

Vergleich der analgetischen Wirkung von Fentanyl und Butorphanol
unter Anästhesie mit Tricainmethansulfonat beim Krallenfrosch
(*Xenopus laevis*)

von Marie Sophie Strobel

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

Vergleich der analgetischen Wirkung von Fentanyl und Butorphanol
unter Anästhesie mit Tricainmethansulfonat beim Krallenfrosch
(*Xenopus laevis*)

von Marie Sophie Strobel

aus Weilheim in Obb.

München 2021

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.- Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka

Angefertigt am:

Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums r. d. Isar der TU München

in Kooperation mit dem Tierforschungszentrum der Universität Ulm

Mentor:

Prof. Dr. med. vet. 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. Heidrun Potschka

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Susanne Lauer

Tag der Promotion: 6. Februar 2021

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis	1
Inhaltsverzeichnis	
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1. EINLEITUNG	6
2. LITERATURÜBERSICHT	10
2.1. KRALLenfROSch ALS VERSUCHSTIER	10
2.2. ANÄSTHESIE UND ANALGESIE BEIM KRALLenfROSch.....	11
2.2.1. Präanästhetische Untersuchung und Vorbereitung.....	11
2.2.2. Preferred optimum temperature zone (POTZ)	12
2.2.3. Monitoring	13
2.2.3.1. Herzfrequenz	14
2.2.3.2. Atmung und Sauerstoffsättigung	14
2.2.3.3. Blutdruck	15
2.2.3.4. Körpertemperatur	17
2.2.4. Reflexe und Narkosestadien bei Amphibien	17
2.2.4.1. Umkehrreflex.....	17
2.2.4.2. Kornealreflex	17
2.2.4.3. Flexorreflex und Tiefensensibilität	17
2.2.4.4. Anästhesiestadien bei Amphibien	19
2.2.4.5. Aufwachphase, bzw. Euthanasie	20
2.3. APPLIKATION UND METABOLISIERUNG DER MEDIKAMENTE.....	22
2.3.1. Narkosebad	23
2.4. WAHL DES GEEIGNETEN ANÄSTHETIKUMS.....	24
2.4.1. Verwendetes Anästhetikum Tricainmethansulfonat	24
2.4.2. Benzocain	27
2.4.3. Eugenol.....	27
2.4.4. Isofluran	28
2.4.5. Propofol.....	28
2.4.6. Ketamin	29
2.5. VERWENDETE ANALGETIKA	29
2.5.1. Physiologische Voraussetzungen zur Beurteilung einer Schmerzkompetenz	29
2.5.2. Einsatz von Analgetika bei Amphibien.....	32
2.5.3. Fentanyl.....	35
2.5.4. Butorphanol	37
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	39
3.1. PUBLIKATION 1.....	39
3.2. PUBLIKATION 2.....	50
4. DISKUSSION	55
4.1. EIN NEUES UNTERSUCHUNGSMODELL ZUM NACHWEIS VON INTRAOPERATIVER NOZIZEPTION UNTER MS222-NARKOSE BEI KRALLenfRÖSchEN	55
4.2. ANALGESIE BEIM KRALLenfROSch	59
4.3. AUSBLICK	61

Inhaltsverzeichnis 2

5. ZUSAMMENFASSUNG 63

6. SUMMARY..... 65

7. LITERATURVERZEICHNIS..... 67

8. DANKSAGUNG 77

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
±	plus-minus
<	kleiner
°C	Grad Celsius
Δ, δ	<i>delta</i>
μ	<i>my</i>
μl	Mikroliter
μg	Mikrogramm
§	Paragraph
AAT	Acetic acid test = Essigsäuretest
ACF	African clawed frog = Afrikanischer Krallenfrosch
AG	Arbeitsgemeinschaft
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
BP	blood pressure = Blutdruck
bpm	beats per minute = Schläge pro Minute
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DGHT	Deutsche Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde
d.h.	das heißt
e.g.	for example = zum Beispiel
EKG	Elektrokardiographie
et al.	<i>et altera</i> = und andere
EU	Europäische Union
e.V.	eingetragener Verein
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus
g	Gramm
G	Gauge
GIT	Gastrointestinaltrakt
g/L	Gramm pro Liter
h	hour = Stunde

HR	heart rate = Herzfrequenz
IASP	International Association for the Study of Pain
i.c.	intracoelomial
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
κ	<i>kappa</i>
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
kHz	Kilohertz
L	Liter
mg	Milligramm
mg/L	Milligramm pro Liter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
min.	Minuten
ml	Milliliter
ml/L	Milliliter pro Liter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MS222	Tricainmethansulfonat
n	Anzahl der Tiere
nmol/g	Nanomol pro Gramm
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
p	p-Wert = statistisches Signifikanzniveau
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
p.o.	<i>per os</i>
POTZ	preferred optimum temperature zone = Bereich der Vorzugstemperatur
PS	pain stimulus = Schmerzreiz
RL	Richtlinie
s.c.	subkutan
SD	standard deviation = Standardabweichung
sec.	Sekunden
spp.	<i>species pluralis</i> = mehrere Arten einer Gattung
TierSchG	Tierschutzgesetz

TRP	transient receptor potential
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VO	Verordnung
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

