

**Vergleichende Untersuchung zur Verbesserung der
intraoperativen Analgesie unter Verwendung von
Ketamin + Medetomidin bzw. S-Ketamin +
Medetomidin bei Mäusen durch präoperative Gabe von
Butorphanol oder Metamizol**

von Caroline Christine Bauer geb. Graf

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

**Vergleichende Untersuchung zur Verbesserung der
intraoperativen Analgesie unter Verwendung von
Ketamin + Medetomidin bzw. S-Ketamin +
Medetomidin bei Mäusen durch präoperative Gabe von
Butorphanol oder Metamizol**

von Caroline Christine Bauer geb. Graf

aus München

München 2019

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Angefertigt am:
Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikum r. d. Isar der TU München

Mentor: PD Dr. habil. Christine Baumgartner

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

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

Berichterstatter: Univ.- Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Korreferent/en: Univ.- Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 27. Juli 2019

Meinem lieben Ehemann und meinen geliebten Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1. ANÄSTHESIE BEI MÄUSEN	3
2.2. VERWENDETE ANÄSTHETIKA	5
2.2.1. PHENCYCLIDINE	5
2.2.2. SEDATIVA	7
2.2.2.1. MEDETOMIDIN	7
2.2.2.2. MIDAZOLAM	8
2.3. VERWENDETE ANALGETIKA	9
2.3.1. METAMIZOL	9
2.3.2. BUTORPHANOL	10
2.3.3. FENTANYL	11
2.4. PRÄ- UND POSTANÄSTHETISCHE PARAMETER	11
2.4.1. PRÄANÄSTHETISCHE UNTERSUCHUNG UND VORBEREITUNG	11
2.4.2. APPLIKATION DER MEDIKAMENTE	12
2.4.3. EINSCHLAFPHASE	12
2.4.4. AUFWACHPHASE	13
2.5. NARKOSEPARAMETER	13
2.5.1. ATEMFREQUENZ	14
2.5.2. HERZFREQUENZ	14
2.5.3. PERIPHERE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG	14
2.5.4. TEMPERATUR	15
2.5.5. ZWISCHENZEHENREFLEX	15
2.5.6. LIDREFLEX	16
3. PUBLIKATION 1	17
4. PUBLIKATION 2	29
5. DISKUSSION	53
6. ZUSAMMENFASSUNG	57
7. SUMMARY	59
8. LITERATURVERZEICHNIS	61
9. DANKSAGUNG	72

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
+	Plus
+/-	mit oder ohne
<	Kleiner
±	Plus-Minus
°C	Grad Celsius
1:1	Verhältnis 1 zu 1
II	2
ADH	Antidiuretisches Hormon
AF	Atemfrequenz
AFN	Atipamezol + Flumazenil + Naloxon
bpm	beats per minute = Schläge pro Minute
BtMG	Betäubungsmittelgesetz
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX3	Cyclooxygenase 3
et al.	et altera = und andere
g	Gramm
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society of Laboratory Animal Science
HF	Herzfrequenz
i.p.	Intraperitoneal
mg	Milligramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MGS	mouse grimace scale
MMF	Medetomidin + Midazolam + Fentanyl

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs = nichtsteroidale Antiphlogistika
O ₂	Sauerstoff
OP	Operation
p	Signifikanz
p.o.	Oral
pH	potentia Hydrogenii
PWR	pedal withdrawl reaction = Fußrückziehreflexion
s.c.	Subkutan
SpO ₂	periphere Sauerstoffsättigung
Temp.	Körpertemperatur
TRPA1	transient receptor potential channel 1
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vol.%	Volumen Prozent
WHO	World Health Organization = Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
α ₁	Alpha 1
α ₂	Alpha 2
δ	Delta
κ	Kappa
μ	My

1. EINLEITUNG

Mäuse gehören mit 66% zu der am häufigsten verwendeten Versuchstierspezies in Deutschland (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft - BMEL, 2016). Da nach wie vor viele Versuche im Mausmodell mit chirurgischen Eingriffen sowie nicht unerheblichen Schmerzen verbunden sind, ist es gemäß den ethischen Richtlinien des Tierschutzes in der experimentellen Forschung – den 3R (Replacement, Reduction, Refinement) – sehr wichtig, ein möglichst schonendes und reproduzierbares Narkoseregime mit ausreichend schmerzausschaltender Komponente zu wählen. Eine Anästhesie mit unzureichender Analgesie ist ethisch nicht vertretbar und führt zum einen bereits intraoperativ zu messbaren nozizeptiven Reaktionen in Form von Änderungen der Vitalparameter, bis hin zu spontanen Bewegungen und Abflachung der Narkosetiefe (Henke et al, 2012). Zum anderen kann ein nicht behandelter akuter Schmerzreiz zu einer verzögerten Rekonvaleszenz (Abou-Madi, 2006), Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses (Henke et al, 2012) und möglicherweise schlechteren Heilung bis hin zu einer erhöhten perioperativen Mortalität (Abou-Madi, 2006) führen.

Mäuse sind aus anästhesiologischer Sicht keine einfachen Patienten. Sie haben wegen ihrer geringen Körpergröße ein hohes Risiko für Hypothermie aufgrund der im Verhältnis recht großen Körperoberfläche (Flecknell, 2016; Sayers & Smith, 2010), sowie für Hypoglykämie aufgrund geringer Glykogenreserven, und für Hypoxie durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch (Abou-Madi, 2006). Entsprechend sollte die Narkosedauer immer so kurz wie möglich gehalten werden. Die angewandten Narkotika sollten deshalb gut steuerbar sein, um die Dauer der Narkose so kurz wie nötig halten zu können. Dies kann zum Beispiel durch die Verwendung von spezifischen Antagonisten erreicht werden, die die Wirkung der Narkotika aufheben. Eine andere Möglichkeit der Steuerbarkeit ist die Verwendung von Substanzen, die schnell wieder aus dem Körper eliminiert werden, wie beispielsweise Inhalationsanästhetika, die kaum metabolisiert werden, oder Injektionsanästhetika, die schnell verstoffwechselt werden, wie z.B. Propofol. Eine geeignete Schmerzausschaltung kann entweder bereits im primär gewählten Anästhesieprotokoll inkludiert sein oder die Analgetika werden sekundär dazu ergänzt. Da man nicht nur mit einer Substanz alle Anforderungen an eine gute, steuerbare und sichere Allgemeinanästhesie mit chirurgischer Toleranz erzielen kann, werden heute so genannte balancierte Anästhesie- und Analgesie-Protokolle gewählt. Hierbei kombiniert man mehrere Substanzen miteinander, die sich in ihrer Wirkung gut ergänzen, um die Dosis der Einzelkomponenten so gering wie möglich halten zu können. Damit hält man auch die unerwünschten Wirkungen der Substanzen auf Atmung und Kreislauf so gering wie möglich und erhöht somit die Sicherheitsbreite (Arras et al, 2001). Allerdings gibt es bei Mäusen deutliche Unterschiede in der Wirkung der einzelnen Anästhesieregime aufgrund Geschlecht (Cruz et al, 1998; Kirihara et al, 2013; Taylor et al, 2000; Voipio et al, 1988), Alter (Flandre et al, 2003) und Stamm (Homanics et al, 1999; Kirihara et al, 2013; Mulder, 1978; Xing et al, 2009). Aufgrund der geringen Körpergröße sind außerdem die Volumina, die appliziert werden können, limitiert (Flecknell, 2016).

Diese verschiedenen Einflussfaktoren gilt es im Rahmen einer Mausnarkose zu beachten und machen die große Varianz der Studienlage ersichtlich. Es bedarf entsprechend einiges Wissen über Vor- und Nachteile sowie Grenzen der verschiedenen Mausnarkoseprotokolle, um im Einzelfall das geeignetste und beste auswählen zu können.

Ziel der vorliegenden Dissertation war eine Verbesserung der bereits etablierten Narkosekombination Ketamin + Medetomidin im Sinne der 3R (Replacement, Reduction, Refinement) Richtlinien. Konkret sollte erstens eine Dosisreduktion durch die Verwendung des Stereoisomers S-Ketamin im Vergleich zum Ketamin-Razemat erreicht werden, da das sogenannte (S)-(+)-Enantiomer eine höhere Affinität zum NMDA-Rezeptor und somit eine stärkere anästhetische Wirkung hat (Fink & Frey, 2010). Das Razemat Ketamin ist das 1:1-Isomergemisch aus (S)-Ketamin und (R)-Ketamin. Zweitens sollte die Steuerbarkeit der teilantagonisierbaren Ketamin + Medetomidin-Narkosekombination verbessert werden. Die Fragestellung war, ob 50% der Dosis bei S-Ketamin im Vergleich zu Ketamin-Razemat ausreichen, um eine stabile Anästhesie zu induzieren, und ob dadurch der Medetomidin-Anteil gleichzeitig 15 Minuten früher antagonisiert werden kann. Dies wurde bereits beim Hamster (Erhardt et al, 2001; Wohlrab, 2001) sowie bei Katzen (Stelter, 2001) und Menschen (Himmelseher & Pfenninger, 1998) beschrieben. Drittens sollte die analgetische Komponente durch zusätzliche nicht betäubungsmittelpflichtige Analgetika verbessert werden. Hierfür wurden die beiden Basisnarkosen Ketamin + Medetomidin sowie S-Ketamin + Medetomidin mit und ohne Ergänzung von Metamizol beziehungsweise Butorphanol verglichen. Zusätzlich sollte die Steuerbarkeit und analgetische Potenz der S-/Ketamin + Medetomidin-Protokolle mit der vollantagonisierbaren Anästhetikakombination Medetomidin + Midazolam + Fentanyl (Fleischmann et al, 2016; Hjálmarsdóttir, 2005) verglichen werden. Alle Protokolle wurden bei Mäusen beider Geschlechter durchgeführt und verglichen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. ANÄSTHESIE BEI MÄUSEN

Es sind derzeit verschiedene Möglichkeiten, eine Anästhesie bei Mäusen durchzuführen, in der Literatur beschrieben:

Zum einen besteht die Möglichkeit einer Inhalationsnarkose mit Isofluran oder Sevofluran (Abou-Madi, 2006; Cesarovic et al, 2010, 2012; Gargiulo et al, 2012), wobei diese Anästhetika über die Lunge aufgenommen und auch wieder abgegeben werden. Der Anteil, der vom Körper metabolisiert wird, ist bei den Inhalationsanästhetika der neuen Generation sehr gering und beträgt bei Isofluran beispielsweise nur < 0,2% (Ammer & Potschka, 2010). Diese Inhalationsanästhetika erzeugen zwar eine gut steuerbare Hypnose und Muskelrelaxation, wirken alleine aber nicht analgetisch (Cornett et al, 2008; Erhardt et al, 2012). Das heißt, es müssen Analgetika ergänzt werden, um das chirurgische Toleranzstadium für die Durchführung schmerzhafter Eingriffe zu erreichen. Bei der Verwendung von Inhalationsanästhetika sind außerdem ein großer gerätetechnischer Aufwand, sowie eine nicht unerhebliche gesundheitliche Belastung von Personal und Umwelt zu beachten (Cruz et al, 1998; Gargiulo et al, 2012; Henke & Erhardt, 2012a). Des Weiteren wirkt vor allem Isofluran, reizend auf die Schleimhäute des Atmungstraktes, was es bei einer reinen Inhalationsnarkoseeinleitung zu bedenken gilt, da es zu vermehrtem Speicheln und Bronchiosekretion kommen kann (Erhardt et al, 2012). Eine weitere Auswirkung der Inhalationsanästhetika auf den Atmungstrakt ist eine starke, dosisabhängige Atemdepression, wodurch v.a. bei höheren Konzentrationen eine Intubation mit kontrollierter Beatmung notwendig wird, da die Spontanatmung nicht mehr ausreicht (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012). Eine Intubation bei Mäusen ist mit etwas Übung grundsätzlich möglich, allerdings benötigt man spezielles Equipment und die jeweilige Intubationstechnik sollte der Mausgröße angepasst sein (Hamacher et al, 2008). Folgen dieser Atemdepression sind eine Hypoxie (ein reduzierter O₂-Gehalt im Blut), eine Hyperkapnie (ein erhöhter CO₂-Gehalt im Blut), sowie eine Azidose (ein erniedrigter pH-Wert im Blut) (Cesarovic et al, 2010). Während die Herzfrequenz bei einer reinen Inhalationsnarkose bei Mäusen auch über eine längere Narkosedauer stabil bleibt (Cesarovic et al, 2010; Szczyński et al, 2004), sinkt durch die Reduktion des peripheren Gefäßwiderstandes (Ammer & Potschka, 2010) der durchschnittliche arterielle Blutdruck bei hohen Isoflurankonzentrationen ab (Szczyński et al, 2004). Die Inhalationsnarkose bei Mäusen wird somit neben der mangelnden Analgesie auch auf bestimmte Konzentrationsbereiche, abhängig vom Inhalationsanästhetikum, beschränkt, um eine sichere und stabile Narkose zu erhalten ohne die drastischen Nebeneffekte der Atemdepression zu erreichen.

Zum anderen gibt es verschiedene Injektionsnarkoseverfahren. Eine weit verbreitete Methode der Anästhesie nicht nur bei Mäusen ist die Kombination des dissoziativ wirkenden Anästhetikums Ketamin (Phencyclidin) mit einem α_2 -Rezeptoragonisten wie Xylazin oder Medetomidin (Buitrago et al, 2008; Green et al, 1981; Gargiulo et al, 2012; Hjálmsdóttir, 2005; Voipio et al, 1988). Die beiden Stoffgruppen können sich

in ihrer Wirkung gegenseitig so ergänzen, dass bestimmte Nebenwirkungen im Sinne einer „Balancierten Anästhesie“ reduziert werden können. So induziert Ketamin im Gegensatz zu den deutlich muskelrelaxierenden α_2 -Agonisten (Scrollavezza et al, 2009) eine Rigidität der quergestreiften Muskulatur (Flecknell, 2016; Mion & Villevieille, 2013; White et al, 1982). Die Kombination der beiden Pharmaka führt zu einer gewünschten Entspannung des Skelettmuskeltonus (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012; Green et al, 1981; Voipio et al, 1988). Des Weiteren kann das Kreislauf-stimulierend wirkende Ketamin (Amornyotin, 2014) beispielsweise der Bradykardie entgegenwirken, die in der Regel durch die Verwendung von α_2 -Agonisten verursacht wird (Burnside et al, 2013). Auf die weiteren Wirkungen der einzelnen Anästhetika wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. In Bezug auf die analgetische Potenz dieser Anästhetikakombination zeigte sich in verschiedenen Studien, dass nicht immer bis keine ausreichende chirurgische Toleranz insbesondere bei Mäusen erreicht werden kann (Arras et al, 2001; Buitrago et al, 2008; Burnside et al, 2013; Voipio et al, 1988). Des Weiteren kann bei der Kombination von Ketamin mit Medetomidin grundsätzlich frühestens nach 40 Minuten eine Teilantagonisierung des α_2 -Agonisten mittels Atipamezol durchgeführt werden (Baker et al, 2011), um den sogenannten Ketamin-Überhang zu vermeiden, der mit starker Katalepsie verbunden sein kann (Erhardt et al, 2012). Studien, unter anderem beim Hamster, zeigen, dass eine Antagonisierung von Medetomidin bei einer Kombination mit S(+)-Ketamin schon nach 30 Minuten möglich ist (Erhardt et al, 2001). Bei einem kurzen Eingriff von ca. 25-30 Minuten kann entsprechend die kürzere Halbwertszeit des S(+)-Ketamin (Kiliç & Henke, 2004; Wohlrab, 2001) genutzt werden und eine Antagonisierung von Medetomidin bereits nach 30 Minuten erfolgen, um die Narkosedauer der Mäuse so kurz wie möglich zu halten.

Eine weitere, häufig genutzte Möglichkeit der Injektionsanästhesie bei Mäusen ist die sogenannte vollantagonisierbare Anästhesie mit Medetomidin + Midazolam + Fentanyl (MMF) (Fleischmann et al, 2016; Hjálmarsdóttir, 2005). Diese Narkose ist v.a. durch die gute opiatbedingte analgetische Wirkung von Fentanyl für schmerzhaft Eingriffe geeignet (Cesarovic et al, 2012; Erhardt et al, 2012). Da jede der drei Komponenten antagonisiert werden kann und sollte (Fleischmann et al, 2016), ist das Beenden dieser Narkose somit jederzeit ohne negative Nebenwirkungen, wie z.B. Katalepsien, möglich und kann somit dem jeweiligen Eingriff angepasst werden. Mögliche Nebenwirkungen bzw. Nachteile dieser sogenannten MMF-Narkose sind die opiatbedingte Atemdepression (Alves et al, 2009) sowie das Phänomen der „Resedation“ trotz Antagonisierung (Hjálmarsdóttir, 2005). Dieses Phänomen entsteht vermutlich durch die längere Halbwertszeit der Agonisten gegenüber den Antagonisten. Der Benzodiazepin-Antagonist Flumazenil hat z.B. eine Wirkdauer von ca. 1 Stunde, während die Wirkung des Benzodiazepins Midazolam mehrere Stunden anhält (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012). Ähnlich verhält es sich auch mit dem α_2 -Agonisten Medetomidin und seinem Antagonisten Atipamezol, deren Wirkung dosisabhängig jeweils ca. 2-3 Stunden andauert (Erhardt et al, 2012), wobei der zeitliche Unterschied hier nur gering ausfällt. Sobald die kompetitiven Antagonisten metabolisiert wurden, können die verbleibenden Agonisten also nochmal am Rezeptor andocken. U.a. aufgrund dieses

„Rebound Effektes“ (Erhardt & Henke, 2012) eignet sich eine MMF-Narkose nur für eine einmalige Anästhesie innerhalb eines kurzen Zeitraumes. Die sechs injizierten Substanzen müssen erst einmal in der Leber verstoffwechselt werden. Dies stellt eine weitere Grenze für Patienten mit eingeschränkter Stoffwechsellistung dar. Außerdem muss rechtzeitig vor vollständiger Antagonisierung an die potentielle Fortführung der postoperativen Analgesie gedacht werden.

Neben diesen häufig verwendeten Anästhesieregimen sind noch zahlreiche weitere Narkoseprotokolle bei Mäusen beschrieben, die u.a. auch die bereits erwähnten Anästhetika kombinieren und zum Teil mit Analgetika ergänzen. Es wurden beispielsweise folgende Protokolle beschrieben: Propofol + Medetomidin +/- Fentanyl (Alves et al, 2009), Ketamin / Tiletamin + Xylazin / Medetomidin +/- Acepromazin / Azaperon / Zolazepam (Arras et al, 2001), Dexmedetomidin + Tiletamin-Zolazepam +/- Butorphanol (Cagle et al, 2017), Sevofluran + Fentanyl+Midazolam / S-Ketamin (Cesarovic et al, 2012), Medetomidin + Midazolam + Butorphanol (Kawai et al, 2011; Kirihara et al, 2013) oder Ketamin + Xylazin + Acepromazin / Buprenorphin / Carprofen (Buitrago et al, 2008).

2.2. VERWENDETE ANÄSTHETIKA

Aufgrund der Vielzahl der verwendbaren Anästhetika soll in der Literaturübersicht nur auf die in der Arbeit verwendeten Injektionsanästhetika eingegangen werden.

Neben den Phencyclidinen Ketamin-Razemat und S(+)-Ketamin kamen der α_2 -Adrenozeptoragonist Medetomidin und das Benzodiazepin Midazolam – beide aus der Gruppe der Sedativa - zum Einsatz. Die ebenfalls verwendeten Analgetika werden unter Punkt 2.3. aufgeführt.

2.2.1. PHENCYCLIDINE

Das Phencyclidin Ketamin nimmt, u.a. durch die Auslösung einer dissoziativen Anästhesie, eine Ausnahmestellung gegenüber anderen Analgetika und Narkotika ein, worunter die Erzeugung von Hypnose und Analgesie unter weitgehender Erhaltung der Schutzreflexe verstanden wird (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012). Die Wirkung beruht v.a. auf einer nicht kompetitiven antagonistischen Aktivität an NMDA-Rezeptoren (Ammer & Potschka, 2010). Eine dissoziative Anästhesie bedeutet eine gleichzeitige Stimulation des Retikulum-aktivierenden Systems und Dämpfung des thalamokortikalen Systems im zentralen Nervensystem (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012; Irifune et al, 1992; Löscher, 2014; Roewer & Thiel, 2014). Die Dämpfung im zentralen Nervensystem führt zum einen zu einem reduzierten Schmerzempfinden sowie zur Sedation bis hin zur Hypnose mit Amnesie (Erhardt et al, 2012; Löscher, 2014). Je höher die Dosis von Ketamin ist, desto stärker wird die analgetische Wirkung (Takahashi et al, 1987), wobei v.a. der somatische Schmerz reduziert wird (Ammer & Potschka, 2010).

Das Ketamin-Razemat besteht aus dem Gemisch der beiden (S)- und (R)-Enantiomere, während S-Ketamin nur aus dem (S)-(+)-Enantiomer besteht (Erhardt et al, 2012; White et al, 1982). Das reine (S)-(+)-Enantiomer ist bei Mäusen potenter

aber auch kürzer wirksam (Amornyotin, 2014; Kiliç & Henke, 2004; Mion & Villeveille, 2013; Ryder et al, 1978). Ketamin und S-Ketamin haben das Potential auch antihyperalgetisch zu wirken, wenn sie vor der Schmerzinduktion verabreicht werden (Minville et al, 2010; Ohnesorge et al, 2013), und können die Wirkung von Morphin verbessern (Minville et al, 2010). Auch in der postoperativen Versorgung ist die Gabe von niedrig dosiertem S-Ketamin in Kombination mit Morphin von Vorteil, da es die durch Langzeitgabe von Morphin induzierte Expression von NDMA-Rezeptoren mit dadurch verursachter Hyperalgesie hemmt (Ohnesorge et al, 2013). Auch wenn Ketamin und S-Ketamin auf supraspinaler Ebene in das μ -Opioid-System, verbunden mit einer Antinozizeption, einzugreifen scheinen, kann diese Wirkung nicht durch den μ - κ - δ -Rezeptorantagonisten Naloxon aufgehoben werden (Sarton et al, 2001; Takahashi et al, 1987). Es gibt aktuell keinen spezifischen Antagonisten für Ketamin. Die Stimulation im zentralen Nervensystem führt zu einer Verstärkung des Skelettmuskeltonus, einer sogenannten Rigidität der quergestreiften Muskulatur, und somit zu einer Katalepsie unter Erhalt der Schutzreflexe mit erhöhtem Sauerstoff- und Energieverbrauch der Muskulatur (Ammer & Potschka, 2010; Löscher, 2014; Mion & Villeveille, 2013; Roewer & Thiel, 2014). Zu beachten ist bei alleiniger Verabreichung, dass Abwehrreaktionen aufgrund der Katalepsie lediglich unterdrückt werden und es zu unwillkürlichen Schmerz unabhängigen Spontanbewegungen der Gliedmaßen sowie Ataxien kommen kann (Amornyotin, 2014; Kos et al, 2006; Löscher, 2014; Roewer & Thiel, 2014). Zum anderen werden durch die Aktivierung des Sympathikus Atem- und Kreislaufzentrum angeregt (Erhardt et al, 2012; Roewer & Thiel, 2014). So kommt es u.a. zu einer Erhöhung der Durchblutung des Gehirns und damit zum erhöhten Sauerstoffverbrauch, sowie dem Anstieg des Liquordrucks (Ammer & Potschka, 2010; Amornyotin, 2014; Erhardt et al, 2012; Oren et al, 1987). Eine höhere Anfallsneigung (Erhardt et al, 2012) und im Gegensatz dazu ein antikonvulsiver Effekt (Hayes & Balster, 1985; Sharma et al, 1991) von Ketamin werden kontrovers diskutiert. Durch die Kombination mit den antikonvulsiv wirkenden Benzodiazepinen oder α_2 -Agonisten soll das Risiko für Anfälle reduziert werden (Green et al, 1981). Blutdruck, Pulsfrequenz und Herzzeitvolumen steigen an und es kommt zu einem positiv inotropen Effekt am Herzen (Ammer & Potschka, 2010; Amornyotin, 2014; Löscher, 2014; Oren et al, 1987; Roewer & Thiel, 2014). Hierdurch steigt auch der Sauerstoffbedarf am Herzen. In einigen Fällen kann Ketamin durch die zentrale Anregung Halluzinationen hervorrufen (Ammer & Potschka, 2010; Kos et al, 2006; Löscher, 2014). Bei S-Ketamin ist diese unerwünschte Nebenwirkung deutlich seltener, da die verwendete Dosis im Vergleich zu Ketamin geringer ist (Amornyotin, 2014). Ebenso kann diese Nebenwirkung durch eine Prämedikation mit Benzodiazepinen, wie z.B. Diazepam, verringert werden (White et al, 1982).

Abhängig von der Umgebungstemperatur kann es sowohl zu Hypo-, Normo- als auch Hyperthermie kommen (Erhardt et al, 2012). Lin et al. (1978) und Ulugol et al. (2000) zeigten in ihrer Studie, dass Ketamin mit zunehmender Dosis zu einer Hypothermie führen, sowie den hypothermen Effekt von Morphin verstärken kann.

Die geringe Atemdepressivität von Ketamin kann dosisabhängig, bzw. in Kombination mit anderen Medikamenten, bis hin zu einer Apnoe führen (Roewer &

Thiel, 2014), wobei es gleichzeitig Bronchospasmen durch die Relaxation der glatten Bronchialmuskulatur vorbeugen kann (Amornyotin, 2014; Roewer & Thiel, 2014). Die Gabe von Atropin (Green et al, 1981; Flecknell, 2016) wird empfohlen, um die durch Ketamin verursachte Hypersalivation (Amornyotin, 2014; Roewer & Thiel, 2014) sowie vermehrte Schleimbildung (Amornyotin, 2014) zu reduzieren bzw. zu verhindern.

Ein positiver Nebeneffekt von Ketamin ist, dass es dosisabhängig die Verweildauer im Magen-Darm-Trakt verkürzen kann und somit eine Opioid bedingte Konstipation, unbeeinflusst durch die Antagonisierung mit Naloxon, mildern kann (Takahashi et al, 1987).

2.2.2. SEDATIVA

Anästhetika die das zentrale Nervensystem dämpfen und somit beruhigend auf das Tier wirken, bezeichnet man als Sedativa. Es kommt hierbei also nicht zu einer Hypnose, einem Zustand der Bewusstlosigkeit. Zu den Sedativa zählen Neuroleptika (Phenothiazine z.B. Acepromazin und Butyrophenone z.B. Azaperon), Ataraktika (Benzodiazepine z.B. Diazepam oder Midazolam) sowie α_2 -Adrenozeptoragonisten (z.B. Medetomidin oder Xylazin). (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012).

2.2.2.1. MEDETOMIDIN

Medetomidin ist neben Dexmedetomidin, Detomidin, Romifidin und Xylazin ein tiermedizinisch wichtiger Vertreter der α_2 -Adrenozeptoragonisten, auch bezeichnet als sedativ-hypnotische Analgetika, α_2 -Agonisten oder α_2 -adrenerge Agonisten (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012). Auch Medetomidin ist ein Razemat bestehend aus dem aktiven Enantiomer Dexmedetomidin und dem inaktiven Levomedetomidin (Burnside et al, 2013; Erhardt et al, 2012; Izer et al, 2014; Sinclair, 2003), wobei der klinische Vorteil von Dexmedetomidin im Vergleich zum Medetomidin-Razemat im Rahmen der Mausnästhesie kontrovers diskutiert wird (Burnside et al, 2013; Flecknell, 2016). Die Dosis kann bei Verwendung von Dexmedetomidin ebenfalls um die Hälfte reduziert werden, die Reduktion führt aber nicht zur Verminderung unerwünschter Nebenwirkungen (Burnside et al, 2013).

Die Wirkorte der α_2 -Adrenozeptoragonisten sind α_1 - und α_2 -Rezeptoren, wobei Medetomidin wesentlich α_2 -rezeptorspezifischer ist als z.B. Xylazin (Ammer & Potschka, 2010; Burnside et al, 2013; Erhardt et al, 2012).

Alpha₁-Rezeptoren befinden sich postsynaptisch an der Herzmuskulatur, durch deren Aktivierung es zu einem positiv inotropen Effekt kommt. Sie befinden sich ebenfalls im Bereich der glatten Gefäßmuskulatur von Venen und Ateriolen (Drew & Whiting, 1979). Hier kommt es durch ihre Aktivierung zu einer peripheren Vasokonstriktion mit Folge eines zentralen Blutdruckanstiegs (Brede et al, 2004; Burnside et al, 2013; Sinclair, 2003). Wie in einer Studie an Knockout Mäusen gezeigt wurde, muss dieser Blutdruckanstieg allerdings nicht immer gleich ausgeprägt stattfinden (Altman et al, 1999). Es entsteht somit eine Kreislaufzentralisation ähnlich eines beginnenden Schocks. Die parenchymatösen Organe werden vermehrt durchblutet, während die peripheren Gewebe weniger durchblutet werden.

