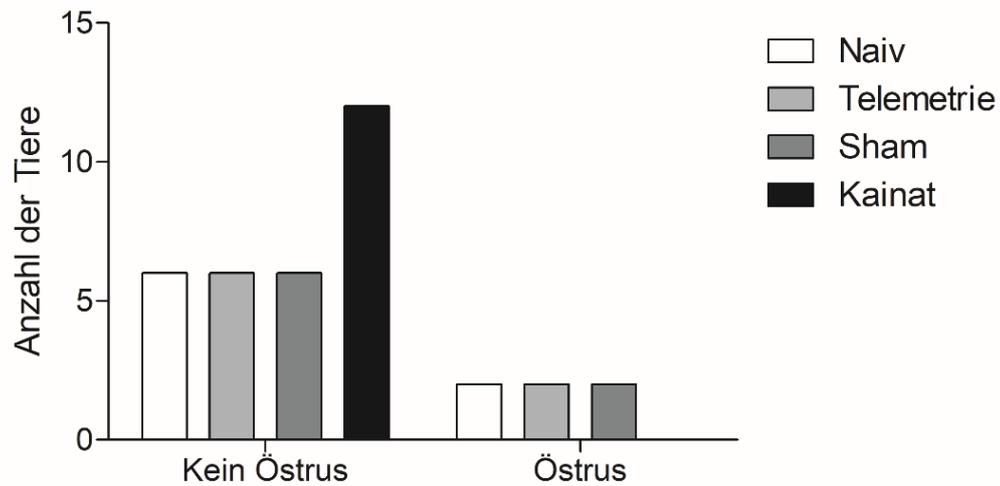


Abbildung 25: Zyklusstand der Tiere (Naiv n = 8, Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12). Die Abbildung zeigt die absolute Tierzahl.

5. Telemetrie Messungen

Die telemetrischen Aufzeichnungen der operierten Tiere fanden zu drei Zeitpunkten für mindestens 48 Stunden statt. Die erste Messung wurde im Anschluss an die Operation bzw. Induktion des Status epilepticus über einen Zeitraum von 96 Stunden erfasst, um die Auswirkungen der jeweiligen Eingriffe zu beurteilen. Die beiden weiteren Aufzeichnungen fanden zwei und vier Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus über jeweils 48 Stunden statt. Bei jeder telemetrischen Aufzeichnung wurde das EEG, das EKG und die Aktivität der Tiere in ihrem Heimkäfig erfasst. Für jeden analysierten Parameter ist nachfolgend der zeitbasierte Kurvenverlauf der einzelnen Zeitpunkte sowie die vergleichende Analyse der Versuchsgruppen während der Hell- und Dunkelphasen dargestellt.

5.1. Circadiane Rhythmik der Aktivität

Mäuse sind nachtaktive Tiere. Die Aktivitätsphase der Tiere findet daher physiologisch während der Dunkelphase statt. Diese deutliche Abgrenzung zwischen hoher Aktivität in der Dunkelphase und niedriger Aktivität in der Hellphase ist zum Zeitpunkt direkt nach der Operation bzw. SE-Induktion nicht zu erkennen. Die Tiere aller Gruppen zeigten zu diesem Zeitpunkt eine niedrigere Aktivität während der Dunkelphase. Zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus sind Aktivitätshöhepunkte während der Dunkelphasen zu erkennen.

Zu keinem der drei Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 26).

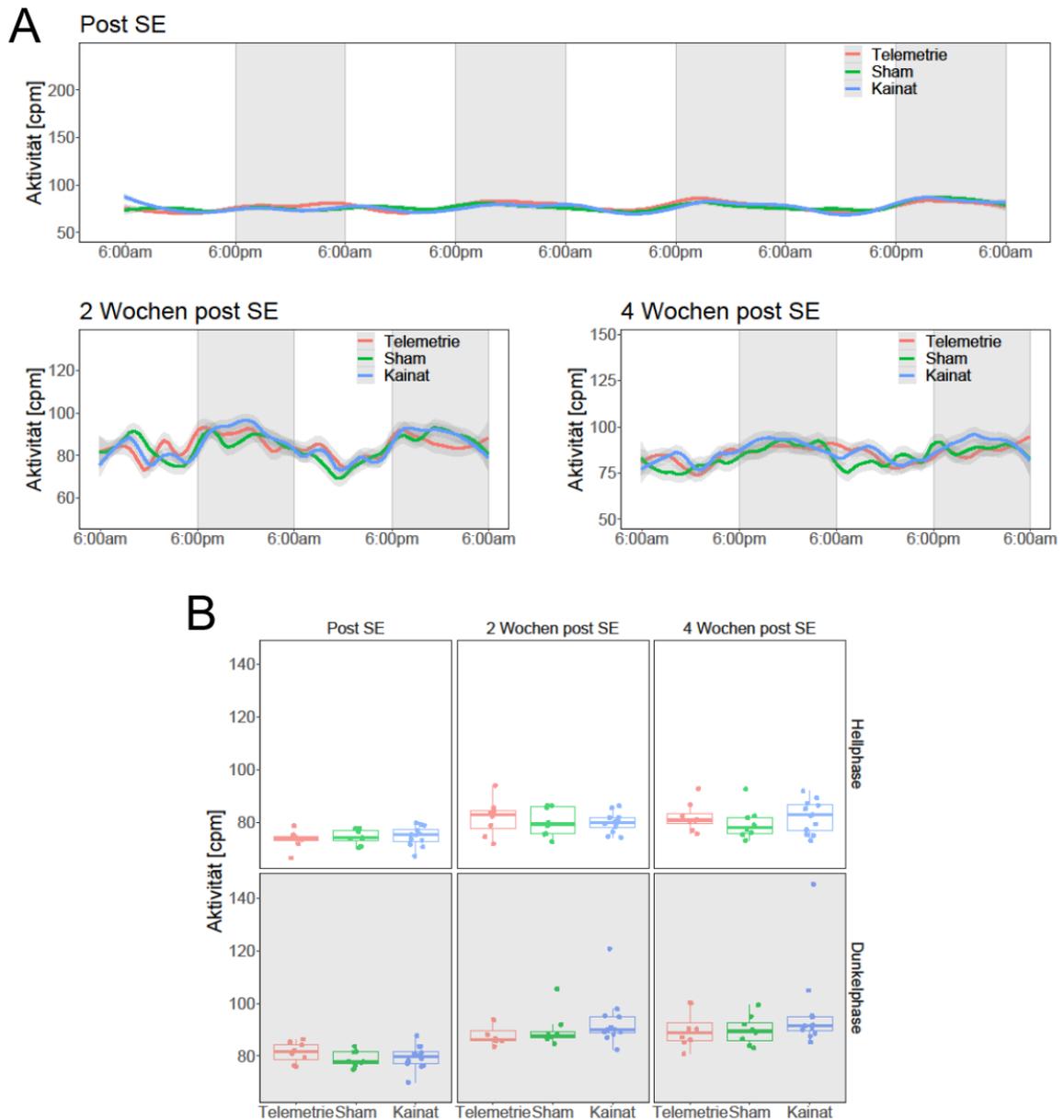


Abbildung 26: Circadiane Aktivität im Heimkäfig. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$).

5.2. Herzfrequenz

Die circadiane Veränderung der Herzfrequenz und des NN-Intervalls der Tiere zu den verschiedenen Messzeitpunkten sind in Abbildung 27 und 28 dargestellt. Der allgemeine Kurvenverlauf der Herzfrequenz zeigt höhere Werte in der Dunkelphase im Vergleich zur Hellphase. Die Tiere aller Gruppen zeigten im Anschluss an die Operation bzw. Induktion des Status epilepticus insgesamt eine höhere Herzfrequenz und ein niedrigeres NN-Intervall im Vergleich zu den anderen beiden Zeitpunkten.

Sowohl in der Hell- als auch in der Dunkelphase zeigten die Tiere der Kainat-Gruppe in der Phase nach der Operation und Induktion des Status epilepticus eine signifikant erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zur Telemetrie-Gruppe (Hellphase: $p = 0,0029$, Dunkelphase: $p = 0,0118$). Diese Abweichungen lassen sich durch ein signifikant erniedrigtes NN-Intervall zum gleichen Zeitpunkt (Hellphase: $p = 0,0052$, Dunkelphase: $p = 0,0112$) bestätigen. In der Dunkelphase zu diesem Zeitpunkt wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der Kainat- und der Sham-Gruppe gefunden ($p = 0,0414$).

Zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus konnten weder für die Herzfrequenz, noch für das NN-Intervall, Veränderungen zwischen den Versuchsgruppen gezeigt werden.

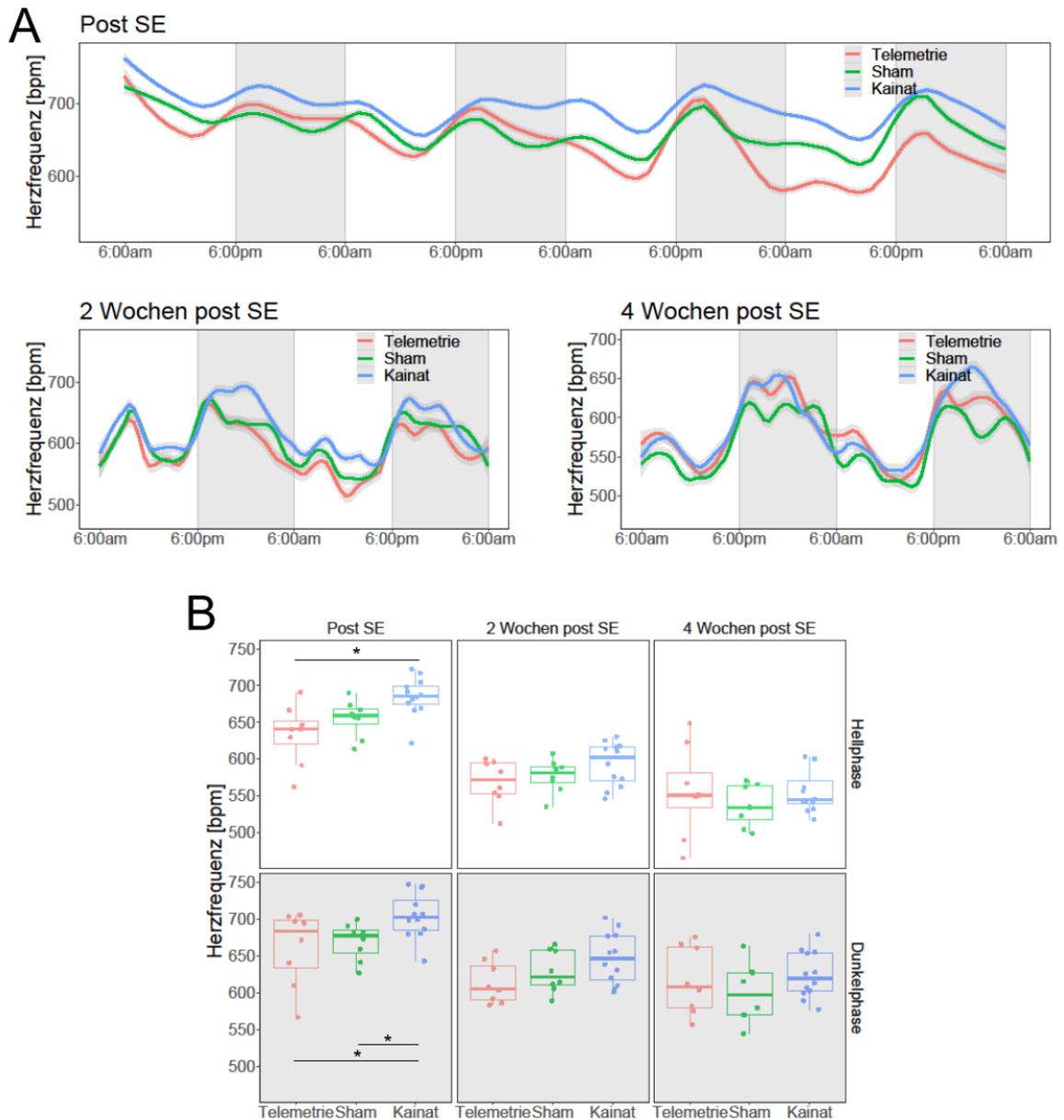


Abbildung 27: Herzfrequenz. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Die Tiere der Kainat-Gruppe zeigten nach der OP bzw. SE-Induktion eine signifikant erhöhte Herzfrequenz gegenüber der Telemetrie-Gruppe in der Hellphase und gegenüber der Telemetrie- und Sham-Gruppe in der Dunkelphase (Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

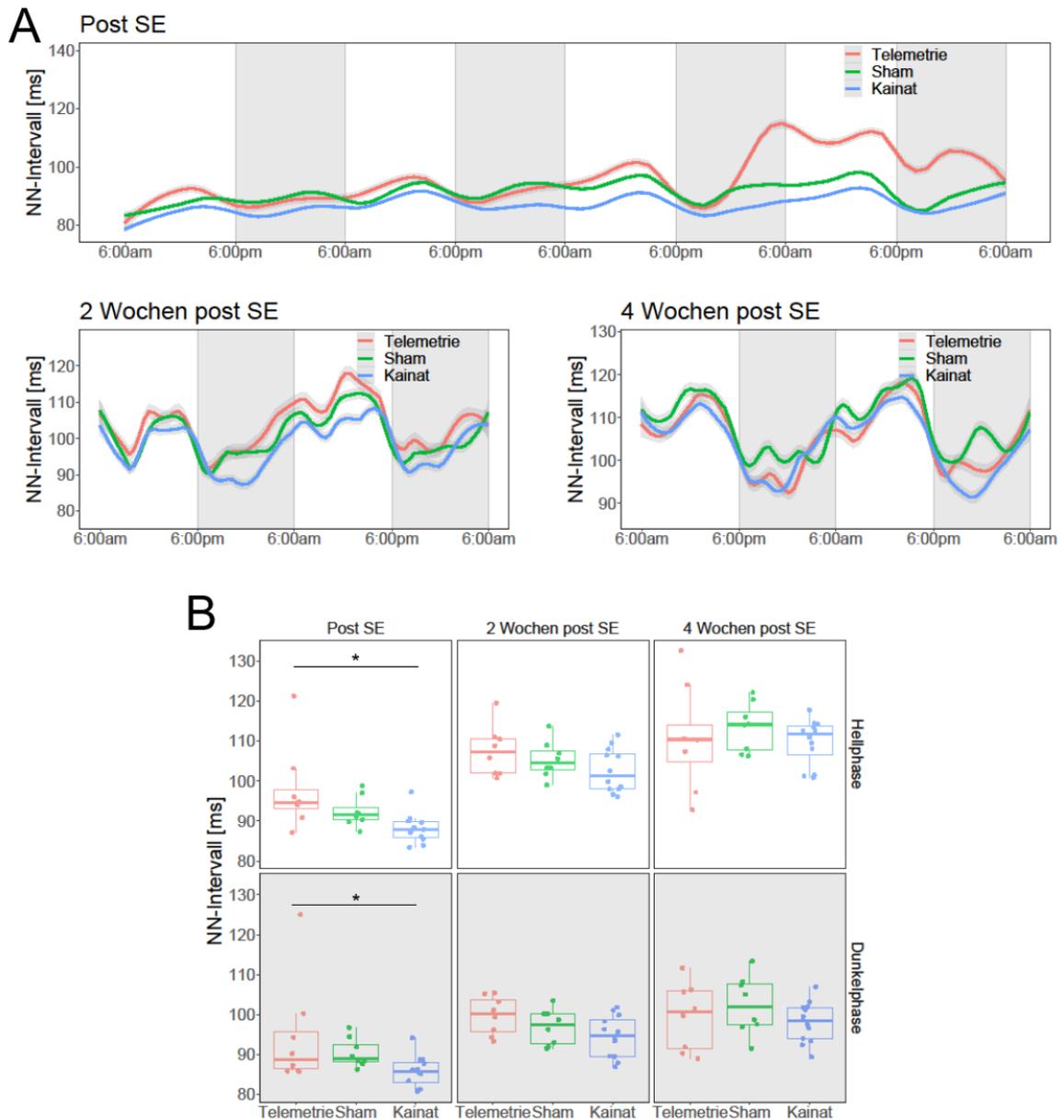


Abbildung 28: NN-Intervall. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Die Tiere der Kainat-Gruppe zeigten nach der OP bzw. SE-Induktion ein signifikant erniedrigtes NN-Intervall gegenüber der Telemetrie-Gruppe sowohl in der Hellphase, als auch in der Dunkelphase (Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

5.3. Herzratenvariabilität

Zur Beurteilung der zeitabhängigen Herzratenvariabilität wurden die Parameter SDNN, RMSSD, NN6 und pNN6 an allen drei Zeitpunkten analysiert.

Für die SDNN-Werte zum Zeitpunkt nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus wurde sowohl während der Hellphase, als auch während der Dunkelphase ein signifikanter Unterschied zwischen der Kainat-Gruppe und der Telemetrie-Gruppe (Hellphase: $p = 0,0222$, Dunkelphase: $0,0253$) gefunden. In der Dunkelphase wurde zum gleichen Zeitpunkt ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren der Sham-Gruppe und denen der Telemetrie-Gruppe ($p = 0,0360$) erfasst. Zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus konnten keine Unterschiede der SDNN-Werte zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 29).

Für die Analyse der kurzfristigen Anpassung der Herzratenvariabilität wurden die Parameter RMSSD, NN6 und pNN6 herangezogen. Bei diesen Parametern konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 30 – 32).

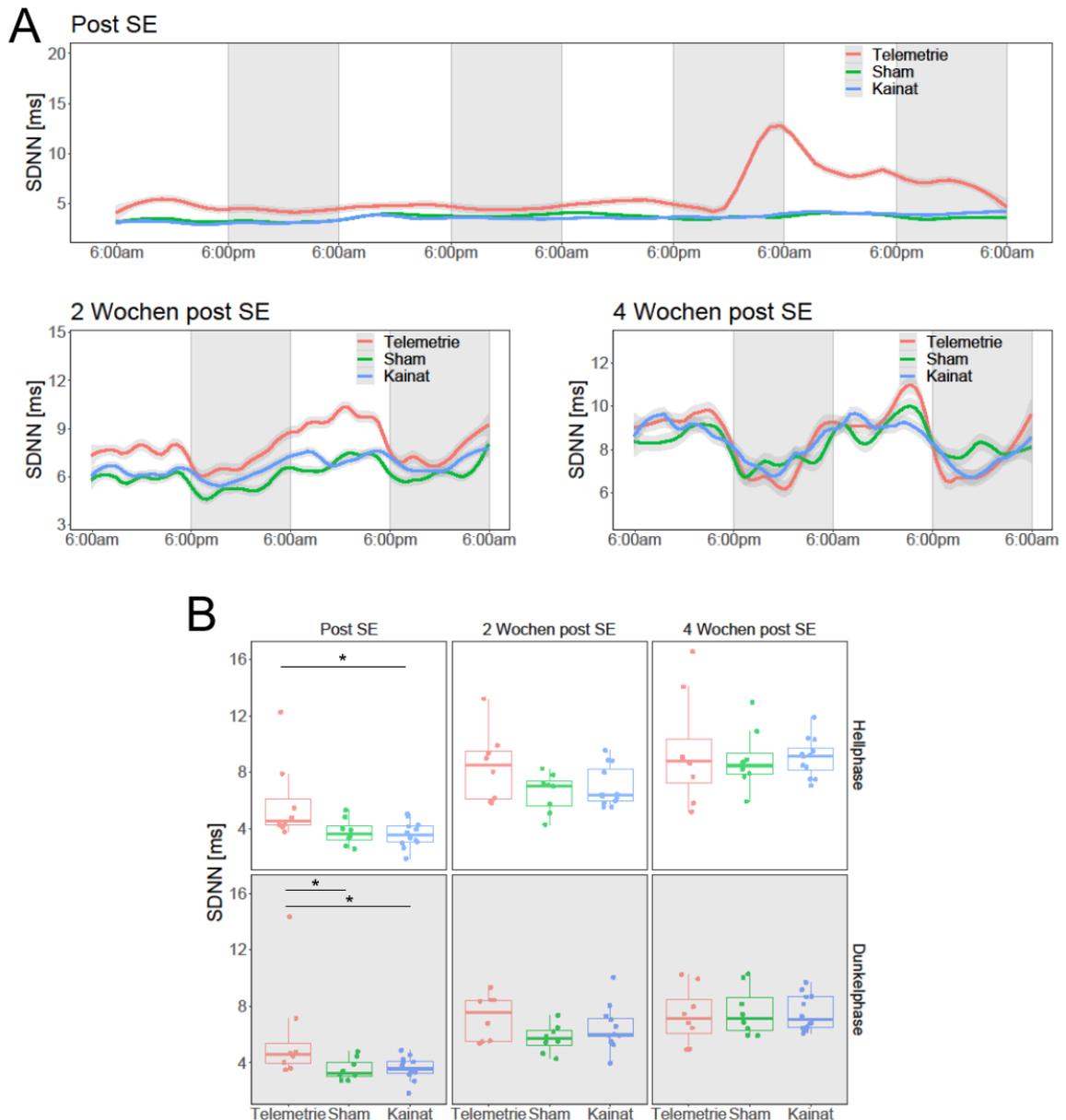


Abbildung 29: Herzratenvariabilitätsparameter SDNN. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Die Tiere der Kainat-Gruppe zeigten nach der OP bzw. SE-Induktion signifikant erniedrigte SDNN-Werte im Vergleich zur Telemetrie-Gruppe sowohl in der Hellphase als auch in der Dunkelphase. In der Dunkelphase wurden in der Sham-Gruppe ebenfalls signifikant erniedrigte SDNN-Werte im Vergleich zur Telemetrie-Gruppe gefunden (Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12). Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind durch einen Stern gekennzeichnet ($p < 0,05$).