In der Versuchstierkunde kommt die Klasse der Amphibien, im Vergleich zu Kleinsäugetieren wie Mäuse und Ratten, aktuell selten zum Einsatz. In Deutschland betrug im Jahr 2018 die Anzahl verwendeter Tiere 3.857, davon gehörten 1.464 Tiere zur Gattung der Krallenfrösche (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft BMEL, 2018). Neben ethologischen Aspekten machen jedoch nicht nur die relativ unkomplizierte Haltung (Chum et al., 2013) und ihre Robustheit gegenüber Krankheit und Infektion (Gurdon, 1996) Krallenfrösche zu einem interessanten Versuchstier, sondern auch die Möglichkeit mit drei verschiedenen Entwicklungsstadien – Ei, Larve und adultes Tier – zu arbeiten. Dadurch hat sich der Glatte oder Afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) im Laufe der Zeit zu der am meisten genutzten Amphibienspezies in der Forschung entwickelt (Major and Wassersug, 1998, Straka and Simmers, 2012, Burggren and Warburton, 2007, DeNardo, 1995). Auch in der Schmerzforschung werden sie interessanterweise seit Jahrzehnten als Tiermodell eingesetzt (Stevens, 1992), obwohl über das Schmerzempfinden von Amphibien bis heute kontrovers diskutiert wird. Aufgrund ihrer einfacheren Gehirnstruktur erkannte Kaplan Fröschen, stellvertretend für alle poikilothermen Tiere, die Fähigkeit Schmerz zu empfinden ab (Kaplan, 1969). Aktuellere Studien stellen diese Aussage jedoch inzwischen in Frage (Guénette et al., 2013, Stevens, 2004, Coble et al., 2011).

Grundsätzlich muss zwischen dem physiologischen Prozess der Nozizeption (Weiterleitung eines Schmerzreizes von der Peripherie über das Rückenmark bis in das Gehirn) und dem bewusst verarbeiteten Schmerzempfinden im Gehirn unterschieden werden. Schmerz wird als ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis definiert, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht (International Association for the Study of Pain IASP, 2019). Zimmermann bezeichnet Schmerz bei Tieren als ein aversives Sinneserlebnis, das durch tatsächliche oder drohende Verletzung ausgelöst wird und motorische sowie vegetative Schutzreaktionen hervorruft. Schmerz kann außerdem zu erlernter Vermeidung und möglicherweise zur Änderung von artspezifischem Verhalten, einschließlich dem Sozialverhalten, führen (Zimmermann, 1986). Bei letzterem Punkt ist selbstverständlich, dass auch nicht sozial lebende Tiere Anzeichen für Schmerz zeigen (Walters and Williams, 2019). Nozizeption dagegen ist die reine neuronale Weiterleitung eines noxischen Reizes (Transduktion und Transmission in der Peripherie, im Rückenmark Verschaltung auf das

zweite Neuron und Modulation). Das heißt, Nozizeption muss nicht zwangsläufig mit Schmerzempfindung, bzw. Leiden verbunden sein, aber die komplexe, bewusste, subjektive und emotionale Sinneswahrnehmung von Schmerz im Gehirn (Perzeption) ist ohne Nozizeption nicht möglich. Bei letzterer handelt es sich zusammenfassend also um die Weiterleitung eines Schmerzreizes von einem peripheren Rezeptor zum Gehirn, wobei dieser dann durch verschiedene Hirnregionen verarbeitet wird. Beim wachen Tier wird daraus ein bewusstes Schmerzerlebnis, wohingegen unter Narkose eher vegetative Stressparameter gemessen werden können. Amphibien haben als Wirbeltiere anatomisch und physiologisch die neurobiologischen Voraussetzungen, um Schmerzreize weiterzuleiten und in ihrem ZNS zu verarbeiten und wahrzunehmen (Stevens, 2004, Guénette et al., 2013). Deshalb darf auch nach §5 TierSchG an einem Wirbeltier ein mit Schmerzen verbundener Eingriff nicht ohne Betäubung, bzw. Schmerzausschaltung vorgenommen werden. Die Betäubung warmblütiger Wirbeltiere sowie von Amphibien und Reptilien ist von einem Tierarzt vorzunehmen.

Ein Beispiel für einen in der Versuchstierkunde häufig am Krallenfrosch durchgeführten schmerzhaften chirurgischen Eingriff ist die laparatomische Entnahme von Laich, die mehrfach im Lebenszyklus weiblicher Tiere durchgeführt wird (Green, 2003, Villeneuve et al., 2011). In der Regel wird diese Operation unter Anästhesie mit Tricainmethansulfonat (MS222) ohne zusätzliche Analgetika durchgeführt (Wright, 2001a, Animal Research Advisory Committee ARAC, 2019). MS222 gilt seit längerem als das Mittel der Wahl bei der Anästhesie von Amphibien (Kölle et al., 2012, Downes, 1995).

Nach heutigem Stand der Wissenschaft beinhaltet eine Allgemeinanästhesie mit chirurgischer Toleranz jedoch neben Bewusstlosigkeit (Hypnose) und Muskelrelaxation auch eine adäquate Analgesie. Um all diese Komponenten abzudecken, müssen verschiedene Medikamente kombiniert werden, die sich in ihrer Wirkung ergänzen und potenzieren. Der Vorteil einer balancierten, d.h. multimodalen Kombinationsanästhesie und -analgesie ist die mögliche Dosisreduktion der Einzelkomponenten und damit auch die Minimierung unerwünschter Nebenwirkungen, v.a. auf Atmung und Kreislauf. Das erhöht zum einen die Sicherheitsbreite, zum anderen wird das Anästhesie- und Analgesie-Regime steuerbarer und kann durch die unterschiedliche Wirkungsweise der verschiedenen Substanzen gezielter, effektiver und individueller eingesetzt werden, v.a. auch im Hinblick auf Schmerzart, Schmerzlokalisierung und Schmerzstärke (Erhardt, 2012).

Im Gegensatz zu Säugetieren finden sich in der Literatur nur begrenzt Angaben zu Arzneimittelwirkstoffen und deren Dosierung für Amphibien. Momentan wird davon ausgegangen, dass MS222 alle Komponenten einer Allgemeinanästhesie kombiniert (Cakir and Strauch, 2005, Lalonde-Robert et al., 2012a, Ramlochansingh et al., 2014). Es gilt damit als Mittel der Wahl für die Anästhesie von Amphibien.