Alpha₂-Rezeptoren befinden sich im zentralen Nervensystem postsynaptisch an der Umschaltstelle des Barorezeptorreflexes und führen dort zu einer Reduktion des Sympathikotonus. Durch α_2 -Agonisten wird die Reizschwelle der Barorezeptoren herabgesetzt, wodurch ein Blutdruckabfall nicht verhindert sondern geduldet wird. Eine dosisabhängige Blutdrucksenkung entsteht v.a. durch die α_2 -agonistische Wirkung an Imidazolrezeptoren, die sich im Bereich der Medulla oblongata befinden. (Altman et al, 1999; Erhardt et al, 2012; Frey & Löscher, 2005; Link et al, 1996; Löscher, 2014; MacMillan et al, 1996) Folge der Sympathikusenkung ist u.a. das Entstehen einer deutlichen Bradykardie (Altman et al, 1999; Hunter et al, 1997; Sinclair, 2003). In Abhängigkeit von der α_2 -Selektivität kann es außerdem zu unterschiedlich stark ausgeprägten Arrhythmien kommen, wobei auch hier die über α_2 -Rezeptoren vermittelte Sympathikusdämpfung die über α_1 -Rezeptoren initiierten Arrhythmien bis zu einem gewissen Grad ausgleichen kann (Sinclair, 2003). Als selektiverer α_2 -Agonist ist Medetomidin – dosisabhängig – also nicht per se Arrhythmie auslösend (Sinclair, 2003). Die analgetische Wirkung der α_2 -Agonisten wird durch die Hemmung der spinalen nozizeptiven Reflexaktivität ebenfalls über α_2 -Rezeptoren vermittelt (Brede et al, 2004; Burnside et al, 2013; Erhardt et al, 2012; Stenberg, 1989). Des Weiteren führen α_2 -Agonisten zu einer Muskelrelaxation, welche im Rückenmark durch die Hemmung der interneuralen Reizübertragung entsteht (Erhardt et al, 2012; Sinclair, 2003), und zusammen mit einer Anxiolyse zur Sedation (Brede et al, 2004; Hunter et al, 1997; Sinclair, 2003).

Auch in der Peripherie gibt es α_2 -Rezeptoren, welche sich präsynaptisch u.a. im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren, in Thrombozyten und im Uterus befinden (Diener, 2005; Erhardt et al, 2012). So hemmen α_2 -Agonisten im Pankreas die Insulinfreisetzung und führen somit zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels und es kann aufgrund dieser osmotischen Diurese, aber auch aufgrund reduzierter ADH-Ausschüttung, zur Polyurie kommen (Erhardt et al, 2012; Hu et al, 1992).

Als Besonderheit wurde bei männlichen Mäusen eine urethrale Obstruktion mit Todesfolge als Komplikation bei Narkosen mit Medetomidin und Dexmedetomidin beschrieben (Cagle et al, 2017; Wells et al, 2009).

Alle α_2 -Agonisten sind kompetitiv antagonisierbar, u.a. mit dem α_2 -Adrenozeptorantagonisten Atipamezol, welche auch α_2 -Adrenolytika genannt werden (Baker et al, 2011; Cruz et al, 1998; Erhardt et al, 2012; Janssen et al, 2004).

2.2.2.2. MIDAZOLAM

Als Vertreter der Benzodiazepine zählt Midazolam, u.a. neben Diazepam, zu den Ataraktika. Die mäßige Sedation (Valentim et al, 2013) wird ergänzt durch Anxiolyse (Pieri, 1983) sowie eine antikonvulsive Wirkung (Dhir et al, 2013) und eine Muskelrelaxation (Valentim et al, 2013). Dies beruht auf der Dämpfung des limbischen Systems. (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012; Ralvenius et al, 2015)

Das analgetische Potential der Benzodiazepine wird kontrovers diskutiert. Chiba et al (2009) zeigten in ihrer Studie einen antinozizeptiven Effekt von Midazolam bei Mäusen. Flecknell (2016) empfiehlt eine postoperative Sedation nicht ohne

Ergänzung von Analgetika aufgrund des beim Menschen aufgetretenen hyperalgetischen Effekts sowie einer fehlenden Analgesie.

Aufgrund der fehlenden peripheren Wirkung wird das Herz-Kreislauf-System nur in sehr hohen Dosen im Sinne einer Blutdrucksenkung beeinflusst und die atemdepressive Wirkung z.B. von Opioiden kann durch Benzodiazepine verstärkt werden (Berry et al, 2009; Erhardt et al, 2012; Gargiulo et al, 2012; Löscher, 2014; Tsukamoto et al, 2015).

Benzodiazepine sind kompetitiv antagonisierbar mit Flumazenil oder Sarmazenil, wobei die Wirkdauer der Antagonisten kürzer ist als die der Agonisten (Erhardt et al, 2012; Gargiulo et al, 2012; Löscher, 2014).

2.3. VERWENDETE ANALGETIKA

2.3.1. METAMIZOL

Das Pyrazolonderivat Metamizol gehört zu den nichtsteroidalen Antipyretika und entfaltet seine Wirkung sowohl zentral (Akman et al, 1996; Carlsson et al, 1986), als auch peripher (Gulmez et al, 2006).

Die periphere Wirkung von Metamizol besteht in einer Spasmyolyse der glatten Muskelzellen (Gulmez et al, 2006) sowie in einer dosisabhängigen analgetischen Wirkung durch die Hemmung der peripheren Prostaglandinsynthese (Aguirre-Bañuelos & Granados-Soto, 1999; Committee for veterinary medicinal products, 2003). Während die zentrale analgetische Wirkung zum einen aus der Hemmung der COX-3 Rezeptoren (Jasiecka et al, 2014) sowie der NDMA-Rezeptoren, ähnlich wie Ketamin, (Khodai, 2008) besteht, wirkt Metamizol zum anderen durch den Antagonismus der TRPA1-Kanäle analgetisch (Nassini et al, 2015). Bisher sind aber noch nicht alle Wirkmechanismen von Metamizol geklärt. Bei Mäusen wurde z.B. eine gute zentrale Analgesie bei akuter Pankreatitis durch die orale Gabe von Metamizol nachgewiesen (Stumpf et al, 2016). Brito et al. (2017) beschreiben in ihrer Studie eine gute Analgesie nach systemischer Gabe bei Mäusen im Rahmen der Tumorschmerztherapie, aber auch die Entwicklung einer Toleranz nach wiederholter Gabe. In Kombination mit dem NDMA-Rezeptorblocker Magnesiumchlorid konnte diese Toleranz allerdings verhindert werden und sogar das Tumorwachstum eindämmen.

Des Weiteren wurde bei Mäusen eine gewisse Entzündungshemmung sowie eine mögliche Kombination mit nichtsteroidalen Antiphlogistika beschrieben (Muñoz et al, 2010).

Die analgetische Wirkdauer ist bei Mäusen mit 5 Stunden beschrieben (Henke et al, 2012), wobei die zentrale antinozizeptive Wirkung von Metamizol nach Studien von Akman et al. (1996) und Kiliç & Erol (2000) durch die Gabe des Opioidantagonisten Naloxon aufgehoben werden kann. Akman et al. (1996) beschreiben die beinahe komplette Antagonisierung der zentralen antinozizeptiven Wirkung von Metamizol durch Naloxon nach intracerebroventrikulärer oder intrathekaler Verabreichung,

während es nach subkutaner Applikation von Metamizol nur zu einer Abschwächung aber keiner kompletten Aufhebung kommt.

Dosisabhängig kann es aufgrund der zentralen Wirkung von Metamizol zur Sedation, aber auch zur Atemdepression kommen (Committee for veterinary medicinal products, 2003).

Die Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf-System sind gering, allerdings gilt es eine zu schnelle intravenöse Applikation zu vermeiden, da diese zu einer relevanten Hypotension führen kann (Erhardt et al, 2012; Müller, 2018).

Generell wirkt Metamizol eher antipyretisch (Schlosburg et al, 2012). Dosisabhängig kann es bei Mäusen durch Metamizol aber auch zu einer Hypothermie kommen (Ertin et al, 2015).

Im Gegensatz zu den nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) (Erhardt et al, 2012) hat Metamizol keine negative Auswirkung auf Leber und Niere (Khodai, 2008). Die beim Menschen beschriebene Agranulozytose und auch die aplastische Amämie (Khodai, 2008) wurden bisher bei Tieren noch nicht beschrieben (Jasiecka et al, 2014).

2.3.2. BUTORPHANOL

Das Opioid Butorphanol wird, mit einer 5-mal stärkeren Potenz als Morphin nach subkutaner Applikation bei Mäusen, klassifiziert als synthetischer Opiat-Agonist-Antagonist (Erhardt et al, 2012; Feng et al, 1994). Somit wirkt Butorphanol agonistisch am κ -Opioidrezeptor (Chen et al, 1993; Gharagozlou et al, 2006) und antagonistisch sowie schwach agonistisch am μ -Opioidrezeptor (Chen et al, 1993; Emmerson et al, 1996; Erhardt et al, 2012; Garner et al, 1997; Kukanich & Papich, 2009). Seine antinozizeptive Wirkung wird zum einen über μ -Opioidrezeptoren und zum anderen über κ -Opioidrezeptoren vermittelt (Garner et al, 1997; Ide et al, 2008; Patrick et al, 1999) und wird bei der Maus aufgrund der kurzen Wirkdauer von 4-6 Stunden (Henke, 2010) bzw. 1-2 Stunden nur bei milden kurzandauernden Schmerzen empfohlen (Gades et al, 2000). Butorphanol eignet sich durch die κ -agonistische Wirkung dazu, Anästhetika aufgrund des sedativen Effekts einzusparen und Narkosen zu vertiefen (Cagle et al, 2017; Izer et al, 2014). Butorphanol gilt als myokardprotektiv im Rahmen ischämischer Herzerkrankungen durch die Reduktion der Kardiomyozytenapoptose (Huang et al, 2018) und kann außerdem die Herz- und Atemfrequenz reduzieren (Erhardt et al, 2012; Löscher, 2014).

Dosisbezogen führt Butorphanol (Feng et al, 1994) zwar zu einer Abhängigkeit (Jaw et al, 1993; Pircio et al, 1976), die allerdings testabhängig geringer ist als die von Morphin (Feng et al, 1994), was sich durch den κ -Agonismus sowie den Antagonismus bzw. schwachen Agonismus am μ -Opioidrezeptor erklären lässt (Löscher, 2014). Daher ist Butorphanol in Deutschland von der Betäubungsmittelpflicht ausgenommen.

Aufgrund der hohen Bindungsaffinität (Chen et al, 1993) ist Butorphanol in der Lage andere Opioide, reine μ -Opioidrezeptor-Agonisten (Löscher, 2014), kompetitiv aus deren Bindung zu verdrängen (Flecknell, 2016; Garner et al, 1997). Butorphanol kann mit höheren Dosen Naloxon antagonisiert werden (Freye, 1999), während der

spezifische α_2 -Antagonist Atipamezol die analgetische Wirkung von Butorphanol nicht beeinflusst (Izer et al, 2014).

2.3.3. FENTANYL

Das vollsynthetische Morphinderivat Fentanyl hat zwar eine höhere analgetische Wirkpotenz als Morphin (Romero et al, 2010), zeigt allerdings eine deutlich kürzere Wirkdauer (Erhardt et al, 2012; Löscher, 2014). Die analgetische Wirkung tritt rasch ein und dauert ungefähr 20-30 Minuten an (Erhardt et al, 2012; Kalvass et al, 2007). Fentanyl wirkt agonistisch v.a. am μ -Opioidrezeptor (Chen et al, 1993; Emmerson et al, 1996; Erhardt et al, 2012), aber auch schwach an den κ - und δ -Opioidrezeptoren (Chen et al, 1993; Gharagozlou et al, 2006).

Durch die zentrale Wirkung kann die Applikation von Fentanyl bei Mäusen dosisabhängig Krämpfe verstärken (Cherng & Wong, 2005). Über die zentrale agonistische Wirkung am μ -Opioidrezeptor (Erhardt et al, 2012) induziert Fentanyl eine ausgeprägte dosis- und altersabhängige Atemdepression bei Mäusen (Alves et al, 2009; Kennedy, 2015) sowie eine Bradykardie (Erhardt et al, 2012) aber auch eine sehr gute Analgesie (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012; Löscher, 2014).

Die Wirkung von Fentanyl inklusive der analgetischen Komponente kann vollständig durch Naloxon aufgehoben werden (Fleischmann et al, 2016; Hu et al, 1992). Fentanyl kann aber auch durch Butorphanol (Hu et al, 1992) oder Buprenorphin, das am μ -Opioidrezeptoren als partieller Agonist und am κ -Opioidrezeptor als Antagonist wirkt (Erhardt et al, 2012), aus der μ -Opioidrezeptorbindung verdrängt werden, wodurch beispielsweise eine postoperative Weiterführung der Analgesie erreicht werden kann.

Aufgrund seiner Sucht induzierenden Potenz (Bremer et al, 2016) fällt Fentanyl in Deutschland unter die Betäubungsmittelgesetzgebung.

2.4. PRÄ- UND POSTANÄSTHETISCHE PARAMETER

2.4.1. PRÄANÄSTHETISCHE UNTERSUCHUNG UND VORBEREITUNG

Aufgrund der geringen Körpergröße sowie um Stress für das Tier zu reduzieren, beschränkt sich die präanästhetische Untersuchung bei Mäusen auf eine adspektorische Begutachtung im gewohnten Käfig. Augenmerk wird hierbei v.a. auf Körperhaltung und Verhalten sowie eine normale Atmung gelegt. Eine gesunde Maus verhält sich neugierig, aufmerksam und separiert sich nicht von ihren Artgenossen. Die Fellqualität sollte gut gepflegt, glatt und glänzend sein. (Sayers & Smith, 2010)

Um Schmerzen und Unwohlsein bei Mäusen genauer und auch einheitlicher einschätzen zu können, wurde der sogenannte „mouse grimace scale“ (MGS) entwickelt. Hierzu werden die Stellung der Ohren und Barthaare, sowie die Öffnung der Augen und die Vorwölbung von Wangen und Nase jeweils von 0-2 bewertet. (Langford et al, 2010) Zu beachten gilt es aber, dass die Ausgangsbewertung des

Basiswertes zwischen Mausstamm und Geschlecht variiert und nicht bei allen Mäusen ohne Schmerz 0 von 10 Punkten sein muss (Miller & Leach, 2015).

Vor jeder Narkose muss die Maus gewogen werden, da eine exakte Dosierung bei dieser geringen Körpermasse sehr wichtig ist (Sayers & Smith, 2010).

Da Mäuse im Rahmen der Anästhesie nicht erbrechen, ist präanästhetisches Fasten nicht nötig und lediglich bei gastrointestinalen Operationen indiziert (Flecknell, 2016; Sayers & Smith, 2010). Aufgrund der generell geringen Glykogenreserven (Abou-Madi, 2006) würde eine Nüchternphase vor Beginn der Anästhesie eher zu einer ausgeprägten Hypoglykämie mit einer möglichen Erhöhung der perioperativen Mortalität führen (Henke & Erhardt, 2012a).

2.4.2. APPLIKATION DER MEDIKAMENTE

Die bevorzugte Applikationsroute der Narkosemedikamente bei der Maus ist die intraperitoneale (i.p.) Injektion (Arras et al, 2001; Henke & Erhardt, 2012a). Hier werden die Medikamente schnell resorbiert und der Wirkeintritt erfolgt relativ zügig. Um das Risiko für Fehlinjektionen in die Hohlorgane sowie die parenchymatösen Organe zu minimieren, wird die Maus in Rückenlage mit dem Kopf tief gehalten, da sich so die abdominalen Organe kranial verlagern. Die Injektion erfolgt, nach Aspiration, im rechten kaudalen Quadranten. (Henke & Erhardt, 2012a)

Für die Prämedikation von Analgetika hat sich auch die orale (p.o.) oder subkutane (s.c.) Verabreichung bewährt (Henke et al, 2012).

Antagonisten werden in der Regel subkutan (Baker et al, 2011; Taylor et al, 2000) appliziert, um die Aufwachphase so schonend wie möglich zu gestalten und die in der Regel größeren Injektionsvolumina der Antagonisten gut verabreichen zu können. Sie können aber auch intraperitoneal (Cruz et al, 1998) injiziert werden. Eine intravenöse Applikation von Antagonisten sollte nur im Notfall stattfinden, da es zu einem abrupten Erwachen mit einem hohen Stresspotential für die Tiere kommen kann (Erhardt & Henke, 2012) und auch hier die höheren Injektionsvolumina problematisch sein können.

Eine intramuskuläre Verabreichung ist meist aufgrund der in Relation zu großen Volumina und oft geweber reizenden Substanzen, wie z.B. das pH-saure Ketamin, nicht zu empfehlen (Flecknell, 2016; Henke & Erhardt, 2012a).

2.4.3. EINSCHLAFPHASE

Um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten (Baumans et al, 1994), sollte die Einschlafphase direkt nach Injektion des Anästhetikums bis zum Verlust des Stellreflexes so kurz wie möglich sein. Der Stellreflex ist eine instinktive Reaktion der Maus. Wird eine Maus in Seiten- oder Rückenlage verbracht (Smith, 1993), versucht sie sich sofort wieder in die natürliche Bauchlage zu bringen. Durch Verabreichung bestimmter Anästhetika gelangen die Tiere in den Zustand der Hypnose. Aufgrund dieser Immobilisierung kommt es zum Verlust des Stellreflexes. (McCarren et al, 2013; Smith, 1993)

Neben der Zeit spielt auch die Qualität der Einschlafphase eine wichtige Rolle. Hierbei kann es zu Exzitationen und Katalepsie kommen, wenn zum einen das

sogenannte Exzitationsstadium (= Anästhesiestadium II) nicht schnell genug durchschritten wird, oder aber der die Katalepsien erzeugende Ketamin-Anteil der Narkose aufgrund individueller pharmakologischer Verteilung kurzfristig überwiegt (Löscher, 2014).

2.4.4. AUFWACHPHASE

Nach subkutaner Verabreichung des jeweiligen Antagonisten, kommt es abhängig von den verwendeten Anästhetika zu einem zeitlich variierenden Wiedererlangen des Stellreflexes mit dem Ziel einer möglichst kurzen Rekonvaleszenzphase. Es zeigt sich, dass eine Teil-/Antagonisierung zur schnelleren Erholung der Mäuse sowie zur Reduktion der postoperativen Sterblichkeit beiträgt (Taylor et al, 2000). Allerdings wird z.B. eine Teilantagonisierung von Medetomidin in Verbindung mit Ketamin frühestens nach 40 Minuten empfohlen, da es sonst zu gegenteiligen Effekten wie verzögerter Erholung oder sogar Versterben kommen kann (Baker et al, 2011). Im Gegensatz dazu, ist die vollständige Antagonisierung der Medetomidin + Midazolam + Fentanyl Narkose jederzeit möglich (Fleischmann et al., 2016).

Auch hier spielt neben der Zeit die Qualität der Aufwachphase eine Rolle. Im Rahmen der Anästhesie mit der Kombination S-/Ketamin + Medetomidin oder Xylaxin kommt es nach einer Teilantagonisierung häufig zu Ataxien (Hjálmarsdóttir, 2005; Kiliç & Henke, 2004), was einer Studie von Cesarovic et al. (2012) zufolge auf das Phencyclidin als Verursacher schließen lässt. Im Gegenteil dazu beschreibt Hjálmarsdóttir (2005) das sogenannte Resedationsphänomen nach der kompletten Antagonisierung der MMF-Narkose, gekennzeichnet durch ein „Immer-wieder-Wegdämmern“ und ein reduziertes Verhalten der Mäuse bis zu 7 Stunden nach Antagonisierung.

2.5. NARKOSEPARAMETER

Aufgrund der Herabsetzung von Atmung und Kreislauf durch die verschiedenen Anästhetika und zur Erkennung etwaiger Schmerzen oder Narkosezwischenfälle, ist eine stetige Überwachung der Vitalparameter unabdingbar. Besonderes Augenmerk bei der Maus liegt auf der Atmung, der Herzfrequenz, der peripheren Sauerstoffsättigung sowie der Körpertemperatur. Reflexe werden zur Bestimmung der Narkosetiefe herangezogen. Für die zuverlässige Bewertung der Narkosetiefe bzw. den Eintritt der sogenannten „chirurgischen Toleranz“ bei der Maus ist der Zwischenzehenreflex am aussagekräftigsten, da diese Reaktion als letzte erlischt aber auch als erste wieder eintritt (Arras et al, 2001).

Weitere Narkoseparameter wie die CO₂- und Blutdruck-Messung, die bei größeren Tieren gut in der Narkoseüberwachung nutzbar sind, finden bei Mäusen während Routinenarkosen selten Verwendung. Eine CO₂-Messung ist nicht-invasiv nur möglich, wenn das Tier intubiert ist, da die sogenannte Kapnografie die CO₂-Konzentration in der Ausatemluft misst (Henke & Erhardt, 2012b). Die Intubation bei Mäusen benötigt spezielles Equipment und die jeweilige Intubationstechnik sollte der Mausgröße angepasst sein, ist mit etwas Übung aber grundsätzlich gut möglich (Hamacher et al, 2008). Alternativ hierzu käme eine kontinuierliche invasive

Blutgasmessung (Cesarovic et al, 2010) in Frage, die sich allerdings wegen der ständig zu wiederholenden arteriellen Blutentnahme nicht für Routineeingriffe im OP-Alltag eignet. Ein peripher arterielles Gefäß ist bei der Maus nicht einfach zugänglich. Ähnlich verhält es sich mit der intraoperativen Blutdruckmessung. Zum einen besteht die Möglichkeit der nicht-invasiven indirekten Blutdruckmessung mittels der Cuff-Plethysmographie am Schwanz der Maus (Buitrago et al, 2008; Fink, 2017). Diese Methode ist abhängig von der Durchblutung des Schwanzes (Fink, 2017) und variiert somit je nach verwendeten Anästhetika. Wenn diese z.B. zu einer peripheren Gefäßveränderung führen, wird die Genauigkeit der Messung beeinträchtigt (Buitrago et al, 2008). Daher kommt auch die Cuff-Plethysmographie am Schwanz der Maus nicht routinemäßig bei jedem Eingriff zum Einsatz. Zum anderen besteht die Möglichkeit der direkten, invasiven Blutdruckmessung mittels eines Katheters in der Arteria carotis (Butz & Davisson, 2001). Diese Art der Messung gilt als sehr genau, wobei eine mögliche Beeinflussung des dort befindlichen Barorezeptorreflexes derzeit noch nicht in Gänze evaluiert ist (Butz & Davisson, 2001). Ein Nachteil dieser direkten Methode ist allerdings die Notwendigkeit einer Narkose inklusive ausreichender Analgesie zum Legen des arteriellen Katheters bzw. eine Verlängerung der geplanten Narkose, weshalb auch diese Messung nicht routinemäßig eingesetzt werden kann.

2.5.1. ATEMFREQUENZ

Für die Atemfrequenz (AF) werden jeweils die Thoraxexkursionen über 15 Sekunden gezählt und dann durch Multiplikation mit 4 auf 1 Minute hochgerechnet. Die physiologischen Werte bei der Maus sind abhängig von Stamm, Alter und Geschlecht und variieren je nach Literatur von 100 – 160 (Henke & Erhardt, 2012a) /- 180 (Flecknell, 2016) /- 250 (Sayers & Smith, 2010) Atemzüge pro Minute.

2.5.2. HERZFREQUENZ

Die Herzfrequenz (HF) wird aufgrund der schnellen Herzfrequenz bei Mäusen mit einem speziellen Highspeed-Pulsoxymeter gemessen (Flecknell, 2016). Hierzu wird der Sensor an einer möglichst gut durchbluteten Stelle einer Gliedmaße angelegt. Die physiologischen Werte bei der Maus sind 310 - 840 Schläge pro Minute (bpm = beats per minute) abhängig von Stamm, Alter und Geschlecht (Henke & Erhardt, 2012a; Sayers & Smith, 2010). Xing et al. (2009) beschreiben bei C57BL/6J Mäusen eine Herzfrequenz von 544 - 630 bpm, wobei die Herzfrequenz bei den Weibchen signifikant höher ist als bei den Männchen.

2.5.3. PERIPHERE SAUERSTOFFSÄTTIGUNG

Die periphere Sauerstoffsättigung (SpO₂) des Blutes wird ebenfalls mit einem (Highspeed-)Pulsoxymeter gemessen. Hierzu wird der Sensor an einer möglichst gut durchbluteten Stelle einer Gliedmaße angelegt. Im Rahmen der Anästhesie gilt es zu beachten, dass eine Anästhetika bedingte Vasokonstriktion, wie z.B. bei der Verwendung von α_2 -Agonisten, zu einer falsch niedrigen Sauerstoffsättigung führen kann (Flecknell, 2016). Weitere Gründe für falsch niedrige Werte können zum einen

ein hoher Anpressdruck des Sensors in Relation zum zierlichen Gewebe der Maus und zum anderen die teilweise pigmentierten Gliedmaßen sein (Henke & Erhardt, 2012b). Eine periphere Sauerstoffsättigung von 100 Vol.% wird angestrebt. Solange die Atemtätigkeit und damit der Gasaustausch unter Narkose noch suffizient sind, genügt es, die Spontanatmung durch Vorhalten von reinem Sauerstoff per Maske zu unterstützen. Sollte allerdings die Atemtätigkeit (Frequenz und Tiefe) stark deprimiert sein und damit auch die Sauerstoffsättigung unter 80 Vol.% absinken (Flecknell, 2016), muss der Patient intubiert und beatmet werden, um eine Hyperkapnie und eine Azidose zu vermeiden (Cesarovic et al, 2010).

2.5.4. TEMPERATUR

Die Körperinnentemperatur (Temp.) wird mit einer rektalen Temperatursonde gemessen. Die physiologischen Werte bei der Maus sind 37,5 - 38,5 °C abhängig von Stamm, Alter und Geschlecht (Henke & Erhardt, 2012a; Sayers & Smith, 2010). Gemäß einer Studie von Kosanke (2012) gilt es zu beachten, dass es im Rahmen der Narkose zu einer deutlichen Hypothermie kommen kann, die eine stetige Wärmezufuhr unabdingbar macht, um Narkosekomplikationen sowie eine verzögerte Rekonvaleszenz zu verhindern. Ursachen für diese Hypothermie sind zum einen das ungünstige Verhältnis von der Körperoberfläche zum Körpergewicht und zum anderen die Verabreichung von kaltem Sauerstoff und großzügiger Oberflächendesinfektion, aber auch das Einwirken der Anästhetika in die Thermoregulation (Flecknell, 2016).

2.5.5. ZWISCHENZEHENREFLEX

Die Fußrückziehreaktion (PWR = pedal withdrawl reaction) wird an der Hintergliedmaße geprüft, da sie dort zuletzt erlischt (Buitrago et al, 2008; Arras et al, 2001). Die Reaktion gilt als positiv, wenn das Zwickeln mit einer anatomischen Pinzette in den Zwischenzehenbereich nach leichter Extension der Gliedmaße ein deutliches Zucken oder Zurückziehen der Extremität bewirkt (Arras et al, 2001). Im Gegensatz dazu wird ein Ausbleiben der Rückziehreaktion, also der Verlust der PWR, als negativ gewertet. Entsprechend diverser Studien (Arras et al, 2001; Buitrago et al, 2008; Taylor et al, 2000) ist die PWR einer der besten Indikatoren bei Mäusen für das Erreichen einer chirurgischen Toleranz unter Anästhesie. Generell gilt es zwischen der Fußrückziehreaktion (PWR) und dem Zwischenzehenreflex zu unterscheiden. Die PWR ist eine nozizeptive Reaktion über Reizung der Schmerzrezeptoren mit einer Weiterleitung zum Gehirn. Sie ist eng mit dem Zwischenzehenreflex verbunden, der eine direkt über das Rückenmark verarbeitete motorische Reaktion ist (Frey & Löscher, 2005).

Smith (1993) fand heraus, dass u.a. die PWR in seltenen Fällen im Rahmen seiner Narkosestudie bei Mäusen nicht immer ausfiel, obwohl die Dosis z.T. nahe der tödlichen Überdosierung lag. Deshalb sollte stets die Kombination aus dem Verlust der PWR und einer ausbleibenden Erhöhung von Herzfrequenz (Flecknell, 2016), Blutdruck und Atemfrequenz bei Spontanatmung berücksichtigt werden. So kann unterschieden werden, ob es sich tatsächlich um eine Schmerzreaktion oder eine

Reflexantwort handelt, da Mäuse generell ein hohes Maß an Reflexaktivität zeigen (Hjálmarsdóttir, 2005).

2.5.6. LIDREFLEX

Der Lidreflex wird durch leichtes Berühren der Lidränder am medialen Augenwinkel mit einem vorher in eine isotone Salzlösung eingetunkten Watteträger überprüft. Er gilt als vorhanden, wenn das Tier mit einem Zwinkern oder einem leichten Zucken der Augenlider reagiert. Bei Mäusen muss allerdings beachtet werden, dass das Ausbleiben des Lidreflexes äußerst variabel sein kann (Flecknell, 2016) in Abhängigkeit von der Wahl der Anästhetika.

3. PUBLIKATION 1

Der Originalartikel „Comparison of pre-emptive butorphanol or metamizole with ketamine+medetomidine and s-ketamine+medetomidine anaesthesia in improving intraoperative analgesia in mice“ wurde am 24. Oktober 2018 zur Publikation im Fachjournal „Laboratory Animals“ angenommen und am 8. Dezember 2018 online veröffentlicht.