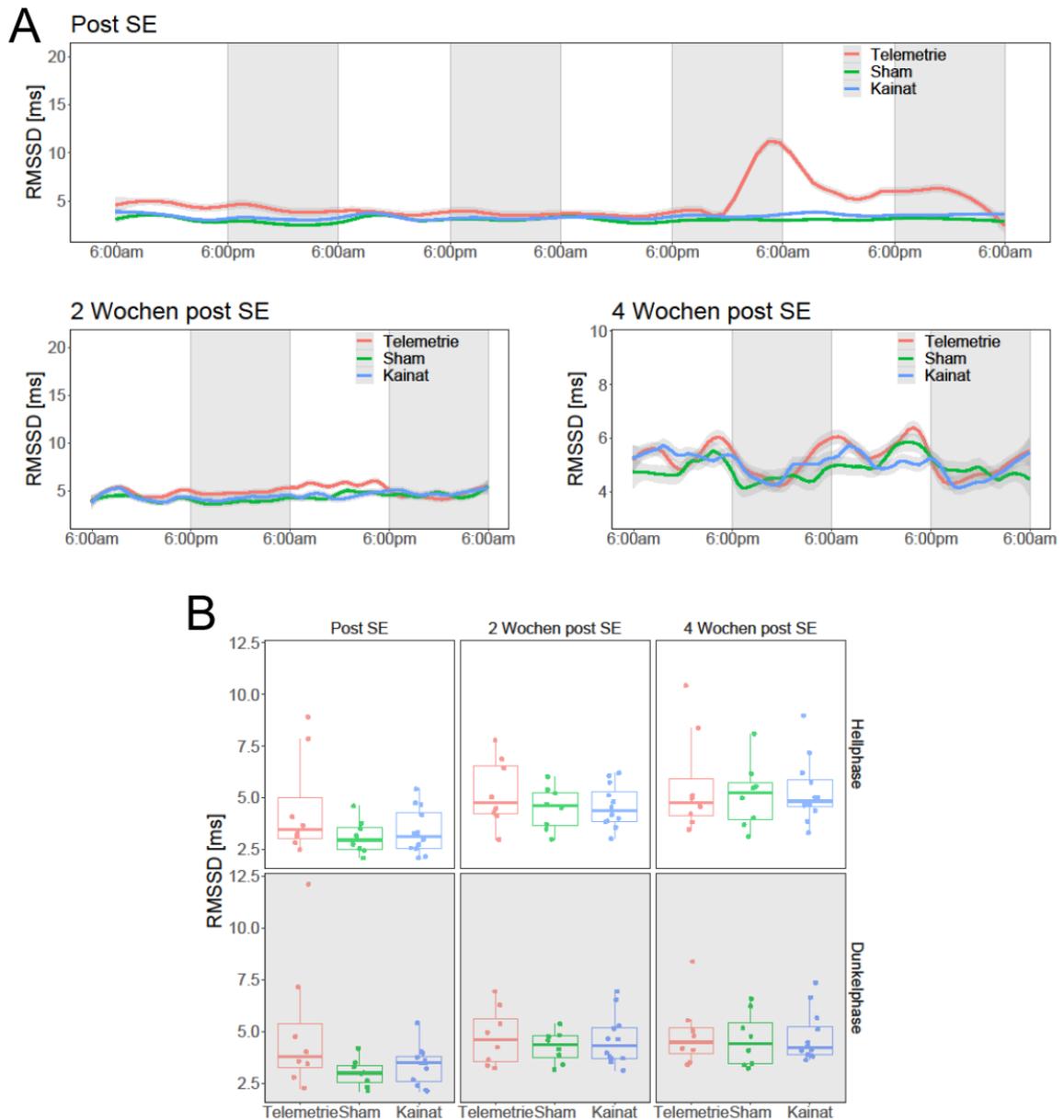


Abbildung 30: Herzratenvariabilitätsparameter RMSSD. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Telemetrie $n = 8$, Sham $n = 8$, Kainat $n = 12$).

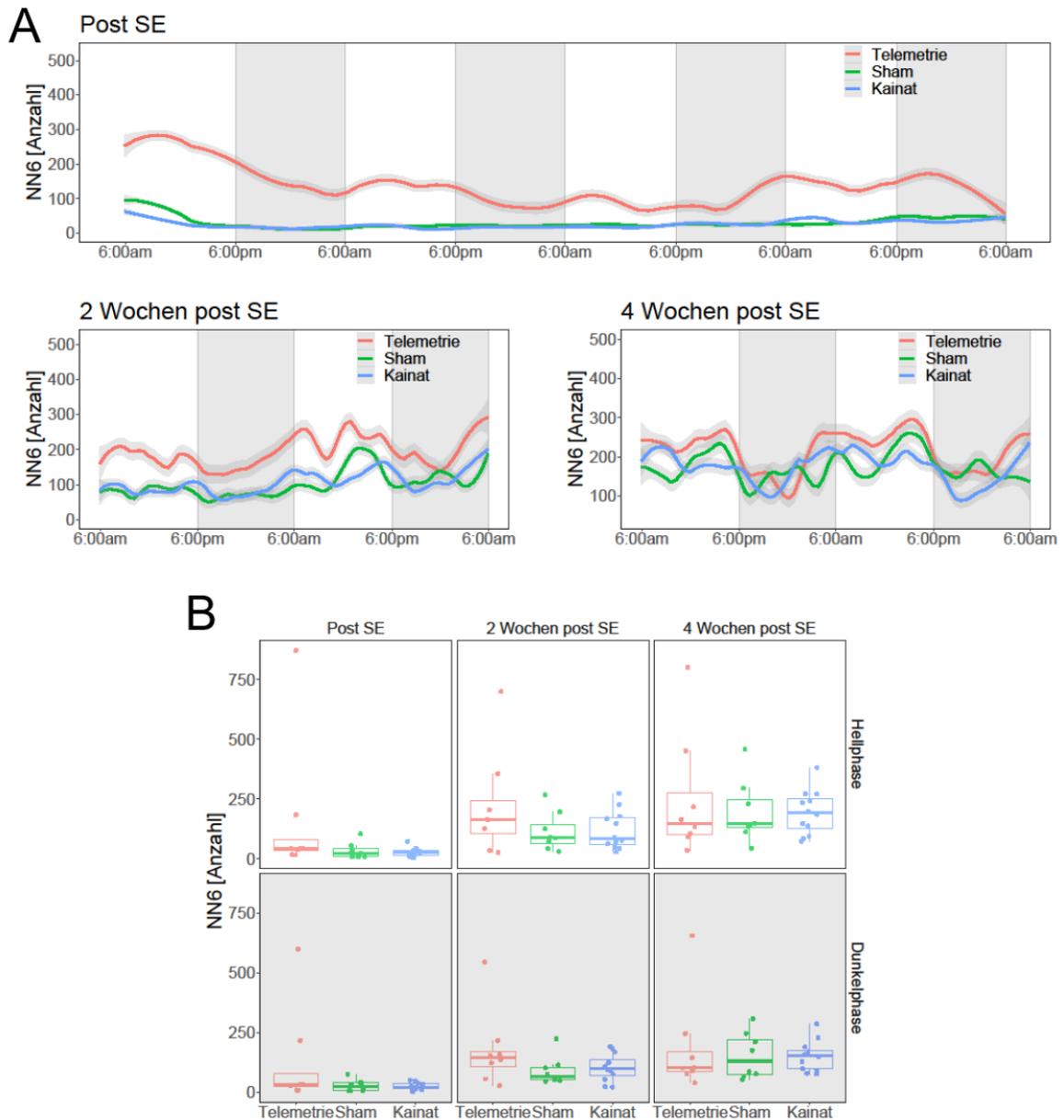


Abbildung 31: Herzratenvariabilitätsparameter NN6. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12).

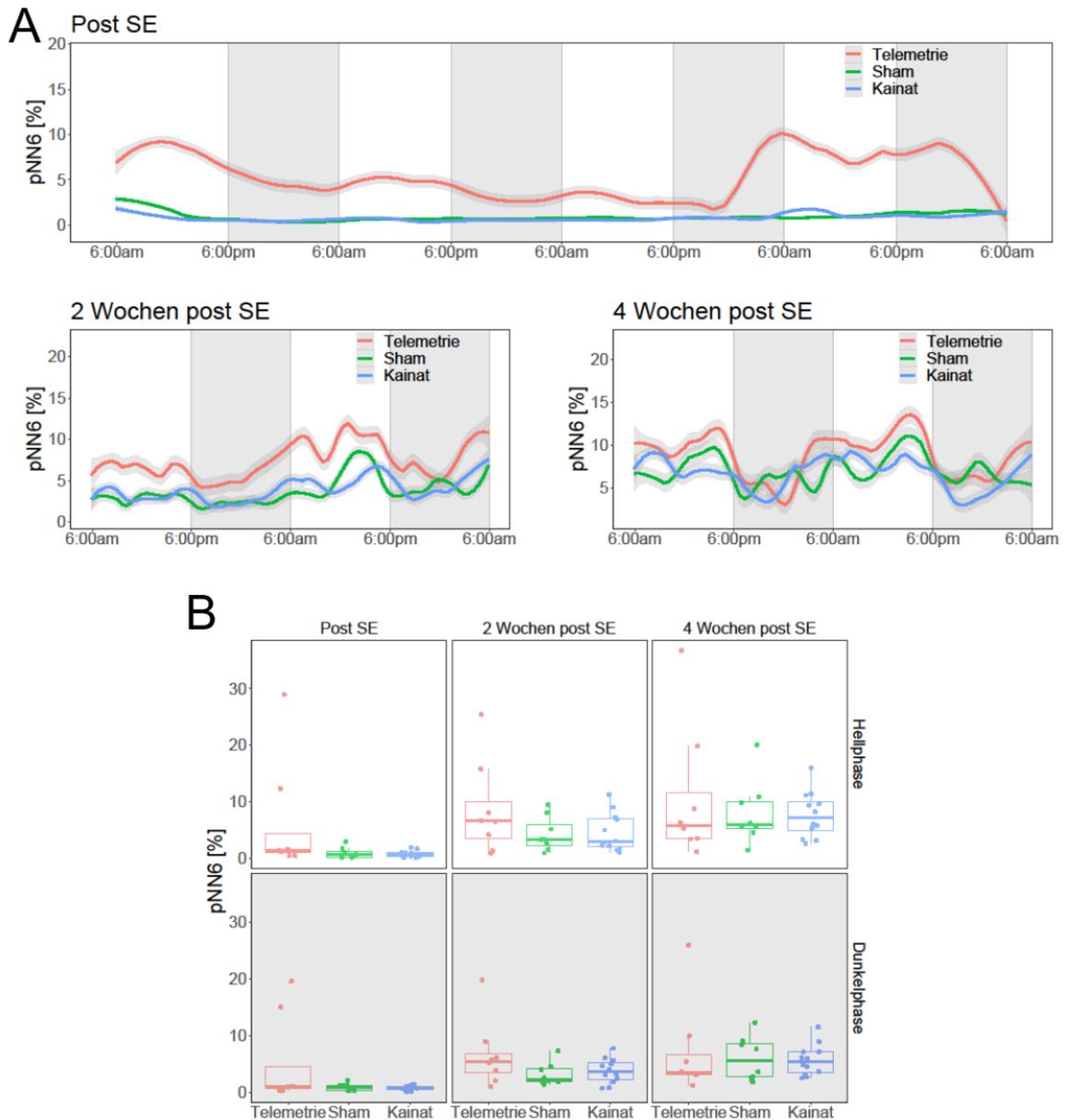


Abbildung 32: Herzratenvariabilitätsparameter pNN6. (A) Zeitbasierter Kurvenverlauf zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Die Dunkelphasen sind durch die graue Hinterlegung angezeigt. Die Linien der Diagramme zeigen die LOESS-Regression der Mittelwerte, die hellgrau unterlegten Flächen das 95%-Konfidenzintervall. Die Boxplots in (B) beschreiben den Median (Whiskers = 1,5 x IQR). Alle Hell- und Dunkelphasen eines Zeitpunktes sind hier zusammengefasst. Zu keinem der Zeitpunkte konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (Telemetrie n = 8, Sham n = 8, Kainat n = 12).

6. Korrelationsanalyse

Alle untersuchten Parameter wurden in einer Korrelationsmatrix nach Spearman erfasst und graphisch in einer *Heatmap* dargestellt. Der Korrelationskoeffizient gibt den linearen Zusammenhang zwischen zwei Parametern an. Eine positive Korrelation wird durch einen positiven Korrelationskoeffizienten zwischen null und eins angegeben und ist in der *Heatmap* in Blau dargestellt. Eine negative Korrelation wird entsprechend durch einen negativen Korrelationskoeffizienten zwischen minus eins und null angegeben und ist in der *Heatmap* in der Farbe Rot dargestellt. Je stärker die Korrelation zwischen zwei Parametern ist, desto intensiver ist die jeweilige Farbe. Liegt der Wert genau bei null, liegt kein linearer Zusammenhang zwischen den Parametern vor. Tabelle 3 zeigt die in der Korrelationsmatrix verwendeten Abkürzungen.

Tabelle 3: Abkürzungen der Korrelationsmatrix

Parameter	Einheit	Test	Bedeutung
NB_2d_postSE	Score 1-6	Nestbauverhalten	Nestkomplexität zwei Tage nach der Elektroden- und Transmitterimplantation und SE-Induktion
NB_1w_postSE	Score 1-6	Nestbauverhalten	Nestkomplexität eine Woche nach dem SE
NB_2w_postSE	Score 1-6	Nestbauverhalten	Nestkomplexität zwei Wochen nach dem SE
NB_4w_postSE	Score 1-6	Nestbauverhalten	Nestkomplexität vier Wochen nach dem SE
Weight_gain	Gramm	Körpergewicht	Gewichtszunahme von Ankunft bis zum Versuchsende
MGS_2d_postSE	Summenscore	MGS	Grimace Scale zwei Tage nach dem SE
MGS_1w_postSE	Summenscore	MGS	Grimace Scale eine Woche nach dem SE
MGS_2w_postSE	Summenscore	MGS	Grimace Scale zwei Wochen nach dem SE
MGS_4w_postSE	Summenscore	MGS	Grimace Scale vier Wochen nach dem SE

Irwin_2d_postSE	Summenscore	Irwin Score	Irwin Score zwei Tage nach dem SE
Irwin_1w_postSE	Summenscore	Irwin Score	Irwin Score eine Woche nach dem SE
Irwin_2w_postSE	Summenscore	Irwin Score	Irwin Score zwei Wochen nach dem SE
Irwin_4w_postSE	Summenscore	Irwin Score	Irwin Score vier Wochen nach dem SE
BUR_1w_postSE_120	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten eine Woche nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten
BUR_1w_postSE_night	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten eine Woche nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge über Nacht
BUR_2w_postSE_120	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten zwei Wochen nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten
BUR_2w_postSE_night	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten zwei Wochen nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge über Nacht
BUR_chronic_120	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten acht Wochen nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge nach 120 Minuten
BUR_chronic_night	Gramm	Wühlverhalten	Wühlverhalten acht Wochen nach dem SE, Evaluation der gebuddelten Menge über Nacht
SI_active	Sekunden	Social-Interaction	Zeit, in der sich die Tierpaare in einer aktiven sozialen Interaktion befanden
SI_passive	Sekunden	Social-Interaction	Zeit, in der sich die Tierpaare in einer passiven sozialen Interaktion befanden
OF_distance	Zentimeter	Open-Field	Zurückgelegte Strecke

OF_velocity	Zentimeter pro Sekunde	Open-Field	Durchschnittliche Geschwindigkeit der Tiere
OF_center	Sekunden	Open-Field	Zeit, die die Tiere im Zentrum des Open Fields verbrachten
OF_wall	Sekunden	Open-Field	Zeit, die die Tiere im Randbereich der Arena verbrachten
OF_immobility	Sekunden	Open-Field	Zeit, die die Tiere in Immobilität verbrachten
OF_rearing	Anzahl	Open-Field	Häufigkeit des Aufrichteverhaltens (<i>rearings</i>) um mehr als 45°
BWB_WB	Sekunden	Black-White-Box	Zeit, die die Tiere in der weißen Box verbrachten
BWB_LT	Sekunden	Black-White-Box	Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die schwarze Box
BWB_stretching	Anzahl	Black-White-Box	Anzahl der <i>Stretching</i> -Positionen
EPM_openarms	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Zeit, die die Tiere in den offenen Armen verbrachten
EPM_closedarms	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Zeit, die die Tiere in den geschlossenen Armen verbrachten
EPM_open1.3	Sekunden	Elevated-Plus-Maze	Zeit, die die Tiere im vorderen Drittel der offenen Arme verbrachten
EPM_stretching	Anzahl	Elevated-Plus-Maze	Anzahl der <i>Stretching</i> -Positionen
EPM_headdips	Anzahl	Elevated-Plus-Maze	Anzahl der <i>Head dips</i>
SP_percentage	Prozent	Saccharin-Präferenz	Saccharinkonsum anteilig vom gesamten Flüssigkeitskonsum
Cort_2d_postSE	µg/0,05g	FCM	Konzentration der FCM zwei Tage nach dem SE
Cort_1w_postSE	µg/0,05g	FCM	Konzentration der FCM eine Woche nach dem SE
Cort_2w_postSE	µg/0,05g	FCM	Konzentration der FCM zwei Wochen nach dem SE

Cort_chronic	µg/0,05g	FCM	Konzentration der FCM acht Wochen nach dem SE
HVSW_n	Anzahl	Anfallsfrequenz	Anzahl der Anfälle während dem EEG-Monitoring der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
HR	Beats per minute (bpm)	Herzschlagfrequenz	Durchschnittliche Anzahl der Herzschläge pro Minute während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
NN-I	Millisekunden	NN-Intervall	Durchschnittliche Länge zwischen zwei R-Zacken während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
NN6	Anzahl	HRV	Anzahl der aufeinanderfolgenden R-Zacken, die um mehr als 6 ms voneinander abweichen; Werte der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
pNN6	Prozent	HRV	Prozentuale Darstellung aller aufeinanderfolgenden RR-Intervalle, die mehr als 6 ms voneinander abweichen; Werte der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
SDNN	Millisekunden	HRV	SDNN während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
RMSSD	Millisekunden	HRV	RMSSD während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)
Act	Counts per minute	Heimkäfigaktivität	Aktivität während der verschiedenen Phasen jeweils für die Tag (d)- und Nachtphase (n)

Zwischen den einzelnen Parametern eines Verhaltenstests zeigte sich oft eine starke Korrelation. So korrelierte die Zeit im Open Field, in der die Tiere immobil waren negativ mit der zurückgelegten Strecke und der Geschwindigkeit. Die zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit im *Open Field* korrelieren hingegen positiv miteinander. Die Zusammenhänge innerhalb eines Verhaltenstests bestätigen zwar die Validität der Korrelationsanalyse, sind jedoch für die Belastungsbeurteilung zu vernachlässigen. Diese sind daher nicht in den nachfolgenden Tabellen 4 und 5 berücksichtigt. Es wurden alle Korrelationskoeffizienten mit mindestens 0,5 für eine positive, und von maximal -0,5 für eine negative Korrelation berücksichtigt. Alle angegebenen Korrelationen sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

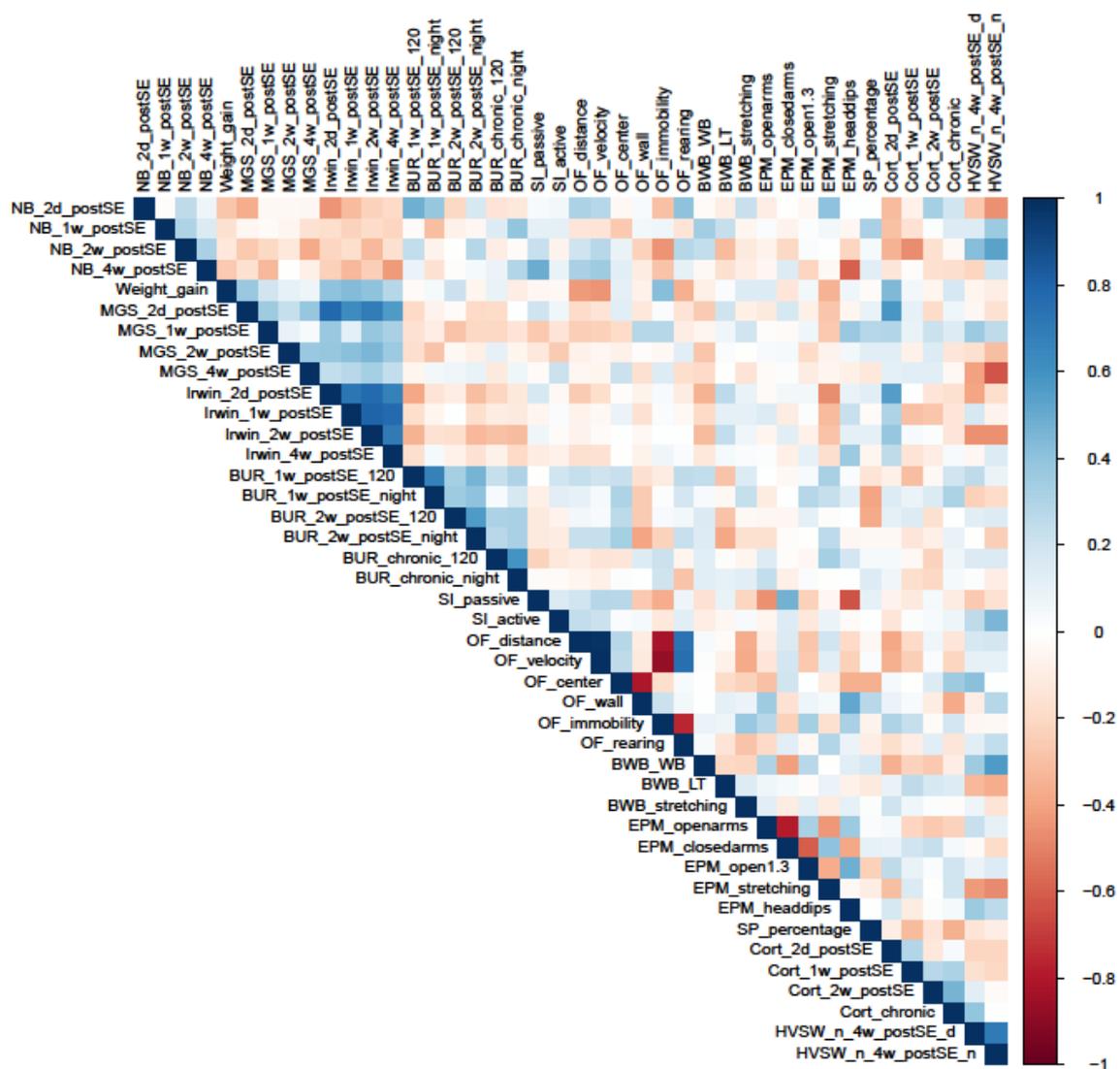


Abbildung 33: Korrelationsmatrix aller untersuchten Parameter nach Spearman. Darstellung der Korrelationskoeffizienten zwischen HVSWs, Verhaltens- und biochemischen Parametern anhand einer *heat map*.