Die Durchführung einer Anästhesie mit unzureichender Analgesie ist mit den ethischen Richtlinien des Tierschutzes in der experimentellen Forschung, den 3R (Replacement, Reduction, Refinement) nicht zu vereinbaren. Beim Säuger ist bekannt, dass die nicht gehemmte Nozizeption unter Bewusstlosigkeit messbar ist (z.B. Anstieg von Cortisol und glykämische Stressantwort, Abflachung der Narkosetiefe, Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz), bzw. deren Hemmung zu ruhigeren Aufwachphasen, besserer Wundheilung, geringerem Infektionsrisiko/Metastasierung, keiner zentralen Sensibilisierung (Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses) und weniger postoperativen Todesfällen führt (Henke et al., 2012). Das heißt, es soll bereits präemptiv und intraoperativ ein Schmerzreiz gehemmt werden, bevor er im Gehirn ankommt. Das ist für Versuchstiere in der RL 2010/63/EU Kapitel III Artikel 14 (4) gesetzlich festgelegt: „Ein Tier, das möglicherweise Schmerzen erleidet, sobald die Betäubung abklingt, ist präventiv und postoperativ mit Analgetika oder anderen geeigneten schmerzlindernden Methoden zu behandeln, vorausgesetzt, dies ist mit dem Zweck des Verfahrens vereinbar.“

Schmerzzustände am wachen Tier sicher und unabhängig von der subjektiven Erfahrung des Untersuchers erkennen zu können, ist immer noch eine große Herausforderung in der Tiermedizin. Zu einen müssen Spezies, Rasse, Alter, individuelles artspezifisches Verhalten und Umgebung berücksichtigt werden und zum anderen die evolutionsbedingte, weitgehende Unterdrückung von äußeren Schmerzzeichen vieler Spezies. Aktuell ist noch kein Standardschema dafür festgelegt worden. Unter anderem können z.B. anhand von Verhaltensmustern, klinischem Erscheinungsbild und Gesichtsausdruck Schmerzen und Leiden bei Kleinsäugetieren erkannt werden (Sotocina et al., 2011, Langford et al., 2010). Die Umsetzung in der Praxis erweist sich bei Amphibien als äußerst schwierig, da diese Tierklasse sowohl beim Allgemeinbefinden als auch bezüglich klassischer Schmerzparameter sehr geringe Veränderungen zeigt (Machin, 1999). Allgemein gilt jedoch, dass die meisten Tiere, die unter Schmerzen leiden, ihre Futter- und Wasseraufnahme verringern. Eine nicht ausreichende Schmerztherapie kann deshalb schnell zu Hypoglykämie und Dehydratation

führen (ITIS-Empfehlungen, 2012). Dennoch gibt es, unter Berücksichtigung speziesspezifischer Unterschiede, auch bei Amphibien einige Verhaltensweisen, die Hinweise auf Schmerzen geben können: protektives Verhalten wie Lecken, Reiben oder Schonen einer Wunde bzw. Verletzung (Sneddon et al., 2014), geschlossene Augen, Anorexie, Aggressivität oder Lethargie (Kempf, 2008).

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Überprüfung, ob MS222 als Narkosemittel wirklich alle Komponenten einer chirurgisch toleranten Allgemeinanästhesie abdeckt oder ob doch Nozizeption nachgewiesen werden kann. In der Tiermedizin (Arras et al., 2007) wie in der Humanmedizin (Brown et al., 2018, Brown et al., 2014) werden Änderungen von Blutdruck und Herzfrequenz als praktikabler Indikator für den Nachweis von Nozizeption unter Bewusstlosigkeit eingestuft. Der erste Teil der Studie widmete sich also der Frage, ob auf drei verschiedene Schmerzreize hin eine hämodynamische Veränderung unter MS222-Narkose messbar ist. Im zweiten Teil sollte die analgetische Wirkung der Opiatanalgetika Fentanyl und Butorphanol in jeweils drei unterschiedlichen Dosierungen beim Krallenfrosch überprüft werden.

2. Literaturübersicht

2.1. Krallenfrosch als Versuchstier

Benannt nach den charakteristischen kräftigen, schwarzen Hornkrallen an den drei inneren Zehen der muskulösen Hintergliedmaßen gehören die *Xenopus spp.* zur Gattung der Krallenfrösche. Bei der Art *Xenopus laevis*, dem Glatten oder Afrikanischen Krallenfrosch, handelt es sich um ein rein aquatisch lebendes Amphib, das sich unter anderem durch eine schnelle Geschlechtsreife und lange Lebensdauer (bis zu 25 Jahre) auszeichnet. Der natürliche Lebensraum der Tiere sind stehende Gewässer jeglicher Art südlich der Sahara (Kobel et al., 1996), die Nahrungsaufnahme der zungenlosen Tiere erfolgt über eine Art Saugschnappen. Bereits seit dem 19. Jahrhundert als Tiermodell für die vergleichende Anatomie und Physiologie der Wirbeltiere verwendet (Chum et al., 2013, Gurdon and Hopwood, 2003), verbreiteten sich die Tiere vor allem seit den 1930er Jahren schnell in den Laboren Nord-Amerikas und Europas. Zu dieser Zeit machte der Brite Lancelot Hogben in Südafrika die Entdeckung, dass weibliche Krallenfrösche innerhalb von 12-24 Stunden ablaichen nachdem ihnen der Morgenurin schwangerer Frauen injiziert wurde (Hogben, 1939, Shapiro and Zwarenstein, 1935). Der Test wurde später von dem Endokrinologen Carlos Galli-Manini modifiziert, er verwendete männliche Tiere, die bereits drei Stunden nach Urininjektion Spermien produzierten (Galli Mainini, 1947). Als sogenannte „Apothekerfrösche“ wurden sie nun weltweit in der Schwangerschaftsdiagnostik eingesetzt, bis sie in den 1970er Jahren durch immunologische Tests abgelöst wurden (Green, 2010). Dennoch riss die Erfolgsgeschichte von *Xenopus laevis* nicht ab. Als erstes Wirbeltier, das geklont wurde (Gurdon, 1962) verhalf er Sir John B. Gurdon 2012 sogar zum Nobelpreis (Nobel Media AB, 2019). Generationen von Studenten der Naturwissenschaften führten physiologische Experimente am isolierten *Musculus gastrocnemius* durch, bis diese Experimente aus Tierschutzgründen infrage gestellt und zum Teil durch Computersimulationen ersetzt wurden (Mutschmann, 2010). Ferner wurde Anfang der 1980er Jahren der FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay *Xenopus*) -Test als Standardmethode zur Teratogenitätsprüfung etabliert. Dabei handelt es sich um ein ökotoxikologisches Testsystem für die Ermittlung von Deformationen durch Chemikalien. Bei dem vier Tage dauernden Embryo-Larval-Test wird die Organentwicklung von *Xenopus* Larven untersucht (Fent, 2013, Dumont et al., 1983, Schultz and Dawson, 2003).