Original Article

Comparison of pre-emptive butorphanol or metamizole with ketamine + medetomidine and s-ketamine + medetomidine anaesthesia in improving intraoperative analgesia in mice

C Bauer¹ , U Schillinger¹, J Brandl¹, A Meyer-Lindenberg², A Ott³ and C Baumgartner¹

Laboratory Animals
0(0) 1–11
© The Author(s) 2018
Article reuse guidelines:
sagepub.com/journals-permissions
DOI: 10.1177/0023677218815208
journals.sagepub.com/home/lan


Abstract

In accordance with the 'refinement' component of the 3Rs, the primary aim of this study was to investigate and compare ketamine + medetomidine (KM) and s-ketamine + medetomidine (SKM) anaesthetic protocols in C57BL/6J mice (both sexes). We sought to determine whether s-ketamine could provide adequate surgical tolerance at a 50% dose relative to that of ketamine racemate and whether antagonism of medetomidine could be initiated 15 min earlier. The second aim was to investigate the potential improvement in analgesia for both anaesthetic protocols by adding butorphanol or metamizole. Analgesia was tested via the pedal withdrawal reaction (PWR) to a painful stimulus. During anaesthesia, respiratory frequency, pulse oximetry, body temperature and PWR were monitored. Among the 16 mice in each group, the PWR was lost in all the KM + metamizole (35:56 ± 6:07 min), KM + butorphanol (43:45 ± 2:14 min) and SKM + butorphanol (24:03 ± 5:50 min) mice, 15 of the non-premedicated KM (37:00 ± 8:11 min) mice, and 9 of the pure SKM (20:00 ± 4:19 min) mice; the latter group increased to 11 mice (17:16 ± 5:10 min) with premedication of metamizole. In contrast to the racemic combination, s-ketamine at the dose used here did not lead to sufficient loss of the PWR. However, earlier partial antagonism of SKM resulted in a slightly shorter and qualitatively better recovery than later partial antagonism of SKM. The addition of metamizole or butorphanol to KM or SKM anaesthesia positively influences the analgesic quality. However, when butorphanol is added, controlled ventilation may be necessary, especially for male mice.

Keywords

Anaesthesia, mice, analgesia, ketamine, medetomidine, s-ketamine, metamizole, butorphanol, dipyrone

Date received: 27 November 2017; accepted: 24 October 2018

Introduction

To improve animal experiments in accordance with the 3R (reduction, refinement, replacement) guidelines, anaesthesia and analgesia are important factors that can be refined. The appropriate balanced anaesthetic regimen is determined based on the frequency and duration of the experiment and the painful stimuli. Mice are difficult animals to anaesthetize due to their high risk of hypothermia and hypoglycaemia¹ and the large discrepancies in doses among different strains. Beside inhalant anaesthetics only few injectable combinations

¹Centre of Preclinical Research, Technical University of Munich, Germany

²Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, Germany

³Institute for Medical Statistics and Epidemiology, Technical University of Munich, Germany

Corresponding author:

Caroline Bauer, Centre of Preclinical Research, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Ismaninger Str. 22, 81675 Munich, Germany.

Email: christine.baumgartner@tum.de

can be recommended for mice. Ketamine + α 2-adrenoceptor agonist combinations are commonly used, but large variations in analgesic depth and duration among individuals have been reported,²⁻⁷ which makes standardization difficult and poses a risk of insufficient analgesia. Therefore, we sought to improve the recovery time and the quality of analgesia for surgical interventions. We compared ketamine + medetomidine (KM) and s-ketamine + medetomidine (SKM) in C57BL/6J mice. Each protocol was also evaluated with the addition of the analgesics butorphanol and metamizole. Butorphanol acts as an agonist mainly at κ -opioid receptors and as a partial agonist or antagonist at μ -opioid receptors.⁸ Therefore, butorphanol has no addictive potency and is officially a non-restricted narcotic drug.^{7,9} The pyrazolone derivate metamizole (syn. dipyrone) is a nonsteroidal antipyretic analgesic. Although the complete mechanisms of action of metamizole have not been fully clarified, metamizole has been shown to inhibit NDMA receptors (similar to ketamine) and cyclooxygenase and act as an antagonist of TRPA1 channels.^{10,11,12} S-ketamine is used at a 50% lower dose than racemic ketamine, as previously described in hamsters,¹³ cats¹⁴ and humans.¹⁵ Therefore, we investigated whether such s-ketamine doses would also achieve an adequate anaesthetic depth in mice. Furthermore, recovery was evaluated after antagonism of medetomidine at the earliest possible time point. For racemic KM, the earliest antagonism time point was after 40 min,¹⁶ without intense ketamine-induced catalepsy. When using s-ketamine, partial antagonism can be performed even earlier, as reported in hamsters.¹⁷ We additionally investigated both sexes independently, as notable sex differences related to the metabolism of these drugs have been reported.^{4,6,18}

Material and methods

Ethics statement

This study was performed in accordance with the German Animal Welfare Act (Deutsches Tierschutzgesetz) as well as Directive 2010/63/EU and approved by the local ethics committee of the approving authority, the district government of Upper Bavaria in Germany (Gz.:55.2-1-54-2532-186-2015). The acute and cumulative stress level was categorized as low for the current study.

Animals

In each group, eight male (weighing 30.4 ± 3.0 g) and eight female (weighing 23.4 ± 1.7 g) C57BL/6J mice (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) aged

15–20 weeks were included. The mice were housed under specific-pathogen-free (SPF) conditions in accordance with the ‘Federation of Laboratory Animal Science Associations’ (FELASA) recommendations.¹⁹ To reduce the number of animals used, each mouse was randomly allocated to two different anaesthetic protocols with a wash-out period of two weeks between experiments. In total, 48 mice (24 male, 24 female) were used in this study, which equals a reduction of experimental mice by half. Furthermore, each mouse was allowed an adaptation period of at least one week before the first intervention. After the end of the study and a convalescence period of at least three weeks, the mice were reused in a final low-stress experiment, with permission from our approving authority.

Mice were group housed (2–5 mice per cage, 435.7 cm² floor area) in individually ventilated cages (cage type 9, Maxi-Miser Thoren-Caging-System, Thoren Caging Systems Inc., Pennsylvania, USA), in accordance with the European guidelines (2010/63/EU), on special wood bedding (Select Fine, Sniff, Germany). Autoclaved standard rodent diet (Altomin No. 1324SP, Lage, Germany) and water were given *ad libitum*. Autoclaved cellulose, aspen bricks, and nestlets (Bioscape, Castrop-Rauxel, Germany) and a red polycarbonate house (Bioscape, Castrop-Rauxel, Germany) were provided for enrichment. The room temperature was maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and a humidity of 45–60%. Animals were maintained under a 12/12 h light/dark cycle with 30 min of dawn and dusk.

Drugs and methods

Mice were not fasted before anaesthesia. After weighing and visual examination, either pre-emptive analgesia was given before intraperitoneal (IP) anaesthesia or (in the groups without additional analgesia) anaesthesia was directly administered by IP injection.

Sixteen mice (8 male, 8 female) each were assigned to the following groups:

- KM: ketamine (100 mg/kg; Narketan 100 mg/ml, Vétoquinol GmbH, Ravensburg, Germany) and medetomidine (1 mg/kg) mixed in one syringe.
- SKM: S-ketamine (50 mg/kg; Ketanest-S 25 mg/ml, Pfizer Pharma PFE GmbH, Berlin, Germany) and medetomidine (1 mg/kg) mixed in one syringe.
- KM + butorphanol: butorphanol (2.5 mg/kg; Alvegesic[®] vet. 10 mg/ml, Selectavet, Weyarn-Holzolling, Germany) subcutaneously (SC) 30 min before ketamine (100 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) administration.
- KM + metamizole: metamizole (150 mg/kg; metamizole 500 mg/ml, Hexal AG, Holzkirchen, Germany) orally (PO) by licking a drop containing the

appropriate dose directly from a 1 ml syringe. The awake mouse was therefore briefly restrained 30 min before ketamine (100 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) administration.

- SKM + butorphanol: butorphanol (2.5 mg/kg) SC 30 min before s-ketamine (50 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) administration.
- SKM + metamizole: metamizole (150 mg/kg) PO 30 min before s-ketamine (50 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) administration.

In the KM groups, medetomidine (Sedator 1 mg/ml Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany) was antagonized after 45 min by atipamezole (5 mg/kg; Antisedan 5 mg/ml, Vêtoquinol GmbH, Ravensburg, Germany) SC and in the SKM groups after 30 min.

The induction time was observed from the injection of anaesthetics until the loss of the righting reflex. The first measurement after loss of the righting reflex was defined as time point 0. Afterwards, data were recorded every 5 min until injection of the antagonist. Immediately after loss of the righting reflex, the cornea was protected with dexpanthenol eye cream (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany). The recovery time was defined from the injection of the antagonist until the righting reflex was regained. Immediately before injecting the antagonist, each mouse was administered a pre-warmed infusion SC (0.2 ml Ringer's solution + 0.1 ml 20% glucose).

Monitoring of anaesthesia was performed by means of the respiratory frequency (RF; respiration counted by the investigator), heart rate (HR), peripheral oxygen saturation (SpO₂) and rectal body temperature (BT) via a high-speed pulse oximeter including a temperature probe ('PhysioSuite' including 'Thermostat', Kent Scientific Corp., USA distributed by EMKA Technologies, Paris, France). Additionally, the pedal withdrawal reaction (PWR; pinching the toes with atraumatic forceps) was evaluated (positive reaction: mouse attempt to withdraw the limb; negative reaction: mouse did not react to toe pinch). Physiological BT was maintained at 38–39°C by a heating pad (Horn GmbH, Gottmadingen, Germany), and 100% oxygen was supplied via a nose mask.

Surgical tolerance was defined as the period when the PWR to a painful stimulus was lost without any significant increase in HR or RF. In this study, the only painful stimulus was a toe pinch with atraumatic forceps to test the PWR.

Statistical analysis

The study was classified as an explorative study and the sample size was set at $n=8$ in accordance to Arras et al.² The data were analysed using Excel and IBM SPSS Statistics, version 24 (IBM Corp., Armonk,

NY, USA). All values are summarized as the mean (M) ± standard deviation (SD). ANOVA and pairwise t -tests were used to analyse the time differences in RF, HR and BT. For SpO₂, the non-parametric Kruskal-Wallis and Wilcoxon tests were used. For unpaired comparisons, such as sex differences, two-sample t -tests or Mann-Whitney- U -tests were performed. All tests were two-sided with a 5% level of significance ($p=0.05$).

Results

Comparative data of the anaesthetic regimens are quantified as the $M \pm SD$. Sex differences and differences in the sensitive vital parameters RF and HR are shown in Tables 1–3. Only significant p -values (<0.05) are listed. Using KM without additional analgesics, one mouse did not lose the PWR. With the use of KM plus butorphanol, three of the five female mice showed a short duration of excitation – defined as a stage of excitement including myoclonic twitches – after loss of the righting reflex. In the SKM group without additional analgesics, the PWR could be slightly triggered at several points for three male mice. Four mice did not show a loss of this reaction at any time during anaesthesia. One of the three male mice showed a short period of catalepsy – defined as stage of immobilization combined with a noticeably increased muscle tone – after loss of the righting reflex. The PWR was triggered slightly at several points for three mice (one male, two female) using SKM + metamizole. Two mice did not show a loss of this reaction at any time during anaesthesia. Five female mice showed a short period of excitation after loss of the righting reflex. In the SKM + butorphanol group, four mice (three male, one female) showed a short period of excitation after, and two female mice before loss of the righting reflex.

Data are not shown for SpO₂ and BT, which were influenced by supplemental oxygen and heat. As expected, a massive decrease in both parameters was observed at only time point 0 (directly after induction) before external supplementation was initiated. However, the data quickly stabilized thereafter within a physiological range of 37.5–38.5°C.⁷ SpO₂ revealed sufficient spontaneous breathing (>95 vol%) in all groups. In only male mice administered KM + butorphanol, SpO₂ was decreased to 93 ± 6 vol% at 40 min; additionally, rattling breathing indicative of increased bronchial secretion was observed in some of these mice.

Discussion

A refinement of anaesthetic protocols for experimental mouse studies according to the 3Rs was aimed in the

Table 1. Comparison of anaesthetic stages and pedal withdrawal reaction (PWR) among groups (in mean \pm standard deviation).

	KM	SKM	KM + metamizole	SKM + metamizole	KM + butorphanol	SKM + butorphanol
Number of mice with loss of the PWR	15 of 16	9 of 16	16 of 16	11 of 16	16 of 16	16 of 16
Duration of the loss of the PWR (min)	37:00 \pm 8:11	20:00 \pm 4:19	35:94 \pm 6:07	17:16 \pm 5:10	43:45 \pm 2:14	24:03 \pm 5:50
Time point when more than 50% of mice (> eight mice) lost the PWR earliest	TP 10	TP 25	TP 10	TP 20	TP 5	TP 10
Induction time (min)						
♂	3:14 \pm 4:45	2:43 \pm 1:22	1:36 \pm 0:33	1:45 \pm 0:45	1:07 \pm 0:24	1:35 \pm 0:49
♀	1:13 \pm 0:23	1:57 \pm 1:02	1:18 \pm 0:42	2:02 \pm 1:10	1:23 \pm 0:31	1:15 \pm 0:33
Number of mice showing catalepsy ^a	2 ♂ 1 ♀	3 ♂	1 ♂			1 ♂
Number of mice showing excitations ^a	1 ♀	2 ♂ 3 ♀	3 ♀	5 ♀	1 ♂ 5 ♀	3 ♂ 3 ♀
Recovery time (min)						
♂	5:29 \pm 2:56	3:10 \pm 1:44	7:25 \pm 3:57	3:17 \pm 1:01	17:04 \pm 3:22	4:41 \pm 2:36
♀	5:42 \pm 1:54	4:36 \pm 2:24	8:23 \pm 6:05	2:59 \pm 1:03	13:17 \pm 4:14	5:33 \pm 2:05
Number of mice showing moderate ataxia	2 ♂ 1 ♀	6 ♂ 5 ♀	8 ♂ 8 ♀	6 ♂ 8 ♀	6 ♂ 6 ♀	8 ♂ 8 ♀
Duration of moderate ataxia (min)	26:08 \pm 17:34	19:38 \pm 12:21	33:18 \pm 15:29	26:25 \pm 11:50	42:05 \pm 18:01	24:11 \pm 12:25
Number of mice showing high-grade ataxia	1 ♂ 3 ♀	1 ♀	7 ♂ 8 ♀	6 ♂ 7 ♀	6 ♂ 8 ♀	8 ♂ 8 ♀
Duration of high-grade ataxia (min)	28:45 \pm 23:13	5:00	28:44 \pm 19:05	15:41 \pm 6:26	65:21 \pm 26:42	43:33 \pm 26:49

♂ male, ♀ female.

KM: ketamine + medetomidine, SKM: s-ketamine + medetomidine.

Loss of the PWR: no pedal withdrawal reaction to a painful stimulus.

Time points (TP) started with TP 0 = loss of the righting reflex; TP were measured every 5 min.

^aIncluding catalepsy/excitations before and after the loss of the righting reflex.

Table 2. Comparison of heart rate during anaesthesia among groups and sex (in mean \pm standard deviation).

Anaesthesia groups	TP 0	TP 5	TP 10	TP15	TP 20	TP 25	TP 30	TP 35	TP 40	TP 45
KM	387 \pm 83	370 \pm 78	340 \pm 56	345 \pm 53	354 \pm 52	351 \pm 51	346 \pm 51	346 \pm 51	338 \pm 53	336 \pm 53
male	371 \pm 79	383 \pm 80	357 \pm 64	372 \pm 60	391 \pm 42	385 \pm 42	375 \pm 52	375 \pm 52	364 \pm 59	360 \pm 62
female	404 \pm 89	358 \pm 80	324 \pm 45	318 \pm 26	317 \pm 30	317 \pm 33	316 \pm 30	317 \pm 32	313 \pm 33	313 \pm 33
SKM	308 \pm 67	266 \pm 46	278 \pm 48	293 \pm 46	303 \pm 47	312 \pm 42	308 \pm 40			
<i>Statistical significance</i>				$p = 0.005^a$		$p = 0.046^a$				
male	307 \pm 29	282 \pm 49	294 \pm 44	305 \pm 35	323 \pm 32	329 \pm 25	327 \pm 22			
female	310 \pm 102	250 \pm 40	262 \pm 48	281 \pm 55	284 \pm 54	295 \pm 50	290 \pm 46			
KM + Metamizole	301 \pm 79	329 \pm 88	348 \pm 66	355 \pm 61	356 \pm 61	362 \pm 64	356 \pm 62	362 \pm 59	358 \pm 56	359 \pm 51
<i>Statistical significance</i>										$p = 0.039^b$
male	293 \pm 71	340 \pm 82	372 \pm 73	372 \pm 73	363 \pm 76	374 \pm 78	367 \pm 75	369 \pm 69	364 \pm 66	358 \pm 65
female	310 \pm 94	318 \pm 97	325 \pm 52	338 \pm 44	348 \pm 47	351 \pm 49	346 \pm 47	355 \pm 51	352 \pm 46	360 \pm 38
SKM + Metamizole	258 \pm 42	259 \pm 43	278 \pm 46	296 \pm 57	305 \pm 50	312 \pm 53	321 \pm 54			
<i>Statistical significance</i>			$p = 0.012^a$	$p = 0.000^a$		$p = 0.000^a$	$p = 0.000^b$			
male	269 \pm 47	265 \pm 44	291 \pm 53	311 \pm 68	322 \pm 59	327 \pm 57	340 \pm 57			
female	249 \pm 39	254 \pm 44	266 \pm 39	283 \pm 46	291 \pm 38	298 \pm 48	305 \pm 49			
KM + Butorphanol	249 \pm 65	330 \pm 55	357 \pm 45	364 \pm 45	362 \pm 43	354 \pm 40	347 \pm 38	344 \pm 35	338 \pm 31	340 \pm 30
<i>Statistical significance</i>		$p = 0.002^a$								$p = 0.000^b$
male	237 \pm 34	306 \pm 43	371 \pm 51	374 \pm 52	372 \pm 59	371 \pm 50	359 \pm 48	358 \pm 40	355 \pm 25	359 \pm 23
female	262 \pm 87	355 \pm 57	342 \pm 35	354 \pm 37	352 \pm 18	338 \pm 17	335 \pm 20	330 \pm 26	320 \pm 28	324 \pm 26
SKM + Butorphanol	209 \pm 27	248 \pm 48	265 \pm 51	286 \pm 51	304 \pm 47	312 \pm 44	317 \pm 45			
<i>Statistical significance</i>		$p = 0.00^a$	$p = 0.0014^a$	$p = 0.000^a$	$p = 0.001^a$		$p = 0.000^b$			
male	213 \pm 17	259 \pm 54	287 \pm 57	309 \pm 55	329 \pm 51	328 \pm 49	331 \pm 51			
female	206 \pm 35	237 \pm 43	244 \pm 35	264 \pm 37	279 \pm 28	297 \pm 33	303 \pm 35			

KM: ketamine + medetomidine, SKM: s-ketamine + medetomidine; TP: time point.

^aSignificant difference between current and former time points.^bSignificant difference between time point 0 and end time point.

Table 3. Comparison of respiratory frequency during anaesthesia among groups and sex (in mean \pm standard deviation).

anaesthesia groups	TP 5	TP10	TP15	TP 20	TP 25	TP 30	TP 35	TP 40	TP 45
KM	150 \pm 23	158 \pm 22	162 \pm 21	163 \pm 20	166 \pm 22	168 \pm 19	167 \pm 19	171 \pm 18	172 \pm 19
<i>Statistical significance</i>		$p = 0.011^a$						$p = 0.014^a$	$p = 0.00^b$
male	162 \pm 17	167 \pm 20	169 \pm 17	170 \pm 14	173 \pm 18	173 \pm 15	171 \pm 17	175 \pm 19	173 \pm 18
female	139 \pm 24	148 \pm 21	155 \pm 23	156 \pm 23	159 \pm 25	163 \pm 22	162 \pm 20	167 \pm 17	170 \pm 21
SKM	138 \pm 20	144 \pm 15	150 \pm 17	155 \pm 18	155 \pm 15	156 \pm 13			
<i>Statistical significance</i>			$p = 0.036^a$	$p = 0.024^a$		$p = 0.001^b$			
male	149 \pm 15	154 \pm 10	158 \pm 12	164 \pm 6	162 \pm 12	159 \pm 10			
female	128 \pm 20	134 \pm 14	142 \pm 18	145 \pm 20	149 \pm 16	152 \pm 15			
KM + Metamizole	163 \pm 24	168 \pm 23	169 \pm 20	172 \pm 23	175 \pm 25	177 \pm 21	178 \pm 19	175 \pm 18	183 \pm 19
<i>Statistical significance</i>									$p = 0.024^a$ $p = 0.007^b$
male	165 \pm 28	171 \pm 22	168 \pm 21	176 \pm 20	178 \pm 23	178 \pm 22	177 \pm 17	176 \pm 18	184 \pm 20
female	162 \pm 22	165 \pm 25	171 \pm 20	167 \pm 26	173 \pm 29	177 \pm 22	179 \pm 22	175 \pm 19	181 \pm 19
SKM + Metamizole	156 \pm 22	158 \pm 22	158 \pm 20	160 \pm 20	162 \pm 15	160 \pm 18			
male	157 \pm 22	158 \pm 28	155 \pm 25	161 \pm 21	162 \pm 16	158 \pm 24			
female	156 \pm 23	159 \pm 16	162 \pm 17	160 \pm 19	162 \pm 16	163 \pm 13			
KM + Butorphanol	132 \pm 14	130 \pm 14	130 \pm 13	132 \pm 12	133 \pm 9	133 \pm 13	135 \pm 10	135 \pm 11	136 \pm 11
male	129 \pm 11	131 \pm 13	129 \pm 13	131 \pm 14	131 \pm 10	131 \pm 12	133 \pm 11	133 \pm 13	135 \pm 13
female	134 \pm 16	130 \pm 15	131 \pm 14	134 \pm 10	135 \pm 10	134 \pm 14	137 \pm 9	138 \pm 9	138 \pm 10
SKM + Butorphanol	123 \pm 20	127 \pm 19	129 \pm 16	128 \pm 17	130 \pm 17	135 \pm 16			
<i>Statistical significance</i>						$p = 0.01^b$			
male	124 \pm 22	130 \pm 22	132 \pm 19	130 \pm 20	135 \pm 18	139 \pm 20			
female	122 \pm 20	124 \pm 17	126 \pm 12	125 \pm 13	126 \pm 15	132 \pm 13			

KM: ketamine + medetomidine, SKM: s-ketamine + medetomidine; TP: time point.

^aSignificant difference between current and former time points.

^bSignificant difference between time point 0 and end time point.

current study by using s-ketamine at half of the dose of racemic ketamine in combination with medetomidine, while inducing an adequate surgical tolerance level as successfully reported in hamsters,¹³ cats¹⁴ and humans.¹⁵ Furthermore, anaesthesia may be better controlled by earlier antagonism of medetomidine to avoid a potential ketamine hangover with intense catalepsy.¹⁶ Additionally, analgesia for surgical procedures may be improved and prolonged by the addition of metamizole or butorphanol to basic KM or SKM anaesthesia. To test nociception during anaesthesia, we used the PWR as a reliable indicator of reaching surgical tolerance and sufficient analgesia in accordance with the studies of Arras et al.² and Buitrago et al.²⁰

The dose of ketamine (100 mg/kg) and medetomidine (1 mg/kg) was based on that used by Arras et al.² In contrast to that of SKM (50 mg/kg), the chosen dose of KM was sufficient to achieve a loss of PWR in nearly all of the C57BL/6J mice for a duration (37:00 \pm 8:11 min) sufficient for surgical procedures, although results of KM anaesthesia were not sufficient in other studies.^{2,3,6,20} In contrast, the tested SKM dose

was not satisfying since only nine out of 16 mice (three male, six female) lost the PWR for 20:00 \pm 4:19 min. Sex differences due to drug dosages in another mouse strain have previously been reported by Cruz et al.,⁴ whom, in contrast to our findings, observed that female Swiss Webster mice needed 55% more ketamine than male mice. Catalepsy during induction occurred in only a few male mice and one female mouse, whereas excitations were observed more often in female mice. Ataxia was observed in all groups after the righting reflex was regained, as also reported by the literature,^{21,22} and lasted longer in the KM group than in the SKM group, which was already known in hamsters¹³ and mice.²¹ Ataxia lasted for at most 2 h, and after this time, the mice showed normal locomotion and behaviour. This finding concurs with those of a study by Hjálmsdóttir.²² High-grade ataxia was more prevalent in female mice. This could have been caused by the ketamine which induces catalepsy by increasing the tonus of skeletal muscles,⁷ and because of the persistent activity of the muscles due to increased action in some subcortical regions,¹⁰ spontaneous limb movements can occur.⁷

This finding is also in accordance with that from Cesarovic et al.,²³ in which only s-ketamine was given as premedication, and all mice exhibited ataxia and tremor during induction. Furthermore, mice are a highly reflex-oriented species.²² Thus, reflex activity can persist while the dose of narcotics cannot be further increased without risk of death.²⁴ Caused by the partial antagonization of medetomidine, ataxia may be attributed to the described ketamine effect. In the s-ketamine protocols, the lower dose of s-ketamine may be responsible for the shorter duration of ataxia.

Sex differences were also observed during induction with SKM and KM, in which unconsciousness and loss of the PWR were achieved earlier in females than in males. This result may be caused by the higher percentage of fat in male mice than in female mice, as more lipophilic ketamine²⁵ accumulates in fat,²⁶ which may lead to a delayed effect. Before additional heat supply, the male mice of the KM group had a higher BT than the female mice, as also reported by Cruz et al.⁴ This difference may be due to the lower percentage of muscle in females than in males.²⁷ Within the SKM group, only three of the male mice, compared to six of the female mice, showed loss of the PWR over a certain time. As s-ketamine is the right-handed enantiomer of racemic ketamine,¹⁵ this sex difference may be caused by possible differences in the enzymatic system of hepatic metabolism.²⁶ The slight, continuous increase in RF over the course of anaesthesia, especially in the KM, SKM, KM + metamizole and SKM + butorphanol groups, may be due to increased BT, pain, insufficient anaesthetic level, hypoxia or hypercapnia. Due to the application of an external heat supply, the BT slowly increased during the course of anaesthesia to a physiological level but not to hyperthermia. We can exclude pain and an insufficient anaesthesia level as reasons for the respiratory depression, as the mice simultaneously exhibited loss of the PWR. Hypoxia was not observed by pulse oximetry, except in some males of the KM + butorphanol group, in which light hypoxia (SpO₂ < 95 vol%) was detected. Regarding hypercapnia, spontaneous respiration during anaesthesia may have led to sufficient but reduced gas exchange, as breathing became shallower. A compensatory reaction would have increased the RF.

The considerable decrease in HR in the SKM and KM groups followed by a continuous increase in HR after 15 min of anaesthesia may be caused by the phenylcyclidines and α 2-agonists. Ketamine likely activates the central sympatho-adrenergic system and depresses the reuptake of noradrenaline at the synaptic junction. Due to these effects, stimulation of the cardiovascular system follows, as indicated by tachycardia and hypertension.⁷ Medetomidine typically causes bradycardia, and within the first few minutes, peripheral

vasoconstriction results in an increase in blood pressure due to increased peripheral vessel resistance.⁷ As blood pressure was not monitored in the current study, we can only assume the simultaneous regulation of HR and blood pressure.