Tabelle 4: Korrelationskoeffizienten der Verhaltensparameter untereinander

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient
NB_2w_postSE	HVSW_n_4w_postSE_n	0,53
NB_4w_postSE	EPM_headdips	- 0,60
MGS_2d_postSE	Irwin_2d_postSE	0,78
	Irwin_1w_postSE	0,62
	Irwin_2w_postSE	0,69
	Irwin_4w_postSE	0,57
	Cort_2d_postSE	0,58
MGS_4w_postSE	HVSW_n_4w_postSE_n	- 0,63
Irwin_2d_postSE	Irwin_1w_postSE	0,72
	Irwin_2w_postSE	0,77
	Irwin_4w_postSE	0,67
	Cort_2d_postSE	0,55
Irwin_1w_postSE	Irwin_2w_postSE	0,80
	Irwin_4w_postSE	0,77
Irwin_2w_postSE	Irwin_4w_postSE	0,70
SI_passive	EPM_headdips	- 0,64
OF_wall	EPM_headdips	0,51
BWB_WB	HVSW_n_4w_postSE_n	0,56
HVSW_n_4w_postSE_d	HVSW_n_4w_postSE_n	0,70

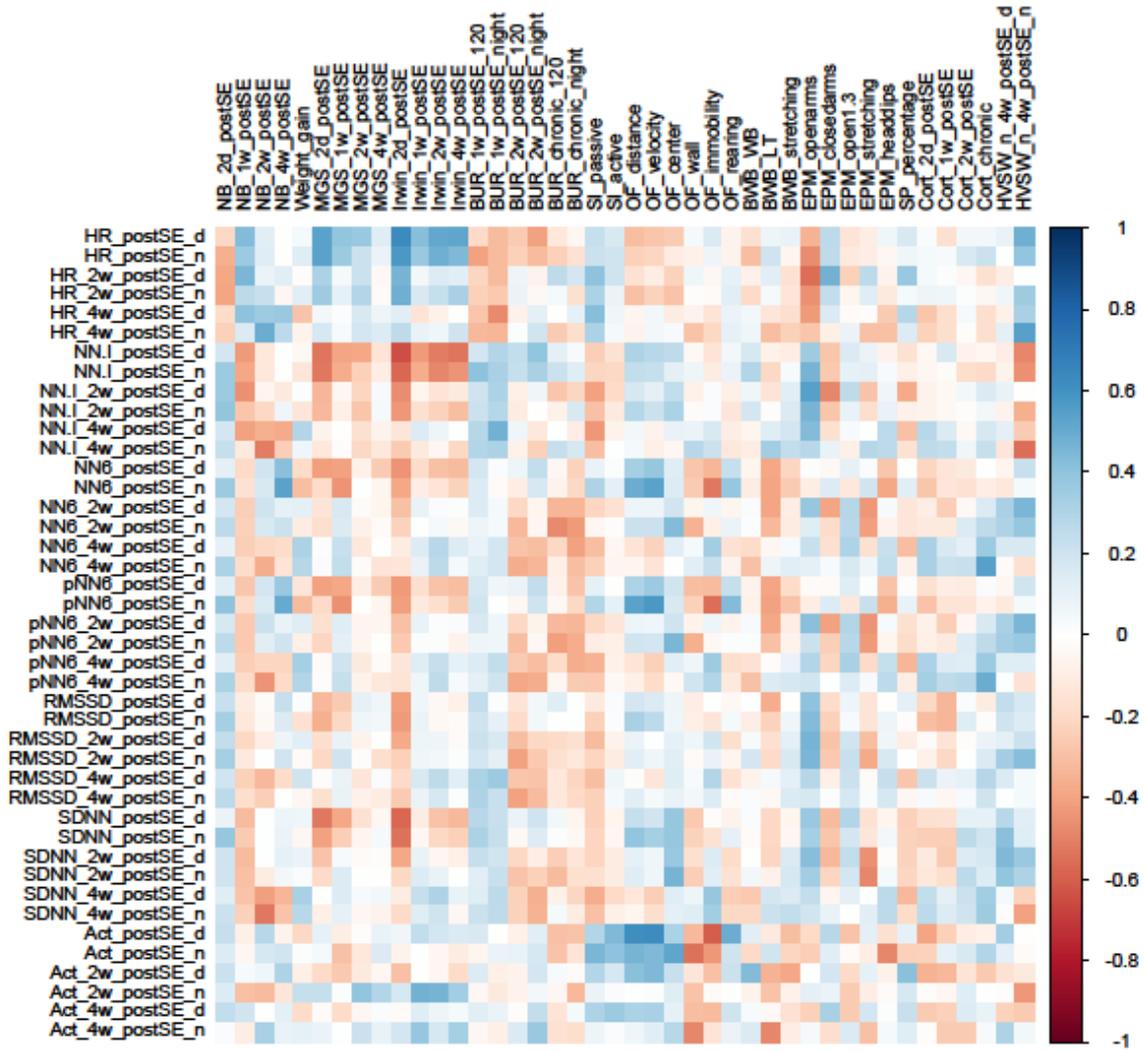


Abbildung 34: Korrelationsmatrixanalyse nach Spearman. Darstellung der Korrelationskoeffizienten zwischen HVSWs, Verhaltens- und telemetrischen Parametern anhand einer *heat map*.

Tabelle 5: Korrelationskoeffizienten der Verhaltensparameter mit den Telemetrie Messungen

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient
NB_2w_postSE	NN-I_4w_postSE_n	- 0,52
	SDNN_4w_postSE_n	- 0,52
NB_4w_postSE	NN6_postSE_n	0,54
	pNN6_postSE_n	0,51
MGS_2d_postSE	NN-I_postSE_d	- 0,53
	NN-I_postSE_n	- 0,52
	SDNN_postSE_d	- 0,53
	HR_postSE_d	0,53
	HR_postSE_n	0,54
Irwin_2d_postSE	NN-I_postSE_d	- 0,64
	NN-I_postSE_n	- 0,58
	SDNN_postSE_d	- 0,58
	SDNN_postSE_n	- 0,55
	HR_postSE_d	0,63
	HR_postSE_n	0,58
Irwin_2w_postSE	NN-I_postSE_d	- 0,51
	HR_postSE_d	0,51
Irwin_4w_postSE	NN-I_postSE_d	- 0,53
	HR_postSE_d	0,53
OF_distance	pNN6_postSE_n	0,53
	Act_postSE_d	0,61
OF_velocity	NN6_postSE_n	0,54
	pNN6_postSE_n	0,58
	Act_postSE_d	0,62
OF_center	Act_postSE_n	0,52
OF_wall	Act_postSE_n	- 0,55
OF_immobility	NN6_postSE_n	- 0,53
	pNN6_postSE_n	- 0,55
	Act_postSE_d	- 0,60
EPM_openarms	HR_2w_postSE_d	- 0,56
	NN-I_2w_postSE_d	0,54
Cort_chronic	NN6_4w_postSE_n	0,54
HVSW_n_4w_postSE_n	NN-I_4w_postSE_n	- 0,56
	HR_4w_postSE_n	0,55

7. Hauptkomponentenanalyse

Eine Hauptkomponentenanalyse (*Principal Components Analysis*, PCA) dient dazu, große Datensätze zu strukturieren und darzustellen. Die Datensätze werden hierfür auf wenige Variablen reduziert, die eine große Varianz der betrachteten Daten darstellen. Für die Erstellung der PCA wurden Daten verwendet, die in der chronischen Phase erhoben wurden. Die beiden Hauptkomponenten (*Principal Components*, PC) beschreiben in Kombination 34,48 % der Varianz aller betrachteten Daten. PC1 entlang der x-Achse stellt dabei 22,09 % dar, PC2 entlang der y-Achse 12,38 %. Weder entlang PC1, noch entlang PC2 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Die Parameter des *Open Fields*, des *Elevated-Plus-Maze* und der *Black-and-White-Box* haben einen großen Einfluss auf beide PCs. Im Folgenden werden Parameter beschrieben, deren Einfluss auf die jeweilige PC größer als 0,5 ist. Das *Open Field* stellt dabei die meisten Parameter der PC1: Geschwindigkeit (PC1: 0,832), Zeitdauer in Immobilität (PC1: 0,814), zurückgelegte Distanz (PC1: 0,797) und *Rearing* (PC1: 0,617). Das *Elevated-Plus-Maze* ist mit den Parametern Zeitdauer in geschlossenen Armen (PC1: 0,624), Zeitdauer in offenen Armen (PC1: 0,617; PC2: 0,528), *Head dips* (PC1: 0,584) und Zeitdauer im äußeren Drittel der offenen Arme (PC1: 0,529) ebenfalls auf der PC1 und PC2 vorzufinden. Die Zeitdauer in den offenen Armen ist ebenfalls in PC2 auffindbar. Ein weiterer Parameter, der zur Darstellung von PC1 beiträgt, ist die passive Zeit im *Social Interaction* (PC1: 0,511) und zur Darstellung von PC2, die Zeitdauer in der weißen Box der *Black-and-White-Box* (PC2: 0,608).

Die ersten zehn Parameter zur Darstellung von PC1 der Hauptkomponentenanalyse aller Versuchsgruppen mit absteigendem Einfluss:

1.	OF_velocity	0,8323946
2.	OF_immobility	0,8136695
3.	OF_distance	0,7965674
4.	EPM_closedarms	0,6243024
5.	OF_rearing	0,6190986
6.	EPM_openarms	0,6171010
7.	EPM_headdips	0,5838168
8.	EPM_open1.3	0,5293504
9.	SI_passive	0,5108796
10.	OF_wall	0,4606380

Die ersten zehn Parameter zur Darstellung von PC2 der Hauptkomponentenanalyse aller Versuchsgruppen mit absteigendem Einfluss:

1.	BWB_WB	0,6081466
2.	EPM_openarms	0,5279934
3.	Cort_chronic	0,4464542
4.	OF_distance	0,4328569
5.	EPM_closedarms	0,4325972
6.	OF_velocity	0,4214146
7.	OF_center	0,4179823
8.	OF_wall	0,3918624
9.	SP_percentage	0,3914853
10.	OF_immobility	0,3697442

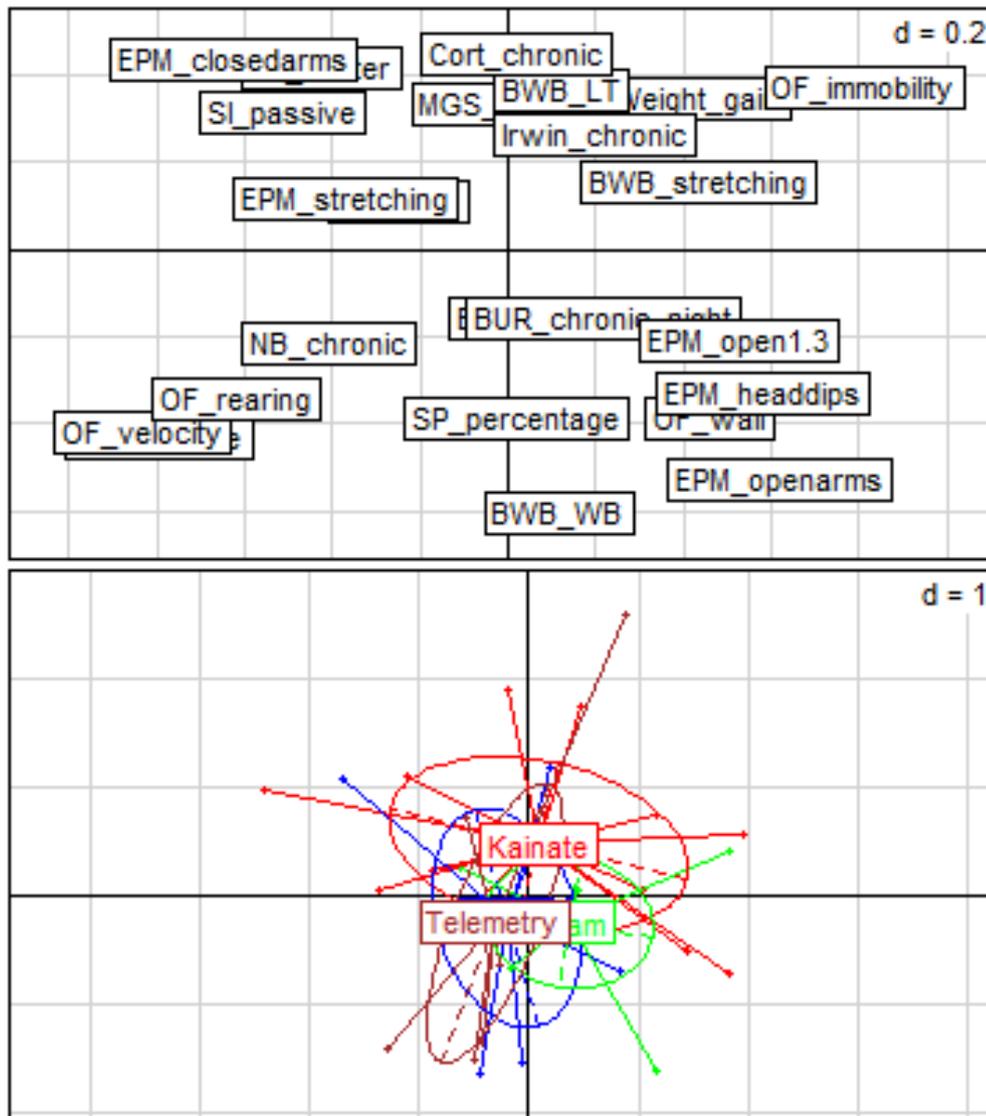


Abbildung 35: Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Datensätze aller Versuchsgruppen. (A) Gewichtung der erfassten Parameter innerhalb der PC1 und PC2. Parameter, die am äußeren Rand der jeweiligen PC liegen, haben den größten Einfluss auf die entsprechende PC. (B) Aufspaltung der epileptischen Gruppen anhand PC1 und PC2. Jeder Punkt reflektiert den individuellen Datensatz eines Tieres.

8. Effektstärke und Forest Plot

Für einen direkten Vergleich zwischen den Spezies, wurden die Daten des Kainat-Modells in Mäusen mit zwei verschiedenen Post-SE-Modellen in Ratten verglichen. Die Daten des chemischen Post-SE-Modells wurden bereits von Koska und Kollegen (KOSKA et al. 2019), die Daten des elektrischen Post-SE-Modells von Seiffert und Kollegen (SEIFFERT et al. 2019) aus unserem Institut veröffentlicht. In allen Modellen wurden überwiegend Daten der chronischen Phase zum Vergleich herangezogen. Der Fokus lag hierbei auf Parametern, die möglicherweise ein erhöhtes Stressniveau der Tiere widerspiegeln.

In beiden Modellen zeigten Ratten der SE-Gruppe anhedonie-ähnliches Verhalten im *Saccharin-Präferenz-Test* jeweils im Vergleich zu Tieren der Sham-Gruppe und der naiven Gruppe (Chemisches Modell: $F(2,34) = 14,18$, $p = 0,0003$, SE vs. Naiv $d = 1,056$ ($CI_{95}[0,287; 1,824]$), SE vs. Sham $d = 0,399$ ($CI_{95}[-0,243; 1,042]$); Elektrisches Modell: $F(2,30) = 4,975$, $p = 0,0136$, SE vs. Naiv $d = 1,381$ ($CI_{95}[0,487; 2,276]$), SE vs. Sham $d = 1,316$ ($CI_{95}[-0,555; 2,077]$)) und eine reduzierte Zeit in aktiver sozialer Interaktion (Chemisches Modell: $F(2,16) = 44,87$, $p = 0,2580$, SE vs. Naiv $d = 4,511$ ($CI_{95}[3,213; 5,808]$), SE vs. Sham $d = 4,601$ ($CI_{95}[3,407; 5,796]$); Elektrisches Modell: $F(2,11) = 52,32$, $p < 0,0001$, SE vs. Naiv $d = 4,013$ ($CI_{95}[2,621; 5,405]$), SE vs. Sham $d = 4,128$ ($CI_{95}[2,911; 5,345]$)). Zusätzlich zeigten Ratten im elektrischen Post-SE-Modell eine Hyperlokomotion im *Open Field* ($F(2,29) = 3,791$, $p = 0,2073$, SE vs. Sham $d = -0,535$ ($CI_{95}[-1,225; 0,156]$)). Für diese Verhaltensparameter ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen im Kainat-Modell in Mäusen. Detaillierte Informationen zu allen Parametern und entsprechenden statistischen Ergebnissen sind in den Tabellen 6 bis 8 in Anhang XI.5 zu finden.

Zusätzlich zu den Verhaltensparametern wurden ebenso Unterschiede in den Konzentrationen der FCM verglichen. In beiden Post-SE-Modellen in Ratten zeigten jeweils die Tiere der SE-Gruppe erhöhte FCM Konzentrationen zwei Tage nach SE-Induktion im Vergleich zu den Tieren der Sham-Gruppe und der naiven Gruppe (Chemisches Modell: $F(2,35) = 10,72$, $p = 0,0002$, SE vs. Naiv $d = -0,590$ ($CI_{95}[-1,335; 0,155]$), SE vs. Sham $d = -0,852$ ($CI_{95}[-1,523; -0,180]$); Elektrisches Modell: $F(2,30) = 4,975$, $p = 0,0136$, SE vs. Naiv $d = 0,006$ ($CI_{95}[-0,789; 0,802]$), SE vs. Sham $d = -1,066$ ($CI_{95}[-1,790; -0,341]$)). Zwei Tage nach der Operation bzw. SE-Induktion zeigten auch die Tiere der Kainat-Gruppe und der Sham-Gruppe des Kainat-Modells erhöhte FCM-Werte im Vergleich zur naiven Gruppe (Kainat vs. Naiv $d = -2,387$ ($CI_{95}[-3,631; -1,142]$), Sham vs. Naiv $d = -3,194$ ($CI_{95}[-4,811; -1,576]$)). Die Ratten der SE-Gruppe im chemischen Post-SE-Modell zeigten darüber hinaus auch eine erhöhte FCM Konzentration in der chronischen Phase im Vergleich zu den Tieren der Sham-Gruppe und der naiven Gruppe ($F(2,35) = 6,549$, $p < 0,0001$; SE vs. Naiv $d = -0,748$ ($CI_{95}[-1,502; 0,006]$), SE vs. Sham $d = -0,872$ ($CI_{95}[-1,545; -0,199]$)).

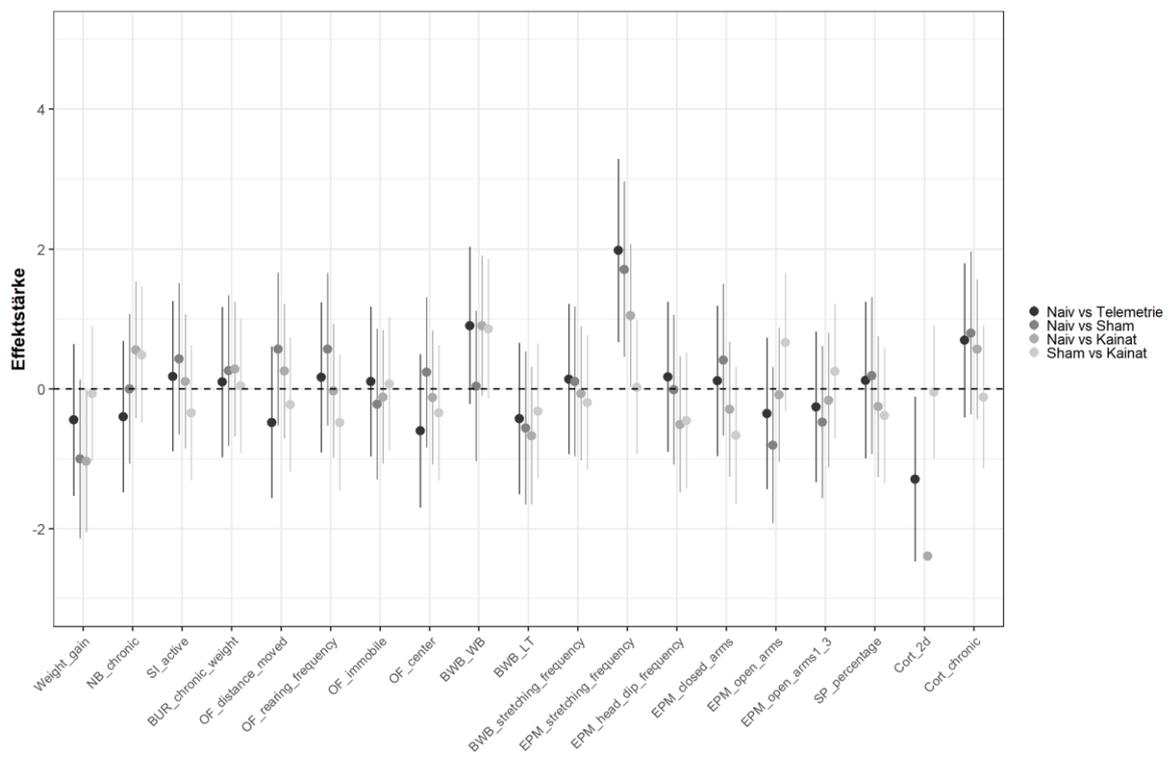


Abbildung 36: Effektstärke von verschiedenen Parametern im Kainat-Modell in Mäusen, dargestellt mit Hilfe des Forest Plot. Die Parameter wurden überwiegend in der chronischen Phase des Modells erhoben.

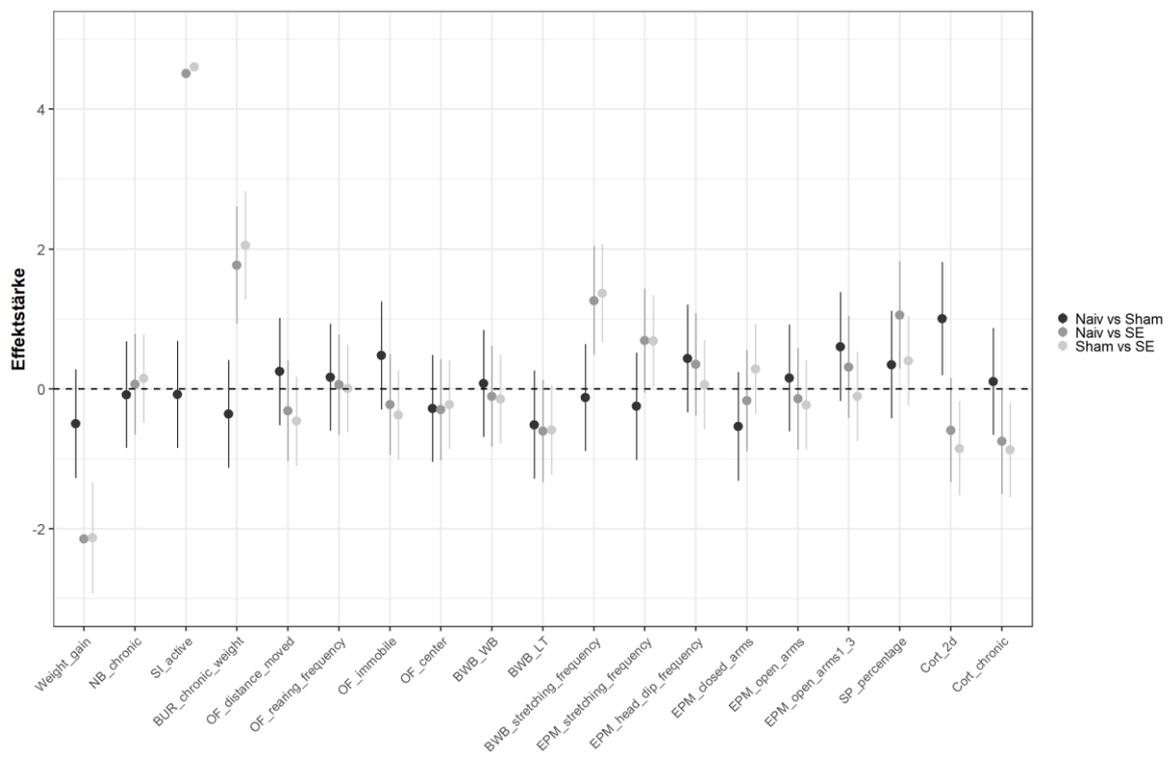


Abbildung 37: Effektstärke von verschiedenen Parametern im chemischen Post-SE Modell in Ratten, dargestellt mit Hilfe des Forest Plot. Die Parameter wurden überwiegend in der chronischen Phase des Modells erhoben. Die verwendeten Daten wurden von Koska und Kollegen veröffentlicht (KOSKA et al. 2019).