In Deutschland 2011 zum Versuchstier des Jahres gewählt, werden Krallenfrösche bis heute aufgrund ihrer vielen Qualitäten in den verschiedensten naturwissenschaftlichen Forschungsgebieten, wie der Molekular- und Neurobiologie oder der Grundlagen- und Genomforschung eingesetzt (Beck and Slack, 2001, Hardwick and Philpott, 2015).

2.2. Anästhesie und Analgesie beim Krallenfrosch

Amphibien werden nicht nur zu tierexperimentellen Forschungszwecken gehalten, sondern erfreuen sich auch zunehmender Beliebtheit als exotisches Haustier und werden somit auch immer häufiger in Tierarztpraxen vorstellig. Um eine veterinärmedizinische Versorgung garantieren zu können, ist die Entwicklung praxistauglicher Behandlungsschemata sehr wichtig.

Historisch betrachtet wurden Amphibien bei Versuchen oft durch physische Ruhigstellung bzw. Fixierung immobilisiert oder Abwehrbewegungen der Tiere wurden durch Hypothermie reduziert. Bei der dadurch erzielten Immobilisierung, die zum Teil als „Kältenarkose“ bezeichnet wird, waren Reflexe nicht mehr auslösbar (Jarofke and Herrmann, 1997, Parker, 1939). Da man jedoch aufgrund des anatomischen Aufbaus des Nervensystems nicht davon ausgehen kann, dass keine Nozizeption stattfindet, muss diese Methode aus Tierschutzgründen strikt abgelehnt werden.

In der Literatur finden sich mittlerweile einige Empfehlungen zur Anästhesie bei Amphibien, einschließlich Empfehlungen zur präanästhetischen Untersuchung sowie peri- und postoperativen Versorgung von poikilothermen Patienten. (Gentz, 2007, Kölle et al., 2012, Mitchell, 2009, Baitchman and Stetter, 2014, Wright, 2001b).

2.2.1. Präanästhetische Untersuchung und Vorbereitung

Zur präanästhetischen Vorbereitung gehören unter anderem eine klinische Untersuchung des Patienten und eventuell weiterführende Untersuchungen von Blut und/oder Kot, die Entnahme von Hautbiopsien (Gentz, 2007) bzw. bildgebende Verfahren wie Röntgenaufnahmen (Kölle et al., 2012, Mitchell, 2009).

Bei der klinischen Untersuchung und im allgemeinen Umgang mit Amphibien sollten stets angefeuchtete Handschuhe getragen werden. Dies dient einerseits dem Schutz des

Untersuchenden vor möglichen giftigen Hautsekreten der Tiere und andererseits dem Schutz der empfindlichen Amphibienhaut vor Verletzungen. Da im Zusammenhang mit Latexhandschuhen Allergien und erhöhte Mortalität bei Amphibien beschrieben wurden, empfehlen sich für den Umgang mit adulten Tieren Nitrilhandschuhe und für Larvenstadien Vinylhandschuhe (Gutleb et al., 2001, Baitchman and Stetter, 2014). Zur klinischen Untersuchung gehören u.a. die Adspektion der Tiere, die Beurteilung von Integument, Ernährungs- und Hydratationszustand, Atmung und Bewegungsapparat (Mitchell, 2009). Vor dem Eingriff sollten auch nicht ausschließlich, bzw. nur temporär *aquatil* lebende Amphibien für mindestens 60 Minuten zur ausreichenden Hydrierung in Wasser gesetzt werden (Wright, 2001b). Über die Gabe prophylaktischer Antibiose gibt es geteilte Meinungen, Gentz und Wright plädieren dafür (Gentz, 2007, Wright, 2001b), was mit den aktuell gültigen Antibiotika-Richtlinien nicht konform geht; Koustubhan et al. plädieren wegen der potentiellen (schleim)hautschädigenden Auswirkung dagegen (Koustubhan et al., 2013).

Da bei gefülltem Magen häufig Vomitus auftritt, empfiehlt es sich die Tiere vor der Narkose für einige Stunden nüchtern zu halten (Gentz, 2007). Bei Tieren unter 20 Gramm wird eine Fastenperiode von 4 Stunden empfohlen. Größere insektivore Arten sollten 48 Stunden und Tiere, die mit Wirbeltieren ernährt werden (wie z.B. Ochsenfrösche), sollten bis zu 7 Tagen gefastet werden (Kölle et al., 2012, Wright, 2001a). In der vorliegenden Studie wurde den Krallenfröschen mindestens 24 Stunden vor dem Eingriff die Nahrung entzogen.

Um unnötigen Stress zu vermeiden, beschränkte sich die präanästhetische Untersuchung in der vorliegenden Studie auf die Adspektion der Tiere in der gewohnten Umgebung bzw. in ihrem Aquarium. Gesunde Tiere haben eine intakte, glänzende, schleimige Hautoberfläche, sind bewegungsfreudig und schnellen bei unerwarteten Bewegungen auf den Grund ihres Wassertanks, um sich zu verstecken (Chum et al., 2013).