Overall, males showed higher RF and HR than females, except the female mice of the KM, SKM, KM + metamizole and KM + butorphanol groups, which initially had a higher HR at time point 0 than the male mice. This may be due to stress, which affects HR₂₉ and RF. As conscious female mice of these groups showed a higher level of activity and defence reactions than male mice, the higher initial HR may be caused by their higher stress level during handling for drug administration. Hence, the induction time was very fast, and the adaptation of HR to anaesthesia in female mice may have taken longer than that in male mice. In accordance with the study by Xing et al.,³⁰ the higher HR in male C57BL/6J mice after administration of anaesthesia may be influenced by their genetic background. Flandre et al.³¹ previously reported a higher RF in male mice than in female mice, which may have been caused by differences in hormones.³² When using SKM, inspiratory breathing was deeper and more effective in females than in males, as females regained physiological SpO₂ immediately after receiving an oxygen supply, whereas males regained physiological SpO₂ only after 15 min, despite their higher RF. Additionally, according to Voipio et al.,⁶ females take longer to regain the righting reflex during recovery than males, which may be caused by different hepatic metabolism of (s-)ketamine between males and females.²⁶

For ketamine + α 2-agonist combinations, the depth and duration of surgical tolerance vary widely among individuals.^{2,3,5,6,20,21} Therefore, we investigated two additional analgesics that are commonly used in veterinary practice and are useful for treating moderate pain. Depending on the painful stimulus of the experiment, more potent analgesics could be necessary. Butorphanol, an opiate agonist-antagonist,⁷ was recommended for use combined with dexmedetomidine + tiletamine + zolazepam in mice by Cagle et al.³³ and combined with medetomidine + midazolam by Kawai et al.³⁴ As shown in other species^{35,36} and in mice,^{37,38} metamizole is a potent analgesic and can reduce the required dose of other anaesthetics when administered in combination. The doses of butorphanol and metamizole were chosen in accordance with Erhardt et al.⁷

With the exception of the SKM + metamizole group, the PWR was lost in all groups with additional administration of analgesia. However, compared to pure SKM treatment, metamizole premedication was able to increase the percentage of mice that lost the PWR from 56 to 69%. Anaesthesia was induced more quickly

with premedication in male mice as well as in female mice of the SKM + butorphanol group than without premedication (see Table 1), which can be explained by the sedative effect of butorphanol⁷ and by the antagonistic effect of metamizole on NMDA receptors of the central nervous system.^{11,39} The combination of KM + butorphanol induced the best analgesic effect. However, the addition of butorphanol to KM led to more side effects, especially short-term mild to moderate excitation. Opioids are able to reduce the threshold of excitation in the central nervous system as they are weak partial μ -agonists.^{7,40} In contrast, all four premedicated groups showed less catalepsy than the groups without premedication, as both butorphanol⁴¹ and metamizole may reduce the high skeletal muscle tonus caused by (s-)ketamine. As metamizole is known to induce spasmolytic action in smooth muscles, supposedly by inhibiting the release of intracellular Ca^{2+} ,^{7,42} it may also influence skeletal muscle when administered in combination with $\alpha 2$ -agonists, as not all mechanisms of action have been identified thus far. In the premedicated KM groups, both metamizole and especially butorphanol clearly prolonged the time to regaining the righting reflex after antagonism, which is caused by the slight sedative effect of butorphanol³³ that was unaffected by atipamezole antagonism⁹ and by the dose-dependent sedative effect of metamizole.⁴³ The mean RF, HR and SpO₂ were lower in the butorphanol groups directly after induction than in the metamizole groups. In contrast to basic KM and SKM, all groups that received premedication started with a markedly lower HR at time point 0, but the HR increased significantly during the anaesthetic period (*p*-values are shown in Table 3). The opioid analgesic butorphanol produces a sedative effect on the central nervous system and depresses breathing by affecting μ -opioid receptors^{25,40} and circulation (blood pressure and HR). Metamizole is known to decrease blood pressure after fast intravenous injection.⁷ In this study, metamizole was given orally. As no primary decrease in HR was observed directly after induction in the metamizole groups, orally administered metamizole does not seem to notably influence the cardiovascular system. This observation may be due to the influence of stomach content on the onset of oral medication,⁴⁵ as rodents do not need to be fasted prior to anaesthetic induction.⁴⁴ Supplementation of 100% oxygen under spontaneous breathing was sufficient in all mice except male mice of the KM + butorphanol group beginning at time point 40, at which time these mice reached only 93 ± 6 vol%, and some exhibited the rattling breathing characteristic of increased bronchial secretion. Massive bronchial secretion during recovery was observed in 10 out of 16 male mice and in half of the female mice of both groups

premedicated with butorphanol. Ketamine induces salivary and bronchial secretion,^{10,44} which appears to be intensified by the addition of butorphanol, especially in males. Whether premedication with atropine, as recommended by Flecknell,⁴⁴ is able to reduce this bronchial secretion needs to be examined in further studies. Additionally, the male mice of the KM + butorphanol group required the longest recovery period. As male mice have a higher percentage of fat, the extended recovery may be caused by the lipophilic property of butorphanol,⁴⁶ which may possibly allow butorphanol to accumulate in the body.

The noticeable difference in sex in all premedicated groups has been previously shown for basic anaesthesia, as the mean HR in male mice is consistently higher than that in female mice. Xing et al.³⁰ also reported a higher HR in male C57BL/6J mice than in female mice. A key reason for this sex difference, aside from an age difference,³⁰ is the contrasting hormone activity, which affects the cardiovascular system by modulating ventricular repolarization.⁴⁷

In summary, our aims were not completely achieved, as the PWR was not lost in all mice under the s-ketamine protocol, which has also been shown in dogs.⁴⁸ Therefore, more detailed dose-evaluation studies on the SKM combination are necessary. However, earlier antagonism of medetomidine in combination with s-ketamine resulted in a qualitatively better and shorter recovery. Improvements in analgesia were observed following the use of (s-)ketamine + medetomidine protocols with the addition of either butorphanol or metamizole. The addition of butorphanol to the basic anaesthetic protocols markedly increased the mean duration for which the PWR was absent. The addition of metamizole or butorphanol to SKM increased the number of mice that exhibited a loss of the PWR. Premedication, especially by pre-emptively administered butorphanol, allowed a notably shorter anaesthesia induction time than that without premedication, especially in males, and decreased ketamine-based catalepsy. However, the excitation rate during induction increased when using the KM-based protocols. A disadvantage of adding butorphanol to KM was the development of insufficient respiration and massive bronchial secretion in male mice after 40 min. Therefore, equipment for intubation and mechanical ventilation should be available when using this combination. Regarding recovery, butorphanol had a longer lasting sedative effect than metamizole, and ataxia was more pronounced. A dose reduction should be considered when using butorphanol in this mouse strain. No disadvantage was observed following the use of metamizole, and pre-operative application of this analgesic in combination with KM and SKM is therefore highly recommended.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

ORCID iD

C Bauer  <http://orcid.org/0000-0003-2970-4450>

References

1. Abou-Madi N. Anesthesia and analgesia of small mammals. In: Gleed RD and Ludders JW (eds) *Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion animals*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service, 2006, A1408.0106.
2. Arras M, Autenried P, Rettich A, et al. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 2001; 51: 443–456.
3. Burnside WM, Flecknell PA, Cameron AI, et al. A comparison of medetomidine and its active enantiomer dexmedetomidine when administered with ketamine in mice. *BMC Vet Res* 2013; 9: 48.
4. Cruz JI, Loste JM and Burzaco OH. Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Lab Anim* 1998; 32: 18–22.
5. Taylor R, Hayes KE and Toth LA. Evaluation of an anesthetic regimen for retroorbital blood collection from mice. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000; 39: 14–17.
6. Voipio HM, Nevalainen TO and Virtanen R. Evaluation of anesthetic potency of medetomidine-ketamine combination in mice. In: Erichsen S, Coates ME and Chatikavanij P (eds) *Proceedings of the 9th ICLAS Symposium on Laboratory Animal Science*, Bangkok, Thailand, 1988, pp.298–299.
7. Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, et al. *Anaesthesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Voegeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2nd ed. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2012, pp.17–110, 383–431, 703–725.
8. Riviere J and Papich M. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 9th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2009, p.325.
9. Izer JM, Whitcomb TL and Wilson RP. Atipamezole reverses ketamine-dexmedetomidine anesthesia without altering the antinociceptive effects of butorphanol and buprenorphine in female C57BL/6J mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014; 53: 675–683.
10. Thiel H. *Anaesthesiologische Pharmakotherapie RN – Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. 3rd ed. Stuttgart: Thieme Verlag, 2014, pp.122–139.
11. Khodai L. *Hemmung humaner NMDA-Rezeptoren durch Metamizol und dessen Metabolit 4-Aminoantipyrin*. PhD Thesis, Westphalian Wilhelms-University of Münster, Germany, 2008.
12. Nassini R, Fusi C, Materazzi S, et al. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 3397–3411.
13. Erhardt W, Wohlrab S, Kiliç N, et al. Comparison of the anaesthesia combinations racemic-ketamine/medetomidine and s-ketamine/medetomidine in Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Vet Anaesth Anal* 2001; 28: 212–213.
14. Stelter A. *Die Anaesthesie bei der Katze mit Medetomidin und Ketamin bzw. S-Ketamin – eine klinische Studie*. PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany, 2001.
15. Himmelseher S and Pfenninger E. The clinical use of S-(+)-ketamine—a determination of its place. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1998; 33: 764–770.
16. Baker NJ, Schofield JC, Caswell MD, et al. Effects of early atipamezole reversal of medetomidine-ketamine anesthesia in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50: 916–920.
17. Wohlrab S. *Vergleichsuntersuchungen der Anaesthetika-Kombinationen Ketamin- Razemat/Medetomidin und S-(+)-Ketamin/Medetomidin und deren Teilantagonisierung mit Atipamezol beim Syrischen Goldhamster (Mesocricetus auratus)*. PhD Thesis, Ludwig-Maximilians-University of Munich, Germany, 2001.
18. Kirihara Y, Takechi M, Kurosaki K, et al. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp Anim* 2013; 62: 173–180.
19. Mähler Convenor M, Berard M, et al.; FELASA working group on revision of guidelines for health monitoring of rodents and rabbits. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 2014; 48: 178–192.
20. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, et al. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008; 47: 11–17.
21. Kiliç N and Henke J. Comparative studies on the effect of S-(+)-ketamine-medetomidine and racemic ketamine-medetomidine in the mouse. *YYÜ Vet Fak Derg* 2004; 15: 15–17.
22. Hjálmsdóttir B. *Haemodynamische Untersuchung zur vollstaendig antagonisierbaren Anaesthesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl im Vergleich zur Ketamin/Xylazin-Kombinationsanaesthesie bei der Maus*. PhD Thesis, Technical University of Munich, Germany, 2005.
23. Cesarovic N, Jirkof P, Rettich A, et al. Combining sevoflurane anesthesia with fentanyl-midazolam or s-ketamine in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 209–218.

24. Smith W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. *Lab Anim* 1993; 27: 30–39.
25. Ammer H and Potschka H. Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In: Frey HH and Loescher W (eds) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3rd ed. Stuttgart: Enke Verlag, 2010, pp.133–143.
26. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, et al. Mice anesthesia, analgesia and care, part I: Anesthetic considerations in preclinical research. *Ar J* 2012; 53: E55–E69.
27. Griffin GE and Goldspink G. The increase in skeletal muscle mass in male and female mice. *Anat Rec* 1973; 177: 465–469.
28. Janssen BJA, de Celle T, Debets JJM, et al. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1618–H1624.
29. Späni D, Arras M, König B, et al. Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Lab Anim* 2003; 37: 54–62.
30. Xing S, Tsaih SW, Yuan R, et al. Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296: H1907–H1913.
31. Flandre TD, Leroy PL and Desmecht DJM. Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1129–1136.
32. Tsunoda K, Lee XP, Watanabe S, et al. Sex differences in respiratory and cardiovascular effects of beta-endorphin. *Nihon Hoigaku Zasshi* 1993; 47: 193–201.
33. Cagle LA, Franzi LM, Epstein SE, et al. Injectable anesthesia for mice: combined effects of dexmedetomidine, tiletamine-zolazepam, and butorphanol. *Anesthesiol Res Practice* 2017; 2017: 9161040.
34. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, et al. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 2011; 60: 481–487.
35. Baumgartner C, Koenighaus H, Ebner J, et al. Comparison of dipyrone/propofol versus fentanyl/propofol anaesthesia during surgery in rabbits. *Lab Anim* 2011; 45: 38–44.
36. Richter T, Pieper K, Henke J, et al. Intraoperative analgesia in dogs with metamizole and/or fentanyl for hip replacement. In: *Proceedings of the Autumn Meeting of the Association of Veterinary Anaesthetists and the European College of Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, Leipzig, Germany, 2007, 19–21, p.53.
37. Brito BE, Vazquez E, Taylor P, et al. Antinociceptive effect of systemically administered dipyrone (metamizol), magnesium chloride or both in a murine model of cancer. *Eur J Pain* 2017; 21: 541–551.
38. Stumpf F, Algül H, Thoeringer CK, et al. Metamizol relieves pain without interfering with cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Pancreas* 2016; 45: 572–578.
39. Akman H, Aksu F, Gültekin I, et al. A possible central antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Pharmacology* 1996; 53: 71–78.
40. Garner HR, Burke TF, Lawhorn CD, et al. Butorphanol-mediated antinociception in mice: partial agonist effects and Mu receptor involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 1253–1261.
41. Kruluc P and Nemeč A. Electroencephalographic and electromyographic changes during the use of detomidine and detomidine-butorphanol combination in standing horses. *Acta Vet Hung* 2006; 54: 35–42.
42. Gulmez SE, Gurdal H and Tulunay FC. Airway smooth muscle relaxations induced by dipyrone. *Pharmacology* 2006; 78: 202–208.
43. EMEA Committee for Veterinary Medicinal Products. Metamizole - Summary. EMEA/MRL/878/03. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections, London, UK, June 2003 Report (2).
44. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*. 4th ed. Oxford: Elsevier, 2016, p.4754.
45. Reinhardt N, Jantos R, Sinning C, et al. Metamizol-Renaissance eines Analgetikums. *Pharmazeut Zeitung Online* 2006; 32.
46. Kumar A, Kumar R, Verma VK, et al. A randomized controlled study between fentanyl and butorphanol with low dose intrathecal bupivacaine to facilitate early post-operative ambulation in urological procedures. *Anesth Essays Res* 2016; 10: 508–511.
47. Saito T, Ciobotaru A, Bopassa JC, et al. Estrogen contributes to gender differences in mouse ventricular repolarisation. *Circ Res* 2009; 105: 343–352.
48. Duque JC, Oleskovicz N, Guirro ECBP, et al. Relative potency of ketamine and S(+)-ketamine in dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 2008; 31: 344–348.

Résumé

Conformément à la composante de « raffinement » des 3R, le principal objectif de cette étude était d'étudier et de comparer les protocoles anesthésiques associant d'une part la kétamine + médétomidine (KM) et d'autre part la s-kétamine + médétomidine (SKM) chez les souris C57BL/6J (des deux sexes). Nous avons cherché à déterminer si la s-kétamine pourrait fournir une tolérance chirurgicale adéquate à une dose de 50% par rapport à celle de la kétamine racémique et si l'antagonisme de la médétomidine pouvait être initié 15 min plus tôt. Le deuxième objectif était d'étudier l'amélioration potentielle de l'analgésie dans le cas des deux protocoles anesthésiques en ajoutant du butorphanol ou du métamizole. L'analgésie était testée via le réflexe de retrait de la patte (RRP) à un stimulus douloureux. Au cours de l'anesthésie, l'oxymétrie du pouls, la fréquence respiratoire, la température corporelle et le RRP ont été surveillés. Parmi les 16 souris de chaque groupe, toutes celles du groupe KM + métamizole (35:56 ± 6:07 min), du groupe KM + butorphanol (43:45 ± 2:14 min) et du groupe SKM + butorphanol (24:03 ± 5:50 min) ont perdu ce réflexe, ainsi que 15 des

souris n'ayant pas fait l'objet d'une prémédication KM ($37:00 \pm 8:11$ min) et 9 des souris du groupe SKM pur ($20:00 \pm 4:19$ min); ce dernier groupe est passé à 11 souris ($17:16 \pm 5:10$ min) avec une prémédication au métamizole. Contrairement à la combinaison racémique, la s-kétamine à la dose utilisée ici n'a pas conduit une perte suffisante du réflexe. Toutefois, l'antagonisme partiel de SKM plus précoce a donné lieu à une récupération un peu plus courte et qualitativement meilleure que l'antagonisme partiel plus tardif de SKM. L'ajout de métamizole ou de butorphanol à l'anesthésie par KM ou SKM influence positivement la qualité de l'analgésique. Cependant, lorsque le butorphanol est ajouté, une ventilation contrôlée peut s'avérer nécessaire, en particulier pour les souris mâles.

Abstract

Im Einklang mit der "Verbesserungskomponente" des 3R-Prinzips (Verbesserung, Verringerung, Vermeidung) war das Hauptziel dieser Studie die Untersuchung und der Vergleich von Ketamin + Medetomidin (KM) und S-Ketamin + Medetomidin (SKM) basierten Anästhesieprotokollen bei C57BL/6J-Mäusen (beide Geschlechter). Wir wollten ermitteln, ob S-Ketamin eine ausreichende chirurgische Toleranz bei einer Dosis von 50% im Vergleich zu der des Ketamin-Racemat bieten würde und ob der Medetomidin-Anteil 15 Min früher antagonisiert werden kann. Das zweite Ziel war es, eine mögliche Verbesserung der Analgesie für beide Anästhesieprotokolle durch Zugabe von Butorphanol oder Metamizol zu untersuchen. Die Analgesie wurde über die Fußrückziehreflexion (PWR) auf einen schmerzhaften Reiz getestet. Während der Anästhesie wurden Atemfrequenz, Pulsoximetrie, Körpertemperatur und PWR überwacht. Von den 16 Mäusen in jeder Gruppe zeigte sich ein Verlust der PWR bei allen Mäusen der KM + Metamizol ($35:56 \pm 6:07$ Min)-, KM + Butorphanol ($43:45 \pm 2:14$ Min)- und SKM + Butorphanol ($24:03 \pm 5:50$ Min)-Gruppen, bei 15 der nicht-prämedizierten KM ($37:00 \pm 8:11$ Min)-Gruppe und bei 9 der reinen SKM ($20:00 \pm 4:19$ Min)-Gruppe. Diese letzte Gruppe wurde auf 11 Mäuse ($17:16 \pm 5:10$ Min) mit Prämedikation von Metamizol erhöht. Im Gegensatz zur racemischen Kombination führte S-Ketamin in der hier verwendeten Dosis nicht zu einem ausreichenden PWR-Verlust. Eine frühere Antagonisierung des Medetomidin-Anteils der SKM-Gruppe führte jedoch zu einer etwas schnelleren und qualitativ besseren Erholung. Die Zugabe von Metamizol oder Butorphanol zu KM- oder SKM-Narkosen beeinflusst die analgetische Wirkung positiv. Bei Butorphanolzugabe ist u. U. jedoch eine kontrollierte Beatmung erforderlich, insbesondere bei männlichen Mäusen.

Resumen

De acuerdo con el componente de «refinamiento» de las 3R, el objetivo principal de este estudio fue investigar y comparar los protocolos de anestesia con ketamina + medetomidina (KM) y s-ketamina + medetomidina (SKM) en ratones C57BL/6J (de ambos sexos). Queríamos determinar si la s-ketamina podía ofrecer una tolerancia quirúrgica adecuada a una dosis del 50% relativa a la de racemato de ketamina y si el antagonismo de medetomidina podía iniciarse 15 min antes. El segundo objetivo era investigar la mejora potencial en la analgesia para ambos protocolos anestésicos añadiendo butorfanol o metamizol. La analgesia fue probada a través de la reacción de retiro pedal (PWR) ante un estímulo doloroso. Durante la anestesia, se controló la frecuencia respiratoria, la oximetría del pulso, la temperatura corporal y la PWR. Entre los 16 ratones de cada grupo, la PWR se perdió en todos los ratones con KM + metamizol ($35:56 \pm 6:07$ min), KM + butorfanol ($43:45 \pm 2:14$ min) y SKM + butorfanol ($24:03 \pm 5:50$ min), 15 de los ratones no premedicados KM ($37:00 \pm 8:11$ min) y 9 de los ratones puros SKM ($20:00 \pm 4:19$ min); el último grupo aumentó a 11 ratones ($17:16 \pm 5:10$ min) con premedicación de metamizol. En contraste con la combinación racémica, s-ketamina a la dosis utilizada aquí no llevó a una pérdida suficiente de la PWR. Sin embargo, un antagonismo parcial anterior de SKM resultó en una recuperación ligeramente inferior y cualitativamente mejor que el antagonismo parcial posterior de SKM. La adición de metamizol o butorfanol a la anestesia KM o SKM influye positivamente en la calidad analgésica. No obstante, cuando se añade butorfanol, puede que sea necesaria una ventilación controlada, especialmente para los ratones machos.

4. PUBLIKATION 2

Das folgende Manuskript „Untersuchung der Narkoseprotokolle Ketamin + Medetomidin sowie S-Ketamin + Medetomidin mit und ohne Ergänzung von Butorphanol oder Metamizol im Vergleich zur vollantagonisierbaren Narkose (MMF) bei Mäusen“ ist zur Publikation vorbereitet.

Untersuchung der Narkoseprotokolle Ketamin + Medetomidin sowie S-Ketamin + Medetomidin mit und ohne Ergänzung von Butorphanol oder Metamizol im Vergleich zur vollantagonisierbaren Narkose (MMF) bei Mäusen

C. Bauer*, J. Brandl*, U. Schillinger*, A. Meyer-Lindenberg[~], A. Ott[°], C. Baumgartner*

* *Zentrum für präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Deutschland*

[~] *Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Veterinärstr. 13, 80539 München, Deutschland*

[°] *Institut für medizinische Statistik und Epidemiologie, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Deutschland*

Korrespondenzadresse:

Caroline Bauer, Zentrum für präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Str. 22, 81675 München, Deutschland, christine.baumgartner@tum.de

Zusammenfassung

Unter dem Aspekt des „Refinement“ im Tierversuch, haben wir bei C57BL/6J Mäusen (beide Geschlechter) verschiedene Narkoseprotokolle in Hinblick auf die Steuerbarkeit der Narkosedauer sowie die mögliche analgetische Potenz evaluiert. So wurden die teilantagonisierbaren Narkoseprotokolle Ketamin + Medetomidin (KM) und S-Ketamin + Medetomidin (SKM) jeweils mit und ohne Ergänzung der Analgetika Butorphanol und Metamizol mit der vollantagonisierbaren Kombination Medetomidin + Midazolam + Fentanyl (MMF) verglichen. Die Tiefensensibilität als verlässlicher Indikator für das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums und somit einer ausreichenden Analgesie wurde mit Hilfe der Fußrückziehreflexion getestet. Während der Narkose wurden Herz- und Atemfrequenz, periphere Sauerstoffsättigung und Körpertemperatur sowie Lid- und Zwischenzehenreflex evaluiert. Alle Ketaminrazemat-basierten Narkoseprotokolle sowie das Narkoseregime SKM + Butorphanol führten zu einer guten und zuverlässigen chirurgischen Toleranz. Der Anteil an Mäusen mit Verlust der Fußrückziehreflexion der S-Ketamin-basierten Gruppen konnte durch die präemptive Gabe von Metamizol oder Butorphanol gesteigert werden. Die 15 Minuten frühere Teilantagonisierung des Medetomidin-Anteils in den S-Ketamin-basierten Narkosen führte zu einer etwas kürzeren Aufwachdauer sowie einer besseren Rekonvaleszenz der Mäuse. Die MMF Narkose kann dagegen vollständig antagonisiert werden unter Beachtung des Resedationsphänomens.

Schlüsselwörter

Anästhesie, Analgesie, Mäuse, Ketamin, S-Ketamin, Medetomidin, Butorphanol, Metamizol, MMF, 3R

Einleitung

Aufgrund verschiedener Einflussfaktoren wie zum Beispiel Körpergröße, Gewicht, starker stammspezifische Unterschiede [1–4] sowie unterschiedlicher Reflexaktivität während der Narkose [5], sind Mäuse eine recht schwierige Spezies für eine Anästhesie und Analgesie. Im Rahmen der Narkose müssen diese Faktoren stets bedacht werden und sind Ursache für die große Varianz in der Studienlage. Die publizierten Möglichkeiten, eine gut steuerbare und chirurgisch tolerante Anästhesie für entsprechend schmerzhaft eingriffe durchzuführen, sind bei Mäusen überschaubar. Neben einer Inhalationsanästhesie in Kombination mit einem entsprechendem Schmerzmittel [6] werden bei reinen Injektionsnarkosen hauptsächlich Ketamin + α 2-Agonist Kombinationen sowie die vollantagonisierbare Medetomidin-Midazolam-Fentanyl-Kombination verwendet [7–13]. Für die Anästhesie bei Mäusen ist es wichtig, die Vor- und Nachteile sowie die Grenzen der verschiedenen Möglichkeiten zu kennen, um für die individuelle Situation die beste und sicherste Variante auszuwählen. Die Kombination Ketamin + Medetomidin ist in praxi sehr beliebt. Ihre Nachteile liegen jedoch vor allem in der schlechten Steuerbarkeit, da nur der Medetomidinanteil antagonisiert werden kann und dies auch frühestens nach 40 Minuten, um einen Ketaminüberhang in Form von klonisch-tonischen Krämpfen zu vermeiden [14,15]. Zudem ist für das Stadium der chirurgischen Toleranz ein individuell stark variierendes Zeitfenster beschrieben [16] und in einigen Studien wurde dieses Narkosestadium nicht erreicht [7,17]. Um diese Nachteile zu verbessern, haben wir eine Studie zum Vergleich von teilantagonisierbaren Narkoseprotokollen mit Ketamin + Medetomidin (KM) und S-Ketamin + Medetomidin (SKM), jeweils mit und ohne Ergänzung zusätzlicher Analgetika wie Butorphanol und Metamizol, bei C57BL/6J Mäusen beider Geschlechter veröffentlicht [18]. Ziel der Studie war es zum einen, mit einer 50% Dosisreduktion von S-Ketamin im Vergleich zu dem Ketamin-Razemat eine ausreichende chirurgische Toleranz zu erreichen, zum anderen aber auch eine 15 Minuten frühere Antagonisierung des Medetomidin-Anteils durch Atipamezol bei den SKM Gruppen zu ermöglichen ohne einen Ketaminüberhang zu erzeugen. Hierdurch sollte die Steuerbarkeit der Narkose verbessert werden. Eine Dosisreduktion um 50% von S-Ketamin im Vergleich zum Razemat führte jedoch nicht zu einer reproduzierbaren chirurgischen Toleranz. Die frühere Antagonisierung hingegen führte zu einer etwas kürzeren Aufwachdauer sowie einer besseren Rekonvaleszenz der Mäuse. Des Weiteren sollte eine mögliche Verbesserung der Analgesie der beiden Basisnarkosen KM und SKM durch eine präoperative Gabe von Butorphanol beziehungsweise Metamizol erreicht werden. Die präemptive Gabe von Butorphanol und Metamizol zu den Basisnarkosen hat die analgetische Qualität deutlich

verbessert [18]. Aufgrund fehlender Nebenwirkungen empfehlen wir für mäßig schmerzhafte Eingriffe Metamizol uneingeschränkt. Butorphanol hingegen führte vor allem aufgrund seiner sedativen Eigenschaft zu verlängerten Aufwachphasen [18]. Metamizol und Butorphanol wirken in Kombination mit Medetomidin und S-/Ketamin jedoch in der Regel nicht ausreichend analgetisch für Eingriffe, die mit starken Schmerzen verbunden sind wie zum Beispiel Thorakotomien. Hierfür müssen intraoperativ starke Opiate, wie zum Beispiel Fentanyl verwendet werden [15]. In Kombination mit Medetomidin und Midazolam bildet Fentanyl eine gut steuerbare, vollständig antagonisierbare Anästhesie bei Mäusen [8,9]. Die benötigte Dosis, aber auch die jeweilige Wirkung, kann bei Mäusen allerdings starken stammspezifischen Schwankungen unterliegen [8,9,11]. Deshalb untersuchen wir hier die validierte MMF-Narkose mit denselben C57BL/6J Mäusen wie in unserer bereits publizierten Studie, um die chirurgische Toleranz sowie die Steuerbarkeit in Form einer Antagonisierung der Narkose direkt vergleichen zu können. Zusätzlich haben wir in unseren Studien einen Geschlechtervergleich integriert, da auch diese Varianz deutlichen Einfluss auf das Mausnästhesieregime haben kann [1,7,19,20].

Material und Methoden Übersicht

Diese Studie wurde gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz sowie der Richtlinie 2010/63/EU durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Gz.: 55.2-1-54-2532-186-2015) und durchgeführt. Das Stressniveau für die Mäuse wurde als gering eingestuft.

Tiere, Unterbringung und Versorgung

In jeder der sieben Gruppen wurden jeweils 8 männliche ($30,4 \pm 3,0$ g) und 8 weibliche ($23,4 \pm 1,7$ g) C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 15-20 Wochen in Narkose gelegt.

Um die Tierzahlen im Sinne des Tierschutzes so gering wie möglich zu halten, wurde jede Maus nach einer „Wash Out Periode“ von mindestens 2 Wochen ein zweites Mal anästhesiert. Die Zuordnung zu den einzelnen Gruppen erfolgte randomisiert.

Nach Abschluss dieser Studie und einer Erholungsphase von mindestens 3 Wochen wurden die Mäuse gemäß der behördlichen Genehmigung einem anderen finalen „low stress“ Versuch zugeteilt.

Die Mäuse wurden gemäß der FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations) Leitlinien unter SPF (specific-pathogen-free) Bedingungen [21] in Gruppen (2 - 5 Mäuse pro Käfig, 435,7 cm² Bodenfläche) in individuell ventilierten Käfigen (Käfig Typ 9, Maxi-Miser Thoren-Caging-System, Thoren Caging Systems Inc., Pennsylvania, USA) auf speziellem Holzstreu (Select Fine, Sniff, Deutschland) gehalten. Autoklaviertes und standardisiertes Nagerfutter (Altomin No. 1324SP, Lage, Deutschland) sowie Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Autoklavierte Zellulose, Pappelholzklötze und Nester (Bioscape, Castrop-Rauxel, Deutschland) sowie rote Polycarbonat-Häuser (Bioscape, Castrop-Rauxel, Deutschland) wurden zur Umgebungsanreicherung in die Käfige gegeben. Die Raumtemperatur betrug

22±2 °C und es herrschte eine Luftfeuchte von 45-60%. Die Tiere wurden unter einem 12/12 h Tag/Nacht Zyklus mit 30 Minuten Dämmerungsphase gehalten.

Medikamente und Versuchsablauf

Die Mäuse wurden präanästhetisch nicht gefastet. Nach dem Wiegen und einer adspektorischen Untersuchung wurden entweder die präemptive Analgesie mit Butorphanol subkutan (s.c.) beziehungsweise Metamizol oral (p.o.), oder in den Gruppen ohne Prämedikation die jeweilige Anästhetikakombination in einer Mischspritze intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Die Gruppen mit präemptivem Butorphanol und Metamizol erhielten die Narkoseeinleitung 30 Minuten später ebenfalls i.p..