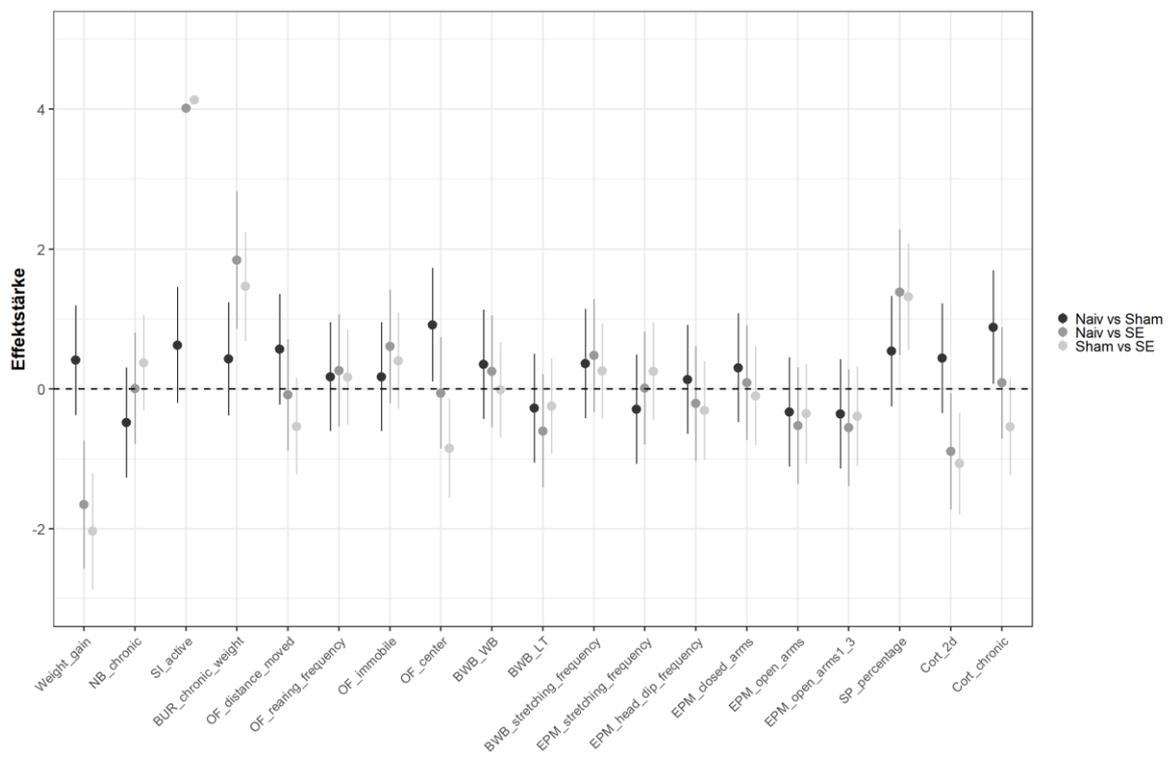


Abbildung 38: Effektstärke von verschiedenen Parametern im elektrischen Post-SE Modell in Ratten, dargestellt mit Hilfe des Forest Plot. Die Parameter wurden überwiegend in der chronischen Phase des Modells erhoben. Die verwendeten Daten wurden von Seiffert und Kollegen veröffentlicht (SEIFFERT et al. 2019).

VI. DISKUSSION

Bei etwa 30 % aller Patienten mit Epilepsie kann durch aktuell verfügbare Antiepileptika noch immer keine Anfallsfreiheit herbeigeführt werden (DEVINSKY et al. 2018; WELZEL et al. 2020). Zudem sind weiterhin noch nicht alle Pathomechanismen der Epileptogenese und der pharmakoresistenten Epilepsie erklärt. Aufgrund dessen sind Tierversuche in der Epilepsieforschung zur Entwicklung neuer Therapieansätze immer noch unerlässlich. Vor allem Tiermodelle zur Erforschung von Epileptogenese-Mechanismen und pharmakoresistenten Epilepsien haben eine große Bedeutung und finden immer häufiger Verwendung (KEHNE et al. 2017). Die Richtlinie 2010/63/EU und ihre Umsetzung in deutsches Recht durch die Tierschutzversuchstierverordnung fordert eine prospektive Belastungseinstufung in „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „leicht“, „mittel“ oder „schwer“. Zusätzlich dazu muss für jedes Tier die tatsächliche Belastung dokumentiert werden. Diese Beurteilungen können auch als Grundlage für die Priorisierung von Tiermodellen dienen, um so die Belastung der Versuchstiere im Sinne des 3R-Prinzips zu minimieren. Für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung müssen in Epilepsiemodellen neben den, durch die Epilepsie bedingten potenziellen Belastungen der Tiere, auch die experimentellen Bedingungen und Prozeduren, wie die Haltung und das *Handling* der Tiere sowie operative Eingriffe berücksichtigt werden. Wie essenziell die Einstufung der Belastung durch epileptische Anfälle ist, wird auch durch das Auftreten epileptischer Anfälle als Nebeneffekt in Tiermodellen anderer neurologischer Erkrankungen oder in genetisch veränderten Tieren deutlich (WOLFENSOHN et al. 2013).

Im Rahmen der Forschergruppe „Severity Assessment in Animal Based Research“ (DFG FOR 2591, www.severity-assessment.de) werden evidenzbasierte Vorschläge zur Belastungseinstufung in verschiedenen Tiermodellen erstellt (BLEICH u. TOLBA 2017). Hierfür werden geeignete Parameter identifiziert und validiert. Die Korrelationsmatrixanalyse und die Hauptkomponentenanalyse bieten zudem eine Möglichkeit geeignete Parameter zur Belastungseinstufung auszuwählen. In unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere Studien in verschiedenen Epilepsiemodellen in der Ratte und im Kindling-Modell in Mäusen durchgeführt, um Parameter zur evidenzbasierten Belastungseinstufung zu identifizieren und zu validieren (MÖLLER et al. 2018; KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019; BOLDT et al. 2021). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Parameter weiter untersucht und eine umfassende Belastungseinstufung des intrahippocampalen Kainat-Modell durchgeführt. Das Kainat-Modell wurde zuerst im Jahre 1978 von SCHWARCZ et al. (1978) bei Ratten beschrieben und gehört seither, neben dem Pilocarpin-Modell, zu einem der meist verwendeten Epilepsiemodellen (JEFFERYS et al. 2016; LIDSTER et al. 2016; HENSHALL 2017).

1. Identifizierung und Validierung von Parametern zur Belastungseinstufung des chemischen Post-Status-Epilepticus-Modells

Ziel dieser Studie ist die Identifizierung und Validierung geeigneter Parameter für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung des Kainat-Modells in Mäusen. Hierzu wurden verschiedene verhaltensbiologische, biochemische und physiologische Parameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Für eine umfangreiche Belastungseinstufung müssen verschiedene Belastungsparameter identifiziert und alle Einzelparameter evaluiert werden. Zu untersuchen sind hier die Belastung der Transmitter- und der Elektrodenimplantation, die zusätzliche Belastung der SE-Induktion im Zuge der Operation und die Belastung durch die mit dem SE verbundenen, spontan auftretenden elektrographischen Anfälle in der chronischen Phase.

1.1. Transmitterimplantation und Elektrodenimplantation

Die Implantation einer Elektrode zur Erfassung von EEG-Daten ist ein wichtiger Bestandteil in Epilepsiemodellen. Die Aufzeichnung der EEG-Daten kann hierbei entweder kabelgebunden oder über Radiotelemetrie durchgeführt werden (LIDSTER et al. 2016). Die kabelgebundene Aufzeichnung stellt eine etablierte, oft verwendete Methode dar (BERTRAM et al. 1997). Sie geht jedoch mit einer partiell eingeschränkten Bewegungsfreiheit einher, wohingegen die Radiotelemetrie Aufzeichnungen in frei beweglichen Tieren erlaubt (WEIERGRÄBER et al. 2005; LIDSTER et al. 2016). In der vorliegenden Studie wurde das EEG daher über ein Radiotelemetriesystem aufgezeichnet. Zusätzlich zum EEG konnte mit diesem System auch das EKG und die Aktivität der Tiere im Heimkäfig erfasst werden. Die Beurteilung der kurz- und langfristigen Belastung durch die Elektrodenimplantation stellt daher eine wichtige Grundlage zur Belastungseinstufung in diesem Modell dar. Eine zusätzliche Kontrollgruppe, die Telemetrie-Gruppe, in der den Tieren lediglich ein Telemetrietransmitter implantiert wurde, ermöglichte eine separate Belastungseinschätzung von einer alleinigen Transmitterimplantation und einer zusätzlichen Elektrodenimplantation.

Um die Belastung der Mäuse in der postoperativen Phase zu beurteilen wurde unter anderem das Nestbauverhalten und das Wühlverhalten im Heimkäfig erfasst. Sowohl das Nestbauverhalten, als auch das Wühlverhalten stellen ein Wohlfühlverhalten der Tiere dar (JIRKOF 2014). Die Tiere, die nur einen Transmitter implantiert bekommen hatten, zeigten am ersten Tag nach der Operation ein reduziertes Nestbauverhalten. Schon JIRKOF et al. (2013a) und zuvor ARRAS et al. (2007) zeigten ein durch Schmerzen reduziertes Nestbauverhalten bei Tieren nach einer Laparotomie bzw. einem Sham-Embryotransfer. Dass die

Tiere der Telemetrie-Gruppe bereits am zweiten Tag nach der Operation kein reduziertes Nestbauverhalten mehr zeigten, spricht für die positive Wirkung der postoperativen Analgesie 24 Stunden nach der Operation. Bei der Betrachtung des Nestbauverhaltens am Tag direkt nach der Operation ist allerdings auch die Nachschlafphase nach der Narkose zu beachten. Durch die Nachschlafphase waren die Tiere weniger aktiv und zeigten unter Umständen deshalb ein reduziertes Nestbauverhalten. In den Tieren mit einer Transmitter- und Elektrodenimplantation, die durch die kompliziertere Operation länger in Narkose lagen, konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Ab dem zweiten Tag nach der Operation bis zum Ende der Studie blieb das Nestbauverhalten der Tiere konstant.

Um Auswirkungen der Operation auf die Tiere mittels Wühlverhalten, einem weiteren Parameter des Heimkäfigverhaltens, festzustellen, wurde eine Woche nach der Operation der *Burrowing-Test* durchgeführt. Auch ein reduziertes Wühlverhalten kann ein Hinweis auf eine, durch Schmerzen bedingte, Beeinträchtigung des Wohlbefindens von Mäusen sein (JIRKOF et al. 2010). Zu diesem Zeitpunkt war das Wühlverhalten beider Gruppen unverändert. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem des Nestbauverhaltens zum gleichen Zeitpunkt und lässt darauf schließen, dass das Wohlbefinden der Tiere eine Woche nach der Operation nicht beeinträchtigt war. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse nach einer Laparotomie ein reduziertes Wühlverhalten (JIRKOF et al. 2010). In dieser Studie ist allerdings zu beachten, dass der *Burrowing-Test* direkt nach Erwachen der Tiere aus der Narkose durchgeführt wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Tiere eine Woche nach der Operation bereits keine Beeinträchtigung mehr zeigten und, dass der *Burrowing-Test* als Parameter zur Erfassung des Wohlbefindens der Tiere zu einem früheren Zeitpunkt eingesetzt werden könnte. Der *Burrowing-Test* wurde erneut zwei und sieben Wochen nach der Operation durchgeführt. Zwei Wochen nach der Operation wurden keine Veränderungen im Wühlverhalten festgestellt. Zum Zeitpunkt sieben Wochen nach der Operation zeigten sowohl die Tiere der Telemetrie-Gruppe als auch der Sham-Gruppe ein vermehrtes Wühlverhalten im Vergleich zum jeweiligen Basalwert. Ein fehlender Unterschied zwischen allen Versuchsgruppen zu diesem Zeitpunkt spricht jedoch gegen einen aussagekräftigen Einfluss der Operationen zu diesem Zeitpunkt und spricht weiterhin, unter Betrachtung des Nestbauverhaltens zum gleichen Zeitpunkt, gegen einen langfristigen Einfluss auf das Wohlfühlverhalten der Tiere.

Der *Grimace Scale* wurde bereits in verschiedenen Modellen als geeigneter Parameter validiert, um einen akuten Schmerzzustand der Tiere erfassen zu können (LANGFORD et al. 2010; LEACH et al. 2012). Zur intensiveren Überwachung der Tiere in der postoperativen Phase wurde der *Grimace Scale* ab dem ersten Tag nach der Operation täglich für 14 Tage erfasst. Danach erfolgte die Beurteilung wöchentlich. Tiere der Sham-Gruppe zeigten am

ersten Tag nach der Operation einen erhöhten *Grimace Scale* im Vergleich zu naiven Tieren, was für einen erhöhten Schmerzzustand zu diesem Zeitpunkt spricht. Dies konnte jedoch nicht bei den Tieren der Telemetrie-Gruppe erkannt werden. Dies könnte eine zusätzliche Belastung der Elektrodenimplantation der Sham-Tiere im Vergleich zu den Telemetrie-Tieren implizieren. Bereits am zweiten Tag erreichten die Werte wieder die der Basalmessung, was wiederum auf eine gute Wirkung der postoperativen Analgesie 24 Stunden nach der Operation hindeutet. Auch der *Irwin Score* wurde zur intensiveren Überwachung der Tiere ab dem ersten Tag nach der Operation für 14 Tage täglich, danach wöchentlich erfasst. Weder die Tiere der Telemetrie-Gruppe, noch der Sham-Gruppe zeigten im Laufe der gesamten Studie erhöhte Werte im *Irwin Score*, was gegen eine erhöhte Aktivierung des zentralen und autonomen Nervensystems spricht.

Die Bestimmung der fäkalen Corticosteronmetaboliten erlaubt eine Aussage über das Stresslevel der Tiere über einen längeren Zeitraum und ist durch die nicht-invasive Methodik zu verschiedenen Zeitpunkten messbar (PALME 2019). Sowohl die Tiere der Telemetrie-Gruppe, als auch die Tiere der Sham-Gruppe zeigten zwei Tage nach der Operation erhöhte Konzentrationen der fäkalen Corticosteronmetaboliten im Vergleich zu den jeweiligen Basalwerten und weisen dadurch auf ein erhöhtes Stresslevel der Tiere beider Gruppen in der frühen postoperativen Phase hin. Auch zwischen den Gruppen konnten erhöhte FCM-Konzentrationen in Tieren der Sham-Gruppe im Vergleich zur naiven Gruppe festgestellt werden, zwischen der Telemetrie-Gruppe und der naiven Gruppe konnte ebenfalls ein Trend festgestellt werden ($p < 0,01$). Die Aktivierung der HPA-Achse hielt jedoch nicht lange an, zu den nächsten beiden Zeitpunkten, eine und zwei Wochen nach der Operation, hatte sich der FCM-Gehalt in beiden Gruppen wieder normalisiert und Werte der Basalmessung erreicht. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Konzentration lediglich durch eine akute Stressreaktion, die Elektrodenimplantation, erhöht wurde.

Bei Betrachtung der telemetrisch ermittelten Daten konnte in der frühen postoperativen Phase während der Dunkelphase eine Reduktion der HRV in der Sham-Gruppe durch veränderte SDNN-Werte im Vergleich zur Telemetrie-Gruppe gezeigt werden. Auch ARRAS et al. (2007) konnte bereits eine reduzierte HRV als Reaktion auf einen operativen Eingriff ohne Schmerzmedikation zeigen. In dieser Studie konnten bei Tieren mit einer adäquaten Analgesie jedoch keine Veränderungen der HRV festgestellt werden. Im Vergleich mit den Daten der vorliegenden Studie, könnte dies auf einen akuten Schmerzzustand bei den Tieren mit einer zusätzlichen Elektrodenimplantation und eine unzureichende Analgesie hinweisen.

Ein reduziertes Nestbauverhalten und ein erhöhter *Grimace Scale* an den ersten beiden Tagen nach der Operation konnte auch bei elektrodenimplantierten Tieren im Kindling-Modell in unserer Arbeitsgruppe erfasst werden (BOLDT et al. 2021). Als *Refinement-*

Maßnahme wurde die Dosierung des Schmerzmittels daraufhin für die vorliegende Studie von 1 mg/kg auf 5 mg/kg erhöht. Auch, wenn postoperativer Schmerz nicht vollständig unterdrückbar ist, implizieren die Daten des Nestbauverhaltens, des *Grimace Scales*, der FCM-Konzentration und der veränderten HRV dieser Studie allerdings die Notwendigkeit für eine weitere Anpassung des Analgesieregimes vor allem für die Elektrodenimplantation, aber auch für die Transmitterimplantation. Kürzlich wurden bereits verschiedene NSAIDs und Buprenorphin als Opioid als Schmerzmedikation nach einer Kraniotomie miteinander verglichen. Dabei konnte mit Buprenorphin die beste Schmerzlinderung erreicht werden, unabhängig von der Verabreichungsart (CHO et al. 2019). Wie in anderen Spezies beschrieben, könnte eine multimodale Analgesie hier effektiver sein als die Anwendung eines einzelnen Wirkstoffes. Jedoch gibt es bisher noch wenige Daten zum multimedialen Analgesieregime im postoperativen Schmerzmanagement in Labornagern (FLECKNELL 2018).

Um den Langzeiteinfluss der Transmitter- bzw. Elektrodenimplantation bewerten zu können, wurden weitere Daten zu verschiedenen Verhaltensparametern und biochemischen Parametern erhoben. Die Verhaltensparameter wurden fünf bis sieben Wochen nach dem operativen Eingriff durchgeführt. Die Proben zur Erfassung der FCM wurden in der achten Woche nach den operativen Eingriffen gesammelt. In der vorliegenden Studie konnte weder durch die Telemetrie-, noch durch die Elektrodenimplantation ein Langzeiteinfluss auf das Verhalten beobachtet werden. Weiterhin verursachten weder die Transmitter- noch die Elektrodenimplantation Veränderungen der Herzfrequenz, der HRV und der Aktivität zu den Zeitpunkten zwei und vier Wochen nach der Operation. Auch durch die Hauptkomponentenanalyse (PCA) werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen bestätigt. Diese deuten darauf hin, dass kein langfristiger Einfluss der verschiedenen Operationstechniken auf die Tiere besteht. Weder die Telemetrie-Gruppe, noch die Sham-Gruppe unterscheiden sich in einem der Hauptkomponenten von der naiven Gruppe. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit den Ergebnissen im Kindling-Modell in Mäusen und im Pilocarpin-Modell in Ratten (KOSKA et al. 2019; BOLDT et al. 2021). Im Gegensatz dazu konnte aber sowohl im Amygdala-Kindling-Modell, als auch im elektrischen Post-SE-Modell in Ratten ein gesteigertes angstassoziiertes Verhalten in elektrodenimplantierten Tieren detektiert werden (MÖLLER et al. 2018; SEIFFERT et al. 2019). Dieses zeigte sich durch einen reduzierten Aufenthalt im äußeren Drittel der offenen Arme im *Elevated Plus Maze* bzw. das vermehrte Aufhalten im Wandbereich im *Open Field*. In diesen beiden Ratten-Modellen wurde, im Gegensatz zum chemischen Post-SE-Modell, die Elektrode in die basolaterale Amygdala (BLA) implantiert. Die Amygdala steht in Zusammenhang mit Angst- und Furchtreaktion und kann somit eine mögliche Ursache für die Unterschiede in angstassoziiertem Verhalten zwischen den Implantationslokalisationen sein (SAH 2017; SORREGOTTI et al. 2018).

Zusammenfassend konnte, in Anlehnung an BOLDT et al. (2021) und KOSKA et al. (2019) aus unserer Arbeitsgruppe, eine akute Belastung der Tiere durch die Transmitter- und die Elektrodenimplantation festgestellt werden. Bei Betrachtung des Nestbauverhaltens, des *Grimace Scales* und der FCM-Konzentration in der frühen postoperativen Phase ist sowohl bei der Transmitterimplantation, als auch bei der zusätzlichen Elektrodenimplantation, lediglich eine kurzfristige, aber keine langfristige Belastung der Tiere zu erkennen. Diese Beurteilung dient aber lediglich als Orientierung und muss immer individuell überprüft werden.

Transmittersysteme werden in der Versuchstierkunde immer häufiger verwendet (CESAROVIC et al. 2011). Gerade in Versuchen mit langfristigen Aufzeichnungen wird die Radiotelemetrie als mögliche *Refinement*-Maßnahme erwähnt (LIDSTER et al. 2016). Die Implantation der Transmitter wird aber auch aufgrund des invasiven Eingriffes, des Volumens und des Gewichts des Implantates im Vergleich zur Maus als belastender Eingriff beschrieben (LEON et al. 2004). Auch in der vorliegenden Studie, in der die Telemetrietransmitter subkutan im Tier implantiert wurde, konnte durch die Schwerkraft eine Lageveränderung des Transmitters im Verlauf der Studie beobachtet werden. Dies führte allerdings nicht zu einer Beeinträchtigung in der Fortbewegung. In dieser Studie wurde der Telemetrietransmitter zur Erfassung der EEG- und EKG-Daten der Tiere zusätzlich zur Elektrode implantiert. Die erhobenen Daten zeigen durch das reduzierte Nestbauverhalten und die erhöhte FCM-Konzentration, dass die Implantation von Telemetrietransmittern eine Belastung der Tiere darstellt. Die Korrelation der Telemetrie-Daten mit Daten von nicht-invasiven und einfach durchzuführenden Methoden, wie dem *Grimace Scale* oder dem *Irwin-Score*, lässt allerdings vermuten, dass auch ohne die invasive Prozedur der Transmitterimplantation eine umfassende Belastungseinstufung möglich ist. Auch KUMSTEL et al. (2020) diskutierte kürzlich den invasiven Eingriff in Bezug auf Distress und den fehlenden Vorteil des Transmitters bei der Belastungseinstufung. In diesem Modell erfolgte die Implantation des Transmitters jedoch nicht nur zur Erfassung von Parametern in Bezug auf die Belastungseinstufung. Wie oben erwähnt erlaubt die Implantation des Transmitters, im Gegensatz zur kabelgebundenen Aufzeichnung, die Erhebung von EEG-Daten in freibeweglichen Tieren (WEIERGRÄBER et al. 2005). Die EEG-Ableitung ist in Epilepsiemodellen unerlässlich. Daher implizieren die erhobenen Daten in dieser Studie eher die Notwendigkeit, minimal-invasive Operationstechniken und das postoperative Schmerzmanagement zu optimieren.

1.2. Status epilepticus

Im intrahippocampalen Kainat-Modell bei Mäusen erfolgt die Induktion des Status epilepticus im Zuge des operativen Eingriffs. Vor der Implantation der Elektrode wird mit Hilfe einer Mikroinjektionskanüle Kainsäure in die CA1-Region des rechten dorsalen Hippocampus injiziert. Nach dem Erwachen aus der Narkose stellte sich bei den Tieren ein mehrstündiger, nicht-convulsiver Status epilepticus ein.

Am ersten Tag nach der Operation und SE-Induktion zeigten die Tiere ein reduziertes Nestbauverhalten im Vergleich zur naiven Gruppe. Wie zuvor bei der Telemetrie-Gruppe beschrieben zeigten auch die Tiere der Kainat-Gruppe bereits am zweiten Tag nach der Induktion des Status epilepticus kein reduziertes Nestbauverhalten mehr. Daraus lässt sich schließen, dass die Beeinträchtigung des Wohlfühlverhaltens ebenfalls durch den akuten Schmerzzustand in Folge der Operation und weniger durch eine zusätzliche Belastung durch die SE-Induktion entstanden ist. Im Laufe der gesamten weiteren Studie konnten weiterhin keine Veränderungen im Nestbauverhalten und somit im Wohlfühlverhalten der Tiere erfasst werden.

Die Erfassung des Wühlverhaltens in dieser Gruppe diene neben der Untersuchung auf etwaige Schmerzzustände der Tiere auch zur Untersuchung anderer Aspekte, die zu einem reduzierten Wühlverhalten der Tiere führen kann. So konnte reduziertes Wühlverhalten bereits in verschiedenen Depressionsmodellen erfasst werden (DEACON et al. 2001; LUEDTKE et al. 2014). DEACON et al. (2001) untersuchte das Wühlverhalten in Scrapie-infizierten Mäusen. Depressionen sind eine häufige Begleiterscheinung bei Prionenkrankheiten in Menschen, wie etwa der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (DEACON et al. 2001). Wie auch die Tiere der Telemetrie-Gruppe und der Sham-Gruppe zeigten die Tiere mit zusätzlicher Induktion des Status epilepticus keine Veränderungen im Wühlverhalten zu den Zeitpunkten ein und zwei Wochen nach der Operation. Ein reduziertes Wühlverhalten konnte jedoch bei Ratten im Pilocarpin-Modell eine Woche nach dem Status erfasst werden (KOSKA et al. 2019). Zum letzten Zeitpunkt, sieben Wochen nach SE-Induktion zeigten auch die Tiere der Kainat-Gruppe ein gesteigertes Wühlverhalten, jedoch wiederum nicht im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Nach Betrachtung der Daten des Nestbauverhaltens und des Wühlverhaltens der Kainat-Tiere konnte keine zusätzliche kurz- oder langfristige Beeinträchtigung des Wohlfühlverhaltens durch die Induktion des Status epilepticus gezeigt werden.