Am Tag der Operation wurden die Tiere gefangen und beim Transport in einem wassergefüllten Eimer auf besondere Vorsicht geachtet. Im Ankunftsort wurde eine mindestens 30-minütige Ruhepause zur Stressreduktion eingehalten.

2.2.2. Preferred optimum temperature zone (POTZ)

Bei poikilothermen Tieren hat jede Art eine speziesspezifische Vorzugstemperatur (POTZ), die ermittelt und eingehalten werden sollte (Stetter, 1995). Vor allem vor, während und nach der

Narkose ist ihre Einhaltung notwendig, um den Stoffwechsel maximal leistungsfähig zu halten. Während des Eingriffs lässt sich die Temperatur am besten über das Wasser steuern, mit dem der Patient feucht gehalten wird. Die meisten Systeme lassen sich mit einer einfachen Heizmatte temperieren. Als grobe Faustformel kann dienen, dass Tiere aus gemäßigten Breiten eine Temperatur von ca. 20°C benötigen, bzw. tropische Arten mit 25°C temperiert werden sollten (Kempf, 2008). Die POTZ von *Xenopus laevis* bewegt sich in der Spanne von 20-26 °C (Kölle et al., 2012).

Ist die Temperatur zu hoch (ab 27°C), steigt der Sauerstoffbedarf bei gleichzeitig reduzierter Sauerstoffaufnahme und kann zum Erstickungstod führen (Bonath, 1977). Temperaturen unter 10°C führen bei Amphibien bereits zu einer Kältestarre (Kölle et al., 2012). Im Gegensatz zu Reptilien genesen kranke Amphibien in einer kühlen Umgebung eher besser als in einer wärmeren Umgebung (Stetter, 1995). Um eine Beeinflussung der wechselwarmen Tiere durch die Umgebungstemperatur zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie zu jeder Zeit auf ein konstantes Raumklima von durchschnittlich 23°C geachtet (Harvey Pough, 2007).

2.2.3. Monitoring

Die Überwachung der Vitalparameter während einer Narkose ist aus verschiedenen Gründen unabdingbar. Zum einen bewirken die unterschiedlichen Anästhetika eine Verringerung der Atem- und Kreislaftätigkeit, zum anderen können durch kontinuierliches Monitoring Narkosezwischenfälle oder Schmerzen frühzeitig erkannt werden. In der Amphibienmedizin sind die Möglichkeiten jedoch begrenzt und die Messung von Narkoseparametern findet routinemäßig noch selten Verwendung. Meist fehlen in der Praxis schlichtweg die passenden Gerätschaften, aber oft werden kreative Lösungen gefunden.

Zum Standard des Narkosemonitorings in der (Klein)Tiermedizin gehört heutzutage die Messung von Puls- und Atemfrequenz, nicht-invasiv abgeleitetem Blutdruckwert, ggf. Elektrokardiographie (EKG), Körpertemperatur, Urinproduktion und oxymetrischer Sauerstoffsättigung. Beim intubierten Tier kommt noch die Kapnometrie/-graphie hinzu (nicht-invasive Messung der end-expiratorischen CO₂-Konzentration) (Henke and Erhardt, 2012). Leider eignet sich dieses Equipment nicht 1:1 für Amphibienpatienten (Mitchell, 2009), einige Methoden können jedoch übernommen werden, die im Folgenden dargestellt werden.

2.2.3.1. Herzfrequenz

Für die Messung der Herzfrequenz eignet sich bei Amphibien u.a. die Dopplersonografie. Da der Puls in der Peripherie kaum messbar ist (Guénette et al., 2013), wird die Sonde am besten direkt über dem Sternum platziert (Mitchell, 2009). Eine weitere Möglichkeiten ist ein transösophageales Elektrokardiogramm (Guénette et al., 2013) oder die direkte, visuelle Beobachtung des Herzspitzenstoßes in Rückenlage. Über die Herzfrequenzraten bei Amphibien ist bisher wenig bekannt, generell sind sie mit 25-80 (Mitchell, 2009) bzw. 50 Schlägen (Mosley and Mosley, 2015) pro Minute niedriger als bei höheren Wirbeltieren. Ein Abfall der Herzfrequenz kann mit dem Eintreten eines tieferen Narkosestadiums einhergehen. Daher sollte dementsprechend reagiert und das Tier am ganzen Körper mit frischem Wasser abgespült werden, um die Anästhesiezufuhr über die Haut und damit die Anästhesietiefe wieder zu reduzieren.

Um möglichst genaue, kontinuierliche und zuverlässige Herzfrequenzwerte zu erhalten, wurde in dieser Studie ein Mikro-Tip-Katheter intrakardial platziert und mit einer vorgelegten Tabaksbeutelnaht fixiert. Dieser hochsensible Mikromanometer-Drucksensor kann Frequenzen von bis zu 10 kHz direkt intravasal, bzw. intrakardial aufnehmen (Zimmer and Millar, 1998, Deuse, 2004). Die Messung erfolgte dabei kontinuierlich alle zwei Sekunden über den ganzen Untersuchungszeitraum. Für invasive kardiovaskuläre Studien in Mäusen ist dies seit 1998, als Millar Instruments einen 1.4 F Mikro-Tip-Katheter erfolgreich entwickelte, der Goldstandard (Trevino et al., 2010).

2.2.3.2. Atmung und Sauerstoffsättigung

Die Mundbodenatmung oder Kehloszillation bezeichnet die rhythmischen Schwingungen des Mundbodens bei lungenatmenden Amphibien. Sie wird bei zunehmender Narkosetiefe flacher und unregelmäßiger, bis sie schließlich ganz aufhört. Dann übernimmt die Haut den Gasaustausch, wobei besonders darauf zu achten ist, dass diese feucht und intakt gehalten wird (Kölle et al., 2012). Eine Messung der Atemfrequenz ist entsprechend unter MS222-Narkose kaum möglich. Auch in der vorliegenden Arbeit erfolgte keine Messung, da die Kehloszillation stagnierte.