Jeweils 8 männliche und 8 weibliche Mäuse wurden zu einer der sieben Gruppen randomisiert zugeordnet. Eine Übersicht über die Gruppen und die verwendeten Anästhetika befindet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Übersicht Narkoseprotokolle und verwendete Anästhetika/Analgetika

Gruppe	Wirkstoffe inklusive Dosierung	Injektionsvolumen
MMF	Medetomidin ¹ 0,67 mg/kg	6,8 µl/10g
	+ Midazolam ² 6,67 mg/kg	13,4 µl/10g
	+ Fentanyl ³ 0,07 mg/kg	14 µl/10g
KM	Ketamin ⁴ 100 mg/kg	10 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
SKM	S-Ketamin ⁵ 50 mg/kg	20 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
KM+ Metamizol	Ketamin ⁴ 100 mg/kg	10 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
	+ Metamizol ⁶ 150 mg/kg	3 µl/10g
SKM+ Metamizol	S-Ketamin ⁵ 50 mg/kg	20 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
	+ Metamizol ⁶ 150 mg/kg	3 µl/10g
KM+ Butorphanol	Ketamin ⁴ 100 mg/kg	10 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
	+ Butorphanol ⁷ 2,5 mg/kg	2,6 µl/10g
SKM+ Butorphanol	S-Ketamin ⁵ 50 mg/kg	20 µl/10g
	+ Medetomidin ¹ 1 mg/kg	2,6 µl/10g
	+ Butorphanol ⁷ 2,5 mg/kg	2,6 µl/10g

¹ Sedator 1 mg/ml, Albrecht GmbH

² Midazolam Hexal 5 mg/ml, Hexal AG

³ Fentadon 50 µg/ml, Albrecht GmbH

⁴ Narketan 100 mg/ml, Vétoquinol GmbH

⁵ Ketanest-S 25 mg/ml Pfizer Pharma PFE GmbH

⁶ Metamizol 500 mg/ml, Hexal AG

⁷ Alvegesic vet. 10 mg/ml, Selectavet

Die Dosierungen der Anästhetikakombinationen wurden entsprechend der Literatur gewählt, so dass eine ausreichende, aber auch nicht zu tiefe Anästhesie zu erwarten war [10,11,16,17]. Da es in Vorversuchen bei demselben Mausstamm zu einer mangelnden Anästhesietiefe kam, wurde die Dosis der MMF Narkose ähnlich einer anderen Studie [9] um ein Drittel höher gewählt als ursprünglich in der Literatur angegeben [8,11].

Der Zeitpunkt der Antagonisierung des Medetomidin-Anteils wurde bei den KM Gruppen nach 45 Minuten und bei den SKM Gruppen nach 30 Minuten gewählt. Die MMF Narkose kann erfahrungsgemäß jederzeit vollständig oder auch nur teilweise (ohne Naloxon) antagonisiert werden. In Vergleichsstudien betrug die Narkosedauer 50-60 Minuten und wurde durch die Verabreichung der Antagonisten beendet [8,9]. Um die Narkoseparameter mit den S-/Ketamin basierten Narkoseprotokollen zu allen Zeitpunkten vergleichen zu können, wurde die MMF Gruppe in dieser Studie nach 45 Minuten vollständig antagonisiert. Eine Übersicht der subkutan (s.c.) applizierten Antagonisten befindet sich in Tabelle 2.

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Antagonisten

Gruppe	Wirkstoffe inklusive Dosierung	Injektionsvolumen
Medetomidin + Midazolam + Fentanyl	Atipamezol ¹ 3,33 mg/kg + Flumazenil ² 0,67 mg/kg + Naloxon ³ 1,60 mg/kg	6,6 µl/10g 67 µl/10g 40 µl/10g
Medetomidin basierte Protokolle	Atipamezol ¹ 5 mg/kg	2,6 µl/10g

¹ Antisedan 5 mg/ml, Vétoquinol GmbH

² Flumazenil Hexal 0,1 mg/ml, Hexal AG

³ Naloxon 0,4 mg/ml, B. Braun Melsungen AG

Bis zum Zeitpunkt der Narkoseeinleitung hatten alle Mäuse stets freien Zugang zu Wasser sowie Futter und durften in ihrer bestehenden Gruppe bleiben, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten.

Direkt nach i.p. Injektion der Anästhetika wurden die Mäuse für die Dauer der Einschlafphase zurück in den abgedunkelten Käfig gesetzt, da die Tiere sich in Gesellschaft [22] deutlich wohler zu fühlen schienen und nicht durch die Partnertiere gestört wurden.

Der erste Messzeitpunkt zur Datenerhebung (Zeitpunkt 0) war direkt nach dem Verlust des Stellreflexes und vor dem Beginn von externer Wärme- und Sauerstoffsubstitution. Nach der Erhebung der Narkoseparameter (Lidreflex, Zwischenzehenreflex, periphere Sauerstoffsättigung, Körperinnentemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz) wurden 100% Sauerstoff per Nasenmaske sowie Wärme mittels einer Wärmematte (Horn GmbH, Gottmadingen, Deutschland) zum Erhalt der physiologischen Körpertemperatur von 38,0-39,0 °C supplementiert und jede Maus erhielt eine Dexpanthenol Augensalbe (Bepanthen, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) zum Schutz der Kornea vor Austrocknung.

Die Narkoseparameter wurden alle 5 Minuten erhoben bis zur Injektion des jeweiligen Antagonisten. Die Atemfrequenz (AF) wurde gezählt, während die Herzfrequenz (HF) sowie die periphere Sauerstoffsättigung (SpO₂) und die Körpertemperatur (KT) mittels eines High-Speed-Pulsoxymeters ('PhysioSuite' inklusive 'Thermostat', Kent Scientific Corp., USA distributed by EMKA Technologies, Paris, Frankreich) gemessen wurden. Der Lidreflex wurde durch leichtes Berühren der Lidränder mit einem vorher in isotone Kochsalzlösung getunktem Watteträger überprüft. Konnte Zwinkern oder leichtes Zucken der Augenlider ausgelöst werden, galt der Lidreflex als positiv. Durch das Kneifen mit einer anatomischen Pinzette in den Zwischenzehenbereich der Hintergliedmaße nach leichter Extension wurde die Fußrückziehreflexion getestet (PWR = pedal withdrawal reaction). Diese galt als vorhanden beziehungsweise positiv, wenn es zu einem deutlichen Zucken oder Zurückziehen der Gliedmaße kommt. Bleibt diese Rückziehreflexion aus, gilt die PWR als negativ beziehungsweise erloschen. In dieser Studie war die PWR der einzige Schmerzreiz. Die chirurgische Toleranz wurde definiert als die Zeit, in der die PWR ohne deutlichen Anstieg der HF oder RF erloschen war.

Jede Maus erhielt kurz vor Applikation des Antagonisten eine Infusion aus 0,2 ml Ringer-Lösung und 0,1 ml Glucose 20% s.c.. Für die Zeit der Aufwachphase waren die Mäuse in einem gewärmten Käfig mit freiem Zugang zu Wasser und Futter untergebracht.

Statistische Auswertung

Diese Studie wurde als explorative Studie klassifiziert und entsprechend einer Studie von Arras et al. [17] eine Stichprobengröße von n=8 je Geschlecht gewählt. Die Daten wurden mithilfe von Excel sowie IBM SPSS Statistics (Version 24, IBM Corp., Armonk, NY, USA) analysiert. Alle Werte wurden als Mittelwert (M) ± Standardabweichung (SD) zusammengefasst. Zur Analyse der Zeitunterschiede von RF, HR und KT wurden die Varianzanalyse (ANOVA) sowie der gepaarte T-Test und für SpO₂ der Kruskal-Wallis sowie der Wilcoxon Test genutzt. Für die ungepaarten Vergleiche wie zum Beispiel geschlechtsspezifischer Unterschiede fanden der gepaarte T-Test beziehungsweise der Mann-Whitney-U-Test Verwendung. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit $p < 0,05$ festgelegt.

Ergebnisse

Eine Zusammenfassung der wichtigsten Narkoseparameter aller Gruppen inklusive Geschlechterunterschiede befindet sich in Tabelle 3 und eine Übersicht über die Anzahl der Mäuse mit und ohne Verlust der Fußrückziehreflexion (PWR) in Abbildung 1 sowie dem Zeitpunkt des Eintretens der PWR in Abbildung 2.

Bei drei Tieren der MMF Gruppe kam es zu keinem stabilen Verlust der PWR über die Narkosedauer. Die PWR war bei diesen Tieren intermittierend für jeweils weniger als 5 Minuten auslösbar. Sieben Mäuse der MMF Gruppe waren zu keiner Zeit chirurgisch tolerant, zeigten also nie einen Verlust der PWR. Wie in unserer Studie [18] bereits detailliert publiziert, zeigte in den drei Ketaminrazemat basierten

Narkoseprotokollen lediglich in der Gruppe Ketamin + Medetomidin eine männliche Maus keinen stabilen Verlust der PWR und war somit fraglich chirurgisch tolerant. Im Vergleich dazu hatten in den S-Ketamin basierten Narkoseregimen drei männliche Mäuse der S-Ketamin + Medetomidin Gruppe sowie drei Tiere der S-Ketamin Gruppe mit präemptiver Ergänzung von Metamizol keinen stabilen Verlust der PWR über die Narkosedauer. Vier Mäuse der S-Ketamin + Medetomidin Gruppe sowie zwei Mäuse der S-Ketamin + Medetomidin + Metamizol Gruppe waren zu keiner Zeit chirurgisch tolerant.

Tabelle 3: Übersicht der Anästhesiestufen im Gruppenvergleich als Anzahl oder Mittelwert \pm Standardabweichung (erweiterte Tabelle basierend auf der Veröffentlichung von Bauer et al. (2018) [18])

	MMF	KM	SKM	KM + Metamizol	SKM + Metamizol	KM + Butorphanol	SKM + Butorphanol
Anzahl Mäuse mit Verlust PWR	6 von 16	15 von 16	9 von 16	16 von 16	11 von 16	16 von 16	16 von 16
Dauer Verlust PWR*	12:30 \pm 6:53	37:00 \pm 8:11	20:00 \pm 4:19	35:94 \pm 6:07	17:16 \pm 5:10	43:45 \pm 2:14	24:03 \pm 5:50
Einschlafphase* ♂	2:42 \pm 0:56	3:14 \pm 4:45	2:43 \pm 1:22	1:36 \pm 0:33	1:45 \pm 0:45	1:07 \pm 0:24	1:35 \pm 0:49
♀	2:34 \pm 1:07	1:13 \pm 0:23	1:57 \pm 1:02	1:18 \pm 0:42	2:02 \pm 1:10	1:23 \pm 0:31	1:15 \pm 0:33
Anzahl Mäuse mit Katalepsie	0	2 ♂ 1 ♀	3 ♂	1 ♂			1 ♂
Anzahl Mäuse mit Exzitationen	0	1 ♀	2 ♂ 3 ♀	3 ♀	5 ♀	1 ♂ 5 ♀	3 ♂ 3 ♀
Aufwachphase* ♂	1:57 \pm 0:35	5:29 \pm 2:56	3:10 \pm 1:44	7:25 \pm 3:57	3:17 \pm 1:01	17:04 \pm 3:22	4:41 \pm 2:36
♀	2:23 \pm 0:27	5:42 \pm 1:54	4:36 \pm 2:24	8:23 \pm 6:05	2:59 \pm 1:03	13:17 \pm 4:14	5:33 \pm 2:05
Anzahl Mäuse mit mgr. Ataxie	16 (Re-Sedation)	2 ♂ 1 ♀	6 ♂ 5 ♀	8 ♂ 8 ♀	6 ♂ 8 ♀	6 ♂ 6 ♀	8 ♂ 8 ♀
Dauer mgr. Ataxie*		26:08 \pm 17:34	19:38 \pm 12:21	33:18 \pm 15:29	26:25 \pm 11:50	42:05 \pm 18:01	24:11 \pm 12:25
Anzahl Mäuse mit hgr. Ataxie	16 (Re-Sedation)	1 ♂ 3 ♀	1 ♀	7 ♂ 8 ♀	6 ♂ 7 ♀	6 ♂ 8 ♀	8 ♂ 8 ♀
Dauer hgr. Ataxie*		28:45 \pm 23:13	5:00	28:44 \pm 19:05	15:41 \pm 6:26	65:21 \pm 26:42	43:33 \pm 26:49

♂ = männlich
mgr. = mittelgradig

♀ = weiblich
hgr. = hochgradig

PWR = Fußrückziehreflexion
* Werte in Minuten: Sekunden

Abbildung 1: Anzahl der Mäuse mit/ohne chirurgische Toleranz

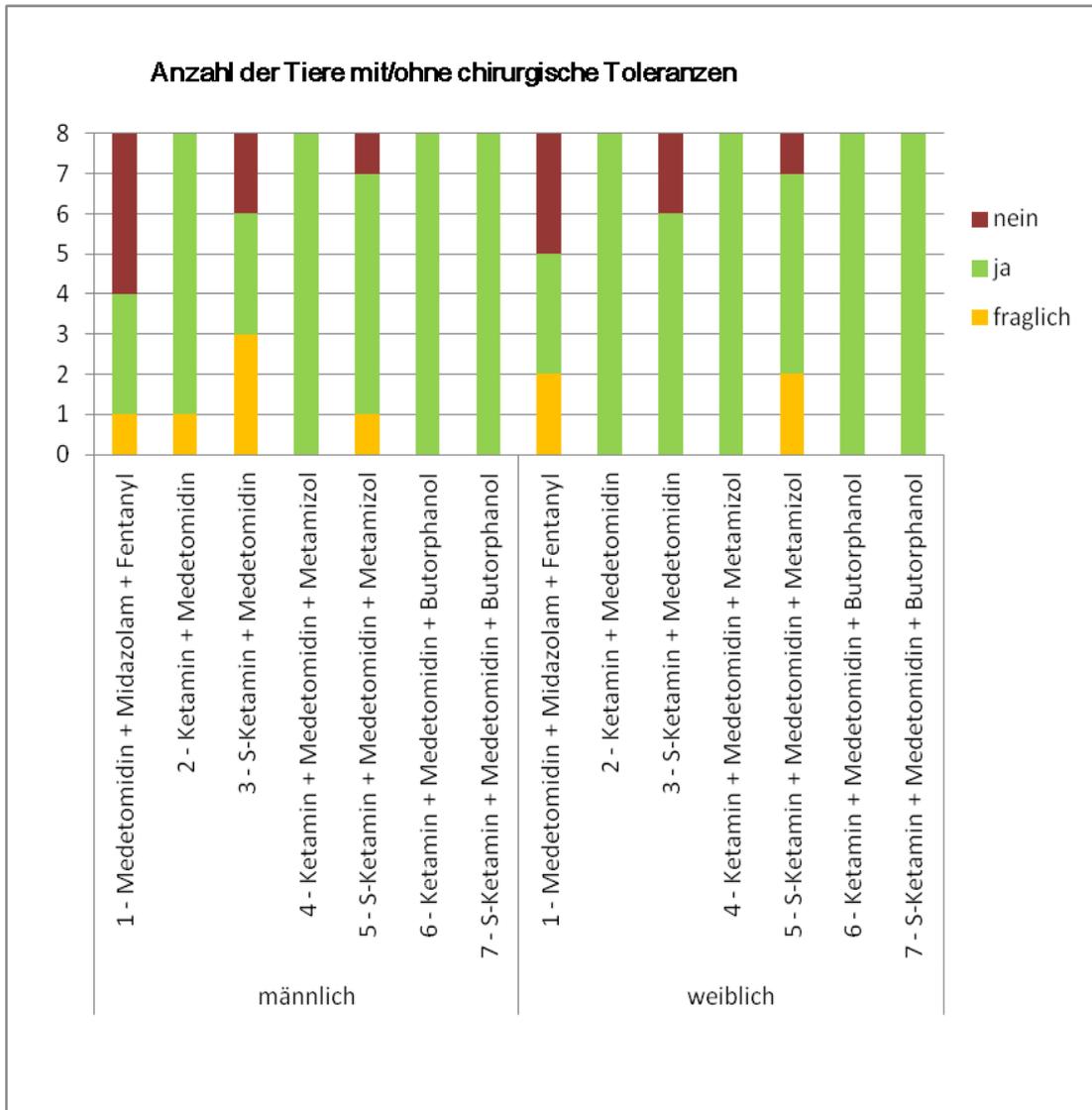


Abbildung 2: Übersicht Anzahl der Mäuse mit/ohne Eintretens des Verlustes des Fußrückziehreflexion (PWR) nach Anästhesiezeitpunkten (ZP) je Gruppe und Geschlecht

Gruppen	PWR	ZP 5	ZP 10	ZP 15	ZP 20	ZP 25	ZP 30	ZP 35	ZP 40	ZP 45
MMF	vorhanden	14	14	11	11	12	13	14	14	14
	abwesend	2	2	5	5	4	3	2	2	2
Männchen	vorhanden	7	8	5	6	5	6	6	6	6
	abwesend	1	0	3	2	3	2	2	2	2
Weibchen	vorhanden	7	6	6	5	7	7	8	8	8
	abwesend	1	2	2	3	1	1	0	0	0
KM	vorhanden	9	5	0	0	2	1	1	2	2
	abwesend	7	11	16	16	14	15	15	14	14
Männchen	vorhanden	5	4	0	0	1	1	0	1	1
	abwesend	3	4	8	8	7	7	8	7	7
Weibchen	vorhanden	4	1	0	0	1	0	1	1	1
	abwesend	4	7	8	8	7	8	7	7	7
SKM	vorhanden	15	12	11	8	7	5			
	abwesend	1	4	5	8	9	11			
Männchen	vorhanden	7	7	7	4	4	3			
	abwesend	1	1	1	4	4	5			
Weibchen	vorhanden	8	5	4	4	3	2			
	abwesend	0	3	4	4	5	6			
KM+Metamizol	vorhanden	15	5	2	0	0	0	0	0	0
	abwesend	1	11	14	16	16	16	16	16	16
Männchen	vorhanden	8	2	1	0	0	0	0	0	0
	abwesend	0	6	7	8	8	8	8	8	8
Weibchen	vorhanden	7	3	1	0	0	0	0	0	0
	abwesend	1	5	7	8	8	8	8	8	8
SKM+Metamizol	vorhanden	15	13	9	5	7	6			
	abwesend	1	3	7	11	9	10			
Männchen	vorhanden	7	5	3	1	2	2			
	abwesend	1	3	5	7	6	6			
Weibchen	vorhanden	8	8	6	4	5	4			
	abwesend	0	0	2	4	3	4			
KM+Butorphanol	vorhanden	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	abwesend	12	16	16	16	16	16	16	16	16
Männchen	vorhanden	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	abwesend	5	8	8	8	8	8	8	8	8
Weibchen	vorhanden	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	abwesend	7	8	8	8	8	8	8	8	8
SKM+Butorphanol	vorhanden	11	4	1	1	0	0			
	abwesend	5	12	15	15	16	16			
Männchen	vorhanden	8	3	1	1	0	0			
	abwesend	0	5	7	7	8	8			
Weibchen	vorhanden	3	1	0	0	0	0			
	abwesend	5	7	8	8	8	8			

PWR = Fußrückziehreflexion

ZP = Zeitpunkt

Anzahl der Mäuse >50%

Anzahl der Mäuse >50%

Zum Zeitpunkt 0, sobald die Mäuse den Stellreflex verloren hatten, kam es zu einem deutlichen Abfall sowohl bei der peripheren Sauerstoffsättigung auf 77 ± 11 Vol.% als auch bei der Körpertemperatur auf $36,0\pm 0,9$ °C in allen Gruppen. Beides konnte durch externe Wärmesubstitution, bzw. durch Substitution von reinem Sauerstoff per Nasenmaske, nach spätestens 10 Minuten wieder in den physiologischen Bereich

von $37,4 \pm 0,8$ °C bzw. 97 ± 3 Vol.% gebracht werden. Eine Übersicht über die Sauerstoffsättigungen sowie die Körpertemperatur der verschiedenen Anästhetikagruppen befinden sich in den Tabellen 4 und 5.

Tabelle 4: Periphere Sauerstoffsättigung im Gruppen- und Geschlechtervergleich - Mittelwert \pm Standardabweichung in Vol.%

Gruppen	ZP 0	ZP 5	ZP 10	ZP 15	ZP 20	ZP 25	ZP 30	ZP 35	ZP 40	ZP 45
MMF	85 \pm 10	97 \pm 5	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 2	99 \pm 1	98 \pm 1	99 \pm 1
statistische Signifikanz	* $p=0,001$									$^{\circ}p=0,001$
Männchen	81 \pm 12	97 \pm 3	97 \pm 3	97 \pm 3	98 \pm 3	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 1
Weibchen	89 \pm 7	97 \pm 6	99 \pm 1	99 \pm 0	99 \pm 0	99 \pm 0	99 \pm 1	99 \pm 0	99 \pm 1	99 \pm 0
KM	80 \pm 12	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 1					
statistische Signifikanz	* $p=0,001$									$^{\circ}p=0,001$
Männchen	77 \pm 6	99 \pm 1	98 \pm 2	97 \pm 3	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 2
Weibchen	83 \pm 16	98 \pm 3	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 2	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 1	99 \pm 0
SKM	79 \pm 6	96 \pm 6	96 \pm 6	97 \pm 4	98 \pm 3	99 \pm 1	98 \pm 1			
statistische Signifikanz	* $p=0,002$						$^{\circ}p=0,001$			
Männchen	80 \pm 5	94 \pm 7	93 \pm 9	96 \pm 6	97 \pm 3	98 \pm 1	98 \pm 2			
Weibchen	78 \pm 8	98 \pm 2	99 \pm 1	98 \pm 1	99 \pm 0	99 \pm 0	99 \pm 0			
KM + Metamizol	77 \pm 8	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2
statistische Signifikanz	* $p=0,001$									$^{\circ}p=0,001$
Männchen	75 \pm 7	97 \pm 2								
Weibchen	81 \pm 9	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 1	99 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 2	99 \pm 0
SKM + Metamizol	82 \pm 10	98 \pm 1	97 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	98 \pm 1			
statistische Signifikanz	* $p=0,002$						$^{\circ}p=0,001$			
Männchen	81 \pm 11	98 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	97 \pm 2	98 \pm 1			
Weibchen	83 \pm 10	98 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 1			
KM + Butorphanol	64 \pm 12	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 1	98 \pm 2	97 \pm 3	97 \pm 3	96 \pm 6	95 \pm 5
statistische Signifikanz	* $p=0,000$									$^{\circ}p=0,001$
Männchen	64 \pm 14	98 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	98 \pm 2	96 \pm 3	96 \pm 4	93 \pm 7	93 \pm 6
Weibchen	63 \pm 10	98 \pm 1								
SKM + Butorphanol	71 \pm 10	98 \pm 2								
statistische Signifikanz	* $p=0,000$						$^{\circ}p=0,000$			
Männchen	71 \pm 10	97 \pm 2								
Weibchen	70 \pm 10	99 \pm 1	99 \pm 0	99 \pm 0	98 \pm 1	98 \pm 1	98 \pm 1			

* signifikante Abweichung zum vorherigen Zeitpunkt

$^{\circ}$ signifikante Abweichung zwischen Zeitpunkt 0 und dem Endzeitpunkt

ZP = Zeitpunkt

Es werden nur die signifikante p-Werte ($<0,05$) ausgewiesen.

Tabelle 5: Körpertemperatur im Gruppen- und Geschlechtervergleich - Mittelwert \pm Standardabweichung in $^{\circ}\text{C}$

Gruppen	ZP 0	ZP 5
MMF	35,2 \pm 1,1	36,0 \pm 1,1
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,007</i>	
Männchen	35,9 \pm 1,3	36,7 \pm 0,6
Weibchen	34,8 \pm 0,9	35,3 \pm 1,1
KM	36,1 \pm 1,0	36,5 \pm 1,1
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>P= 0,002</i>	
Männchen	36,7 \pm 0,8	36,8 \pm 1,2
Weibchen	35,7 \pm 0,9	36,2 \pm 1,0
SKM	36,0 \pm 0,7	36,5 \pm 0,9
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,000</i>	
Männchen	36,1 \pm 0,9	36,6 \pm 1,1
Weibchen	36,0 \pm 0,5	36,4 \pm 0,9
KM + Metamizol	36,1 \pm 1,1	36,7 \pm 0,9
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,000</i>	
Männchen	36,4 \pm 0,7	36,9 \pm 0,6
Weibchen	35,9 \pm 1,4	36,5 \pm 1,2
SKM + Metamizol	35,6 \pm 0,8	36,3 \pm 0,8
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,000</i>	
Männchen	36,0 \pm 0,7	36,5 \pm 0,8
<i>Weibchen</i>	35,4 \pm 0,8	36,1 \pm 0,8
KM + Butorphanol	36,5 \pm 0,7	37,2 \pm 0,6
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,000</i>	
Männchen	36,7 \pm 0,7	37,3 \pm 0,7
Weibchen	36,3 \pm 0,7	37,1 \pm 0,6
SKM + Butorphanol	36,1 \pm 0,8	37,4 \pm 1,0
<i>statistische Signifikanz</i>	* <i>p= 0,000</i>	
Männchen	36,0 \pm 0,9	37,0 \pm 0,7
Weibchen	36,3 \pm 0,6	37,7 \pm 1,1

ZP = Zeitpunkt

Eine Übersicht über die Herz- und die Atemfrequenzen der verschiedenen Anästhetikagruppen im Verlauf der Narkose befinden sich in den Tabellen 6 und 7. In allen Tabellen wurden nur die signifikante p-Werte (<0,05) ausgewiesen.