Der *Grimace Scale* wurde auch bei den Tieren der Kainat-Gruppe in der postoperativen Phase zur Erfassung akuter Schmerzzustände (LANGFORD et al. 2010) für 14 Tage täglich erhoben. Im Vergleich zu den naiven Tieren zeigten die Tiere an den ersten vier Tagen nach der SE-Induktion deutlich erhöhte Werte. An Tag zwei, drei und vier waren die Werte

zusätzlich auch im Vergleich zu den Tieren der Telemetrie-Gruppe erhöht. Ab dem fünften Tag nach dem Status zeigten auch die Tiere der Kainat-Gruppe wieder Werte der Basalmessung. Die länger anhaltende Erhöhung des *Grimace Scales* lässt entweder eine transient erhöhte Belastung der Tiere als Folge des Status epilepticus oder eine Beeinträchtigung der Erholungsphase nach der Operation durch die zusätzliche Induktion des Status epilepticus vermuten. Ratten im Pilocarpin-Modell zeigten bis zu drei Tage nach dem Status erhöhte Werte im *Grimace Scale* und dadurch eine erhöhte Belastung in der frühen Post-Insult-Phase (KOSKA et al. 2019). In diesem Pilocarpin-Modell erfolgte die Induktion des Status epilepticus erst zwei Wochen nach der Operation.

Auch der *Irwin Score* wurde bei den Tieren der Kainat-Gruppe zur intensiveren Überwachung der Tiere ab dem ersten Tag nach dem Status epilepticus für 14 Tage täglich, danach wöchentlich erfasst. Mit dem *Irwin Score* können, neben Veränderungen im Allgemeinbefinden der Tiere, auch Handling-assoziierte Verhaltensänderungen erfasst werden (GROTICKE et al. 2007). Bereits ab dem ersten Tag nach Induktion des Status epilepticus zeigten die Tiere der Kainat-Gruppe einen erhöhten Summenscore im *Irwin* im Vergleich zu den Tieren der Telemetrie-Gruppe und den naiven Tieren, an vereinzelten Tagen ebenso gegenüber den Tieren der Sham-Gruppe. Diese Erhöhung der Werte hielt bis zum Ende der Studie durchgehend an. Auch in Post-SE-Modellen bei Ratten zeigten die Tiere sowohl in der frühen Post-Insult-Phase, als auch später in der chronischen Phase erhöhte Werte im *Irwin Score* (KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019). Zudem zeigten verschiedene Studien auch ein aggressives Verhalten der Ratten nach intraperitonealer Kainat- oder Pilocarpin-Injektion (STAFSTROM et al. 1993; KOSKA et al. 2019). Eine gesteigerte Aggressivität bestätigte sich für Mäuse nach intrahippocampaler Kainat-Injektion nicht. Parameter, die zu der konstanten Erhöhung des *Irwin Scores* in der Kainat-Gruppe führten, waren eine erhöhte Berührungsreaktion, erhöhter Körpertonus und eine erhöhte Schwanzposition. All diese Parameter können auf eine erhöhte Nervosität der Tiere hindeuten. Daher ist im Umgang mit diesen Tieren eine ruhige Atmosphäre und ein sanftes Handling notwendig. Sofern die Tiere nicht zur Applikation von Medikamenten oder zur intensiven Beurteilung von Operationsbereichen fixiert werden müssen, wäre bei diesen Tieren auch das Cup-Handling, das Tunnel-Handling oder eine Kombination beider Techniken zu empfehlen, welche nachweislich das Stresslevel in Tieren reduzieren (HURST u. WEST 2010; GOUVEIA u. HURST 2019).

Die Erfassung der fäkalen Corticosteronmetaboliten als biochemischer Parameter, um eine Aussage über das Stresslevel durch die Induktion des Status epilepticus der Tiere treffen zu können, wurde bereits in vorherigen Studien als geeigneter Parameter selektiert (KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019). Durch die Bestimmung der Corticosteronkonzentration kann die Aktivierung der HPA-Achse erfasst und somit eine Aussage über das

Stresslevel der Tiere gemacht werden (SCORRANO et al. 2015). So wurde in der Kainat-Gruppe, ebenso wie in der Telemetrie- und der Sham-Gruppe, in der frühen postoperativen Phase eine erhöhte Konzentration ermittelt. Allerdings konnte zu diesem Zeitpunkt zwischen den Gruppen operierter Tiere kein Unterschied festgestellt werden, sodass es fraglich ist, ob die Erhöhung der FCM-Konzentration in der Kainat-Gruppe durch eine zusätzliche Belastung durch den Status epilepticus zustande kam. Auch in dieser Gruppe hielt die Aktivierung der HPA-Achse nicht lange an, sodass die FCM-Konzentration zu den Zeitpunkten ein und zwei Wochen nach dem Status epilepticus wieder die Werte der Basalmessung erreichten. Auch zum letzten Zeitpunkt, acht Wochen nach dem Status epilepticus, konnte eine Veränderung der FCM-Konzentration festgestellt werden. In den Post-SE-Modellen bei Ratten war hingegen ein deutlicher Einfluss des Status epilepticus auf die FCM-Konzentration sichtbar geworden. Sowohl Ratten im Pilocarpin-Modell, als auch im elektrischen Modell zeigten zwei Tage nach dem Status deutlich erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Und auch in der chronischen Phase konnten in diesen Post-SE-Modellen erhöhte FCM-Konzentrationen festgestellt werden (KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019). In diesem Zusammenhang wurde bereits eine mögliche anfallsbedingte Aktivierung der HPA-Achse diskutiert (O'TOOLE et al. 2014). Im Falle der beiden Modelle bei Ratten würde dies, bedingt durch den Status und später durch die spontanen Anfälle in der chronischen Phase auftreten. Aber auch im Kindling-Modell in Mäusen konnte keine erhöhte Konzentration der fäkalen Corticosteronmetaboliten in der späten Kindlingphase erfasst werden (BOLDT et al. 2021). Die Aktivierung der HPA-Achse kann aber auch durch einen akuten Stressor erfolgen (BERRY et al. 2012; CARNEVALI et al. 2017). Dieser wäre dann in der vorliegenden Studie vermutlich die Elektrodenimplantation.

Beginnend am ersten Tag nach dem Status epilepticus wurde zusätzlich das EKG und die Aktivität der Tiere aufgezeichnet. Dabei konnte in der frühen postoperativen Phase eine erhöhte Herzfrequenz und eine reduzierte SDNN, ein Parameter der HRV, während der Aktiv- und der Ruhephase erfasst werden. Molekulare Veränderungen im Myokard, die in Folge des Status epilepticus auftreten, könnten eine Ursache für die Veränderungen der Herzfrequenz und der HRV sein (BREWSTER et al. 2016). LAI et al. (2018) beschreibt, dass diese Veränderungen im Myokard nicht von transienter Natur sind und auch in späteren Phasen erhalten bleiben. Bei Patienten mit Epilepsie konnte ebenfalls eine reduzierte HRV erfasst werden (BAYSAL-KIRAC et al. 2017). In der vorliegenden Studie konnten zu den nächsten beiden Zeitpunkten, zwei und vier Wochen nach dem Status jedoch keine Veränderungen der Herzfrequenz und der HVR erfasst werden, was gegen einen Einfluss der Prozesse im Myokard nach dem Status epilepticus spricht. Vielmehr gibt dies Hinweise, dass die erhöhte Herzfrequenz und die erniedrigte HVR in der frühen postoperativen Phase distressbedingte Abweichungen darstellen. Messungen der HRV dienten bereits in früheren

Studien als Methode zur Evaluierung von Distress (CESAROVIC et al. 2011; PARK et al. 2017).

Zusammenfassend wird nach der Betrachtung der Daten eine Belastungseinstufung der Induktion des Status epilepticus im Rahmen der Operation als „mittelgradig“ empfohlen. Zusätzlich zur oben beschriebenen kurzfristigen Belastung in der frühen postoperativen Phase durch die Implantation des Transmitters und der Elektrode, zeigten die Tiere der Kainat-Gruppe Veränderungen im *Irwin Score*, in der Herzfrequenz und der HRV. Diese Einstufung dient aber wiederum nur als Orientierung und muss stets individuell überprüft werden.

Im Gegensatz zum intrahippocampalen Kainat-Modell entwickeln die Tiere in anderen Post-SE-Modellen, wie dem Pilocarpin-Modell in Mäusen und Ratten oder dem elektrischen Modell in Ratten, einen konvulsiven Status epilepticus mit tonisch-klonischen Krämpfen (GROTICKE et al. 2007; KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019). Die langanhaltende Krampfaktivität der Muskulatur stellt dabei eine physische Belastung dar (YOKOYAMA et al. 2016). Sowohl KOSKA et al. (2019) als auch SEIFFERT et al. (2019) beschreiben die Post-Insult-Phase in Post-SE-Modellen in der Ratte als „schwere“ Belastung. Aufgrund dessen ist nach einem konvulsiven Status epilepticus eine intensive Überwachung und Pflege der Tiere nötig. Der nicht-convulsive Status epilepticus der Tiere im Kainat-Modell ist durch die fehlende Krampfaktivität der Muskulatur und der damit verbundenen Belastung, keineswegs mit dem konvulsiven Status epilepticus der zuvor beschriebenen Modelle vergleichbar. Trotzdem zeigen die Daten der vorliegenden Studie eine Beeinträchtigung der Tiere in der frühen postoperativen Phase durch die Induktion des Status epilepticus. Diese Beeinträchtigung ergab sich aus der erhöhten Herzfrequenz, dem erhöhten *Grimace Score* über mehrere Tage und dem erhöhten *Irwin Score* in dieser Phase. LIDSTER et al. (2016) beschreibt bereits die Bedeutung der frühen Phase nach dem Status epilepticus und mögliche *Refinement*-Methoden. Aber auch hier ist in Betracht zu ziehen, dass die Veränderungen der genannten Parameter auch durch eine Beeinträchtigung der Erholungsphase nach der Operation durch die zusätzliche Induktion des Status epilepticus entstanden sein können. Daher geben die Daten der vorliegenden Studien den Hinweis darauf, dass sich die Entwicklung von *Refinement*-Methoden vor allem auf die frühe Phase nach der Operation und der Induktion des Status epilepticus konzentrieren sollten.

1.3. Verhaltenstests in der chronischen Phase

Die chronische Phase ist definiert durch das Auftreten spontaner Anfälle. Im intrahippocampalen Kainat-Modell in Mäusen ist die chronische Phase gekennzeichnet durch eine hochfrequente elektrographische Anfallsaktivität und vereinzelt auftretende generalisierte Anfälle. Je nach Geschlecht und Stamm der Tiere ist die chronische Phase durch eine kurze Latenzphase vom Status epilepticus abgrenzbar. Wie auch bereits von TWELE et al. (2016b) in weiblichen Tieren verschiedener Stämme beschrieben, war bei den weiblichen Tieren in dieser Studie bereits ab dem ersten Tag nach Induktion des Status epilepticus elektrographische Aktivität im EEG sichtbar, sodass keine klare Latenzphase bestimmt werden konnte. In männlichen Tieren hingegen wird je nach Stamm eine Latenzphase zwischen zwei Tagen und zwei Wochen beschrieben (RIBAN et al. 2002; ARABADZISZ et al. 2005; TWELE et al. 2016b). Bei weiblichen Tieren wird daher oft auch schon ein oder zwei Wochen nach dem Status epilepticus von einer chronischen Phase gesprochen (LOSCHER et al. 2017). Aufgrund der fehlenden Latenzperiode in weiblichen Mäusen ist das Modell in weiblichen Mäusen auch nicht für Studien zur Erforschung von Pathomechanismen der Epileptogenese geeignet (TWELE et al. 2016b).

Der Eintritt in die chronische Phase wurde in der vorliegenden Arbeit durch die EEG-Aufzeichnung vier Wochen nach Induktion des Status durch eine hochfrequente elektrographische Anfallsaktivität, in Form von HVSWs, in allen Tieren der Kainat-Gruppe bestätigt. In diesem Kontext ist auch zu nennen, dass in Sham-operierten Tieren keine vergleichbare Anfallsaktivität detektiert werden konnte, was auch eine frühere Studie in männlichen NMRI-Mäusen bestätigt (TWELE et al. 2017). In früheren Studien im Kainat-Modell wurden HVSWs aufgrund fehlender Verhaltensänderungen jedoch nicht als elektrographische Anfallsaktivität, sondern lediglich als interiktale Aktivität eingeordnet (RIBAN et al. 2002). HPDs galten bislang als die typischen Anfälle in diesem Modell (RIBAN et al. 2002; MAROSO et al. 2011). Wie auch Twele und Kollegen in verschiedenen Studien beschreiben (TWELE et al. 2016a; TWELE et al. 2016b), treten bei weiblichen Mäusen HPDs aber nur vereinzelt auf, sodass die Tiere in der vorliegenden Studie nach dieser Definition nicht in der chronischen Phase wären. Aufgrund folgender Tatsachen klassifizieren neuere Studien HVSWs allerdings sehr wohl als elektrographische Anfälle (TWELE et al. 2016b). Erstens sind elektrographische Anfälle typischerweise nicht mit Verhaltensänderungen verbunden (CLAASSEN et al. 2004). Das Fehlen von Verhaltensänderungen, wie in diesem Modell, spricht daher dagegen, HVSWs lediglich als interiktale Aktivitäten einzustufen. Zweitens, bei Patienten gehen elektrographische Anfälle oft in klinische Anfälle über (LOSCHER et al. 2015), was auch in weiblichen Mäusen bereits erfasst werden konnte

(TWELE et al. 2016b). Drittens, interiktale Aktivitäten lassen sich oft nur schwer durch Antikonvulsiva unterdrücken, wohingegen HVSWs auf einige Antikonvulsiva ansprechen (KLEIN et al. 2015b).

In vorangegangenen Studien zur Belastungseinstufung in Epilepsiemodellen in unserer Arbeitsgruppe wurden bereits verschiedene Parameter identifiziert, die wertvolle Informationen über den Zustand der Tiere und Einflüsse der verschiedenen Prozeduren im Zusammenhang mit dem jeweiligen Modell geben können (MÖLLER et al. 2018; KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019; VAN DIJK et al. 2020; BOLDT et al. 2021). So konnten in den untersuchten Modellen verschiedene Beeinträchtigungen erfasst werden, dargestellt unter anderem durch angst-assoziiertes Verhalten, durch eine reduzierte Saccharin-Präferenz, durch eine reduzierte aktive soziale Interaktion im *Social-Interaction-Test* oder angst-assoziiertes Verhalten im *Elevated-Plus-Maze* oder der *Black-and-White-Box*, durch eine Hyperaktivität im *Open Field* oder ein reduziertes Wohlfühlverhalten (KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019; BOLDT et al. 2021).

Im Vergleich dazu konnten in der vorliegenden Studie in keinem der Tests relevante Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Alle diese Parameter geben daher Hinweise, dass die Belastung der Tiere in der chronischen Phase eher gering erscheint. Dies spiegelt auch die Ergebnisse aus früheren Studien im intrahippocampalen Kainat-Modell in Mäusen wider. So konnte auch GROTIKKE et al. (2008) keine Verhaltensänderungen in Tests für angst-assoziiertes Verhalten, für Lokomotion und Exploration oder für Motorik und Gleichgewicht feststellen. Lediglich ein Effekt auf den *Forced Swim Test*, einem Test für depressions-assoziiertes Verhalten, und den *Morris Water Maze Test*, einem Lern- und Gedächtnistest konnte detektiert werden (GROTIKKE et al. 2008). Diese Tests wurden aufgrund von möglichem zusätzlichem, mit Wasser assoziiertem, Distress vermieden. Zusätzlich konnte eine reduzierte Präferenz von Sucrose erfasst werden (KLEIN et al. 2015a).

Der einzige Parameter, der neben einem kurzzeitigen auch einen langzeitigen Effekt auf die Tiere der Kainat-Gruppe zeigte, war wie oben bereits beschrieben, der *Irwin Score*. Der *Irwin Score*, zuerst beschrieben im Jahr 1968, dient als Score-System für die Aktivierung des autonomen und zentralen Nervensystems (IRWIN 1968). Da der *Irwin Score* einfach durchzuführen ist und als Erweiterung des klinischen Scores dienen kann, wurde er als Parameter zur Belastungsbeurteilung in unseren Studien aufgenommen. Zudem korrelieren die Daten des *Irwin Scores* zu den verschiedenen Zeitpunkten positiv miteinander und geben Hinweise auf eine mögliche prädiktive Validität dieses Parameters. Der *Irwin Score* korreliert in der frühen postoperativen Phase zusätzlich mit dem *Grimace Scale* und der FCM-Konzentration zum gleichen Zeitpunkt, was zusätzlich für einen geeigneten Parameter zur Belastungseinstufung in der frühen Phase spricht.

Wie oben beschrieben, konnten zwei und vier Wochen nach dem Status epilepticus keine Veränderungen mehr in der Herzfrequenz, der Herzratenvariabilität oder der Aktivität detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten männliche C57Bl/6J Mäuse eine erhöhte Herzfrequenz zum Zeitpunkt zwei Wochen nach dem Status epilepticus (LEVINE et al. 2020). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die unterschiedliche Natur der Anfallsaktivität zwischen weiblichen und männlichen Mäusen sein. Wie bereits erwähnt, zeigt sich die Anfallsaktivität bei weiblichen Mäusen hauptsächlich durch das Auftreten von HVSWs, wohingegen bei männlichen Mäusen auch frequent HPDs detektiert werden (TWELE et al. 2016b). In diesem Zusammenhang ist auch zu erwähnen, dass die telemetrischen Daten der Herzfrequenz, der HRV und auch der Aktivität in der frühen postoperativen Phase mit den Daten einiger Verhaltensparameter korrelieren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der direkte Einfluss des Status epilepticus auf die genannten Parameter auch eine Aussage über dessen Langzeiteffekt haben kann. So korrelierte beispielsweise die Aktivität in der frühen postoperativen Phase positiv mit der zurückgelegten Distanz und der Geschwindigkeit und gleichzeitig negativ mit der Immobilitätszeit im *Open Field*.

Die Temporallappenepilepsie in Patienten ist mit einem hohen Risiko für psychiatrische Komorbiditäten, wie Angststörungen oder Depressionen, verbunden (KEEZER et al. 2016). Durch die fehlenden verhaltensbiologischen Veränderungen in diesem Modell der Temporallappenepilepsie kann dieses Modell, im Gegensatz zum Pilocarpin-Modell in Mäusen und Ratten und zum elektrischen Post-SE-Modell in Ratten, nicht zur Erforschung der Pathomechanismen der Komorbiditäten empfohlen werden. Auch für Studien mit dem Ziel, die Auswirkungen eines therapeutischen Ansatzes auf die Symptome der Temporallappenepilepsie, inklusive der psychiatrischen Auswirkungen, zu erforschen, kann dieses Modell nicht empfohlen werden. Wie von KLEIN et al. (2015b) beschrieben, sprechen die vorherrschenden HVSWs jedoch auf einige Antiepileptika, wie Levetiracetam, Valproat und Diazepam an. Daher kann dieses Modell für die Erforschung von Antiepileptika und auch von pharmakoresistenten Epilepsien empfohlen werden (KLEIN et al. 2015b; WELZEL et al. 2020).

2. Schlussfolgerung

Identifizierung und Validierung von Parametern zur Belastungseinstufung des chemischen Post-SE-Modells

Die vorliegende Studie diente der Identifizierung und Validierung von geeigneten Parametern für eine evidenzbasierte Belastungseinstufung im Rahmen der gesetzlichen Vorgaben. Die erhobenen Daten deuten darauf hin, dass sowohl der *Grimace Scale*, als auch der *Irwin Score* robuste Parameter für die postoperative Phase darstellen. Die Ergebnisse der beiden Tests korrelieren unter anderem auch mit Daten der Herzfrequenz und der HRV. Zudem erwies sich in der postoperativen Phase das Nestbauverhalten als ein sensitiverer Parameter zur Erfassung des Wohlbefindens als das Wühlverhalten.

In chronischen Epilepsiemodellen mit spontanen Anfällen lassen sich Phasen mit unterschiedlichen experimentellen Einflüssen unterscheiden. Aufgrund der hauptsächlich elektrographischen Anfallsaktivität in diesem Modell, ist die Implantation einer Tiefenelektrode zur Ableitung des EEGs eine Voraussetzung. Bei der Beurteilung der Gesamtbelastung muss daher auch die Implantation der Elektrode berücksichtigt werden. Analog zu früheren Studien aus unserer Arbeitsgruppe im Kindling-Modell in Mäusen und im Pilocarpin-Modell in Ratten (KOSKA et al. 2019; BOLDT et al. 2021), zeigt die vorliegende Studie lediglich eine die kurzfristige, aber keine langfristige Belastung der Tiere durch die Elektrodenimplantation in den rechten Hippocampus.

Um eine umfassende Belastungseinschätzung für das vorliegende Modell geben zu können, wird die Belastung in den verschiedenen Phasen des Modells separat betrachtet.

In der frühen Phase nach dem Status epilepticus zeigten die Tiere eine transient erhöhte Herzfrequenz mit gleichzeitig reduzierter SDNN als Parameter für die HRV. Zudem wurden konstant erhöhte Werte in *Irwin Score* durch eine erhöhte Berührungsreaktion und einen erhöhten Körpertonus beim *Handling* erfasst. In diesem Modell wird der Status epilepticus im Zuge der Elektrodenimplantation induziert. Durch den operativen Eingriff zeigten die Tiere zusätzlich ein reduziertes Nestbauverhalten, erhöhte Werte im *Grimace Scale* und erhöhte FCM-Konzentrationen. Nach der EU-Richtlinie 2010/63 werden Prozeduren, wenn diese „kurzzeitig mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste oder lang anhaltende geringe Schmerzen verursachen sowie Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine mittelschwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere verursachen“, als „mittelgradige“ Belastung eingestuft (EUROPÄISCHES-PARLAMENT 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wird eine Einstufung der Belastung in der frühen Phase nach der Operation bzw. Induktion des Status epilepticus als „mittelgradig“ vorgeschlagen.

In der chronischen Phase konnten in verschiedenen Verhaltenstest keine Veränderungen erfasst werden. Es konnte weder eine Hyperlokomotion, noch ein reduziertes Wohlbefinden, noch angst- oder anhedonie-assoziiertes Verhalten der Tiere erfasst werden.

Auch konnten in der chronischen Phase keine Änderungen der Herzfrequenz und der HRV mehr detektiert werden.

Der einzige Parameter, der sich in der chronischen Phase veränderte, war der *Irwin Score*. Die erfassten Veränderungen in der chronischen Phase können als *anhaltend gering* eingestuft werden.

Zusammenfassend wird aufgrund der mittelgradigen Belastung in der frühen Phase nach dem Status und der geringen Belastung in der chronischen Phase eine Belastungseinstufung des intrahippocampalen Kainat-Modells in Mäusen als „mittelgradig“ empfohlen. Dabei handelt es sich aber wiederum nur um eine Empfehlung als Basis für die individuelle, labor-spezifische Beurteilung.