Die in der Literatur empfohlene Messung der Sauerstoffsättigung (Wright, 2001a), gestaltet sich in der Praxis als recht schwierig. Während der Apnoe vermindert sich die Sauerstoffaufnahme, dadurch sinkt die arterielle Sauerstoffsättigung bei gleichzeitig steigender arterieller Kohlenstoffdioxidanreicherung (Longley, 2008). Pulsoxymeter können an der Zwischenzehenhaut, über dem Herzen oder im Ösophagus angebracht werden. Es gibt keine vergleichenden Werte für die Sauerstoffsättigung bei Amphibien. Aufgrund einer fehlenden vollständigen Trennung zwischen arteriellem und venösem Blutkreislauf wird jedoch davon ausgegangen, dass Amphibien niedrigere Werte als Säugetiere haben (Guénette et al., 2013). Bei einer MS222-Narkose wurden bei adulten Krallenfröschen Werte von ca. 80% gemessen (Lalonde-Robert et al., 2012a, Lalonde-Robert et al., 2012b). Um eine hohe Sauerstoffsättigung des Blutes über die Hautatmung zu erreichen und bei einem Abfall der Sättigung um 5% oder mehr, empfiehlt sich die Oxygenierung des Wasserbades (Baitchman and Stetter, 2014, Longley, 2008).

Eine CO₂-Messung fand in dieser Studie nicht statt. Es besteht zwar die Möglichkeit größere Amphibien zu intubieren, dies wird jedoch nur selten praktiziert, weil es einige Übung erfordert. Der Larynx ist bei Amphibien fest verschlossen, sodass sanfte Gewalt angewendet werden muss, um den Tubus zu schieben. Die Trachea ist wiederum sehr kurz, sodass der Tubus gleich hinter dem Larynx platziert werden sollte (Longley, 2008). Die mechanische oder manuelle Beatmung sollte sehr sanft erfolgen (Baitchman and Stetter, 2014).

2.2.3.3. Blutdruck

Die nichtinvasive Blutdruckmessung kann bei Säugetieren über aufblasbare Manschettensysteme (Doppler-Ultraschall oder Oszillationsprinzip) erfolgen (Erhardt et al., 2007). Das Oszillationsprinzip misst die durch den Blutdruck hervorgerufenen Oszillationen in der verwendeten Manschette. Das Druckäquivalent bei Auftreten der ersten Oszillationen wird als systolischer Druck angegeben, der Druck beim Maximum der Oszillationen als arterieller Mitteldruck. Der diastolische Druck wird meist nicht genau bestimmt, sondern nur näherungsweise errechnet. Somit ist erklärlich, dass bei oszillometrischen Messungen der arterielle Mitteldruck sehr gut abgebildet wird, wohingegen Unsicherheiten bei der exakten Bestimmung des diastolischen Blutdrucks bestehen. Die Blutdruckmanschette wird auf einen Wert oberhalb des systolischen Blutdrucks aufgeblasen und langsam abgelassen (Janssens et al., 2016). Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten und da der Puls in der Peripherie kaum

messbar ist (Guénette et al., 2013), kann eine solche Manschette beim Krallenfrosch allerdings nicht korrekt platziert werden.

Invasiv kann der Blutdruck über Kanülierung einer Arterie und Anschluss an einen elektronischen Druckwandler ermittelt werden (Henke and Erhardt, 2012). Der intravasal platzierte Katheter nimmt die Pulswelle des Gefäßes auf und führt diese über ein flüssigkeitsgefülltes Schlauchsystem einem Druckaufnehmer zu, der das vorliegende Drucksignal in ein elektrisches Signal umwandelt (mechanoelektrische Transduktion). Die Genauigkeit des Messsystems hängt von einer intakten Flüssigkeitssäule im Schlauchsystem sowie einer regelrechten Signalverarbeitung im elektronischen System ab. Dies verdeutlicht, dass insbesondere auf Luftfreiheit im Schlauchsystem zu achten ist, zudem sind die Höhenausrichtung und Nullpunktkalibrierung des Druckaufnehmers gegen den Atmosphärendruck von eminenter Bedeutung. Als Referenzpunkt dient die Höhe des Koronarvenensinus im rechten Herzvorhof (Schnittpunkt mittlere Axillarlinie mit einer transversalen Ebene in Höhe des vierten Interkostalraums) (Janssens et al., 2016). Um eine möglichst störungsfreie, kontinuierliche Druckmessung zu erhalten, eignet sich alternativ ein Mikro-Tip-Katheter (Zimmer and Millar, 1998, Erhardt et al., 2007), bei dem der Drucksensor direkt im Gefäß oder Herz zu liegen kommt. Dadurch ermöglicht er die höchste Messgenauigkeit unter den invasiven Druckmesssystemen. Externe Kathetersysteme können in Abhängigkeit von der Schlauchlänge, der Häufigkeit der Spülung etc. zum Teil erhebliche Abweichungen (bis 40%) aufweisen (Erhardt et al., 2007). Zum Einsatz kommt der Mikro-Tip-Katheter nicht nur in der Kardiologie, sondern auch in der Urologie und Gastroenterologie (Deuse, 2004).

Die Messung des Blutdrucks findet bei Amphibien nicht routinemäßig statt. In der Literatur finden sich so gut wie keine Referenzwerte. Ein durchschnittlicher systolischer Blutdruck von 32 mmHg wird für Leopard- und Grasfrösche angegeben (Shelton and Jones, 1965). Für *Xenopus laevis* wird ein niedrigerer Wert vermutet, eine ältere Studie nennt einen durchschnittlichen Wert von 25 mmHg, jedoch ohne nähere Angabe zur Anzahl der untersuchten Individuen (De Graaf, 1957). Andere Autoren geben an, dass ihre Blutdruckuntersuchungen verschiedener Amphibienspezies keine auffälligen Unterschiede bei Anuren zeigten (Shelton and Jones, 1968).