Tabelle 6: Herzfrequenz im Gruppen- und Geschlechtervergleich - Mittelwert \pm Standardabweichung als Schläge pro Minute (erweiterte Tabelle basierend auf der Veröffentlichung von Bauer et al. (2018) [18])

Gruppen	ZP 0	ZP 5	ZP 10	ZP 15	ZP 20	ZP 25	ZP 30	ZP 35	ZP 40	ZP 45
MMF	304\pm50	317\pm42	288\pm29	288\pm36	295\pm35	302\pm31	304\pm26	313\pm29	326\pm35	340\pm42
statistische Signifikanz			* $p=0,026$			* $p=0,020$			* $p=0,004$	* $p=0,005$ ° $p=0,049$
Männchen	317 \pm 42	328 \pm 41	295 \pm 36	304 \pm 39	317 \pm 33	321 \pm 26	319 \pm 25	328 \pm 27	339 \pm 39	347 \pm 52
Weibchen	291 \pm 56	305 \pm 43	282 \pm 21	273 \pm 27	274 \pm 22	282 \pm 22	290 \pm 20	297 \pm 22	314 \pm 29	333 \pm 31
KM	387\pm83	370\pm78	340\pm56	345\pm53	354\pm52	351\pm51	346\pm51	346\pm51	338\pm53	336\pm53
Männchen	371 \pm 79	383 \pm 80	357 \pm 64	372 \pm 60	391 \pm 42	385 \pm 42	375 \pm 52	375 \pm 52	364 \pm 59	360 \pm 62
Weibchen	404 \pm 89	358 \pm 80	324 \pm 45	318 \pm 26	317 \pm 30	317 \pm 33	316 \pm 30	317 \pm 32	313 \pm 33	313 \pm 33
SKM	308\pm67	266\pm46	278\pm48	293\pm46	303\pm47	312\pm42	308\pm40			
statistische Signifikanz				* $p=0,005$		* $p=0,046$				
Männchen	307 \pm 29	282 \pm 49	294 \pm 44	305 \pm 35	323 \pm 32	329 \pm 25	327 \pm 22			
Weibchen	310 \pm 102	250 \pm 40	262 \pm 48	281 \pm 55	284 \pm 54	295 \pm 50	290 \pm 46			
KM + Metamizol	301\pm79	329\pm88	348\pm66	355\pm61	356\pm61	362\pm64	356\pm62	362\pm59	358\pm56	359\pm51
statistische Signifikanz										° $p=0,039$
Männchen	293 \pm 71	340 \pm 82	372 \pm 73	372 \pm 73	363 \pm 76	374 \pm 78	367 \pm 75	369 \pm 69	364 \pm 66	358 \pm 65
Weibchen	310 \pm 94	318 \pm 97	325 \pm 52	338 \pm 44	348 \pm 47	351 \pm 49	346 \pm 47	355 \pm 51	352 \pm 46	360 \pm 38
SKM + Metamizol	258\pm42	259\pm43	278\pm46	296\pm57	305\pm50	312\pm53	321\pm54			
statistische Signifikanz			* $p=0,012$	* $p=0,000$		* $p=0,007$	° $p=0,000$			
Männchen	269 \pm 47	265 \pm 44	291 \pm 53	311 \pm 68	322 \pm 59	327 \pm 57	340 \pm 57			
Weibchen	249 \pm 39	254 \pm 44	266 \pm 39	283 \pm 46	291 \pm 38	298 \pm 48	305 \pm 49			
KM + Butorphanol	249\pm65	330\pm55	357\pm45	364\pm45	362\pm43	354\pm40	347\pm38	344\pm35	338\pm31	340\pm30
statistische Signifikanz		* $p=0,002$								° $p=0,000$
Männchen	237 \pm 34	306 \pm 43	371 \pm 51	374 \pm 52	372 \pm 59	371 \pm 50	359 \pm 48	358 \pm 40	355 \pm 25	359 \pm 23
Weibchen	262 \pm 87	355 \pm 57	342 \pm 35	354 \pm 37	352 \pm 18	338 \pm 17	335 \pm 20	330 \pm 26	320 \pm 28	324 \pm 26
SKM + Butorphanol	209\pm27	248\pm48	265\pm51	286\pm51	304\pm47	312\pm44	317\pm45			
statistische Signifikanz		* $p=0,003$	* $p=0,014$	* $p=0,000$	* $p=0,001$		° $p=0,000$			
Männchen	213 \pm 17	259 \pm 54	287 \pm 57	309 \pm 55	329 \pm 51	328 \pm 49	331 \pm 51			
Weibchen	206 \pm 35	237 \pm 43	244 \pm 35	264 \pm 37	279 \pm 28	297 \pm 33	303 \pm 35			

* signifikante Abweichung zum vorherigen Zeitpunkt

° signifikante Abweichung zwischen Zeitpunkt 0 & dem Endzeitpunkt

ZP = Zeitpunkt

Tabelle 7: Atemfrequenz im Gruppen- und Geschlechtervergleich - Mittelwert \pm Standardabweichung als Atemzüge pro Minute (erweiterte Tabelle basierend auf der Veröffentlichung von Bauer et al. (2018) [18])

Gruppen	ZP 5	ZP 10	ZP 15	ZP 20	ZP 25	ZP 30	ZP 35	ZP 40	ZP 45
MMF	122\pm17	123\pm17	132\pm20	134\pm17	144\pm13	148\pm16	149\pm16	152\pm15	154\pm15
statistische Signifikanz			* $p=0,017$		* $p=0,001$				$^{\circ}p=0,000$
Männchen	129 \pm 20	129 \pm 21	135 \pm 18	136 \pm 16	145 \pm 14	147 \pm 16	152 \pm 18	151 \pm 17	153 \pm 19
Weibchen	115 \pm 10	118 \pm 11	129 \pm 23	133 \pm 19	144 \pm 14	149 \pm 17	146 \pm 15	153 \pm 14	155 \pm 12
KM	150\pm23	158\pm22	162\pm21	163\pm20	166\pm22	168\pm19	167\pm19	171\pm18	172\pm19
statistische Signifikanz		* $p=0,011$						* $p=0,014$	$^{\circ}p=0,000$
Männchen	162 \pm 17	167 \pm 20	169 \pm 17	170 \pm 14	173 \pm 18	173 \pm 15	171 \pm 17	175 \pm 19	173 \pm 18
Weibchen	139 \pm 24	148 \pm 21	155 \pm 23	156 \pm 23	159 \pm 25	163 \pm 22	162 \pm 20	167 \pm 17	170 \pm 21
SKM	138\pm20	144\pm15	150\pm17	155\pm18	155\pm15	156\pm13			
statistische Signifikanz			* $p=0,036$	* $p=0,024$		$^{\circ}p=0,001$			
Männchen	149 \pm 15	154 \pm 10	158 \pm 12	164 \pm 6	162 \pm 12	159 \pm 10			
Weibchen	128 \pm 20	134 \pm 14	142 \pm 18	145 \pm 20	149 \pm 16	152 \pm 15			
KM + Metamizol	163\pm24	168\pm23	169\pm20	172\pm23	175\pm25	177\pm21	178\pm19	175\pm18	183\pm19
statistische Signifikanz									* $p=0,024$ $^{\circ}p=0,007$
Männchen	165 \pm 28	171 \pm 22	168 \pm 21	176 \pm 20	178 \pm 23	178 \pm 22	177 \pm 17	176 \pm 18	184 \pm 20
Weibchen	162 \pm 22	165 \pm 25	171 \pm 20	167 \pm 26	173 \pm 29	177 \pm 22	179 \pm 22	175 \pm 19	181 \pm 19
SKM + Metamizol	156\pm22	158\pm22	158\pm20	160\pm20	162\pm15	160\pm18			
Männchen	157 \pm 22	158 \pm 28	155 \pm 25	161 \pm 21	162 \pm 16	158 \pm 24			
Weibchen	156 \pm 23	159 \pm 16	162 \pm 17	160 \pm 19	162 \pm 16	163 \pm 13			
KM + Butorphanol	132\pm14	130\pm14	130\pm13	132\pm12	133\pm9	133\pm13	135\pm10	135\pm11	136\pm11
Männchen	129 \pm 11	131 \pm 13	129 \pm 13	131 \pm 14	131 \pm 10	131 \pm 12	133 \pm 11	133 \pm 13	135 \pm 13
Weibchen	134 \pm 16	130 \pm 15	131 \pm 14	134 \pm 10	135 \pm 10	134 \pm 14	137 \pm 9	138 \pm 9	138 \pm 10
SKM + Butorphanol	123\pm20	127\pm19	129\pm16	128\pm17	130\pm17	135\pm16			
statistische Signifikanz						$^{\circ}p=0,014$			
Männchen	124 \pm 22	130 \pm 22	132 \pm 19	130 \pm 20	135 \pm 18	139 \pm 20			
Weibchen	122 \pm 20	124 \pm 17	126 \pm 12	125 \pm 13	126 \pm 15	132 \pm 13			

* signifikante Abweichung zum vorherigen Zeitpunkt

$^{\circ}$ signifikante Abweichung zwischen Zeitpunkt 0 und dem Endzeitpunkt

ZP = Zeitpunkt

Diskussion

Nachdem die Mausanästhesie verschiedensten starken Einflussfaktoren unterliegt, kann man nicht von „der Narkose für die Maus“ sprechen. Deshalb ist es wichtig, die Stärken und Schwächen, aber auch die Grenzen der unterschiedlichen Narkosemöglichkeiten zu kennen und zu beachten, um sich im Einzelfall für die beste und sicherste Methode entscheiden zu können. Da ein starker Einflussfaktor bei Mäusen die Stammspezifität ist [1–4], haben wir den von uns bereits mit S-/Ketamin + Medetomidin-Protokollen untersuchten [18] und in der Versuchstierkunde sehr häufig verwendeten Mausstamm C57BL/6J auch mit der etablierten Medetomidin + Midazolam + Fentanyl-Kombination (MMF) getestet und hinsichtlich Steuerbarkeit sowie chirurgischer Toleranz verglichen. Die Tiefensensibilität als verlässlicher Indikator für das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums und somit einer ausreichenden Analgesie, kann zuverlässig mit Hilfe der Fußrückziehreflexion (PWR) getestet werden [10,17]. Nachdem in der MMF Narkose das analgetisch sehr potente Opiat Fentanyl [23] enthalten ist, wird diese Kombination auch für hochschmerzhafte Eingriffe empfohlen. Im Gegensatz dazu werden Ketamin + Medetomidin Kombinationen vom Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) lediglich als „Prämedikation für stärker schmerzhafte Eingriffe“ empfohlen [24]. Um die analgetische Potenz von (S-) Ketamin + Medetomidin zu verbessern, haben wir in einer bereits publizierten Studie die Prämedikation mit Butorphanol beziehungsweise Metamizol untersucht [18].

Bei unserem direkten Vergleich der S-/Ketamin basierten Narkoseprotokolle bei C57BL/6J Mäusen beider Geschlechter mit der MMF Narkose konnten wir in der verwendeten MMF-Dosierung allerdings keinen zuverlässigeren Verlust des Fußrückziehreflexes, als Indiz für das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums, gegenüber den S-/Ketamin basierten Gruppen feststellen. Die gewählte Dosierung für KM – mit und ohne zusätzliche analgetische Prämedikation - scheint für diesen Mausstamm geeigneter gewesen zu sein. Bis auf ein Männchen zeigten alle anästhesierten Mäuse eine zuverlässige chirurgische Toleranz. Im Gegensatz zu den Ergebnissen unserer Studie wird in der Literatur beschrieben, dass es bei KM Narkosen nicht immer zu einer stabilen chirurgischen Toleranz kommt [7,14,16,17,19]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse liegen unter anderem vermutlich am Alter, Geschlecht und Stamm der Mäuse [7,19,20]. Butorphanol hatte auf unser SKM Protokoll einen sehr positiven Einfluss. Alle untersuchten Mäuse zeigten einen Verlust der PWR, was sich zum einen durch den sedativen [25,26] aber natürlich auch analgetischen [27,28] Effekt von Butorphanol zurückführen lässt. In einer Studie von Kiriara (2013) [1] konnte das Stadium der chirurgischen Toleranz bei Mäusen relativ zuverlässig mit der Kombination von Medetomidin + Midazolam ergänzt durch das Analgetikum Butorphanol erreicht werden. Durch die präemptive Gabe von Metamizol zur SKM Narkose konnte die Anzahl der Mäuse mit einem Verlust der PWR von 9 auf 11 von 16 Mäusen erhöht werden. Vergleichbar hierzu zeigten auch 3 von 16 Mäusen der MMF Gruppe einen fraglichen Verlust der PWR über einen intermittierend sehr kurzen Zeitraum. Die Narkose schien nicht tief genug zu sein für einen schmerzhaften Eingriff. Abgesehen vom Test der PWR wurde in dieser Studie

allerdings kein weiterer Schmerzreiz gesetzt. Da die PWR – eine nozizeptive Reaktion über Reizung der Schmerzrezeptoren mit Weiterleitung zum Gehirn - eng mit dem Zwischenzehenreflex – eine direkt über das Rückenmark verarbeitete motorische Reaktion - verbunden ist [29], könnte es zu Schwierigkeiten bei der Interpretation durch einen lange auslösbaren Zwischenzehenreflex versus einer wirklichen Schmerzantwort kommen. Generell zeigen Mäuse ein hohes Maß an Reflexaktivität [9]. Wie in der Studie von Smith (1993) [5] beschrieben, kann die Reflexaktivität sogar bestehen bleiben, obwohl die Dosis der Anästhetika nicht mehr erhöht werden kann ohne aufgrund massiver Atem- und Kreislaufdepression tödlich zu enden. Zur exakten Unterscheidung der Schmerzreaktion versus Zwischenzehenreflex müssen weitere Parameter wie akuter Herzfrequenzanstieg, Blutdruckanstieg und Atemfrequenzanstieg (bei Spontanatmung) hinzu gezogen werden. Im Gegensatz zu anderen Studien [8,9] zeigten sieben Mäuse der MMF-Gruppe in dieser Studie eine deutliche PWR über die gesamte Narkosedauer mit gleichzeitiger Herzfrequenzerhöhung als Reaktion auf den schmerzvollen Stimulus. Diese Mäuse erreichten folglich das Stadium der chirurgischen Toleranz nicht. Da in Vergleichsstudien der selbe Mausstamm sowie beide Geschlechter untersucht wurden [8,9], könnte diese Diskrepanz möglicherweise an Alters- und Gewichtsunterschieden sowie der individuellen Enzymzusammensetzung der Mäuse liegen [4,12].

Die Dauer des Verlustes der PWR war durch die präemptive Gabe von Butorphanol (KM+Butorphanol 43:45±2:14 min, SKM+Butorphanol 24:03±5:50 min) deutlich länger als bei den Basisnarkosen KM und SKM (KM 37:00±8:11 min, SKM 20:00±4:19 min). Vor allem durch die κ - aber auch schwach μ -Opioidrezeptor-agonistische [30,31] Wirkung von Butorphanol kann die Narkose aufgrund des sedativen [25,26], aber auch analgetischen [27,28] Effekts, der bei Mäusen 1-6 Stunden je nach Mausstamm anhält [24,27], vertieft werden. Die vergleichsweise dazu kurze Dauer des Verlustes der PWR in der MMF Gruppe (12:30±6:53 min) spiegelt die analgetische Wirkdauer des μ -Opioidrezeptor-Agonisten Fentanyl von ca. 20-30 Minuten wieder [12,15,32] und korreliert mit den Ergebnissen einer Studie von Fleischmann et al. (2016) [8]. Durch seine schwache κ -agonistische Wirkung [33,34] hat Fentanyl bis zu einem gewissen Grad auch einen sedativen Effekt, da die Sedation durch eine agonistische Wirkung am κ -Opioidrezeptor vermittelt wird [15]. Die mittlere Dauer des Verlustes der PWR konnte durch die präoperative Gabe von Metamizol zu den Basisnarkosen KM und SKM (KM+Metamizol 35:94±6:07 min, SKM+Metamizol 17:16±5:10 min) wider Erwarten nicht verlängert werden. Die Anzahl der Mäuse mit Verlust der PWR konnte zwar erhöht werden, die Dauer des Verlustes der PWR sank aber geringgradig und nicht signifikant bei beiden Gruppen.

Im Vergleich zu Katalepsien oder Exzitationen bei einigen Mäusen der KM und SKM basierten Narkoseprotokolle, gab es während der Einschlafphase bei der MMF Narkosegruppe, wie auch in einer anderen Studie beschrieben [9], keinerlei Auffälligkeiten. Dies scheint am (S-) Ketamin-Anteil zu liegen [35], da Phencyclidine durch die Stimulation im zentralen Nervensystem bei alleiniger Gabe zu einem erhöhtem Skelettmuskeltonus und somit einer Katalepsie führen [15,36]. Cesarovic et

al. (2012) [6] beschreiben in ihrer Studie bei einer Narkoseeinleitung mit S-Ketamin bei allen Mäusen Ataxien und Zittern. Auch Henke (2010) [37] beschreibt Exzitationen aufgrund hoher Reflexaktivität im Rahmen der Einschlafphase bei Mausnarkosen.

Die Einschlafdauer war deutlich kürzer bei KM und SKM Narkosen mit präemptiver Analgesie als bei den Gruppen MMF, KM und SKM. Diese könnte am sedativen Effekt des κ -Agonisten Butorphanol [15,25,26] sowie dem dosisabhängigen (ab 100-250 mg/kg) sedativen Potential von Metamizol [38] liegen. Der sedative Effekt der MMF-Komponenten [15,39–41] scheint bei diesen anästhesierten Mäusen in dieser Dosierung nicht ausreichend gewesen zu sein. Eine möglichst kurze Einschlafdauer ist jedoch anzustreben, um das Stresslevel bei den Mäusen so gering wie möglich zu halten [42].

Bei allen Narkoseprotokollen kam es direkt nach Verlust des Stellreflexes zu einem deutlichen Abfall der peripheren Sauerstoffsättigung. Die Mäuse der MMF Gruppe zeigten vor externer Sauerstoffzufuhr im Vergleich zu den KM und SKM basierten Narkoseprotokollen die höchste periphere Sauerstoffsättigung. Dies könnte an dem durch Ketamin verursachten erhöhten Sauerstoffverbrauch v.a. in Gehirn [43] und Myokard [15] liegen, sowie an einer reduzierten peripheren Durchblutung, verursacht durch die periphere Vasokonstriktion aufgrund des vergleichsweise höheren Medetomidin-Anteils [44] als bei der MMF Kombination. Aber auch die Hypothermie kann zu einer verminderten peripheren Durchblutung und somit zu einer niedrigeren Sauerstoffsättigung führen [16]. Durch die Verabreichung von 100% Sauerstoff konnte die periphere Sauerstoffsättigung jedoch in allen Gruppen sofort wieder erhöht und gehalten werden. Dies zeigt, dass trotz reduzierter Atemtätigkeit noch ein suffizienter Gasaustausch unter Spontanatmung möglich ist und es sich zu Beginn der Narkose tatsächlich um eine verminderte periphere Sauerstoffsättigung zu handeln scheint und nicht nur um falsch erniedrigte Werte aufgrund der Medetomidin bedingten peripheren Vasokonstriktion innerhalb der ersten 30 Minuten [15,44]. Eine Besonderheit ist bei den männlichen Mäusen der Gruppe KM+Butorphanol zu beobachten. Hier kam es bei einigen Männchen ab dem ZP 40 zu einer veränderten Atmung, die eine vermehrte Bronchiosekretion vermuten lässt, und hierdurch zu einem Absinken der peripheren Sauerstoffsättigung auf 93 ± 7 Vol.%, wie in unserer S-/Ketamin-Studie bereits erklärt [18]. Bei der Gabe von Ketamin wird eine vermehrte Speichelbildung sowie Bronchiosekretion beschrieben [44,45], die vermutlich durch die Zugabe von Butorphanol verstärkt wird. In der Literatur wird für Narkosen mit Ketamin entsprechend die Prämedikation mit Atropin empfohlen [44]. Wie auch in der Studie von Burnside et al. (2013) dargestellt, in der die periphere Sauerstoffsättigung (SpO_2) positiv mit dem Körpergewicht korrelierte, zeigten die Männchen der Gruppen MMF, KM, KM+Metamizol sowie SKM+Metamizol ohne Sauerstoffsupplementation eine niedrigere SpO_2 als die Weibchen dieser Gruppen. Bei den mit Butorphanol prämedizierten Gruppen konnten wir dies hingegen zum Zeitpunkt 0 nicht feststellen.

Bei allen Gruppen kam es direkt nach Verlust des Stellreflexes zu einem deutlichen Abfall der Körpertemperatur, wobei die Mäuse der MMF Gruppe mit $35,2 \pm 1,1$ °C die

niedrigsten Werte mit einem deutlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern aufwiesen. Durch die Aktivierung des Sympathikus wird das Kreislaufzentrum durch Ketamin angeregt [15,45], welches den Medetomidin bedingten Temperaturabfall [35] im Vergleich zur MMF Narkose vermutlich minimal geringer ausfallen lässt. Aufgrund ihrer großen Körperoberfläche im Verhältnis zum Körpergewicht sowie durch die Anästhetika bedingte Dämpfung der Thermoregulation, kommt es ohne Substitution von Wärme rasch zu einer Hypothermie bei Mäusen [44,46]. Dies wird auch in verschiedensten Narkosestudien bei Mäusen beschrieben [9,12,20,47,48]. Die höhere Körpertemperatur der Männchen der MMF Gruppe liegt vermutlich an einem höheren Fettanteil, da Kleinsäuger in der Lage sind Wärme ohne Zittern mithilfe des braunen Fettgewebes zu erzeugen [46]. Auch eine weitere Studie zeigt diesen geschlechtsspezifischen Unterschied [20]. Durch die Lagerung der Mäuse auf einer Wärmematte konnte die Körpertemperatur zum ZP 5 in allen Gruppen signifikant erhöht und stetig bis in den physiologischen Bereich von 37,5 - 38,5 °C [11,22] gesteigert werden.

Bei allen Narkoseprotokollen kam es durch den Medetomidin-Anteil [49] anfangs zu einem Absinken der HF [39], vermutlich bedingt durch eine periphere Vasokonstriktion mit Folge des zentralen Blutdruckanstiegs [16,40,50]. Wie auch bei Buitrago et al. (2008) [10] beschrieben kommt es in dieser Studie bei allen Narkoseprotokollen zu einem kontinuierlichen und teilweise signifikanten Anstieg der HF. Die im Mittel niedrigere HF der Weibchen konnte auch in einer Studie von Xing et al. (2009) [4] beobachtet werden. Eine Ursache hierfür könnte der Einfluss der Sexualhormone sein [51].

Bei den Anästhetika-Gruppen mit Opioiden (MMF, KM+Butorphanol, SKM+Butorphanol) ist die AF aufgrund der atemdepressiven Wirkung von Fentanyl [52,53] und Butorphanol [15,35] geringer als bei den anderen Gruppen. Da die Wirkdauer von Fentanyl ungefähr 10-30 Minuten bei Mäusen beträgt [32,52], steigt die AF in der MMF Gruppe ab dem ZP 25 signifikant an.

Die Mäuse der MMF Gruppe zeigten im Vergleich zu allen anderen Narkoseprotokollen die kürzeste Aufwachzeit mit $2:10 \pm 0:33$ min, da bei der MMF alle 3 Komponenten antagonisiert werden [8]. Die mit Abstand längste Aufwachdauer war in der Gruppe KM+Butorphanol mit $15:03 \pm 4:12$ min zu verzeichnen. Die Wirkung von Butorphanol wird durch die Gabe von Atipamezol nicht aufgehoben [26], wodurch die Aufwachdauer aufgrund des sedativen Effekts [25,26] verlängert wird. Generell war die Aufwachzeit bei den Ketamin basierten Narkoseprotokollen länger als bei den S-Ketamin basierten. Ursache hierfür ist die 50% niedrigere Dosierung von S-Ketamin, das im Vergleich zum Razemat nach der Teilantagonisierung von Medetomidin schneller metabolisiert werden kann. Während es in der MMF Gruppe bei einem Großteil der Tiere zu einer ständigen oder intermittierenden Resedation für mehrere Stunden nach Wiedererlangen des Stellreflexes kam, zeigten die Mäuse der restlichen Narkosegruppen mittel- bis hochgradige Ataxien über ca. 1-2 Stunden. Dies wurde auch von Hjálmarsdóttir (2005) und Kilic & Henke (2004) beschrieben.

Da bei den (S-) Ketamin basierten Narkoseprotokollen lediglich der Medetomidin-Anteil antagonisiert werden kann, bleibt der durch Ketamin verursachte erhöhte Skelettmuskeltonus bestehen und führt zu unwillkürlichen Muskelbewegungen [15,55]. Das Phänomen der Resedation bei der MMF wurde von Hjálmarsdóttir [9] ebenfalls beschrieben. Es wurde vermutet, dass die Halbwertszeit der Anästhetika länger anhält als die der Antagonisten. Die Autorin beschreibt allerdings, basierend auf nicht veröffentlichten Studien, dass auch eine wiederholte, also zweimalige, Verabreichung der Antagonisten der Resedation nicht zufriedenstellend entgegen zu wirken schien.

Bei 53% der Mäuse kam es aufgrund des Medetomidin-Anteils zu einer deutlichen Polyurie. Alpha2-Agonisten führen zu einer osmotischen Diurese sowie aufgrund reduzierter ADH-Ausschüttung zur Polyurie [15,56]. Eine Infusion bestehend aus Glucose und einer Vollelektrolytlösung ist unter anderem auch deshalb anzuraten.

Ebenso kam es bei fast allen Mäusen (96%) zu einem mittel- bis hochgradigen Exophthalmus, wie bereits beim Meerschweinchen beschrieben [57], weshalb der Lidreflex nicht aussagekräftig evaluiert werden konnte und daher nicht zur Bestimmung der Narkosetiefe herangezogen werden konnte. Diese Beobachtung ist auf die Wirkung von Medetomidin zurückzuführen, wie Hirsimaki (1984) in einer unveröffentlichten Studie bereits bei NMRI-Mäusen beschrieben hat [58]. Eine Applikation von pflegenden Augensalben als Schutz der Kornea vor Austrocknung ist daher umso wichtiger und sollte je nach Dauer der Narkose wiederholt werden.

Als Ergebnis dieser Studie mit dem Ziel, verschiedene Narkoseprotokolle in Hinblick auf die Steuerbarkeit der Narkosedauer sowie die mögliche analgetische Potenz zu evaluieren, kann zusammengefasst werden, dass jedes der sieben Narkose-Regime eine zuverlässige Hypnose und Muskelrelaxanz erzeugen kann. Zu beachten gilt, dass die Dosierung abhängig von Mausstamm [1–4], Geschlecht [1,7,19,20] und Alter [59] variieren kann. Alle Ketamin basierten Narkoseprotokolle sowie das Narkoseregime S-Ketamin + Medetomidin + Butorphanol führten bei den verwendeten C57BL/6J Mäusen beider Geschlechter zu einer guten und zuverlässigen chirurgischen Toleranz. Zur weiteren Verbesserung sollten eine Dosisreduktion von Butorphanol sowie der Zusatz von Atropin in einer weiteren Studie evaluiert werden. Der Anteil an Mäusen mit einem Verlust der PWR in der S-Ketamin Gruppe konnte zwar durch die präemptive Gabe von Metamizol gesteigert werden, dennoch sind weitere Studien zur S-Ketamin-Dosierung im Sinne einer Dosiserhöhung nötig. Auch wenn die MMF Narkose in dieser Studie nicht die zu erwartende gute Analgesie widerspiegeln konnte und vermutlich eine höhere Dosis bei diesen Mäusen nötig gewesen wäre, führte sie in Vergleichsstudien bei demselben Mausstamm zu guten Ergebnissen [8,9]. Trotz vergleichsweise guter Steuerbarkeit muss bei der MMF Narkose das auch in dieser Studie aufgetretene Resedationsphänomen beachtet werden, das eine intensivere postoperative Pflege notwendig machen kann. Der Vorteil der MMF Narkose ist allerdings, dass diese erfahrungsgemäß zu jeder Zeit vollständig antagonisiert werden kann [60]. Bei allen

Protokollen, in denen die analgetische Komponente bei Narkoseende antagonisiert wird, muss ein postoperativ wirksames Analgetikum rechtzeitig appliziert werden, um eine Versorgungslücke zu vermeiden [8].

Interessenskonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenskonflikt besteht.

Literaturverzeichnis

1. Kiriwara Y, Takechi M, Kurosaki K, Kobayashi Y, Kurosawa T. Anesthetic Effects of a Mixture of Medetomidine, Midazolam and Butorphanol in Two Strains of Mice. *Experimental Animals*. 2013;62:173–80.
2. Homanics GE, Quinlan JJ, Firestone LL. Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1999;63:21–6.
3. Mulder J. Anesthesia in the mouse using a combination of ketamine and promazine. *Laboratory animal science*. 1978;28:70–1.
4. Xing S, Tsaih S-W, Yuan R, Svenson KL, Jorgenson LM, So M, u. a. Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2009;296:H1907-13.
5. Smith W. Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. *Laboratory animals*. 1993;27:30–9.
6. Cesarovic N, Jirkof P, Rettich A, Nicholls F, Arras M. Combining sevoflurane anesthesia with fentanyl-midazolam or s-ketamine in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2012;51:209–18.
7. Voipio H, Nevalainen T, Virtanen R. Evaluation of anesthetic potency of medetomidine-ketamine combination in mice. In: Erichsen S, Coates M, Chatikavanij P, Herausgeber. *Laboratory animal and health for all*. Bangkok, Thailand; 1988. S. 298–9.
8. Fleischmann T, Jirkof P, Henke J, Arras M, Cesarovic N. Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. *Laboratory animals*. 2016;50:264–74.
9. Hjálmsdóttir B. Hämodynamische Untersuchung zur vollständig antagonisierbaren Anästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl im Vergleich zur Ketamin-Xylazin-Kombinationsanästhesie bei der Maus [Dissertation]. [München, Deutschland]: Ludwig-Maximilian-Universität; 2005.
10. Buitrago S, Martin T, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding G. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2008;47:11–7.
11. Henke J, Erhardt W. Speziespezifische Anästhesie. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S, Herausgeber. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2012. S. 703–24.

12. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, u. a. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR journal*. 2012;53:E55-69.
13. Green C, Knight J, Precious S, Simpkin S. Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory animals*. 1981;15:163–70.
14. Baker N, Schofield J, Caswell M, McLellan A. Effects of early atipamezole reversal of medetomidine-ketamine anesthesia in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2011;50:916–20.
15. Erhardt W, Henke J, Tacke S, Baumgartner C, Kroker R. Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S, Herausgeber. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2. Auflage. Stuttgart: Schattauer Verlag; 2012. S. 19–97.
16. Burnside W, Flecknell P, Cameron A, Thomas A. A comparison of medetomidine and its active enantiomer dexmedetomidine when administered with ketamine in mice. *BMC veterinary research*. 2013;9:48.
17. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine*. 2001;51:443–56.
18. Bauer C, Schillinger U, Brandl J, Meyer-Lindenberg A, Ott A, Baumgartner C. Comparison of pre-emptive butorphanol or metamizole with ketamine +medetomidine and s-ketamine + medetomidine anaesthesia in improving intraoperative analgesia in mice. *Laboratory Animals*. 2018;002367721881520.
19. Taylor R, Hayes K, Toth L. Evaluation of an anesthetic regimen for retroorbital blood collection from mice. *Contemporary topics in laboratory animal science*. 2000;39:14–7.
20. Cruz J, Loste J, Burzaco O. Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Laboratory animals*. 1998;32:18–22.
21. Mähler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, Illgen-Wilcke B, Pritchett-Corning K, u. a. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*. 2014;48:178–92.
22. Sayers I, Smith S. Mice, rats, hamsters and gerbils. In: Meredith A, Johnson-Delaney C, Herausgeber. *BSAVA Manual of Exotic Pets A Foundation Manual*. 5th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2010. S. 1–27.
23. Romero A, Miranda HF, Puig MM. Analysis of the opioid–opioid combinations according to the nociceptive stimulus in mice. *Pharmacological Research*. 2010;61:511–8.
24. Henke J, Haberstroh J, Sager M, Becker K, Eberspächer E, Bergadano A, u. a. Schmerztherapie bei Versuchstieren - Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT [Internet]. 2015 Mai S. 1–72. Verfügbar unter: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/Anaest._Analgesie/Schmerztherapie_Mai_2015.pdf

25. Cagle L, Franzi L, Epstein S, Kass P, Last J, Kenyon N. Injectable Anesthesia for Mice: Combined Effects of Dexmedetomidine, Tiletamine-Zolazepam, and Butorphanol. *Anesthesiology research and practice*. 2017;2017:9161040.
26. Izer JM, Whitcomb TL, Wilson RP. Atipamezole reverses ketamine-dexmedetomidine anesthesia without altering the antinociceptive effects of butorphanol and buprenorphine in female C57BL/6J mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2014;53:675–83.
27. Gades NM, Danneman PJ, Wixson SK, Tolley EA. The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2000;39:8–13.
28. Patrick CA, Holden Ko MC, Woods JH. Comparison of Antinociceptive Effects Induced by Kappa Opioid Agonists in Male and Female Mice. *Analgesia (Elmsford N Y)*. 1999;4:397–404.
29. Diener M. Vegetatives Nervensystem. In: von Engelhardt W, Breves G, Ahrens F, Herausgeber. *Physiologie der Haustiere*. 2. Auflage. Stuttgart: Enke Verlag; 2005. S. 104–8.
30. Garner HR, Burke TF, Lawhorn CD, Stoner JM, Wessinger WD. Butorphanol-mediated antinociception in mice: partial agonist effects and mu receptor involvement. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1997;282:1253–61.
31. Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl G, Satoh M, Sora I, u. a. Abolished thermal and mechanical antinociception but retained visceral chemical antinociception induced by butorphanol in μ -opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology*. 2008;54:1182–8.
32. Kalvass JC, Olson ER, Cassidy MP, Selley DE, Pollack GM. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Seven Opioids in P-Glycoprotein-Competent Mice: Assessment of Unbound Brain EC₅₀, μ and Correlation of in Vitro, Preclinical, and Clinical Data. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;323:346–55.
33. Chen J, Smith E, Cahill M, Cohen R, Fishman J. The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sciences*. 1993;52:389–96.
34. Gharagozlou P, Hashemi E, DeLorey TM, Clark JD, Lamah J. Pharmacological profiles of opioid ligands at Kappa opioid receptors. *BMC Pharmacology*. 2006;6:3–3.
35. Löscher W. Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: Löscher W, Bäumer W, Herausgeber. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 9., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Enke; 2014. S. 93–144.
36. Mion G, Villeveille T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS neuroscience & therapeutics*. 2013;19:370–80.
37. Henke J. Analgesie und Anästhesie beim Kleinsäuger. *Prakt Tierarzt*. 2010;91:294–304.
38. Committee for veterinary medicinal products. Metamizole - Summary Report (2) [Internet]. London, UK; 2003. Report No.: EMEA/MRL/878/03-FINAL. Verfügbar unter: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015055.pdf
39. Hunter JC, Fontana DJ, Hedley LR, Jasper JR, Lewis R, Link RE, u. a. Assessment of the role of α 2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic

- action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology*. 1997;122:1339–44.
40. Brede M, Philipp M, Knaus A, Muthig V, Hein L. α 2-Adrenergic Receptor Subtypes — Novel Functions Uncovered in Gene-Targeted Mouse Models. *Biology of the Cell*. 2004;96:343–8.
41. Valentim AM, Olsson IAS, Antunes LM. The anaesthetic combination of ketamine/midazolam does not alter the acquisition of spatial and motor tasks in adult mice. *Laboratory Animals*. 2013;47:19–25.
- z42. Baumans V, Brain P, Brugère H, Clausing P, Jeneskog T, Perretta G. 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*. 1994;28:97–112.
43. Oren RE, Rasool NA, Rubinstein EH. Effect of ketamine on cerebral cortical blood flow and metabolism in rabbits. *Stroke*. 1987;18:441–4.
44. Flecknell P. *Laboratory animal anaesthesia*. 4. Auflage, S. 1-108,203-207. Amsterdam: Academic Press an imprint of Elsevier; 2016.
45. Roewer N, Thiel H. Anästhetika, Hypnotika und Sedativa. In: Roewer N, Thiel H, Herausgeber. *Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. 3. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014. S. 122–39.
46. Jessen C. Wärmebilanz und Temperaturregulation. In: von Engelhardt W, Breves G, Ahrens F, Herausgeber. *Physiologie der Haustiere*. 2., völlig neu bearb. Aufl. Stuttgart: Enke; 2005. S. 446–60.
47. Kosanke Y. Einfluss verschiedener Anästhesiemethoden auf die Rektal- und Oberflächentemperatur von C57Bl/6-Mäusen (Inhalationsnarkose mit Isofluran und Injektionsnarkose mit Medetomidin-Midazolam-Fentanyl und Ketamin-Xylazin) [Dissertation]. [München, Deutschland]: Ludwig-Maximilian-Universität; 2012.
48. Taylor D. Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2007;46:37–41.
49. Janssen BJA, Celle T, Debets JJM, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2004;287:H1618-24.
50. Sinclair MD. A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J*. 2003;44:885–97.
51. Tsunoda K, Lee XP, Watanabe S, Doge K, Akiya Y, Watanabe T. Sex differences in respiratory and cardiovascular effects of beta-endorphin. *Nihon hoigaku zasshi = The Japanese journal of legal medicine*. 1993;47:193–201.
52. Alves H, Valentim A, Olsson I, Antunes L. Intraperitoneal anaesthesia with propofol, medetomidine and fentanyl in mice. *Laboratory animals*. 2009;43:27–33.
53. Kennedy A. An investigation of the effects of fentanyl on respiratory control [Dissertation]. [Glasgow, UK]: University of Glasgow; 2015.

54. Kiliç N, Henke J. Comparative Studies on the Effect of S(+)-Ketamine-Medetomidine and Racemic Ketamine-Medetomidine in Mouse. *YYÜ Vet Fak Derg.* 2004;15:15–7.
55. Amornyotin S. Ketamine: Pharmacology Revisited. *Int J Anesthesiol Res.* 2014;2:42–4.
56. Hu C, Flecknell P, Liles J. Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat and its reversal using atipamazole and either nalbuphine or butorphanol. *Lab Anim.* 1992;26:15–22.
57. Schmitz S, Tacke S, Guth B, Henke J. Comparison of Physiological Parameters and Anaesthesia Specific Observations during Isoflurane, Ketamine-Xylazine or Medetomidine-Midazolam-Fentanyl Anaesthesia in Male Guinea Pigs. Baud O, Herausgeber. *PLOS ONE.* 2016;11:e0161258.
58. UK Competent Authority, Chemicals Regulation Directorate, Health and Safety Executive. CLH Report for Medetomidine - Proposal for Harmonised Classification and Labelling - Based on Regulation (EC) No 1272/2008 (CLP Regulation), Annex VI, Part 2. United Kingdom; 2014 S. 19.
59. Flandre T, Leroy P, Desmecht D. Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *Journal of applied physiology.* 2003;94:1129–36.
60. Henke J, Baumgartner C, Roltgen I, Eberspacher E, Erhardt W. Anaesthesia with Midazolam/Medetomidine/Fentanyl in Chinchillas (*Chinchilla lanigera*) Compared to Anaesthesia with Xylazine/Ketamine and Medetomidine/Ketamine. *Journal of Veterinary Medicine Series A.* 2004;51:259–64.

5. DISKUSSION

Derzeit gibt es verschiedene Narkoseprotokolle in der Mausnarkose, doch nicht jede Einrichtung bzw. Praxis kann über alle Ausstattungen oder Medikamente verfügen.

Eine Inhalationsnarkose mit Isofluran oder Sevofluran erzeugt zwar eine sehr gut steuerbare Hypnose und Muskelrelaxation, erfordert aber neben einem passenden, teuren Narkosegerät mit Präzisionsverdampfer auch stets eine ausreichende analgetische Versorgung für schmerzhafte Eingriffe (Abou-Madi, 2006; Cornett et al, 2008; Henke & Erhardt, 2012a). Des Weiteren können volatile Anästhetika die Schleimhäute des Respirationstraktes der Patienten reizen (Sayers & Smith, 2010) und das Risiko der personellen Belastung durch das Entweichen des Narkosegases in die Räumlichkeiten gilt es ebenfalls zu beachten (Flecknell, 2016). Bei entsprechender Ausstattung bietet die Inhalationsnarkose eine gut steuerbare Möglichkeit der Anästhesie bei Mäusen und kann auch als Vertiefung der Narkose ergänzend genutzt werden (Abou-Madi, 2006; Cesarovic et al, 2012; Gargiulo et al, 2012).

Als Alternative dazu gibt es zahlreiche Anästhetika-Kombinationen im Rahmen der Injektionsanästhesie. Hierbei müssen spezielle Arznei- und Betäubungsmittelrechtliche Vorschriften des jeweiligen Landes bedacht werden. In Japan fällt z.B. Ketamin aufgrund Missbrauchs seit dem Jahr 2007 unter die Betäubungsmittelpflicht (Kiriara et al, 2013), was eine Nutzung der lange bewährten Narkosekombinationen Ketamin + Xylazin bzw. Medetomidin (Buitrago et al, 2008; Gargiulo et al, 2012; Green et al, 1981; Hjálmarsdóttir, 2005; Voipio et al, 1988) dort erschwert. Ketamin und auch S-Ketamin werden aber u.a. auch aufgrund des guten antihyperalgetischen Effekts in der Anästhesie gerne verwendet (Minville et al, 2010; Ohnesorge et al, 2013). In Deutschland gibt es derzeit diese Einschränkungen des Betäubungsmittelgesetzes (BtMG) lediglich für die Gruppe der Opioide, wie z.B. für den μ -Opioidrezeptoragonist Fentanyl, der im Rahmen der weit verbreiteten MMF-Narkose neben Medetomidin und Midazolam als potente analgetische Komponente verwendet wird (Fleischmann et al, 2016; Henke & Erhardt, 2012a; Hjálmarsdóttir, 2005). Kriterium für die Einstufung als betäubungsmittelpflichtige Substanz ist ein Abhängigkeit induzierendes Potential (Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz - BtMG), 1982). Das Suchtpotential aber auch eine Euphorie werden hauptsächlich über den μ -Opioidrezeptor vermittelt (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012), während dagegen über den κ -Opioidrezeptor eine Dysphorie vermittelt wird (Ammer & Potschka, 2010; Gavériaux-Ruff & Kieffer, 2002). Das vergleichsweise deutlich geringere Suchtpotential von Butorphanol (Feng et al, 1994) lässt sich somit durch den κ -Agonismus sowie den Antagonismus bzw. nur schwachen Agonismus am μ -Opioidrezeptor erklären (Löscher, 2014). Daher fällt Butorphanol in Deutschland nicht unter die Betäubungsmittelpflicht im Sinne des BtMG. Da derzeit nicht alle versuchstierkundlichen Einrichtungen in Deutschland über betäubungsmittelpflichtige Substanzen wie Fentanyl und damit über die MMF-Narkose verfügen können, war es auch Ziel dieser Studie, nicht betäubungsmittelpflichtige Alternativen wie Ketamin + Medetomidin basierte Narkoseprotokolle mit

nicht betäubungsmittelpflichtigen Zusatzanalgetika zu evaluieren. Die Kombination Ketamin + Medetomidin führt zu einer „balancierten Anästhesie“, indem sich die jeweiligen Wirkungen gegenseitig positiv ergänzen (Ammer & Potschka, 2010; Erhardt et al, 2012; Green et al, 1981; Voipio et al, 1988). Allerdings wurde in diversen Studien beschrieben, dass eine chirurgische Toleranz nicht immer sicher oder auch z.T. gar nicht erreicht werden konnte (Arras et al, 2001; Buitrago et al, 2008; Burnside et al, 2013; Voipio et al, 1988). Die Dauer der pharmakologischen Toleranz, also Hypnose und Immobilisierung, sowie die Dauer einer chirurgischen Toleranz inklusive entsprechender Schmerzausschaltung sind sehr variabel und hängen von der Dosis, aber auch von weiteren Faktoren wie z.B. Geschlecht und Stamm ab (Baker et al, 2011; Cruz et al, 1998; Kiliç & Henke, 2004; Voipio et al, 1988). In dieser Studie konnte die Anästhetikakombination Ketamin + Medetomidin alleine, aber auch mit Ergänzung präemptiver Analgesie eine gute und zuverlässige Anästhesie erzeugen. Als Analgetika wurden in dieser Studie das durch die periphere sowie zentrale Wirkung gut bei viszeralen und tumorbedingten Schmerzen wirkende nicht-opioide Metamizol (Akman et al, 1996; Carlsson et al, 1986; Gulmez et al, 2006; Henke et al, 2015) und das schwach bis mäßig potente Opioid Butorphanol (Gades et al, 2000), das aufgrund des κ -Agonismus gut wirksam bei viszeralen Schmerzen ist (Ammer & Potschka, 2010), gewählt.

Beachtung muss in Hinblick auf die Analgesie v.a. finden, dass bei einer vollständigen Antagonisierung der MMF Narkose mittels Atipamezol + Flumazenil + Naloxon (AFN) an eine rechtzeitige analgetische Versorgung gedacht wird (Fleischmann et al, 2016). Hierzu wäre die präoperative p.o. Gabe von Metamizol zu überlegen, das eine Wirkung von 4-6 Stunden besitzt. Zu bedenken gilt es hier, dass es laut Studien von Akman et al. (1996) und Kiliç & Erol (2000) zu einer Aufhebung der zentralen antinozizeptiven Wirkung von Metamizol durch die Gabe von Naloxon kommen kann. Laut Akman et al. (1996) kommt es zu einer beinahe kompletten Antagonisierung der zentralen antinozizeptiven Wirkung von Metamizol nach intracerebroventrikulärer oder intrathekaler Verabreichung, während es nach subkutaner Applikation von Metamizol nur zu einer Abschwächung aber keiner kompletten Aufhebung kommt. Die Applikationsroute scheint hier einen deutlichen Einfluss zu haben und es ist anzunehmen, dass es bei peroraler Verabreichung von Metamizol, wenn überhaupt, auch nur zu einer Abschwächung kommt. Sollte ein Opioid postoperativ nötig sein, kann das Fentanyl der MMF-Kombination entweder anstelle des Antagonisten Naloxon direkt durch Butorphanol oder Buprenorphin (Fleischmann et al, 2016; Hu et al, 1992) vom Rezeptor verdrängt werden, oder Butorphanol bzw. Buprenorphin werden ca. 30 Minuten vor der vollständigen Antagonisierung inklusive Naloxon appliziert, um sicherzustellen, dass rechtzeitig ein ausreichend hoher Wirkspiegel erreicht wird. Letztere Variante reduziert auch die ausgeprägten kardio-respiratorischen Nebenwirkungen von Fentanyl deutlich (Fleischmann et al, 2016; Hu et al, 1992) und verbessert die Rekonvaleszenz erfahrungsgemäß deutlich. Die Bindungsaffinität gegenüber μ - und κ -Opioidrezeptoren von Butorphanol (Chen et al, 1993) und Buprenorphin (Erhardt et al, 2012; Volpe et al, 2011) ist wesentlich höher als die von Fentanyl. Die rechtzeitige Gabe der postoperativen Analgetika verhindert einen Schmerzpeak nach

Antagonisierung. Durch die starke Rezeptorbindung werden Butorphanol oder Buprenorphin nicht mehr relevant vom Rezeptor verdrängt, sodass sie trotz Antagonisierung ausreichend wirken können. Während Butorphanol eher für schwache bis mäßige Schmerzen für einen relativ kurzen Zeitraum von 1-6 Stunden (Gades et al, 2000; Henke, 2010; Henke et al, 2015) bei Mäusen – abhängig vom Stamm – geeignet ist, können mit Buprenorphin aufgrund des partiellen μ -Agonismus sehr gut moderate bis teilweise starke Schmerzen für einen längeren Zeitraum von 3-8 Stunden abgedeckt werden (Ammer & Potschka, 2010; Gades et al, 2000; Henke, 2010; Henke et al, 2015). Des Weiteren muss bei der Verwendung der MMF Narkose bedacht werden, dass die sehr potente analgetische Wirkung des injizierten μ -Agonisten Fentanyl nur kurz wirksam (ca. 20-30 Minuten) ist (Erhardt et al, 2012) und man allein deswegen an eine rechtzeitige weitere analgetische Versorgung denken muss. Eine sehr gute Übersicht mit Empfehlungen zur analgetischen Versorgung für den jeweiligen operativen Eingriff und den zu erwartenden Schmerzen wurde vom Ausschuss für Anästhesie der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) für den Praktiker zur Verfügung gestellt (Henke et al, 2015).

Für die Zusammenstellung der „balancierten Analgesie“ sollte auch der 3-Stufen-Plan für die Schmerztherapie der Weltgesundheitsorganisation (WHO) berücksichtigt werden, der ursprünglich als Richtlinie zur gezielten analgetischen Behandlung bei Tumorschmerzen beim Menschen veröffentlicht wurde (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 1996) sich aber auch gut beim Tier anwenden lässt. Die Empfehlungen sind, als erste Stufe mit einem Nicht-Opioid, wie z.B. einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum (NSAID), Coxib oder nichtsteroidalen Antipyretikum, wie Metamizol gegebenenfalls in Kombination mit einem sogenannten „Adjuvanz“, wie z.B. Neuroleptika oder Anxiolytika als Hilfsmittel zur Schmerzlinderung zu beginnen. Wenn diese Medikation nicht zu einer Linderung der Schmerzen führt, sollte die zweite Stufe ergänzt werden. Das bedeutet, dass schwach bis mäßig wirksame Opioide wie z.B. Butorphanol ins Spiel kommen. Sollte auch diese Kombination nicht zur Schmerzfremheit bzw. ausreichenden Schmerzlinderung führen, sollten die Opioide der 2. Stufe durch stärkere bis hochpotente Opioide, wie Fentanyl oder z.T. auch Buprenorphin, ersetzt werden. Je nach individueller Anforderung lässt sich dieses Stufenschema noch breiter ausdehnen z.B. in Richtung zusätzlicher Lokalanästhesie. (Beubler, 2016; Erhardt et al, 2012; Henke et al, 2015; Weltgesundheitsorganisation (WHO), 1996).

Des Weiteren spielt die Art der Schmerzentstehung und die Lokalisation eine wichtige Rolle für eine adäquate Analgesie. Die Nozizeption, also die Erkennung und Verarbeitung von Schmerzreizen, beinhaltet periphere und zentrale Mechanismen. So möchte man mit NSAID z.B. vorwiegend die Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren verhindern, während bestimmte Anästhetika und die Opioide dosisabhängig die zentrale Weiterverarbeitung reduzieren. (Sann, 2005) Sind z.B. entzündliche Schmerzen zu erwarten oder das Trauma eines chirurgischen Eingriffs, der immer mit einer Gewebeschädigung einhergeht, sollten bei nierengesunden Patienten bereits präoperativ NSAID, wie z.B. Meloxicam (Erhardt et al, 2012; Henke et al, 2015) eingesetzt werden, die in das Entzündungsgeschehen v.a. durch eine COX-Hemmung eingreifen (Henke et al, 2012). Für viszerale Schmerzen, also den

Eingeweideschmerzen, sind z.B. Butorphanol aber auch Buprenorphin und Metamizol gut geeignet (Ammer & Potschka, 2010; Brito et al, 2017; Stumpf et al, 2016), wobei diese bei hochgradigen Schmerzen alleine nicht ausreichen und ein stärkeres Opioid, wie z.B. Fentanyl (Ammer & Potschka, 2010) verwendet werden muss.

Im Vergleich zu den Ketamin + Medetomidin basierten Narkoseprotokollen dieser Studie, führte die zu erwartende Dosisersparung von S-Ketamin um 50% aber nur mit der Prämedikation des schwach bis mäßig analgetisch wirksamen (Gades et al, 2000; Henke et al, 2015) Butorphanol zu einer belastbaren chirurgischen Toleranz. Eine Halbierung der Dosis des aktiven Entantiomers S-Ketamin im Vergleich zur Dosis des Razemats Ketamin konnte bereits beim Hamster (Erhardt et al, 2001; Wohlrab, 2001), bei der Katze (Stelter, 2001) und auch beim Menschen (Himmelseher & Pfenninger, 1998) erfolgreich beschrieben werden. Die Ergebnisse dieser Studie, in der die Kombination S-Ketamin + Medetomidin nicht zu einem ausreichend hohen Anteil an Mäusen mit einer belastbaren Anästhesie führte, korreliert mit einer Studie beim Hund (Duque et al, 2008). Durch die analgetische Ergänzung des Pyrazolonderivats Metamizol zur S-Ketamin + Medetomidin Narkose konnte der Anteil der Mäuse mit einer zuverlässigen Anästhesie zwar erhöht werden, dennoch sollte eine um lediglich 25% reduzierte S-Ketamin Dosis in Betracht gezogen werden. Beim Hund wurde bereits eine Dosisreduktion von S-Ketamin um 20% in Kombination mit Medetomidin erfolgreich beschrieben (Tunkel, 2001). Der zentrale analgetische Effekt von Butorphanol (Gades et al, 2000; Henke et al, 2015), aber auch von Metamizol (Jasiecka et al, 2014; Khodai, 2008; Nassini et al, 2015) war in der Lage die Zahl der Mäuse mit einem Verlust des Zwischenzehenreflexes zu erhöhen. Der Zwischenzehenreflex an der Hintergliedmaße gilt entsprechend einiger Studien (Arras et al, 2001; Buitrago et al, 2008; Taylor et al, 2000) als zuverlässiger Indikator für das Erreichen der chirurgischen Toleranz bei Mäusen. In seltenen Fällen kann der Zwischenzehenreflex allerdings vorhanden bleiben, obwohl die Dosis z.T. nahe der tödlichen Überdosierung liegt (Smith, 1993). Vermutlich liegt dies an der hohen Reflexaktivität einiger Tiere (Hjálmarsdóttir, 2005). In dieser Studie wurde daher bei vorhandenem Zwischenzehenreflex auf einen gleichzeitigen Anstieg der Herzfrequenz (Flecknell, 2016) geachtet. Arras et al. (2001) beschreiben in ihrer Studie auch die Unzuverlässigkeit der alternativen Reflexe wie z.B. des Hautreflexes oder des sogenannten „tail pinch reflex“. Der bei anderen Tierarten, in Kombination mit weiteren Parametern gemäß modifiziertem Guedel-Schema, zuverlässig nutzbare Lidreflex (Erhardt & Haberstroh, 2012) zur Bestimmung der Narkosetiefe konnte in dieser Studie aufgrund des Exophthalmus bei diesen Mäusen nicht genutzt werden. Auch Flecknell (2016) beschreibt die Verwendung des Lidreflexes bei kleinen Nagern als schwierig.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Studie wurden zum einen die Basisnarkoseprotokolle KM (Ketamin + Medetomidin) und SKM (S-Ketamin + Medetomidin) mit der bereits validierten MMF (Medetomidin + Midazolam + Fentanyl) Narkose bei C57BL/6J Mäusen beider Geschlechter verglichen. Jede der sieben Gruppen bestand aus jeweils 8 männlichen und 8 weiblichen Mäusen. Um die Tierzahlen im Sinne des Tierschutzes so gering wie möglich zu halten, wurde jede Maus nach einer „wash out“ Periode von mindestens 2 Wochen ein weiteres Mal anästhesiert. Ziel war es, sowohl eine ausreichende chirurgische Toleranz mit einer 50% Dosisreduktion von S-Ketamin im Vergleich zu dem Ketamin-Razemat zu erreichen, als auch eine um 15 Minuten frühere Antagonisierung des Medetomidin-Anteils durch Atipamezol bei der SKM Gruppe ohne einen Ketaminüberhang zu erzeugen. Zum anderen sollte in dieser Studie eine mögliche Verbesserung der Analgesie der beiden Basisnarkosen KM und SKM durch eine präoperative Gabe von Butorphanol bzw. Metamizol erreicht werden.

Als zuverlässiger Indikator für das Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde der sogenannte Fußrückziehreflex (PWR), also die Reaktion auf einen schmerzhaften Stimulus an der Hintergliedmaße, in Kombination mit akuten Herzfrequenzveränderungen genutzt.

Die Narkoseparameter Atem- und Herzfrequenz sowie die Körpertemperatur, die periphere Sauerstoffsättigung und die PWR wurden alle 5 Minuten kontrolliert. Ebenso wurde die Einschlaf- und Aufwachzeit gemessen, sowie die Qualität der Einschlaf- und Aufwachphase beobachtet und bewertet. Die Mäuse erhielten nach Verlust des Stellreflexes 100% Sauerstoff per Nasenmaske und eine externe Wärmezufuhr mittels einer Wärmematte. Vor Injektion des Antagonisten, wurde jeder Maus subkutan ein Ringer-Glucose-Gemisch verabreicht.

Alle Ketamin basierten Narkoseprotokolle sowie das Narkoseregime S-Ketamin + Medetomidin + Butorphanol führten bei den verwendeten C57BL/6J Mäusen zu einer guten und zuverlässigen chirurgischen Toleranz. Folgestudien sollten eine denkbare Dosisreduktion von Butorphanol sowie den möglichen Zusatz von Atropin evaluieren, um die Aufwachdauer sowie die Nebenwirkung der sekretorischen Atmung möglicherweise zu reduzieren.

Eine Dosisreduktion um 50% bei S-Ketamin führte nicht zu einem ausreichend hohen Anteil an Mäusen mit einem Verlust der PWR. Dieser Anteil konnte zwar durch die präemptive Gabe von Metamizol gesteigert werden, dennoch sind weitere Studien zur S-Ketamin-Dosierung nötig. Zu überlegen ist eine Reduktion um lediglich 25% bei S-Ketamin.

Die frühere Antagonisierung des Medetomidin-Anteils bei den S-Ketamin basierten Narkosen führte zu einer etwas kürzeren Aufwachdauer sowie einer besseren Rekonvaleszenz der Mäuse. Des Weiteren muss bei der MMF Narkose das auch in dieser Studie aufgetretene Resedationsphänomen beachtet werden.

Bei allen Narkoseregimen ist eine externe Sauerstoff- und Wärmezufuhr bereits zum Zeitpunkt der Injektion der Anästhetika, aber auch nach Verabreichen der Antagonisten während der Rekonvaleszenzphase erforderlich, um den deutlichen Abfall der peripheren Sauerstoffsättigung sowie der Körpertemperatur ohne Substitution zu minimieren.

Insgesamt gesehen ist eine frühere Antagonisierung von Medetomidin in Kombination mit S-Ketamin nach 30 statt 45 Minuten grundsätzlich gut möglich, da durch die kürzere Wirkdauer von S-Ketamin keine Katalepsie bei den Mäusen beobachtet wurde. Des Weiteren führte die kürzere Anästhesiedauer zu einer deutlich verbesserten Rekonvaleszenz bei den Tieren. Im Vergleich zum Ketamin-Razemat führte die um 50% reduzierte S-Ketamin Dosierung aber nicht zu einem ausreichend großen Anteil an Mäusen mit einem Verlust der PWR.

Bezüglich der Verbesserung der analgetischen Potenz der KM und SKM Basisnarkosen lässt sich folgendes aussagen: Die präemptive Gabe von Butorphanol und Metamizol zu den Basisnarkosen S-/Ketamin + Medetomidin führt zu einer besseren analgetischen Qualität. Zum einen konnte durch die Ergänzung von Butorphanol zu beiden Basisnarkosen die Dauer des Verlustes der PWR deutlich gesteigert werden. Zum anderen konnte durch die Zugabe von Butorphanol aber auch von Metamizol zur SKM Basisnarkose die Anzahl der Tiere mit einem Verlust der PWR erhöht werden. Da es zu keinen negativen Effekten kam, ist die präemptive Gabe von Metamizol ohne Einschränkungen zu empfehlen. Bei der Verwendung von Butorphanol im Rahmen der Narkose sollte aufgrund der verlängerten Aufwachphase eine Dosisreduktion in Betracht gezogen werden.

7. SUMMARY

In this study, the basic anaesthesia regimens KM (ketamine + medetomidine) as well as SKM (s-ketamine + medetomidine) have been compared with the well known MMF (medetomidine + midazolam + fentanyl) anaesthesia regimen on C57BL/6J mice of both sexes. Each of the seven groups included 8 male and 8 female mice, respectively. Each mouse was administered another anaesthesia after a wash out period of at least 2 weeks, to reduce the number of animals in sense of animal welfare. One aim was, to reach a reliable surgical tolerance with 50% less dosage of s-ketamine compared to the racemic ketamine. Second aim was, to evaluate, whether the medetomidine part could be antagonized 15 minutes earlier for SKM than for KM without producing the typical ketamine-induced catalepsy. Furthermore, this study investigated a possible improvement of analgesia for KM and SKM anaesthesia by adding pre-emptive butorphanol or metamizole.

As a reliable indicator for reaching surgical tolerance, analgesia was tested via the pedal withdrawal reaction (PWR) to a painful stimulus on the hind limb combined with a simultaneous increase of heart rate.

Every 5 minutes during anaesthesia, respiratory frequency and heart rate, as well as body temperature, peripheral oxygen saturation and PWR were monitored. Furthermore, induction and recovery time as well as their quality were measured and evaluated. After the loss of the righting reflex, 100% oxygen was supplied via a nose mask and external heat via a heating pad. Before injecting the antagonist, each mouse was administered an infusion (Ringer's solution + glucose) subcutaneously.

All ketamine based anaesthetic regimen as well as SKM + butorphanol induced a good and reliable surgical tolerance within all used C57BL/6J mice. Further studies should evaluate a possible dose reduction of butorphanol as well as the addition of atropine, to reduce the time of recovery and the bronchial secretion.

A dose reduction of 50% for s-ketamine did not induce a sufficient loss of the PWR. The number of mice with a loss of the PWR could have been raised by adding pre-emptive metamizole. However, further dose finding studies are necessary. A possible reduction of 25% for s-ketamine has to be taken into account.

The earlier antagonisation of the medetomidine part for s-ketamine based regimens induced a shorter recovery time as well as a better reconvalescence of the mice. Regarding the MMF regimen, there has to be considered the re-sedation phenomenon, which also occurred in this study.

No matter which anaesthetic regimen will be used, an external oxygen and heat supply is necessary when initiating the anaesthesia and also after injecting the antagonist for the time of recovery, to minimize the decrease of the peripheral oxygen saturation and the body temperature.

In summary, an earlier antagonisation of the medetomidine part in combination with s-ketamine after 30 instead of 45 minutes is basically possible in mice, as there has been monitored no catalepsy due to the shorter duration of action of s-ketamine. Besides, mice showed a better reconvalescence period due to the shorter time of anaesthesia. Compared to the racemic ketamine, the 50% less dosage of s-ketamine could not induce a sufficient amount of mice with a loss of the PWR.