Die Temporallappenepilepsie ist bei Humanpatienten mit einem hohen Risiko für psychiatrische Komorbiditäten, wie Angststörungen oder Depressionen, verbunden (KEEZER et al. 2016). Durch die fehlenden verhaltensbiologischen Veränderungen in dem in dieser Studie betrachteten Mausmodell der Temporallappenepilepsie, kann dieses Modell nicht zur Erforschung der Pathomechanismen der Komorbiditäten empfohlen werden. Auch für Studien mit dem Ziel, die Auswirkungen eines therapeutischen Ansatzes auf die Symptome der Temporallappenepilepsie, inklusive der psychiatrischen Auswirkungen, zu erforschen, kann dieses Modell nicht empfohlen werden.

Verwendung von Telemetrie-Transmittern

In dieser Studie wurde zur Erfassung der EEG- und EKG-Daten der Tiere zusätzlich ein Telemetrie-Transmitter implantiert. Die erhobenen Daten zeigen durch das reduzierte Nestbauverhalten und die erhöhte FCM-Konzentration, dass die Implantation von Telemetrie-Transmittern eine geringe Belastung der Tiere darstellt. Die Korrelation der Telemetrie-Daten mit Daten von nicht-invasiven und einfach durchzuführenden Methoden, wie dem *Grimace Scale* oder dem *Irwin-Score*, lässt allerdings vermuten, dass auch ohne die invasive Prozedur der Transmitterimplantation eine umfassende Belastungseinstufung möglich ist. In dieser Studie diente die Implantation der Transmitter aber auch der EEG-Ableitung. Wie bereits erwähnt, ist die Aufzeichnung der EEG-Daten in Epilepsiemodellen essenziell und impliziert daher die Notwendigkeit der Optimierung von Operationstechniken und des postoperativen Managements.

3. Limitationen und Ausblick

Limitationen

Bei der Interpretation der erhobenen Daten sind verschiedene Limitationen zu berücksichtigen. Und auch in Bezug auf die Generalisierbarkeit der identifizierten Parameter wurden noch nicht alle möglichen Fragen beantwortet. Diese beziehen sich einerseits auf den verwendeten Mausstamm und das Geschlecht der Tiere, andererseits auch auf die Erfassung der verschiedenen Parameter.

Eine große Limitation dieser Studie stellt die Wahl des Geschlechts der Tiere in diesem Modell dar. So wurden in dieser Studie, in Anlehnung an die vorhergehende Studie im Kindling-Modell (BOLDT et al. 2021), nur weibliche NMRI Mäuse verwendet. Frühere Studien zeigten bereits deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede im Kainat-Modell in der Art und Anzahl der elektrographischen Anfallsaktivität. So treten bei männlichen Tieren, wie auch oben beschrieben, frequent HPDs auf, welche in weiblichen Tieren nur vereinzelt zu sehen waren. Auch zeigten männliche Tiere, im Gegensatz zu weiblichen, eine kurze aber klare Latenzperiode nach dem Status epilepticus (TWELE et al. 2016a; TWELE et al. 2016b). So sind in Bezug auf die Generalisierbarkeit der Parameter Studien in männlichen Tieren nötig.

Bei weiblichen Tieren können zudem auch der Sexualzyklus und die damit verbundenen hormonellen Schwankungen einen Einfluss auf die HPA-Achse und verschiedene Parameter wie die soziale Interaktion haben und somit die Varianz der Daten erhöhen (OYOLA u. HANDA 2017; CHARI et al. 2020). Der Zyklusstand wurde in dieser Studie einmalig zum Ende der Versuche bestimmt. Die Zyklusbestimmung mittels Ohmmeter stellt allerdings eine nicht-invasive Methode dar und könnte in weiteren Studien zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden, um den Einfluss des Zyklus auf verschiedene andere Parameter zu evaluieren.

LOSCHER et al. (2017) beschreibt zudem den Einfluss des genetischen Hintergrundes auf die Anfallsentwicklung in verschiedenen Modellen. In dieser Studie wurden, ebenfalls in Anlehnung an die vorherige Studie im Kindling-Modell (BOLDT et al. 2021), ausschließlich NMRI-Mäuse verwendet, ein häufig verwendeter Auszuchtstamm. In früheren Studien wurden für das vorliegende Kainat-Modell bereits Unterschiede zwischen verschiedenen Mausstämmen beobachtet. Diese Unterschiede bezogen sich sowohl auf die Dauer der Latenzphase nach dem Status epilepticus, als auch auf die Anfallsfrequenz (MCKHANN et al. 2003; TWELE et al. 2016b).

Des Weiteren müssen die speziellen Haltungsbedingungen berücksichtigt werden. Aufgrund der verschiedenen Implantate und der Erhebung von individuellen Parametern, wie

dem Nestbauverhalten oder dem Wühlverhalten, erfolgte eine Einzelhaltung der Tiere. Die Einzelhaltung der Tiere ist jedoch mit zusätzlichem Stress verbunden und stellt je nach Zeitraum eine geringe bis mittlere Belastung nach Richtlinie 2010/63/EU dar. Durch die Haltung in einem offenen System hatten die Tiere jedoch sowohl auditiven, als auch olfaktorischen Kontakt untereinander.

Der Corticosteronspiegel dient als Parameter zur Beurteilung des Stresslevels der Tiere. Anders als die Corticosteronbestimmung im Serum oder in Haaren, stellt die Bestimmung der fäkalen Corticosteronmetaboliten dabei eine nicht-invasive Methode dar und kann zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt werden. Allerdings kann anhand der Corticosteronbestimmung nicht zwischen Eustress und Distress unterschieden werden. Dies ist bei der Interpretation zu beachten.

Nach Möglichkeit sollte die Erhebung aller Parameter verblindet durchgeführt werden, so dass die Gruppenzugehörigkeit der einzelnen Tiere nicht ersichtlich ist. Sowohl bei der Erhebung des *Grimace Scales*, als auch des *Irwin Scores* war eine Verblindung durch die verschiedenen Operationstechniken der einzelnen Versuchsgruppen jedoch nicht möglich. Dies muss bei der Interpretation dieser Parameter berücksichtigt werden. Zudem müssen beim *Grimace Scale* mögliche Veränderung der Gesichtsmimik der Tiere aufgrund der Implantation der Tiefenstimulationselektrode und möglichen Schwellungen im Kopfbereich durch den operativen Eingriff in der frühen postoperativen Phase berücksichtigt werden. Des Weiteren ist zu beachten, dass die Erfassung der beiden genannten Parameter zusammen mit der des Nestbauverhaltens und des Nestverschmutzungsgrades zwar anhand etablierter Schemata erfolgt, aber dennoch subjektiv ist. Zur Erfassung des *Grimace Scales* könnte daher künftig eine videobasierte Erkennung der Gesichtsmimik genutzt werden (ERNST et al. 2020a; ERNST et al. 2020b).

Ausblick

Die in diesem Mausmodell erhobenen Daten sollen neben dem speziesübergreifenden Vergleich künftig auch modellübergreifend mit Parametern aus anderen Epilepsiemodellen in Mäusen verglichen werden. In einer vergleichenden Studie zwischen dem Amygdala- und dem Hippocampus-Kindling-Modell in Mäusen wurden bereits umfassende Daten zu Verhaltens- und biochemischen Parametern evaluiert (BOLDT et al. 2021). Das sogenannte *Composite Measure Scheme* (CMS) stellt ein Scoring-System dar, mit Hilfe dessen sich Tiere in verschiedene Belastungsgrade einstufen lassen. Zunächst werden anhand einer PCA Parameter selektiert, die die Varianz im Datensatz prägen. Die Belastungsgrade ergeben sich schließlich aus Clustern, die aus den selektierten Parametern erstellt werden. Eine Vorlage für diese modellübergreifenden Vergleich in Mäusen mittels CMS bietet eine

bereits veröffentlichte Studie über den modellübergreifenden Vergleich zwischen einem Amygdala-Kindling-Modell, einem chemischen und einem elektrischen Post-SE-Modell in Ratten von VAN DIJK et al. (2020). In diesen Rattenmodellen wurden Daten zu Verhaltens- und biochemischen Parametern erfasst (DI LIBERTO et al. 2018; MÖLLER et al. 2018; VAN DIJK et al. 2018; KOSKA et al. 2019; SEIFFERT et al. 2019).

Für weiteres *Refinement* im Sinne des 3R-Prinzips sind künftig weitere Studien mit multimodalem Analgesieregime zur Verbesserung des perioperativen und präventiven Schmerzmanagement für Mäuse mit Kraniotomie geplant. Hier sollen verschiedene Kombinationen von nichtsteroidalen Antiphlogistika, Opioiden und Lokalanästhetika verglichen werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Epilepsie ist in der Human- und Veterinärmedizin eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. In etwa 30 Prozent aller Fälle lassen sich die Anfälle der Patienten noch nicht pharmakologisch kontrollieren. Um pathophysiologische Mechanismen der Epilepsie besser zu verstehen, und um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, sind Tiermodelle in der Epilepsieforschung nach wie vor nicht zu ersetzen. Daher müssen die mit den Versuchsprozeduren verbundenen Schmerzen, Leiden, Schäden und Ängste der Tiere so gering wie möglich gehalten werden. In der europäischen Richtlinie 2010/63/EU werden daher Belastungseinstufungen der Tiermodelle in „gering“, „mittel“ und „schwer“ gefordert. Diese Belastungseinstufung stellt auch die Grundlage für die ethische Vertretbarkeit eines Tierversuchs dar. In jedem geplanten Versuchsvorhaben muss auch im Tierversuchsantrag die zu erwartende Belastung und basierend darauf die ethische Vertretbarkeit begründet werden. Im Rahmen der Forschergruppe „Severity Assessment in Animal Based Research“ (DFG FOR 2591) werden geeignete Parameter für eine objektive und evidenzbasierte Belastungseinstufung identifiziert und validiert.

Die vorliegende Arbeit dient, im Rahmen dieser Forschergruppe, der Identifizierung und Validierung geeigneter Parameter zur Belastungseinstufung im intrahippocampalen Kainat-Modell in weiblichen NMRI Mäusen. Hierfür wurden verschiedene Verhaltenstests durchgeführt, um das Heimkäfiverhalten (Nestbauerhalten), das Sozialverhalten, das Wühlverhalten, das angst- und depressionsassoziierte Verhalten (*Elevated-Plus-Maze*, *Black-and-White-Box*, *Saccharin-Präferenz*) und die lokomotorische Aktivität (*Open Field*) der Tiere zu untersuchen. Des Weiteren wurden biochemische Stressparameter in Kotproben evaluiert. Durch eine zusätzliche Implantation von Telemetrietransmitter konnte die lokomotorische Aktivität sowie die Herzfrequenz und Herzratenvariabilität der Tiere erfasst werden. Durch diese Parameter konnten umfassende Informationen zur Veränderung verhaltensbiologischer, biochemischer und physiologischer Parameter im intrahippocampalen Kainat-Modell erhoben werden. Der Vergleich von vier Versuchsgruppen (Kainat-Gruppe, Sham-Gruppe, Telemetrie-Gruppe, naive Gruppe) ermöglichte eine Aussage über den Einfluss der verschiedenen Operationstechniken, der Induktion des Status epilepticus und der später spontan auftretenden elektrographischen Anfälle.

In der vorliegenden Arbeit konnte kurzzeitig ein signifikanter Einfluss der Transmitterimplantation auf das Nestbauerhalten und die Konzentration der fäkalen Corticosteronmetaboliten beobachtet werden. Die Elektrodenimplantation führte zusätzlich zu einer transienten Erhöhung des *Grimace Scales* und ebenso transienten Reduktion der Herzratenvariabilität während der Dunkelphase. Zudem konnte durch die Induktion des Status epilepticus eine kurzzeitige Erhöhung der Herzfrequenz, eine weitere Reduktion der

Herzratenvariabilität während der Hellphase und eine dauerhafte Erhöhung des *Irwin Scores* detektiert werden. Alle weiteren verhaltensbiologischen, biochemischen und physiologischen Parameter ergaben keine Hinweise auf einen zusätzlichen Einfluss der hochfrequenten elektrographischen Anfallsaktivität auf das Wohlbefinden der Tiere. Um geeignete Parameter für eine Belastungseinschätzung identifizieren und die Versuchsgruppen parameterübergreifend vergleichen zu können, wurde zusätzlich eine Korrelationsmatrixanalyse und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Die Korrelationsmatrixanalyse zeigte, dass der Irwin Score zusammen mit dem Grimace Scale und der Beurteilung der FCM-Konzentration in der frühen Phase nach der Operation und Induktion des Status epilepticus dazu geeignet ist, invasivere Methoden, wie eine zusätzliche Transmitterimplantation, in der Belastungseinstufung zu ersetzen. Es zeigten sich somit geeignete Parameter für eine modellspezifische Belastungsbeurteilung in der Routineüberwachung der Tiere. Die Hauptkomponentenanalyse zeigte keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Eine weitere Analyse zum Speziesvergleich zwischen Post-SE-Modellen in Ratten und Mäuse zeigten deutliche Unterschiede in Bezug auf Auswirkungen auf verhaltensbiologische Parameter. Anhand der beschriebenen Auswirkungen auf Verhaltensparameter, Herzfrequenz und Herzratenvariabilität, vor allem in der frühen Phase nach der Operation und Induktion des Status epilepticus, wird für das intrahippocampale Kainat-Modell in Mäusen eine mittlere Belastung der Tiere vorgeschlagen. Die Veränderungen in der frühen postoperativen Phase zeigen zudem eine Notwendigkeit von modellspezifischen Refinement-Methoden in dieser Phase auf.

VIII. SUMMARY

Evidence-based severity assessment in epilepsy models:

Investigations in the chemical post-status-epilepticus model in mice

Epilepsy is one of the most common neurological diseases in humans, as well as in dogs and cats. However, about 30 percent of all patients do not respond to medical treatment. In order to better understand the pathophysiological mechanisms of epilepsy and to develop new therapeutic options, animal models are still needed in epilepsy research. The pain, suffering, harm, and distress of animals associated with experimental procedures in these models must be minimized. Therefore, the European Directive 2010/63/EU requires an evidence-based severity assessment for animal models classifying the burden as 'mild', 'moderate' and 'severe'. This classification also serves as the basis for the ethical justifiability of an animal experiment. Within the research group 'Severity Assessment in Animal Based Research' (DFG FOR 2591) suitable parameters for an objective and evidence-based severity assessment in mice and rats are identified and validated.

The present work is concerned with the identification and validation of suitable parameters for an evidence-based severity assessment of the intrahippocampal kainite model in female NMRI mice. For this purpose, different behavioural tests were performed to investigate home cage and well-being behaviour (nest-building behaviour, burrowing test), social behaviour (social interaction test), anxiety- and depression-associated behaviour (elevated-plus-maze, black-and-white-box, saccharin preference) and locomotor activity (open field). Furthermore, biochemical stress parameters (corticosterone metabolites in faeces) were evaluated. Additional implantation of telemetry transmitters was used to record locomotor activity as well as heart rate and heart rate variability in freely moving mice. Through these parameters, comprehensive information on changes in behavioural, biochemical and physiological parameters in the intrahippocampal kainite model was collected. The comparison of four experimental groups (kainate group, sham group, telemetry group, naive group) allowed the influence of the different surgical techniques, the induction of status epilepticus and the spontaneously occurring electrographic seizures in the chronic phase to be assessed.

In the present work, a short-term effect of transmitter implantation on nesting-building behaviour and faecal corticosterone metabolite concentrations was observed. The additional electrode implantation led to a transient increase in grimace scale and equally transient reduction of heart rate variability during the dark phase. Moreover, the induction of status epilepticus resulted in a transient increase in heart rate, a further reduction in heart rate

variability during the light phase, and a sustained increase in Irwin score. All other behavioural, biochemical and physiological parameters did not indicate an additional influence of the high-frequency electrographic seizure activity on the well-being of the animals. In order to identify suitable parameters for severity assessment and to compare the experimental groups, a correlation matrix analysis and a principal component analysis were additionally performed.

Based on the described short-term and long-term effects on behavioural parameters, heart rate, and heart rate variability, especially in the early post-surgical and post-status epilepticus phase, the intrahippocampal kainate model in mice can be described as 'moderate'. The changes in the early post-surgical phase also indicate that refinement measures in this phase aiming to optimize minimally-invasive surgical procedures, post-surgical care and pain management should be assessed. Furthermore, a moderate correlation between telemetric outread parameters and the mouse grimace scale and Irwin score obtained evidence to propose these non-invasive and simple parameters as suitable candidates to evaluate severity.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

ACHIRAMAN, S., G. ARCHUNAN, D. SANKARGANESH, T. RAJAGOPAL, R. L. RENGARAJAN, P. KOKILAVANI, S. KAMALAKKANNAN u. S. KANNAN (2011):

Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection.

Zoolog Sci 28, 600-605

AJAYI, A. F. u. R. E. AKHIGBE (2020):

Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update.

Fertil Res Pract 6, 5

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

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

Neurobiol Pain 2, 13-17

ARABADZISZ, D., K. ANTAL, F. PARPAN, Z. EMRI u. J. M. FRITSCHY (2005):

Epileptogenesis and chronic seizures in a mouse model of temporal lobe epilepsy are associated with distinct EEG patterns and selective neurochemical alterations in the contralateral hippocampus.

Exp Neurol 194, 76-90

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

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

BMC Veterinary Research 3, 16

BAUMANS (2005):

Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals.

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

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

Pain and Distress in Laboratory Rodents and Lagomorphs - Report of the Federation-of-European-Laboratory-Animal-Science-Associations (Felasa) Working Group on Pain and Distress Accepted by the Felasa Board of Management November 1992.

Laboratory Animals 28, 97-112

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

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

Epilepsy Behav 71, 60-64

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

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

Neurobiol Stress 1, 116-127

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

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

Stress 18, 269-279

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

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

BMC Vet Res 11, 182

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

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

Psychoneuroendocrinology 37, 762-772

BERTRAM, E. H., J. M. WILLIAMSON, J. F. CORNETT, S. SPRADLIN u. Z. F. CHEN (1997):

Design and construction of a long-term continuous video-EEG monitoring unit for simultaneous recording of multiple small animals.

Brain Research Protocols 2, 85-97

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

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

Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 13 Suppl, S3-14

BLEICH, A. u. R. H. TOLBA (2017):

How can we assess their suffering? German research consortium aims at defining a severity assessment framework for laboratory animals.

Lab Anim 51, 667

BOLDT, L., I. KOSKA, R. MAARTEN VAN DIJK, S. R. TALBOT, N. MILJANOVIC, R. PALME, A. BLEICH u. H. POTSCHKA (2021):

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

Epilepsy Behav 115, 107689

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

Der ethisch vertretbare Tierversuch: Kriterien und Grenzen.

mentis Verlag GmbH 10

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

The mouse light/dark box test.

Eur J Pharmacol 463, 55-65

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

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

Neuropharmacology 51, 789-804

BRANDT, C., H. POTSCHKA, W. LOSCHER u. U. EBERT (2003):

N-methyl-D-aspartate receptor blockade after status epilepticus protects against limbic brain damage but not against epilepsy in the kainate model of temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 118, 727-740

BRANDT, C., V. RANKOVIC, K. TOLLNER, R. KLEE, S. BROER u. W. LOSCHER (2016):

Refinement of a model of acquired epilepsy for identification and validation of biomarkers of epileptogenesis in rats.

Epilepsy Behav 61, 120-131

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

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

Epilepsia 57, 1907-1915

BYERS, S. L., M. V. WILES, S. L. DUNN u. R. A. TAFT (2012):

Mouse estrous cycle identification tool and images.

PLoS One 7, e35538

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

Animal models of anxiety disorders and stress.

Braz J Psychiatry 35 Suppl 2, S101-111

CANITANO, R. (2007):

Epilepsy in autism spectrum disorders.

Eur Child Adolesc Psychiatry 16, 61-66

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

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

Psychoneuroendocrinology 82, 155-163

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

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

Journal of Visualized Experiments e3260

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

Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice.

Lab Anim 44, 329-336

CHAMPLIN, A. K., D. L. DORR u. A. H. GATES (1973):

Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina.

Biol Reprod 8, 491-494

CHANDLER, K. (2006):

Canine epilepsy: what can we learn from human seizure disorders?

Vet J 172, 207-217

CHARI, T., S. GRISWOLD, N. A. ANDREWS u. M. FAGIOLINI (2020):

The Stage of the Estrus Cycle Is Critical for Interpretation of Female Mouse Social Interaction Behavior.

Front Behav Neurosci 14, 113

CHO, C., V. MICHAILIDIS, I. LECKER, C. COLLYMORE, D. HANWELL, M. LOKA, M. DANESH, C. PHAM, P. URBAN, R. P. BONIN u. L. J. MARTIN (2019):

Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale.

Sci Rep 9, 359

CLAASSEN, J., S. A. MAYER, R. G. KOWALSKI, R. G. EMERSON u. L. J. HIRSCH (2004):

Detection of electrographic seizures with continuous EEG monitoring in critically ill patients.

Neurology 62, 1743-1748

CORA, M. C., L. KOOISTRA u. G. TRAVLOS (2015):

Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears.

Toxicol Pathol 43, 776-793

CRAWLEY, J. (2007):

What's wrong with my mouse? Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice.

John Wiley & Sons,

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

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

Pharmacol Biochem Behav 13, 167-170

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

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

Bioinformatics 21, 2789-2790

CURIA, G., D. LONGO, G. BIAGINI, R. S. JONES u. M. AVOLI (2008):

The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.

J Neurosci Methods 172, 143-157

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

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

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

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

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

9, e92281

DARWIN, C. (1872):

The expression of emotion in animals and man.

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

DEACON (2006a):

Assessing nest building in mice.

Nat Protoc 1, 1117-1119

DEACON (2012):

Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice.

J Vis Exp e2607

DEACON, R. M. (2006b):

Assessing hoarding in mice.

Nat Protoc 1, 2828-2830

DEACON, R. M. (2006c):

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

Nat Protoc 1, 118-121

DEACON, R. M. (2006d):

Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts.

Nat Protoc 1, 122-124

DEACON, R. M. (2009):

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

Behav Brain Res 200, 128-133

DEACON, R. M., A. CROUCHER u. J. N. RAWLINS (2002):

Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice.

Behav Brain Res 132, 203-213

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

Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice.

Behav Brain Res 139, 139-155

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

Burrowing into prion disease.

Neuroreport 12, 2053-2057

DEACON, R. M., D. REISEL, V. H. PERRY, J. NICHOLAS u. P. RAWLINS (2005):

Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice.

Behav Brain Res 157, 99-105

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

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

J Am Assoc Lab Anim Sci 54, 35-39

DEVINSKY, O., A. VEZZANI, T. J. O'BRIEN, N. JETTE, I. E. SCHEFFER, M. DE CURTIS u. P. PERUCCA (2018):

Epilepsy.

Nat Rev Dis Primers 4, 18024

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

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

Neurobiol Dis 118, 9-21

DUDEK, F. E. (2006):

Kainate-induced status epilepticus: a chronic model of acquired epilepsy.

Models of seizures and epilepsy 415

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

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

Epilepsy Behav 25, 266-276

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

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

Schattauer Verlag,

ERNST, L., M. KOPACZKA, M. SCHULZ, S. R. TALBOT, B. STRUVE, C. HAGER, A. BLEICH, M. DURST, P. JIRKOF, M. ARRAS, R. M. VAN DIJK, N. MILJANOVIC, H. POTSCHKA, D. MERHOF u. R. H. TOLBA (2020a):

Semi-automated generation of pictures for the Mouse Grimace Scale: A multi-laboratory analysis (Part 2).

Lab Anim 54, 92-98

ERNST, L., M. KOPACZKA, M. SCHULZ, S. R. TALBOT, L. ZIEGLOWSKI, M. MEYER, S. BRUCH, D. MERHOF u. R. H. TOLBA (2020b):

Improvement of the Mouse Grimace Scale set-up for implementing a semi-automated Mouse Grimace Scale scoring (Part 1).