2.2.3.4. Körpertemperatur

Die Körpertemperatur kann über eine Kloakalsonde gemessen werden (Kempf, 2008). Da sich die Tiere der Umgebungstemperatur anpassen, wurde in der vorliegenden Studie in Anlehnung an die Literatur besonders auf eine konstante Raumtemperatur von 23°C geachtet (Mutschmann, 2010).

2.2.4. Reflexe und Narkosestadien bei Amphibien

In der Literatur sind verschiedene Reflexe beschrieben, anhand derer die Narkosetiefe bei Amphibien beurteilt werden kann:

2.2.4.1. Umkehrreflex

Der Umkehrreflex ist die wohl aussagekräftigste Reaktion bezüglich der Narkosetiefe. Hierbei werden die Tiere in Rückenlage verbracht und die Zeitspanne bis zur Reposition in die aufrechte ventrale Haltung wird beobachtet. Treten noch Bemühungen ein, die Rückenlage zu verlassen, ist das Toleranzstadium noch nicht erreicht (Mutschmann, 2010).

2.2.4.2. Kornealreflex

Beim Kornealreflex wird der Lidschluss durch leichtes Berühren der Lidränder am medialen Augenwinkel mit einem angefeuchteten Wattestäbchen überprüft (Bonath, 1977, Mitchell, 2009). Er gilt als vorhanden, wenn das Tier mit einem Zwinkern oder leichten Zucken reagiert. Im Gegensatz zu anderen Tierklassen kann er bei Amphibien schneller erloschen sein.

2.2.4.3. Flexorreflex und Tiefensensibilität

Der Flexorreflex ist eine typische Abwehrreaktion von Wirbeltieren auf ein Kneifen der Zehen oder Zehenzwischenhaut (Kölle et al., 2012). Die Gliedmaße wird auf diesen Reiz hin zurückgezogen. Die Auslösung des Schutzreflexes zeigt die Umschaltung im Rückenmark über einen Reflexbogen, um eine schnelle, unwillkürliche Muskelantwort der beteiligten Gliedmaßen zu erzielen bevor die Information im Gehirn ankommt. Das bedeutet, die

Transmission des Schmerzreizes von der Peripherie ins Rückenmark über die myelinisierten A- δ -Fasern löst die direkte, protektive Rückkopplung in die Peripherie aus. Bei der Transmission eines Schmerzreizes gelangt die Information aber auch weiter zum Gehirn. D.h. durch den Schmerzreiz an der Zehe wird sowohl der Schutzreflex als auch die Tiefensensibilität überprüft. Auch bei Säugetieren ist dies eine Standardmethode, um die chirurgische Toleranz zu beurteilen (Arras et al., 2001).

In der Vorstudie sollten drei verschiedene Schmerzreize am narkotisierten Krallenfrosch untersucht werden, um den am besten reproduzier- und standardisierbaren Reiz zu ermitteln. Mit diesem sollten dann in der Hauptstudie die weiteren Versuche durchgeführt werden. Es wurde ein viszeraler und zwei somatische Schmerzreize ausgewählt.

Der viszerale Schmerzreiz wurde in Anlehnung an die laparotomische Entnahme von Laich ausgewählt, d.h. Zug mit einer Pinzette am Ovar. Dieser Eingriff gehört mit zu den häufigsten Operationen bei Krallenfröschen (Green, 2003, Coble et al., 2011). Nach Eröffnung der Leibeshöhle wird ein kleine Masse Eierstockgewebe herausgezogen und entnommen.

Als somatischer Schmerzreiz sollte zum einen das Zwicken einer Zehe der Krallenfrösche mit einer Bulldog-Klemme getestet werden, die eine standardisierte Druckausübung garantiert. Dieser Schmerzreiz orientiert sich an der Fußrückziehreflexion (pedal withdrawal reaction), die als eine der zuverlässigsten Schmerzreize zur Überprüfung von Nozizeption unter Narkose gilt bzw. als bester Indikator für das Erreichen einer chirurgischen Toleranz unter Anästhesie gewertet wird (Arras et al., 2001). Dabei wird die Zwischenzehenhaut der Hintergliedmaße mit einer Pinzette gezwickt und leicht angezogen. Zuckt die Gliedmaße oder wird sie zurückgezogen, ist der Test als positiv zu werten. Zum anderen stellt der Essigsäuretest, der bereits in den 1980er Jahren etabliert wurde (Pezalla, 1983) und mittlerweile als Standardtest für Nozizeption bei Amphibien gilt (Stevens, 1992, Lalonde-Robert et al., 2012a, Coble et al., 2011, Hamamoto and Simone, 2003), einen somatischen Schmerzreiz dar. Dabei werden elf verschiedene Konzentrationen von Essigsäure in einer Verdünnungsreihe von 0-10 erstellt. Beginnend mit der niedrigsten Konzentration, wird mit einer Pasteur-Pipette die Essigsäure auf die Oberseite des Schenkels getropft. Erfolgt keine Reaktion, wird nach 5 Sekunden mit reichlich Wasser gespült. Ist der nozizeptive Schwellenwert erreicht, reagiert der Frosch mit der sogenannten „wiping response“. Dabei wischt das nicht fixierte Tier mit der Hintergliedmaße energisch über das betroffene Hautareal, woraufhin ebenfalls gespült wird, um Hautschädigungen zu vermeiden (Stevens, 1992). Diese Reaktion gehört nicht zu dem

natürlichen Bewegungsmuster der Tiere und wurde im Labor ausschließlich auf einen Schmerzreiz hin beobachtet (Stevens, 2011). Eine Studie zeigte, dass 39% der primär-afferenten Nervenfasern durch den Essigsäuretest erregt werden (Hamamoto and Simone, 2003).

Da Studien bereits gezeigt haben, dass schon 5%ige Essigsäure die sogenannte „wiping response“ auslöst, wurde aus Tierschutzgründen für die vorliegende Studie nur diese niedrige Konzentration ausgewählt (Goulet et al., 2010).