Regarding the improvement of analgesia for KM and SKM anaesthetic regimens, the following has to be summarized: The pre-emptive application of butorphanol and metamizole improved the analgesic quality of the KM and SKM anaesthesia. By adding butorphanol to KM and SKM, the duration of the loss of the PWR could have been increased considerably. Furthermore, the amount of mice showing a loss of the PWR could have been increased by adding butorphanol and also metamizole to the SKM anaesthesia. As there has been observed no negative impact of metamizole, the pre-emptive application could be recommended with any limitation. When using pre-emptive butorphanol for anaesthetic protocols, a dose reduction should have to be taken into account because of the prolonged recovery time.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abou-Madi, N. (2006) Anesthesia and analgesia of small mammals. In *Recent advances in veterinary anesthesia and analgesia: companion animals*, Gleed R & Ludders J (eds) International Veterinary Information Service, this document is available on-line at www.ivis.org A1408.0106.
- Aguirre-Bañuelos, P. & Granados-Soto, V. (1999) Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyrone. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 42, 79–85.
- Akman, H., Aksu, F., Gültekin, I., Ozbek, H., Oral, U., Doran, F. & Baysal, F. (1996) A possible central antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Pharmacology*, 53, 71–78.
- Altman, J.D., Trendelenburg, A.U., MacMillan, L., Bernstein, D., Limbird, L., Starke, K., Kobilka, B.K. & Hein, L. (1999) Abnormal Regulation of the Sympathetic Nervous System in α_{2A} -Adrenergic Receptor Knockout Mice. *Molecular Pharmacology*, 56, 154–161.
- Alves, H., Valentim, A., Olsson, I. & Antunes, L. (2009) Intraperitoneal anaesthesia with propofol, medetomidine and fentanyl in mice. *Laboratory animals*, 43, 27–33.
- Ammer, H. & Potschka, H. (2010) Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Frey H-H & Löscher W (eds) pp 126, 128-139, 143-156. Stuttgart: Enke Verlag.
- Amornyotin, S. (2014) Ketamine: Pharmacology Revisited. *International Journal of Anesthesiology Research*, 2, 42–44.
- Arras, M., Autenried, P., Rettich, A., Spaeni, D. & Rüllicke, T. (2001) Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine*, 51, 443–456.
- Baker, N., Schofield, J., Caswell, M. & McLellan, A. (2011) Effects of early atipamezole reversal of medetomidine-ketamine anesthesia in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50, 916–920.
- Baumans, V., Brain, P., Brugère, H., Clausing, P., Jeneskog, T. & Perretta, G. (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.
- Berry, C., Thedens, D., Light-McGroary, K., Miller, J., Kutschke, W., Zimmerman, K. & Weiss, R. (2009) Effects of deep sedation or general anesthesia on cardiac function in mice undergoing cardiovascular magnetic resonance. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 11, 16.

- Beubler, E. (2016) Arzneimittel in der Schmerztherapie. In *Kompendium der medikamentösen Schmerztherapie: Wirkungen, Nebenwirkungen und Kombinationsmöglichkeiten*, Beubler E (ed) pp 10–11. Berlin Heidelberg: Springer.
- Brede, M., Philipp, M., Knaus, A., Muthig, V. & Hein, L. (2004) α 2-Adrenergic Receptor Subtypes — Novel Functions Uncovered in Gene-Targeted Mouse Models. *Biology of the Cell*, 96, 343–348.
- Bremer, P., Kimishima, A., Schlosburg, J., Zhou, B., Collins, K. & Janda, K. (2016) Combatting Synthetic Designer Opioids: A Conjugate Vaccine Ablates Lethal Doses of Fentanyl Class Drugs. *Angewandte Chemie International Edition*, 55, 3772–3775.
- Brito, B., Vazquez, E., Taylor, P., Alvarado, Y., Vanegas, H., Millan, A. & Tortorici, V. (2017) Antinociceptive effect of systemically administered dipyrone (metamizol), magnesium chloride or both in a murine model of cancer. *European journal of pain (London, England)*, 21, 541–551.
- Buitrago, S., Martin, T., Tetens-Woodring, J., Belicha-Villanueva, A. & Wilding, G. (2008) Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 47, 11–17.
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft - bmel (2016) Versuchstierzahlen 2016. Available at: https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?docId=10323474#doc10323474bodyText1.
- Burnside, W., Flecknell, P., Cameron, A. & Thomas, A. (2013) A comparison of medetomidine and its active enantiomer dexmedetomidine when administered with ketamine in mice. *BMC veterinary research*, 9, 48.
- Butz, G.M. & Davisson, R.L. (2001) Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiological Genomics*, 5, 89–97.
- Cagle, L., Franzi, L., Epstein, S., Kass, P., Last, J. & Kenyon, N. (2017) Injectable Anesthesia for Mice: Combined Effects of Dexmedetomidine, Tiletamine-Zolazepam, and Butorphanol. *Anesthesiology research and practice*, 2017, 9161040.
- Carlsson, K., Helmreich, J. & Jurna, I. (1986) Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyrone): *Pain*, 27, 373–390.
- Cesarovic, N., Jirkof, P., Rettich, A., Nicholls, F. & Arras, M. (2012) Combining sevoflurane anesthesia with fentanyl-midazolam or s-ketamine in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 51, 209–218.

- Cesarovic, N., Nicholls, F., Rettich, A., Kronen, P., Hässig, M., Jirkof, P. & Arras, M. (2010) Isoflurane and sevoflurane provide equally effective anaesthesia in laboratory mice. *Laboratory Animals*, 44, 329–336.
- Chen, J., Smith, E., Cahill, M., Cohen, R. & Fishman, J. (1993) The opioid receptor binding of dezocine, morphine, fentanyl, butorphanol and nalbuphine. *Life Sciences*, 52, 389–396.
- Cherng, C. & Wong, C. (2005) Effect of Fentanyl on Lidocaine-Induced Convulsions in Mice. *Pharmacology*, 75, 1–4.
- Chiba, S., Nishiyama, T., Yoshikawa, M. & Yamada, Y. (2009) The Antinociceptive Effects of Midazolam on Three Different Types of Nociception in Mice. *Journal of Pharmacological Sciences*, 109, 71–77.
- Committee for veterinary medicinal products (2003) Metamizole - Summary Report (2) London, UK Available at:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015055.pdf.
- Cornett, P., Matta, J. & Ahern, G. (2008) General anesthetics sensitize the capsaicin receptor transient receptor potential V1. *Molecular pharmacology*, 74, 1261–1268.
- Cruz, J., Loste, J. & Burzaco, O. (1998) Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Laboratory animals*, 32, 18–22.
- Dhir, A., Zolkowska, D. & Rogawski, M. (2013) Seizure protection by intrapulmonary delivery of midazolam in mice. *Neuropharmacology*, 73, 425–431.
- Diener, M. (2005) Vegetatives Nervensystem. In *Physiologie der Haustiere*, von Engelhardt W, Breves G & Ahrens F (eds) pp 104–108. Stuttgart: Enke Verlag.
- Drew, G. & Whiting, S. (1979) Evidence for two distinct types of postsynaptic α -adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo. *British Journal of Pharmacology*, 67, 207–215.
- Duque, J., Oleskovicz, N., Guirro, E., Valadão, C. & Soares, V. (2008) Relative potency of ketamine and S(+)-ketamine in dogs. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 31, 344–348.
- Emmerson, P., Clark, M., Mansour, A., Akil, H., Woods, J. & Medzihradsky, F. (1996) Characterization of opioid agonist efficacy in a C6 glioma cell line expressing the mu opioid receptor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278, 1121–1127.
- Erhardt, W. & Haberstroh, J. (2012) Anästhesietiefe und Anästhesiezeichen. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 323–324. Stuttgart: Schattauer Verlag.

- Erhardt, W. & Henke, J. (2012) Allgemeinanästhesie. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 356-359. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Erhardt, W., Henke, J., Tacke, S., Baumgartner, C. & Kroker, R. (2012) Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 19–97. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- Erhardt, W., Wohlrab, S., Kiliç, N., Werner, C. & Henke, J. (2001) Comparison of the anaesthesia combinations racemic-ketamine/medetomidine and S-Ketamine/medetomidine in syrian golden hamsters (*mesocricetus auratus*). *Veterinary anaesthesia and analgesia*, 28, 212–213.
- Ertin, I., Gunduz, O. & Ulugol, A. (2015) Contribution of nociceptin/orphanin FQ receptors to the anti-nociceptive and hypothermic effects of dipyrone. *Acta Neuropsychiatrica*, 27, 48–52.
- Feng, Y., Tseng, Y., Jaw, S., Hoskins, B. & Ho, I. (1994) Tolerance Development to Butorphanol: Comparison With Morphine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49, 649–655.
- Fink, G.D. (2017) Does Tail-Cuff Plethysmography Provide a Reliable Estimate of Central Blood Pressure in Mice? *Journal of the American Heart Association*, 6, 1–2.
- Fink, H. & Frey, H.-H. (2010) Allgemeine Pharmakologie. In *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Frey H-H & Löscher W (eds) p 12. Stuttgart: Enke Verlag.
- Flandre, T., Leroy, P. & Desmecht, D. (2003) Effect of somatic growth, strain, and sex on double-chamber plethysmographic respiratory function values in healthy mice. *Journal of applied physiology*, 94, 1129–1136.
- Flecknell, P. (2016) Laboratory animal anaesthesia 4. Auflage, pp. 1-108,203-207. Amsterdam: Academic Press an imprint of Elsevier.
- Fleischmann, T., Jirkof, P., Henke, J., Arras, M. & Cesarovic, N. (2016) Injection anaesthesia with fentanyl-midazolam-medetomidine in adult female mice: importance of antagonization and perioperative care. *Laboratory animals*, 50, 264–274.
- Frey, H.-H. & Löscher, W. (2005) Zentrales Nervensystem (ZNS). In *Physiologie der Haustiere*, von Engelhardt W, Breves G & Ahrens F (eds) p 46. Stuttgart: Enke.
- Freye, E. ed. (1999) Rezeptorinteraktion von Agonisten, Antagonisten und partiellen Agonisten. In *Opiode in der Medizin: Wirkung und Einsatzgebiete zentraler Analgetika* pp 44–51. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

- Gades, N.M., Danneman, P.J., Wixson, S.K. & Tolley, E.A. (2000) The magnitude and duration of the analgesic effect of morphine, butorphanol, and buprenorphine in rats and mice. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 39, 8–13.
- Gargiulo, S., Greco, A., Gramanzini, M., Esposito, S., Affuso, A., Brunetti, A. & Vesce, G. (2012) Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR journal*, 53, E55-69.
- Garner, H.R., Burke, T.F., Lawhorn, C.D., Stoner, J.M. & Wessinger, W.D. (1997) Butorphanol-mediated antinociception in mice: partial agonist effects and mu receptor involvement. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 282, 1253–1261.
- Gavériaux-Ruff, C. & Kieffer, B.L. (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides*, 36, 62–71.
- Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz - BtMG) (1982) Available at: https://www.gesetze-im-internet.de/btmg_1981/BJNR106810981.html.
- Gharagozlou, P., Hashemi, E., DeLorey, T.M., Clark, J.D. & Lameh, J. (2006) Pharmacological profiles of opioid ligands at Kappa opioid receptors. *BMC Pharmacology*, 6, 3–3.
- Green, C., Knight, J., Precious, S. & Simpkin, S. (1981) Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory animals*, 15, 163–170.
- Gulmez, S., Gurdal, H. & Tulunay, F. (2006) Airway smooth muscle relaxations induced by dipyrone. *Pharmacology*, 78, 202–208.
- Hamacher, J., Arras, M., Bootz, F., Weiss, M., Schramm, R. & Moehrlen, U. (2008) Microscopic wire guide-based orotracheal mouse intubation: description, evaluation and comparison with transillumination. *Laboratory Animals*, 42, 222–230.
- Hayes, B. & Balster, R. (1985) Anticonvulsant properties of phencyclidine-like drugs in mice. *European journal of pharmacology*, 117, 121–125.
- Henke, J. (2010) Analgesie und Anästhesie beim Kleinsäuger. *Der Praktische Tierarzt*, 91, 294–304.
- Henke, J. & Erhardt, W. (2012a) Speziespezifische Anästhesie. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 703–724. Stuttgart: Schattauer.
- Henke, J. & Erhardt, W. (2012b) Narkoseüberwachung. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 207–208. Stuttgart: Schattauer.

- Henke, J., Haberstroh, J., Sager, M., Becker, K., Eberspächer, E., Bergadano, A., Zahner, D. & Arras, M. (2015) Schmerztherapie bei Versuchstieren - Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT Available at: http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Anaest._Analgesie/Schmerztherapie_Mai2015.pdf [Accessed November 11, 2018].
- Henke, J., Tacke, S. & Erhardt, W. (2012) Analgesie. In *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier. Mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C & Tacke S (eds) pp 385–418. Stuttgart: Schattauer.
- Himmelseher, S. & Pfenninger, E. (1998) Die klinische Anwendung von S-(+)-Ketamin--eine Standortbestimmung. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS*, 33, 764–770.
- Hjálmarsdóttir, B. (2005) Hämodynamische Untersuchung zur vollständig antagonisierbaren Anästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl im Vergleich zur Ketamin-Xylazin-Kombinationsanästhesie bei der Maus. Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Homanics, G.E., Quinlan, J.J. & Firestone, L.L. (1999) Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 63, 21–26.
- Hu, C., Flecknell, P. & Liles, J. (1992) Fentanyl and medetomidine anaesthesia in the rat and its reversal using atipamezole and either nalbuphine or butorphanol. *Laboratory Animals*, 26, 15–22.
- Huang, L.-H., Li, J., Gu, J.-P., Qu, M.-X., Yu, J. & Wang, Z.-Y. (2018) Butorphanol attenuates myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting mitochondria-mediated apoptosis in mice. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 1819–1824.
- Hunter, J.C., Fontana, D.J., Hedley, L.R., Jasper, J.R., Lewis, R., Link, R.E., Secchi, R., Sutton, J. & Eglen, R.M. (1997) Assessment of the role of α 2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *British Journal of Pharmacology*, 122, 1339–1344.
- Ide, S., Minami, M., Ishihara, K., Uhl, G., Satoh, M., Sora, I. & Ikeda, K. (2008) Abolished thermal and mechanical antinociception but retained visceral chemical antinociception induced by butorphanol in μ -opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 54, 1182–1188.
- Irifune, M., Shimizu, T., Nomoto, M. & Fukuda, T. (1992) Ketamine-induced anesthesia involves the N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in mice. *Brain Research*, 596, 1–9.
- Izer, J.M., Whitcomb, T.L. & Wilson, R.P. (2014) Atipamezole reverses ketamine-dexmedetomidine anesthesia without altering the antinociceptive effects of

- butorphanol and buprenorphine in female C57BL/6J mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53, 675–683.
- Janssen, B.J.A., Celle, T., Debets, J.J.M., Brouns, A.E., Callahan, M.F. & Smith, T.L. (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 287, H1618-24.
- Jasiecka, A., Maślanka, T. & Jaroszewski, J.J. (2014) Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17, 207–214.
- Jaw, S.P., Hoskins, B. & Ho, I.K. (1993) Opioid antagonists and butorphanol dependence. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 44, 497–500.
- Kalvass, J.C., Olson, E.R., Cassidy, M.P., Selley, D.E. & Pollack, G.M. (2007) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Seven Opioids in P-Glycoprotein-Competent Mice: Assessment of Unbound Brain EC₅₀ and Correlation of in Vitro, Preclinical, and Clinical Data. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323, 346–355.
- Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. & Kurosawa, T. (2011) Effect of Three Types of Mixed Anesthetic Agents Alternate to Ketamine in Mice. *Experimental Animals*, 60, 481–487.
- Kennedy, A. (2015) An investigation of the effects of fentanyl on respiratory control. Dissertation, University of Glasgow, Glasgow.
- Khodai, L. (2008) Hemmung humaner NMDA-Rezeptoren durch metamizol und dessen Metabolit 4-Aminoantipyrin, Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität, Münster.
- Kiliç, F. & Erol, K. (2000) Central components in the antinociceptive activity of dipyrone in mice. *Inflammopharmacology*, 8, 259–265.
- Kiliç, N. & Henke, J. (2004) Comparative Studies on the Effect of S(+)-Ketamine-Medetomidine and Racemic Ketamine-Medetomidine in Mouse. *YYÜ Vet Fak Derg*, 15, 15–17.
- Kirihara, Y., Takechi, M., Kurosaki, K., Kobayashi, Y. & Kurosawa, T. (2013) Anesthetic Effects of a Mixture of Medetomidine, Midazolam and Butorphanol in Two Strains of Mice. *Experimental Animals*, 62, 173–180.
- Kos, T., Popik, P., Pietraszek, M., Schäfer, D., Danysz, W., Dravolina, O., Blokhina, E., Galankin, T. & Bespalov, A.Y. (2006) Effect of 5-HT₃ receptor antagonist MDL 72222 on behaviors induced by ketamine in rats and mice. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 16, 297–310.
- Kosanke, Y. (2012) Einfluss verschiedener Anästhesiemethoden auf die Rektal- und Oberflächentemperatur von C57Bl/6-Mäusen (Inhalationsnarkose mit Isofluran und Injektionsnarkose mit Medetomidin-Midazolam-Fentanyl und Ketamin-Xylazin), Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

- Kukanich, B. & Papich, M.G. (2009) Opioid Analgesic Drugs. In *Veterinary pharmacology and therapeutics*, Riviere JE & Papich MG (eds) p 325. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
- Langford, D.J., Bailey, A.L., Chanda, M.L., Clarke, S.E., Drummond, T.E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., LaCroix-Fralish, M.L., Matsumiya, L., Sorge, R.E., Sotocinal, S.G., Tabaka, J.M., Wong, D., van den Maagdenberg, A.M.J.M., Ferrari, M.D., Craig, K.D. & Mogil, J.S. (2010) Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*, 7, 447–449.
- Lin, M.T., Chen, C.F. & Pang, I.H. (1978) Effect of ketamine on thermoregulation in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 56, 963–967.
- Link, R.E., Desai, K., Hein, L., Stevens, M.E., Chruscinski, A., Bernstein, D., Barsh, G.S. & Kobilka, B.K. (1996) Cardiovascular Regulation in Mice Lacking alpha 2-Adrenergic Receptor Subtypes b and c. *Science*, 273, 803–805.
- Löscher, W. (2014) Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, Löscher W & Bäumer W (eds) pp 93–144. Stuttgart: Enke.
- MacMillan, L.B., Hein, L., Smith, M.S., Piascik, M.T. & Limbird, L.E. (1996) Central Hypotensive Effects of the alpha 2a-Adrenergic Receptor Subtype. *Science*, 273, 801–803.
- McCarren, H.S., Moore, J.T. & Kelz, M.B. (2013) Assessing Changes in Volatile General Anesthetic Sensitivity of Mice after Local or Systemic Pharmacological Intervention. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 80, 1–8.
- Miller, A.L. & Leach, M.C. (2015) The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? *PLOS ONE*, 10, e0136000.
- Minville, V., Fourcade, O., Girolami, J.-P. & Tack, I. (2010) Opioid-induced hyperalgesia in a mice model of orthopaedic pain: preventive effect of ketamine. *British journal of anaesthesia*, 104, 231–238.
- Mion, G. & Villevieille, T. (2013) Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS neuroscience & therapeutics*, 19, 370–380.
- Mulder, J. (1978) Anesthesia in the mouse using a combination of ketamine and promazine. *Laboratory animal science*, 28, 70–71.
- Müller, K. (2018) DPT_Schmerztherapie bei Kaninchen, Meerschweinchen, Chinchillas und Frettchen – ein Update. *Der Praktische Tierarzt*, 348–360.
- Muñoz, J., Navarro, C., Noriega, V., Pinaridi, G., Sierralta, F., Prieto, J.C. & Miranda, H.F. (2010) Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammopharmacology*, 18, 65–71.
- Nassini, R., Fusi, C., Materazzi, S., Coppi, E., Tuccinardi, T., Marone, I.M., Logu, F., Preti, D., Tonello, R., Chiarugi, A., Patacchini, R., Geppetti, P. & Benemei, S.

- (2015) The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. *British journal of pharmacology*, 172, 3397–3411.
- Ohnesorge, H., Feng, Z., Zitta, K., Steinfath, M., Albrecht, M. & Bein, B. (2013) Influence of clonidine and ketamine on m-RNA expression in a model of opioid-induced hyperalgesia in mice. *PloS one*, 8, 1–11.
- Oren, R.E., Rasool, N.A. & Rubinstein, E.H. (1987) Effect of ketamine on cerebral cortical blood flow and metabolism in rabbits. *Stroke*, 18, 441–444.
- Patrick, C.A., Holden Ko, M.C. & Woods, J.H. (1999) Comparison of Antinociceptive Effects Induced by Kappa Opioid Agonists in Male and Female Mice. *Analgesia (Elmsford, N.Y.)*, 4, 397–404.
- Pieri, L. (1983) Preclinical pharmacology of midazolam. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 16 Suppl 1, 17S-27S.
- Pircio, A.W., Gyls, J.A., Cavanagh, R.L., Buyniski, J.P. & Bierwagen, M.E. (1976) The pharmacology of butorphanol, a 3,14-dihydroxymorphinan narcotic antagonist analgesic. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*, 220, 231–257.
- Ralvenius, W.T., Benke, D., Acuña, M.A., Rudolph, U. & Zeilhofer, H.U. (2015) Analgesia and unwanted benzodiazepine effects in point-mutated mice expressing only one benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subtype. *Nature Communications*, 6, 1–12.
- Roewer, N. & Thiel, H. (2014) Anästhetika, Hypnotika und Sedativa. In *Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*, Roewer N & Thiel H (eds) pp 122–139. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Romero, A., Miranda, H.F. & Puig, M.M. (2010) Analysis of the opioid–opioid combinations according to the nociceptive stimulus in mice. *Pharmacological Research*, 61, 511–518.
- Ryder, S., Way, W.L. & Trevor, A.J. (1978) Comparative pharmacology of the optical isomers of ketamine in mice. *European journal of pharmacology*, 49, 15–23.
- Sann, H. (2005) Sinnesphysiologie - Nozizeption und Schmerz. In *Physiologie der Haustiere*, von Engelhardt W, Breves G & Ahrens F (eds) pp 74–79. Stuttgart: Enke.
- Sarton, E., Teppema, L.J., Olivevier, C., Nieuwenhuijs, D., Matthes, H.W.D., Kieffer, B.L. & Dahan, A. (2001) The Involvement of the μ -Opioid Receptor in Ketamine-Induced Respiratory Depression and Antinociception. *Anesthesia & Analgesia*, 93, 1495–1500.
- Sayers, I. & Smith, S. (2010) Mice, rats, hamsters and gerbils. In *BSAVA Manual of Exotic Pets.A Foundation Manual*, Meredith A & Johnson-Delaney C (eds) pp 1–27. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.

- Schlosburg, J.E., Radanova, L., Marzo, V.D., Imming, P. & Lichtman, A.H. (2012) Evaluation of the endogenous cannabinoid system in mediating the behavioral effects of dipyrone (metamizol) in mice: *Behavioural Pharmacology*, 23, 722–726.
- Scrollavezza, P., Tambella, A.M., Vullo, C. & Piccionello, A.P. (2009) Evaluation of the muscular relaxant effect of dexmedetomidine or medetomidine in cats. *Veterinary research communications*, 33 Suppl 1, 213–215.
- Sharma, A.C., Thorat, S.N., Nayar, U. & Kulkarni, S.K. (1991) Dizocilpine, ketamine and ethanol reverse NMDA-induced EEG changes and convulsions in rats and mice. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 35, 111–116.
- Sinclair, M.D. (2003) A review of the physiological effects of alpha2-agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 44, 885–897.
- Smith, W. (1993) Responses of laboratory animals to some injectable anaesthetics. *Laboratory animals*, 27, 30–39.
- Stelter, A. (2001) Die Anästhesie bei der Katze mit Medetomidin und Ketamin-Razemat bzw. S-(+)-Ketamin: eine klinische Studie, Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Stenberg, D. (1989) Physiological role of alpha 2-adrenoceptors in the regulation of vigilance and pain: effect of medetomidine. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum*, 85, 21–28.
- Stumpf, F., Algül, H., Thoeringer, C.K., Schmid, R.M., Wolf, E., Schneider, M.R. & Dahlhoff, M. (2016) Metamizol Relieves Pain Without Interfering With Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Mice. *Pancreas*, 45, 572–578.
- Szczyński, G., Veihelmann, A., Massberg, S., Nolte, D. & Messmer, K. (2004) Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice—the haemodynamic effects. *Laboratory Animals*, 38, 64–69.
- Takahashi, R.N., Morato, G.S. & Rae, G.A. (1987) Effects of ketamine on nociception and gastrointestinal motility in mice are unaffected by naloxone. *General Pharmacology: The Vascular System*, 18, 201–203.
- Taylor, R., Hayes, K. & Toth, L. (2000) Evaluation of an anesthetic regimen for retroorbital blood collection from mice. *Contemporary topics in laboratory animal science*, 39, 14–17.
- Tsukamoto, A., Serizawa, K., Sato, R., Yamazaki, J. & Inomata, T. (2015) Vital signs monitoring during injectable and inhalant anesthesia in mice. *Experimental Animals*, 64, 57–64.
- Tunkel, F. (2001) Die Anästhesie beim Hund mit Ketamin-Razemat-Medetomidin im Vergleich zu S-(+)-Ketamin-Medetomidin: eine klinische Studie, dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.

- Ulugol, A., Dost, T., Dokmeci, D., Akpolat, M., Karadag, C.H. & Dokmeci, I. (2000) Involvement of NMDA receptors and nitric oxide in the thermoregulatory effect of morphine in mice. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 107, 515–521.
- Valentim, A.M., Olsson, I.A.S. & Antunes, L.M. (2013) The anaesthetic combination of ketamine/midazolam does not alter the acquisition of spatial and motor tasks in adult mice. *Laboratory Animals*, 47, 19–25.
- Voipio, H., Nevalainen, T. & Virtanen, R. (1988) Evaluation of anesthetic potency of medetomidine-ketamine combination in mice. In *Laboratory animal and health for all*, Erichsen S Coates M & Chatikavanij P (eds) pp 298–299. Bangkok, Thailand.
- Volpe, D.A., Tobin, G.A.M., Mellon, R.D., Katki, A.G., Parker, R.J., Colatsky, T., Kropp, T.J. & Verbois, S.L. (2011) Uniform assessment and ranking of opioid Mu receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59, 385–390.
- Wells, S., Trower, C., Hough, T.A., Stewart, M. & Cheeseman, M.T. (2009) Urethral obstruction by seminal coagulum is associated with medetomidine-ketamine anesthesia in male mice on C57BL/6J and mixed genetic backgrounds. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 48, 296–299.
- Weltgesundheitsorganisation (WHO) ed. (1996) Cancer pain relief: with a guide to opioid availability 2. ed. Genf.
- White, P.F., Way, W.L. & Trevor, A.J. (1982) Ketamine—Its Pharmacology and Therapeutic Uses. *Anesthesiology*, 56, 119–136.
- Wohlrab, S. (2001) Vergleichsuntersuchungen der Anästhetika-Kombinationen Ketamin-Razemat-Medetomidin und S-(+)-Ketamin-Medetomidin und deren Teilantagonisierung mit Atipamezol beim Syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*), Dissertation, Ludwig-Maximilian-Universität, München.
- Xing, S., Tsaih, S.-W., Yuan, R., Svenson, K.L., Jorgenson, L.M., So, M., Paigen, B.J. & Korstanje, R. (2009) Genetic influence on electrocardiogram time intervals and heart rate in aging mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296, H1907-13.

9. DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. Meyer-Lindenberg für die Annahme meiner Dissertation an ihrem Lehrstuhl.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an PD Dr. med. vet. Christine Baumgartner. Vielen Dank für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die Bereitstellung aller nötigen „Zutaten“. Danke für die herzliche Betreuung, die wertvollen Tipps und die Geduld rund um die Veröffentlichung und das Erstellen der Dissertation!

Herzlichen Dank an Dr. med. vet. Ulrike Schillinger für die tatkräftige Hilfe beim Einarbeiten in die Versuche.

Ein riesiger Dank gilt auch Dr. med. vet. Johanna Brandl für die liebe Unterstützung zu jeder Zeit und die zahlreichen hilfreichen Tipps rund um die Dissertation sowie die Veröffentlichung!

Danke an André Gürgen aus dem ZPF und Susanne Frank aus dem Mausraum 1 im ZPF für die Betreuung bei den Versuchen und das liebevolle Versorgen meiner Mäuse.

Vielen Dank an Herrn Armin Ott für den statistischen Feinschliff meiner Daten.

Ein großes Dankeschön gilt auch meiner Kollegin Dr. med. vet. Svenja Rödel sowie meinem Chef Florian Fellner für das „Alles möglich machen“ und Dienstplan schieben in der täglichen Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an meine liebe Cousine Denise Diehl für die Unterstützung bei der Interpretation der statistischen Daten!

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen lieben Mann Dominik und meine lieben Eltern, die mir zu jeder Zeit den Rücken frei gehalten, die Hasis bespaßt und mich mit Nervennahrung versorgt haben! Danke für die Motivation am Ball zu bleiben, die Doppelbelastung durchzuhalten und für das möglich machen all meiner Träume und Ziele!