Lab Anim 54, 83-91

EUROPÄISCHES-PARLAMENT (2010):

RICHTLINIE 2010/63/EU.

EUROPÄISCHE PARLAMENT UND RAT

EUROPEAN-UNION (2010):

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

33–79

FALLER, K. M., D. J. MCANDREW, J. E. SCHNEIDER u. C. A. LYGATE (2015):

Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale.

Exp Physiol 100, 164-172

FERKANY, J. W., J. T. SLEVIN, R. ZACZEK u. J. T. COYLE (1982):

Failure of folic acid derivatives to mimic the actions of kainic acid in brain in vitro or in vivo.

Neurobehav Toxicol Teratol 4, 573-579

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

Can social interaction be used to measure anxiety?

Br J Pharmacol 62, 19-24

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

Animal tests of anxiety.

Curr Protoc Neurosci Chapter 8, Unit 8 3

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

A review of 25 years of the social interaction test.

Eur J Pharmacol 463, 35-53

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

ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy.

Epilepsia 55, 475-482

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

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

Epilepsia 58, 522-530

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

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

Epilepsia 46, 470-472

FLECKNELL, P. (2018):

Rodent analgesia: Assessment and therapeutics.

The Veterinary Journal 232, 70-77

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

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

Handb Exp Pharmacol 229, 83-113

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

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

J Vis Exp 51012

GASTAUT, H. (1964):

Certain basic concepts concerning the treatment of the epilepsies.

The British journal of clinical practice 18, 463-468

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

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

Neurology 68, 364-368

GODDARD, G. V. (1983):

The kindling model of epilepsy.

Trends in Neurosciences 6, 275-279

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

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

Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 80, 84-97

GONZALEZ, G. (2016):

Determining the Stage of the Estrous Cycle in Female Mice by Vaginal Smear.

Cold Spring Harb Protoc 2016,

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

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

Epilepsy Behav 49, 13-16

GOUDER, N., J. M. FRITSCHY u. D. BOISON (2003):

Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy.

Epilepsia 44, 877-885

GOUVEIA, K. u. J. L. HURST (2019):

Improving the practicality of using non-aversive handling methods to reduce background stress and anxiety in laboratory mice.

Scientific Reports 9, 20305

GRONE, B. P. u. S. C. BARABAN (2015):

Animal models in epilepsy research: legacies and new directions.

Nat Neurosci 18, 339-343

GROSS, V. u. F. C. LUFT (2003):

Exercising restraint in measuring blood pressure in conscious mice.

Hypertension 41, 879-881

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

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

Exp Neurol 207, 329-349

GROTICKE, I., K. HOFFMANN u. W. LOSCHER (2008):

Behavioral alterations in a mouse model of temporal lobe epilepsy induced by intrahippocampal injection of kainate.

Exp Neurol 213, 71-83

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

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

12, e0175839

HALL, C. S. (1934):

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

Journal of Comparative Psychology 18, 385-403

HAMILTON, S. E., M. D. LOOSE, M. QI, A. I. LEVEY, B. HILLE, G. S. MCKNIGHT, R. L. IDZERDA u. N. M. NATHANSON (1997):

Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice.

Proc Natl Acad Sci U S A 94, 13311-13316

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

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

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 327, 1-5

HENSHALL, D. C. (2017):

Poststatus epilepticus models: focal kainic acid.

In: Models of seizures and epilepsy

Elsevier, S. 611-624

HERCK, H. V., BAUMANS, V. AND DE BOER, S.F. (1994):

Assessment of discomfort in laboratory animals.

In: Cohen, I.R. and Miller, A., (Eds.): Autoimmune disease models. A guidebook

Academic Press., New York, S. pp. 303-320.

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

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

Vet J 202, 471-476

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

Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice.

Curr Protoc Mouse Biol 5, 291-309

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

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

BMC Vet Res 11, 175

HURST, J. L. u. R. S. WEST (2010):

Taming anxiety in laboratory mice.

Nature Methods 7, 825-826

ILAE (1981):

Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.

Epilepsia 22, 489-501

ILAE (1985):

Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy.

Epilepsia 26, 268-278

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

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

PLoS One 7, e38959

IRWIN, S. (1968):

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

Psychopharmacologia 13, 222-257

JEFFERYS, J., C. STEINHAUSER u. P. BEDNER (2016):

Chemically-induced TLE models: Topical application.

J Neurosci Methods 260, 53-61

JIRKOF, P. (2014):

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

Journal of Neuroscience Methods 234, 139-146

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

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

Front Behav Neurosci 4, 165

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

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

Lab Anim 47, 153-161

JIRKOF, P., K. LEUCHT, N. CESAROVIC, M. CAJ, F. NICHOLLS, G. ROGLER, M. ARRAS u. M. HAUSMANN (2013b):

Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice.

Lab Anim 47, 274-283

KANDRATAVICIUS, L., P. A. BALISTA, C. LOPES-AGUIAR, R. N. RUGGIERO, E. H. UMEOKA, N. GARCIA-CAIRASCO, L. S. BUENO-JUNIOR u. J. P. LEITE (2014):

Animal models of epilepsy: use and limitations.

Neuropsychiatr Dis Treat 10, 1693-1705

KANNER, A. M. (2003):

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

Biol Psychiatry 54, 388-398

KANNER, A. M. (2017):

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

Seizure 49, 79-82

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

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

Neurosci Biobehav Rev 5, 247-251

KEARSLEY-FLEET, L., D. G. O'NEILL, H. A. VOLK, D. B. CHURCH u. D. C. BRODBELT (2013):

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

Vet Rec 172, 338

KEATING, S. C., A. A. THOMAS, P. A. FLECKNELL u. M. C. LEACH (2012):

Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses.

PLoS One 7, e44437

KEEZER, M. R., S. M. SISODIYA u. J. W. SANDER (2016):

Comorbidities of epilepsy: current concepts and future perspectives.

The Lancet Neurology 15, 106-115

KEHNE, J. H., B. D. KLEIN, S. RAEISSI u. S. SHARMA (2017):

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) Epilepsy Therapy Screening Program (ETSP).

Neurochem Res 42, 1894-1903

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

Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research.
PLoS Biol 8, e1000412

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

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

Exp Neurol 263, 263-271

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

Inter-individual variation in the effect of antiepileptic drugs in the intrahippocampal kainate model of mesial temporal lobe epilepsy in mice.

Neuropharmacology 90, 53-62

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

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

Behav Brain Res 308, 128-142

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

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

Horm Behav 27, 167-183

KOSKA, I., R. M. VAN DIJK, I. SEIFFERT, V. DI LIBERTO, C. MOLLER, R. PALME, R. HELLWEG u. H. POTSCHKA (2019):

Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model.

Epilepsia 60, 2114-2127

KRALIC, J. E., D. A. LEDERGERBER u. J. M. FRITSCHY (2005):

Disruption of the neurogenic potential of the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy with focal seizures.

Eur J Neurosci 22, 1916-1927

KRAMER, K., L. KINTER, B. P. BROCKWAY, H. P. VOSS, R. REMIE u. B. L. VAN ZUTPHEN (2001):

The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances.

Contemp Top Lab Anim Sci 40, 8-16

KRÜGER, A. (2000)

Alexithymie und Anhedonie bei psychosomatischen Patienten: eine klinische Untersuchung.

KUMSTEL, S., P. VASUDEVAN, R. PALME, X. ZHANG, E. H. U. WENDT, R. DAVID, B. VOLLMAR u. D. ZECHNER (2020):

Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer.

J Adv Res 21, 35-47

KUSSMAUL, A. u. A. TENNER (1857):

Untersuchungen über Ursprung und Wesen der fallsuchtartigen Zuckungen bei der Verblutung, sowie der Fallsucht überhaupt.

Meidinger,

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

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

Epilepsia Open 3, 213-223

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

Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse.

Nat Methods 7, 447-449

LEACH, M. C., K. KLAUS, A. L. MILLER, M. SCOTTO DI PERROTOLO, S. G. SOTOCINAL u. P. A. FLECKNELL (2012):

The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale.

PLoS One 7, e35656

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

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

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 286, R967-974

LEVINE, A. T., H. A. BORN, A. P. LANDSTROM, S. LARSON, W. L. LEE, A. T. DAO, X. H. WEHRENS, Y. C. LAI u. A. E. ANDERSON (2020):

Cardiac dysregulation following intrahippocampal kainate-induced status epilepticus.

Sci Rep 10, 4043

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

Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice.

Am J Physiol 276, R500-504

LIAO, D., M. CARNETHON, G. W. EVANS, W. E. CASCIO u. G. HEISS (2002):

Lower heart rate variability is associated with the development of coronary heart disease in individuals with diabetes: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study.

Diabetes 51, 3524-3531

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

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

Journal of Neuroscience Methods 260, 2-25

LIGHTMAN, S. L. (2008):

The neuroendocrinology of stress: a never ending story.

J Neuroendocrinol 20, 880-884

LISK, R. D., R. A. PRETLOW, 3RD u. S. M. FRIEDMAN (1969):

Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*).

Anim Behav 17, 730-737

LIU, M. Y., C. Y. YIN, L. J. ZHU, X. H. ZHU, C. XU, C. X. LUO, H. CHEN, D. Y. ZHU u. Q. G. ZHOU (2018):

Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice.

Nat Protoc 13, 1686-1698

LOSCHER, W. (2011):

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

Seizure 20, 359-368

LOSCHER, W. (2017):

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

Neurochem Res 42, 1873-1888

LÖSCHER, W. u. C. BRANDT (2010):

Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research.

Pharmacol Rev 62, 668-700

LOSCHER, W., R. J. FERLAND u. T. N. FERRARO (2017):

The relevance of inter- and intrastain differences in mice and rats and their implications for models of seizures and epilepsy.

Epilepsy Behav 73, 214-235

LOSCHER, W., L. J. HIRSCH u. D. SCHMIDT (2015):

The enigma of the latent period in the development of symptomatic acquired epilepsy - Traditional view versus new concepts.

Epilepsy Behav 52, 78-92

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

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

J Neurotrauma 31, 1107-1121

LUEPTOW, L. M. (2017):

Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice.

J Vis Exp

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

EEG Radiotelemetry in Small Laboratory Rodents: A Powerful State-of-the Art Approach in Neuropsychiatric, Neurodegenerative, and Epilepsy Research.

Neural Plasticity 2016, 8213878

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

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

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

MACKAY, R. S. (1968):

Biomedical telemetry. Sensing and transmitting biological information from animals and man.

Biomedical telemetry. Sensing and transmitting biological information from animals and man.

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

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

Neurosci Biobehav Rev 38, 173-192

MARCONDES, F. K., K. J. MIGUEL, L. L. MELO u. R. C. SPADARI-BRATFISCH (2001):

Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test.

Physiol Behav 74, 435-440

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

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

Epilepsy Behav 13, 43-46

MAROSO, M., S. BALOSSO, T. RAVIZZA, V. IORI, C. I. WRIGHT, J. FRENCH u. A. VEZZANI (2011):

Interleukin-1 β Biosynthesis Inhibition Reduces Acute Seizures and Drug Resistant Chronic Epileptic Activity in Mice.

Neurotherapeutics 8, 304-315

MARTIN, L. G., Z. ZIMMER u. J. LEE (2017):

Foundations of Activity of Daily Living Trajectories of Older Americans.

J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci 72, 129-139

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

Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior.

Epilepsy Behav 10, 377-383

MCEWEN, B. S. (1998):

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

Ann N Y Acad Sci 840, 33-44

MCKHANN, G. M., 2ND, H. J. WENZEL, C. A. ROBBINS, A. A. SOSUNOV u. P. A. SCHWARTZKROIN (2003):

Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology.

Neuroscience 122, 551-561

MILLER, A. L., G. L. KITSON, B. SKALKOYANNIS, P. A. FLECKNELL u. M. C. LEACH (2016):

Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy.

Appl Anim Behav Sci 181, 160-165

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

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

Epilepsia 59, 765-777

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

Hormones as indicators of stress.

Domest Anim Endocrinol 23, 67-74

MOTO, F. C. O., A. ARSA'A, G. T. NGOUPAYE, G. S. TAIWE, J. S. K. NJAPDOUNKE, A. K. KANDEDA, G. C. N. NKANTCHOUA, J. P. OMAM OMAM, S. PALE, N. E. KOUEMOU, E. R. AYISSI MBOMO, D. B. PAHAYE, L. OJONG, V. MAIRARA u. E. NGO BUM (2018):

Anxiolytic and Antiepileptic Properties of the Aqueous Extract of *Cissus quadrangularis* (Vitaceae) in Mice Pilocarpine Model of Epilepsy.

Front Pharmacol 9, 751

NADLER, J. V., B. W. PERRY u. C. W. COTMAN (1978):

Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells.

Nature 271, 676-677

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

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

Epilepsy Research 38, 177-205

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

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

Epilepsy Reserach 108, 29-43

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

Subtle improvement of seizure susceptibility by atorvastatin treatment during epileptogenesis.

Pharmacol Rep 70, 364-371

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

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

Stress 20, 476-494

PALME, R. (2019):

Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems.

Physiol Behav 199, 229-243

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

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

Physiol Behaviour 171, 21-31

PASCHKE, R. (2019):

Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-System: Mineralo- und Glucocorticoide.

In: Physiologie

9., vollständig überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, S.

PAXINOS, G. u. K. B. FRANKLIN (2019):

Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates.

Academic press,

PELLOW, S., P. CHOPIN, S. E. FILE u. M. BRILEY (1985):

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.

J Neurosci Methods 14, 149-167

PIJLMAN, F. T., G. WOLTERINK u. J. M. VAN REE (2003):

Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats.

Behav Brain Res 139, 131-138

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

Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.

Epilepsy Behav 14 Suppl 1, 16-25

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

Epileptogenesis.

Cold Spring Harb Perspect Med 5, a022822

PLAZNIK, A., R. STEFANSKI u. W. KOSTOWSKI (1989):

Restraint stress-induced changes in saccharin preference: the effect of antidepressive treatment and diazepam.

Pharmacol Biochem Behav 33, 755-759

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

Pharmacoresistance.

Handb Clin Neurol 108, 741-757

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

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

European Journal of Pharmacology 463, 3-33

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

Experimental Determination of the Anticonvulsant Properties of Some Phenyl Derivatives.

Science 85, 525-526

RACINE, R. J. (1972):

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

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 32, 281-294

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

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

J Appl Physiol (1985) 91, 667-670

RIBAN, V., V. BOUILLERET, B. T. PHAM-LE, J. M. FRITSCHY, C. MARESCAUX u. A. DEPAULIS (2002):

Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy.

Neuroscience 112, 101-111

ROGAWSKI, M. A. (2006):

Molecular targets versus models for new antiepileptic drug discovery.

Epilepsy Res 68, 22-28

RONKAINEN, E., H. ANSAKORPI, H. V. HUIKURI, V. V. MYLLYLA, J. I. ISOJARVI u. J. T. KORPELAINEN (2005):

Suppressed circadian heart rate dynamics in temporal lobe epilepsy.

J Neurol Neurosurg Psychiatry 76, 1382-1386

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

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

Curr Protoc Pharmacol Chapter 10, Unit 10 10

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

The Principles of Humane Experimental Technique.

Methuen, London

SAH, P. (2017):

Fear, Anxiety, and the Amygdala.

Neuron 96, 1-2

SANCHEZ, C. (1997):

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

Eur Neuropsychopharmacol 7, 283-288

SAPOLSKY, R. M., L. M. ROMERO u. A. U. MUNCK (2000):

How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions.

Endocr Rev 21, 55-89

SATO, M., R. J. RACINE u. D. C. MCINTYRE (1990):

Kindling: basic mechanisms and clinical validity.

Electroencephalogr Clin Neurophysiol 76, 459-472

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

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

Epilepsia 58, 512-521

SCHNEBLE, H. (2003):

Heillos, heilig, heilbar: die Geschichte der Epilepsie von den Anfängen bis heute.

Walter de Gruyter,

SCHNEBLE, H. (2013):

Historisches zur Epilepsie.

Informationsblatt der IZE-Datenbank 9,

SCHRIEFL, S., T. A. STEINBERG, K. MATIASEK, A. OSSIG, N. FENSKE u. A. FISCHER (2008):

Etiologic classification of seizures, signalment, clinical signs, and outcome in cats with seizure disorders: 91 cases (2000-2004).

J Am Vet Med Assoc 233, 1591-1597

SCHWARCZ, R., R. ZACZEK u. J. T. COYLE (1978):

Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus.

Eur J Pharmacol 50, 209-220

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

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

FASEB Journal 29, 859-867

SEIFFERT, I., R. M. VAN DIJK, I. KOSKA, V. DI LIBERTO, C. MOLLER, R. PALME, R. HELLWEG u. H. POTSCHKA (2019):

Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model.

Epilepsia 60, 1539-1551

SELYE, H. (1975):

Stress and distress.

Compr Ther 1, 9-13

SEVCENCU, C. u. J. J. STRUIJK (2010):

Autonomic alterations and cardiac changes in epilepsy.

Epilepsia 51, 725-737

SGOIFO, A., C. POZZATO, P. MEERLO, T. COSTOLI, M. MANGHI, D. STILLI, G. OLIVETTI u. E. MUSSO (2002):

Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity.

Stress 5, 23-35

SHAFFER, F. u. J. P. GINSBERG (2017):

An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms.

Front Public Health 5, 258

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

Taschenatlas Physiologie.

Thieme, Ludwigsburg

SIMON, P., R. DUPUIS u. J. COSTENTIN (1994):

Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions.

Behav Brain Res 61, 59-64

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

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

Behavioural brain research 338, 159-165

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

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

Mol Pain 7, 55

SPACKMAN, D. H. u. V. RILEY (1978):

Corticosterone concentrations in the mouse.

Science 200, 87

STAFSTROM, C. E., A. CHRONOPOULOS, S. THURBER, J. L. THOMPSON u. G. L. HOLMES (1993):

Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures.

Epilepsia 34, 420-432

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

Circadian and ultradian rhythms in heart rate variability.

Biomed Tech (Berl) 51, 155-158

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

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

Reviews in Aquaculture 4, 142-162

TAKEMOTO, T. (1978):

Isolation and structural identification of naturally occurring excitatory amino acids.

In: Kainic acid as a tool in neurobiology

Raven Press New York, S. 1-15

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

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

Circulation 93, 1043-1065

TEAM, R. C. (2013):

R: A language and environment for statistical computing.

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

Beyond heart rate variability: vagal regulation of allostatic systems.

Ann N Y Acad Sci 1088, 361-372

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

Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide.

Experimental Physiology 93, 83-94

TIERSCHUTZ-VERSUCHSTIERVERORDNUNG (2013):

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

TierSchVersV

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

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

Gen Comp Endocrinol 130, 267-278

TURSKI, W. A., E. A. CAVALHEIRO, Z. A. BORTOLOTTI, L. M. MELLO, M. SCHWARZ u. L. TURSKI (1984):

Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis.

Brain Res 321, 237-253

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

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

Behav Brain Res 9, 315-335

TWELE, F., A. SCHIDLITZKI, K. TOLLNER u. W. LOSCHER (2017):

The intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy: Lack of electrographic seizure-like events in sham controls.

Epilepsia Open 2, 180-187

TWELE, F., K. TOLLNER, M. BANKSTAHL u. W. LOSCHER (2016a):

The effects of carbamazepine in the intrahippocampal kainate model of temporal lobe epilepsy depend on seizure definition and mouse strain.

Epilepsia Open 1, 45-60

TWELE, F., K. TOLLNER, C. BRANDT u. W. LOSCHER (2016b):

Significant effects of sex, strain, and anesthesia in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy.

Epilepsy Behav 55, 47-56

VALZELLI, L. (1973):

The "isolation syndrome" in mice.

Psychopharmacologia 31, 305-320

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

Imaging biomarkers of behavioral impairments: A pilot micro-positron emission tomographic study in a rat electrical post-status epilepticus model.

Epilepsia

VAN DIJK, R., I. KOSKA, A. BLEICH, R. TOLBA, I. SEIFFERT, C. MOLLER, V. DI LIBERTO, S. R. TALBOT u. H. POTSCHKA (2020):

Design of composite measure schemes for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research: A case study focussed on rat epilepsy models.

PLoS One 15, e0230141

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

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

Lab Anim 38, 17-24

VON ENGELHARDT, W., G. BREVES, M. DIENER u. G. GÄBEL (2015):

Physiologie der Haustiere.

Georg Thieme Verlag,

WALF, A. A. u. C. A. FRYE (2007):

The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents.

Nature Protocols 2, 322

WEI, T. u. V. SIMKO (2016):

corrplot: Visualization of a Correlation Matrix. R package version 0.77.

CRAN, Vienna, Austria

WEIERGRÄBER, M., M. HENRY, J. HESCHELER, N. SMYTH u. T. SCHNEIDER (2005):

Electrocorticographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system.

Brain research protocols 14, 154-164

WEISS, S. M., S. LIGHTOWLER, K. J. STANHOPE, G. A. KENNETT u. C. T. DOURISH (2000):

Measurement of anxiety in transgenic mice.

Rev Neurosci 11, 59-74

WELZEL, L., A. SCHIDLITZKI, F. TWELE, M. ANJUM u. W. LOSCHER (2020):

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 61, 157-170

WHO, G. C. A. EPILEPSY, P. F. N. DISEASES, NEUROSCIENCE, I. B. F. EPILEPSY, W. H. O. D. O. M. HEALTH, S. ABUSE, I. B. O. EPILEPSY u. I. L. A. EPILEPSY (2005):

Atlas: epilepsy care in the world.

World Health Organization,

WICKHAM, H. (2010):

ggplot2: elegant graphics for data analysis.

Journal of Statistical Software 35, 65-88

WOLF, L. S. BUENO-JUNIOR, C. LOPES-AGUIAR, R. A. DO VAL DA SILVA, L. KANDRATAVICIUS u. J. P. LEITE (2016):

The frequency of spontaneous seizures in rats correlates with alterations in sensorimotor gating, spatial working memory, and parvalbumin expression throughout limbic regions.

Neuroscience 312, 86-98

WOLF, U. (2012):

Ethik der Mensch-Tier-Beziehung.

Klostermann Frankfurt am Main,

WOLFENSOHN, S., P. HAWKINS, E. LILLEY, D. ANTHONY, C. CHAMBERS, S. LANE, M. LAWTON, S. ROBINSON, H.-M. VOIPIO u. G. WOODHALL (2013):

Reducing suffering in animal models and procedures involving seizures, convulsions and epilepsy.

Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 67, 9-15

WOLFENSOHN, S. u. M. LLOYD (2008):

Handbook of laboratory animal management and welfare.

John Wiley & Sons,

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

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

PLoS One 13, e0197955

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

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

Rinsho Shinkeigaku 56, 204-207

X. ANHANG

1. Geräte

Geräte	Hersteller
ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems™ by life technologies, Darmstadt
Analog-Digitalwandler (PowerLab 4/30)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
Beobachtungskäfige (Glasaquarien)	Domes Aquaristik, München, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Cisco Small Business Switch	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Cobas Integra® 400 plus System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
EEG-Ableitung (Powerlab 4/30 und 8/30, Animal BioAmp)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EEG-Ableitungs- und Stimulationskabel	Conrad Elektronik, München, Deutschland
Ein-Kanal-Verstärker 8/30, Animal Bio-Amp	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
GeneAmp® PCR System 9700 (Thermocycler)	Applied Biosystems™ by life technologies, Darmstadt
Glaspotter	neoLab®, Heidelberg
Kinematica Homogeniser Polytron® PT10-35	Kinematica, Littau, Schweiz
Kleinschüttler „IKA-VIBRAX-VRX“	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Luxmeter	Conrad Electronic SE, Hirschau
Magnetrührer mit Heizplatte, Typ MR3001	Heidolph, Schwabach
Matrix 2.0	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Mikro 200 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
Mikro-Ultrazentrifuge	Sorvall Products L.P., Newton, CT, USA
Mikro-Ultrazentrifuge M150 GX	Sartorius AG, Göttingen
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	World Percision Instruments, Berlin
Switchbox (HSE Type 215E12)	Fa. Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland
Tierkäfige Makrolon Typ III und Wasserflaschen	EHRET GmbH & Co. KG, Emmendingen,
Tischzentrifuge „Rotina 35R“	Fa. Hettlich, Tuttlingen
Transmitter HD-X-02	Data Science International, St.Paul, MN, USA
Universalschrank UN	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden

Zentrifuge 5418	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
-----------------	-------------------------------

2. Software

Software	Hersteller
EEG Software (Chart 7 für Windows)	ADInstruments Ltd., Hastings, UK
EthoVision, Version 8.5 EthoVision, Version 15	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
Electrocardiogram Analysis Software Module v5.30 NeuroScore™ © Version 3.0 Ponemah® 5.20 und 6.41,	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA

3. Lösungen, Medikamente und Substanzen

Lösungen

Chloralhydrat

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

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

- 45,43 g/l Na₂HPO₄ (wasserfrei)
- 12,48 g/l Na₂HPO₄ x H₂O
- in Aqua dest. lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

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

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

Paraformaldehyd (8-prozentig)

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

Paraformaldehyd (4-prozentig)

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

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)

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

Saccharin-Lösung (0,1-prozentig)

- 0,1 g Saccharin ≥ 98%
- 100 ml Wasser

Saccharin-Lösung (0,2-prozentig)

- 0,2 g Saccharin ≥ 98%
- 100 ml Wasser

Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (30-prozentig)

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

Medikamente

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

Substanzen

<i>Substanz</i>	<i>Hersteller</i>
Acetonitril	Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Actril®, cold sterilant	Medivators Inc. Minneapolis, USA
Antiprotease	Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Chloralhydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure 99,8%	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Isopentan (2-Methylbutan)	Honeywell, Offenbach
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Saccharin ≥ 98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Stickstoff (flüssig)	Linde AG Gases Division, Pullach

Trifluoroacetic acid, 99 %	Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt
Zahnzement (Paladur®)	Heraeus Kulzer, Hanau

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 Augenlider partiell geöffnet
- +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 *Handlings*)

- 0 Keine
- +1 Leichte
- +2 Deutliche

6. Neugier (auf Zeigen eines Objektes, z.B. Stift)

- 2 keine Reaktion
- 1 verminderte Neugier
- 0 normal, Interesse an präsentiertem Objekt
- +1 ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug
- +2 Angriffsverhalten

7. Freezing

- 0 kein Freezing
- +1 leichtes Freezing sichtbar
- +2 deutliches, abruptes Freezing

8. Vokalisation

- 0 keine Vokalisation
- +1 zeitweise spontan auftretendes, leises Piepsen
- +2 häufiges spontan auftretendes, stärkeres Piepsen

9. Harnabsatz (während des *Handlings*)

- 0 kein Harnabsatz
- +1 vorhanden

10. Kotabsatz (während des *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, teilweise Schwanzschlagen
- +2 Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)

16. Beinrotation (nach außen)

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

17. Körpertonus (während des *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 Schwanz mit kaum sichtbaren Gefäßen
- 0 normale Hautdurchblutung
- +1 Pfoten dunkelrosa, Schwanz stark hellrosa
- +2 Pfoten, Ohrmuschel oder Schwanz rot

27. Atemfrequenz

- 2 Schnappatmung, akute Atemnot
- 1 verminderte, unregelmäßige, angespannte Atmung
- 0 normale Atmung
- +1 erhöhte Atemfrequenz
- +2 erhöhte Atemfrequenz, aber auch während der Ruheperiode

28. Zittern

- 0 kein Zittern
- +2 vorhanden

29. Zuckungen

- 0 keine Zuckungen
- +2 vorhanden

30. Krämpfe

- 0 keine Krämpfe
- +2 vorhanden

31. Implantatbereich

- 2 hochgradige nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
- 1 leichte nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
- 0 unauffällige Implantatfläche
- +1 kleine Entzündung im Implantatbereich
- +2 hochgradige Entzündung im Implantatbereich

32. Stereotypien

- 0 keine Stereotypien
- +2 vorhanden

33. Körpertemperatur (wenn generelle Konstitution des Tieres abweicht)

- 1 Temperatur von 2 ° C oder mehr gegen die Kontrolle
- 0 Temperatur normal
- +1 Temperatur um 2 ° C oder mehr erhöht

5. Effektstärke und Forest Plot

Tabelle 6: Effektstärken im Kainat-Modell in Mäusen.

Parameter/Variable	Tierart	Vergleich	n	d	se	lwr	upr
Weight_gain	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.443	1.213	-1.529	0.642
NB	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.399	0.313	-1.482	0.684
SI_active	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.180	28.265	-0.894	1.255
BUR_weight	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.098	15.430	-0.975	1.171
OF_distance_moved	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.478	876.036	-1.566	0.610
OF_rearing	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.166	16.153	-0.908	1.241
OF_immobile	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.104	22.224	-0.969	1.177
OF_center	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.599	16.044	-1.695	0.497
BWB_WB	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.905	12.504	-0.221	2.031
BWB_LT	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.425	2.812	-1.509	0.659
BWB_stretching	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.141	1.325	-0.932	1.215
EPM_stretching	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	1.980	1.105	0.671	3.289
EPM_head_dips	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.172	4.000	-0.902	1.246
EPM_closed_arms	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.114	13.506	-0.959	1.187
EPM_open_arms	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.353	11.226	-1.433	0.728
EPM_open_arms1.3	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-0.256	9.133	-1.332	0.821
SP_percentage	Maus	Naiv vs. Telemetrie	15	0.124	6.342	-0.995	1.243
Cort_2d	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-1.288	36.830	-2.467	-0.110
Cort_chronic	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	0.695	16.988	-0.409	1.799
Weight_gain	Maus	Naiv vs. Telemetrie	16	-1.002	1.122	-2.140	0.135
NB	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.000	0.299	-1.072	1.072
SI_active	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.430	24.309	-0.655	1.514
BUR_weight	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.260	12.574	-0.817	1.337
OF_distance_moved	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.567	685.570	-0.526	1.661
OF_rearing	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.566	11.604	-0.528	1.659
OF_immobile	Maus	Naiv vs. Sham	16	-0.220	20.815	-1.296	0.856
OF_center	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.237	19.432	-0.839	1.313
BWB_WB	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.041	9.533	-1.032	1.113
BWB_LT	Maus	Naiv vs. Sham	16	-0.557	2.846	-1.650	0.536
BWB_stretching	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.106	1.176	-0.967	1.179
EPM_stretching	Maus	Naiv vs. Sham	16	1.708	1.098	0.455	2.961
EPM_head_dips	Maus	Naiv vs. Sham	16	-0.012	5.228	-1.084	1.060
EPM_closed_arms	Maus	Naiv vs. Sham	16	0.414	15.249	-0.670	1.498
EPM_open_arms	Maus	Naiv vs. Sham	16	-0.805	11.562	-1.920	0.310
EPM_open_arms1.3	Maus	Naiv vs. Sham	16	-0.475	11.665	-1.562	0.612
SP_percentage	Maus	Naiv vs. Sham	15	0.188	5.461	-0.932	1.309

Cort_2d	Maus	Naiv vs. Sham	16	-3.194	21.830	-4.811	-1.576
Cort_chronic	Maus	Naiv vs. Sham	15	0.800	12.845	-0.362	1.962
Weight_gain	Maus	Naiv vs. Sham	20	-1.031	1.126	-2.049	-0.012
NB	Maus	Naiv vs. Kainat	20	0.558	0.253	-0.418	1.535
SI_active	Maus	Naiv vs. Kainat	20	0.104	27.614	-0.856	1.064
BUR_weight	Maus	Naiv vs. Kainat	20	0.283	11.969	-0.681	1.246
OF_distance_moved	Maus	Naiv vs. Kainat	20	0.254	721.656	-0.708	1.217
OF_rearing	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.026	13.958	-0.985	0.933
OF_immobile	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.116	19.764	-1.075	0.844
OF_center	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.124	18.011	-1.084	0.836
BWB_WB	Maus	Naiv vs. Kainat	20	0.903	11.606	-0.102	1.907
BWB_LT	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.669	3.702	-1.653	0.315
BWB_stretching	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.069	1.140	-1.028	0.890
EPM_stretching	Maus	Naiv vs. Kainat	20	1.049	1.451	0.029	2.069
EPM_head_dips	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.506	4.773	-1.479	0.468
EPM_closed_arms	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.292	16.552	-1.255	0.672
EPM_open_arms	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.084	12.438	-1.043	0.875
EPM_open_arms1.3	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.160	11.171	-1.120	0.801
SP_percentage	Maus	Naiv vs. Kainat	19	-0.253	3.699	-1.260	0.754
Cort_2d	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-2.387	22.754	-3.631	-1.142
Cort_chronic	Maus	Naiv vs. Kainat	19	0.567	13.631	-0.433	1.566
Weight_gain	Maus	Naiv vs. Kainat	20	-0.066	0.793	-1.026	0.893
NB	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.487	0.316	-0.485	1.460
SI_active	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.339	17.252	-1.305	0.626
BUR_weight	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.045	12.956	-0.914	1.004
OF_distance_moved	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.223	686.896	-1.185	0.738
OF_rearing	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.479	11.759	-1.451	0.493
OF_immobile	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.070	23.209	-0.889	1.029
OF_center	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.343	18.722	-1.309	0.623
BWB_WB	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.858	12.074	-0.143	1.858
BWB_LT	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.317	4.303	-1.282	0.648
BWB_stretching	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.194	0.957	-1.155	0.767
EPM_stretching	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.022	1.526	-0.937	0.981
EPM_head_dips	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.453	5.520	-1.424	0.517
EPM_closed_arms	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.665	14.985	-1.649	0.319
EPM_open_arms	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.666	10.321	-0.318	1.650
EPM_open_arms1.3	Maus	Sham vs. Kainat	20	0.252	12.216	-0.711	1.214
SP_percentage	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.382	5.418	-1.349	0.586
Cort_2d	Maus	Sham vs. Kainat	20	-0.045	29.741	-1.004	0.914
Cort_chronic	Maus	Sham vs. Kainat	18	-0.116	12.528	-1.142	0.910

Tabelle 7: Effektstärken im chemischen Post-SE-Modell in Ratten.

Parameter/Variable	Tierart	Vergleich	n	d	se	lwr	upr
Weight_gain	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.497	6.652	-1.272	0.278
NB	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.082	0.250	-0.845	0.682
SI_active	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.080	15.908	-0.843	0.684
BUR_weight	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.357	114.650	-1.126	0.413
OF_distance_moved	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.250	425.214	-0.517	1.016
OF_rearing	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.165	3.161	-0.599	0.930
OF_immobile	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.477	12.946	-0.296	1.251
OF_center	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.280	8.201	-1.047	0.487
BWB_WB	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.077	11.937	-0.687	0.841
BWB_LT	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.512	3.574	-1.287	0.263
BWB_stretching	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.122	0.920	-0.886	0.642
EPM_stretching	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.249	1.143	-1.015	0.518
EPM_head_dips	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.434	2.557	-0.338	1.206
EPM_closed_arms	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.537	13.028	-1.314	0.239
EPM_open_arms	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.154	19.139	-0.610	0.919
EPM_open_arms1.3	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.604	10.830	-0.176	1.384
SP_percentage	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.347	5.211	-0.422	1.116
Cort_2d	Ratte	Naiv vs. Sham	30	1.005	1.005	0.197	1.814
Cort_chronic	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.107	1.159	-0.657	0.871
Weight_gain	Ratte	Naiv vs. SE	35	-2.144	9.075	-3.037	-1.252
NB	Ratte	Naiv vs. SE	36	0.066	0.227	-0.653	0.785
SI_active	Ratte	Naiv vs. SE	36	4.511	18.923	3.213	5.808
BUR_weight	Ratte	Naiv vs. SE	36	1.770	170.947	0.935	2.604
OF_distance_moved	Ratte	Naiv vs. SE	36	-0.314	682.927	-1.036	0.409
OF_rearing	Ratte	Naiv vs. SE	36	0.058	7.581	-0.661	0.776
OF_immobile	Ratte	Naiv vs. SE	36	-0.222	34.384	-0.942	0.498
OF_center	Ratte	Naiv vs. SE	36	-0.298	19.069	-1.020	0.424
BWB_WB	Ratte	Naiv vs. SE	36	-0.106	21.853	-0.825	0.613
BWB_LT	Ratte	Naiv vs. SE	36	-0.603	22.453	-1.335	0.130
BWB_stretching	Ratte	Naiv vs. SE	36	1.263	0.931	0.484	2.043
EPM_stretching	Ratte	Naiv vs. SE	35	0.690	0.665	-0.054	1.434
EPM_head_dips	Ratte	Naiv vs. SE	35	0.351	3.153	-0.378	1.081
EPM_closed_arms	Ratte	Naiv vs. SE	35	-0.169	12.754	-0.894	0.557
EPM_open_arms	Ratte	Naiv vs. SE	35	-0.139	25.606	-0.864	0.586
EPM_open_arms1.3	Ratte	Naiv vs. SE	35	0.313	12.919	-0.416	1.041
SP_percentage	Ratte	Naiv vs. SE	35	1.056	3.307	0.287	1.824
Cort_2d	Ratte	Naiv vs. SE	34	-0.590	3.506	-1.335	0.155

Cort_chronic	Ratte	Naiv vs. SE	34	-0.748	2.165	-1.502	0.006
Weight_gain	Ratte	Sham vs. SE	41	-2.127	7.335	-2.921	-1.333
NB	Ratte	Sham vs. SE	42	0.148	0.208	-0.483	0.779
SI_active	Ratte	Sham vs. SE	42	4.601	19.040	3.407	5.796
BUR_weight	Ratte	Sham vs. SE	42	2.055	165.811	1.279	2.831
OF_distance_moved	Ratte	Sham vs. SE	42	-0.460	630.522	-1.099	0.178
OF_rearing	Ratte	Sham vs. SE	42	0.007	7.669	-0.623	0.638
OF_immobile	Ratte	Sham vs. SE	42	-0.377	34.572	-1.012	0.259
OF_center	Ratte	Sham vs. SE	42	-0.223	19.242	-0.856	0.409
BWB_WB	Ratte	Sham vs. SE	42	-0.145	21.873	-0.776	0.486
BWB_LT	Ratte	Sham vs. SE	42	-0.586	22.546	-1.229	0.057
BWB_stretching	Ratte	Sham vs. SE	42	1.364	0.876	0.666	2.062
EPM_stretching	Ratte	Sham vs. SE	41	0.685	1.008	0.030	1.339
EPM_head_dips	Ratte	Sham vs. SE	41	0.060	3.349	-0.577	0.696
EPM_closed_arms	Ratte	Sham vs. SE	41	0.284	14.931	-0.356	0.923
EPM_open_arms	Ratte	Sham vs. SE	41	-0.228	29.329	-0.866	0.411
EPM_open_arms1.3	Ratte	Sham vs. SE	41	-0.107	13.517	-0.744	0.530
SP_percentage	Ratte	Sham vs. SE	41	0.399	6.025	-0.243	1.042
Cort_2d	Ratte	Sham vs. SE	40	-0.852	3.412	-1.523	-0.180
Cort_chronic	Ratte	Sham vs. SE	40	-0.872	1.976	-1.545	-0.199

Tabelle 8: Effektstärken im elektrischen Post-SE-Modell in Ratten.

Parameter/Variable	Tierart	Vergleich	n	d	se	lwr	upr
Weight_gain	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.412	4.375	-0.372	1.195
NB	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.480	0.230	-1.266	0.307
SI_active	Ratte	Naiv vs. Sham	28	0.625	20.578	-0.204	1.454
BUR_weight	Ratte	Naiv vs. Sham	29	0.427	158.848	-0.383	1.237
OF_distance_moved	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.566	512.317	-0.225	1.356
OF_rearing	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.175	6.826	-0.602	0.953
OF_immobile	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.175	17.919	-0.603	0.952
OF_center	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.916	19.384	0.103	1.729
BWB_WB	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.349	12.543	-0.433	1.131
BWB_LT	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.276	6.165	-1.056	0.503
BWB_stretching	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.361	1.059	-0.421	1.143
EPM_stretching	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.292	0.924	-1.072	0.488
EPM_head_dips	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.135	2.315	-0.642	0.912
EPM_closed_arms	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.303	10.277	-0.477	1.083
EPM_open_arms	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.332	11.650	-1.113	0.449
EPM_open_arms1.3	Ratte	Naiv vs. Sham	30	-0.356	7.676	-1.138	0.426
SP_percentage	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.538	1.286	-0.251	1.326
Cort_2d	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.439	1.301	-0.346	1.223
Cort_chronic	Ratte	Naiv vs. Sham	30	0.883	1.264	0.073	1.694
Weight_gain	Ratte	Naiv vs. SE	28	-1.652	9.138	-2.567	-0.736
NB	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.006	0.294	-0.789	0.802
SI_active	Ratte	Naiv vs. SE	27	4.013	26.698	2.621	5.405
BUR_weight	Ratte	Naiv vs. SE	26	1.841	204.800	0.856	2.825
OF_distance_moved	Ratte	Naiv vs. SE	28	-0.086	656.586	-0.882	0.710
OF_rearing	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.264	8.402	-0.535	1.063
OF_immobile	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.606	19.333	-0.207	1.419
OF_center	Ratte	Naiv vs. SE	28	-0.061	24.930	-0.856	0.735
BWB_WB	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.249	15.998	-0.549	1.047
BWB_LT	Ratte	Naiv vs. SE	28	-0.602	6.388	-1.415	0.210
BWB_stretching	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.477	1.597	-0.329	1.283
EPM_stretching	Ratte	Naiv vs. SE	27	0.011	1.087	-0.795	0.818
EPM_head_dips	Ratte	Naiv vs. SE	26	-0.208	3.866	-1.030	0.613

EPM_closed_arms	Ratte	Naiv vs. SE	26	0.090	16.412	-0.730	0.910
EPM_open_arms	Ratte	Naiv vs. SE	26	-0.526	17.679	-1.359	0.307
EPM_open_arms1.3	Ratte	Naiv vs. SE	26	-0.554	11.951	-1.389	0.280
SP_percentage	Ratte	Naiv vs. SE	27	1.381	4.159	0.487	2.276
Cort_2d	Ratte	Naiv vs. SE	28	-0.892	11.434	-1.724	-0.060
Cort_chronic	Ratte	Naiv vs. SE	28	0.087	1.718	-0.709	0.883
Weight_gain	Ratte	Sham vs. SE	36	-2.035	8.813	-2.871	-1.200
NB	Ratte	Sham vs. SE	36	0.376	0.270	-0.308	1.061
SI_active	Ratte	Sham vs. SE	35	4.128	22.064	2.911	5.345
BUR_weight	Ratte	Sham vs. SE	35	1.465	211.578	0.688	2.242
OF_distance_moved	Ratte	Sham vs. SE	36	-0.535	573.971	-1.225	0.156
OF_rearing	Ratte	Sham vs. SE	36	0.169	6.361	-0.510	0.849
OF_immobile	Ratte	Sham vs. SE	36	0.400	20.282	-0.286	1.085
OF_center	Ratte	Sham vs. SE	36	-0.849	17.040	-1.557	-0.141
BWB_WB	Ratte	Sham vs. SE	36	-0.013	15.525	-0.692	0.665
BWB_LT	Ratte	Sham vs. SE	36	-0.246	8.710	-0.927	0.435
BWB_stretching	Ratte	Sham vs. SE	36	0.256	1.615	-0.425	0.938
EPM_stretching	Ratte	Sham vs. SE	35	0.253	1.104	-0.440	0.946
EPM_head_dips	Ratte	Sham vs. SE	34	-0.308	3.758	-1.016	0.400
EPM_closed_arms	Ratte	Sham vs. SE	34	-0.099	15.616	-0.803	0.605
EPM_open_arms	Ratte	Sham vs. SE	34	-0.355	16.292	-1.064	0.354
EPM_open_arms1.3	Ratte	Sham vs. SE	34	-0.392	10.811	-1.102	0.318
SP_percentage	Ratte	Sham vs. SE	35	1.316	4.286	0.555	2.077
Cort_2d	Ratte	Sham vs. SE	36	-1.066	11.418	-1.790	-0.341
Cort_chronic	Ratte	Sham vs. SE	36	-0.544	1.614	-1.235	0.147

XI. DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen für die Unterstützung bedanken.

Mein größter Dank geht an meine Betreuerin Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka. Ich bedanke mich dafür, dass sie mir dieses interessante und vor allem wichtige Projekt anvertraute und dafür, dass ich meine Arbeit unter ihrer Anleitung und Aufsicht anfertigen konnte. Danke für die tolle Betreuung, die anregenden Diskussionen und die stetige Unterstützung und Förderung meiner Aus- und Weiterbildung im Bereich der Versuchstierkunde während der gesamten Zeit.

Ich bedanke mich außerdem bei der Forschergruppe (DFG FOR 2591) für die finanzielle Unterstützung, durch die die Durchführung dieser Studie möglich war und für die stetige Förderung des Tierschutzes in der Versuchstierkunde. Bei unserem Kooperationspartner Prof. Palme (Vetmed Uni Wien) bedanke ich mich für die Analyse der Proben.

Ein ganz großer Dank geht auch an meine Postdocs Dr. Maarten van Dijk und Dr. Ines Koska für die fachliche und vor allem persönliche Betreuung während der gesamten Zeit. Danke für eure Geduld und unzähligen Erklärungen bei der Auswertung der Daten. Danke Ines auch für deine stets aufmunternden Worte sowohl in beruflichen, als auch in privaten Angelegenheiten. Vielen Dank euch beiden!

Bei Dr. Claudia Pace möchte ich mich für die fachliche und organisatorische Hilfestellung bedanken. Vielen Dank auch für die vielen Tipps und Tricks im *in vivo* Bereich.

Ein besonderer Dank geht auch an Sarah Glisic. Danke für deine gewissenhafte und sorgfältige Arbeit, die Hilfe bei den OPs und den Verhaltensuntersuchungen die tolle Einarbeitung und Betreuung im Labor und für viele, viele andere Dinge. Danke auch dir für dein immer offenes Ohr in beruflichen und privaten Angelegenheiten und für die tollen Gespräche.

Danke auch an Lena Boldt, Nina Miljanovic, Katharina Schönhoff, Isabel Seiffert, Marta Nowakowska, Katharina Aulehner und Maria Reiber für die schöne Zeit im Doktorandenzimmer. Bei Sieglinde Fischlein, Helen Stirling, Claudia Siegl, Grazyna Langer, Susanne Legat, Isabella Waclawczyk, und Andreas Kutschka möchte ich mich für die tolle technische Unterstützung im Labor und am Computer bedanken. Danke an Lara von Schuhmann für die Unterstützung bei den Auswertungen. Bei Sabine Vican, Katharina Gabriel und Uwe Roßberg bedanke ich mich für die Pflege und Betreuung meiner Tiere.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an Freddie, Julia, Lara und Sophie. Danke für eure Freundschaft und, dass ihr immer für mich da seid. Danke an Julia auch für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester Chrissy für Ihre Unterstützung danken. Danke, dass ihr mir immer zur Seite steht und mich immer unterstützt. Danke, dass ihr immer an mich glaubt, auch wenn ich das mal nicht tue. Ich kann mich immer auf euch verlassen. Und danke auch an Chrissy und Quattro für die willkommene Abwechslung, wenn es mal nicht alles so gelaufen ist, wie es hätte sein sollen 😊