2.2.4.4. Anästhesiestadien bei Amphibien

Folgende Anästhesiestadien werden bei Amphibien unterschieden (Bonath, 1977, Kölle et al., 2012):

Stadium I: oberflächliche Sedierung

Wright beschreibt in dieser Phase anfangs eine mögliche gesteigerte Bewegungsaktivität (Wright, 2006). Danach verlangsamen sich die Bewegungen, die Tiere werden unkoordiniert und schließlich ganz bewegungslos. In diesem Stadium ist der Umkehrreflex verzögert, bis stark verzögert und der Flexorreflex unregelmäßig stark bis gedämpft auslösbar. Die Mundbodenatmung ist unregelmäßig, es kommt zum Teil zu Atempausen.

Stadium II: tiefe Sedierung

Der Umkehrreflex ist meist erloschen oder stark verzögert und die Reaktionen auf einen Schmerzreiz hin sind ebenso stark gedämpft. Die Mundbodenatmung ist weiter ungleichmäßig, die Atempausen sind jedoch häufiger und länger bis zur vollständigen Stagnation der Atembewegungen. Der Kornealreflex ist meist noch vorhanden.

Stadium III: Toleranzstadium

Umkehr- und Flexorreflex sind erloschen. Auf einen Schmerzreiz hin sind kurze Atemaktionen zu beobachten. Die Mundbodenatmung stagniert völlig, auch sonst sind keine Spontanbewegungen zu provozieren. Der Kornealreflex ist gedämpft bis erloschen.

Stadium IV: irreversibles Narkosestadium

In dessen Verlauf tritt der Herzstillstand ein.

2.2.4.5. Aufwachphase, bzw. Euthanasie

Die Aufwachphase aus der Anästhesie ist ein komplexer Vorgang und geht mit einigen Stoffwechselfvorgängen einher. In dieser postoperativen Zeitspanne muss der Patient überwacht werden, bis er wieder ganz bei Bewusstsein ist und in der Lage ist, seine lebensnotwendigen Vitalfunktionen selbst regulieren zu können.

Egal ob nach Immersions- oder Injektionsnarkose, Amphibien sollten nach erfolgtem Eingriff unter fließendem Wasser bei Raumtemperatur abgespült werden, um die Hautatmung zu erleichtern. Überhaupt sollte die Feuchthaltung der Amphibienhaut in dieser Phase oberste Priorität haben, da dieses wichtige Organ nicht nur am Gasaustausch beteiligt ist, sondern auch eine wichtige Barriere gegenüber Infektionserregern darstellt (Guénette et al., 2013). Die komplette Verbringung in frisches Wasser sollte allerdings vermieden werden, da dabei die Gefahr des Ertrinkens besteht (Mitchell, 2009). Es empfiehlt sich, die Tiere alle 5-10 Minuten mit Frosch-Ringerlösung zu besprühen (Koustubhan et al., 2013). Die Umgebung sollte beim Aufwachen ruhig und reizarm sein. Die Raum- und Wassertemperatur sollten sich in der individuellen POTZ bewegen, um eine gut funktionierende Stoffwechselleistung zu erreichen. Je nach Art des Eingriffs gehört zur postoperativen Versorgung auch die Gabe eines Antibiotikums bzw. Analgetikums (Koustubhan et al., 2013).

Die in der vorliegenden Studie durchgeführten Untersuchungen waren als finale Experimente geplant, d.h. dass die Tiere am Ende des Versuches euthanasiert wurden.

Nach §4 der Tierschutzgesetzes darf ein Tier nur unter wirksamer Betäubung und Vermeidung von Schmerzen getötet werden. Ein Wirbeltieren darf nur töten, wer die dazu notwendigen Kenntnisse und Fähigkeiten hat (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2019). Grundsätzlich sollte es bei einer Euthanasie zu einem schnellen Bewusstseinsverlust mit anschließendem Herz-Kreislaufversagen und endgültigem Versagen des Gehirns kommen (Leary et al., 2013).

Bereits die verschiedenen Arten der Klasse der Amphibien unterscheiden sich u.a. in ihrer Anatomie und Physiologie stark voneinander. In ihrer wechselwarmen Thermoregulation und

ihrem Stoffwechsel unterscheiden sie sich besonders von anderen Wirbel- und vor allem Säugetieren.

Für die Euthanasie von Amphibien müssen daher verschiedene Dinge berücksichtigt werden. Grundsätzlich sollte bei der Euthanasie von Poikilothermen auf eine optimale Umgebungstemperatur (POTZ) geachtet werden, um einen schnellen Wirkungseintritt der Präparate zu gewährleisten (Schmidt, 2015).

In der Literatur sind unterschiedliche Methoden beschrieben: zum einen können Substanzen durch Inhalation, Injektion oder topische Anwendung verabreicht werden, zum anderen gibt es physikalische Methoden, um den Tod herbei zu führen (Leary et al., 2013).

Da die Amphibienhaut einen großen Anteil am Gasaustausch übernimmt (Harvey Pough, 2007), und viele Arten Hypoxie und sogar längere Phasen der Anoxie gut überstehen können (Leary et al., 2013), eignen sich Inhalationsnarkotika besser zur Anästhesie (Smith and Stump, 2000, Mitchell, 2009) als zur Euthanasie (Leary et al., 2013).

Die intracoelomiale Injektion von Pentobarbital wird von einigen Studien empfohlen (Lalonde-Robert et al., 2012b, Torreilles et al., 2009). Barbiturate gehörten früher zu den am häufigsten verwendeten Narkotika in der Veterinärmedizin. In ihrer chemischen Beschaffenheit handelt es sich um Säuren, die sich im Körper sofort so stark in den gut durchbluteten Organen, v.a. dem Gehirn anreichern, dass die Narkose eintritt (Löscher, 2014). Bei Überdosierung (100 mg/kg KGW) führen sie rasch zu einer Bewusstlosigkeit und zum Atem- und Kreislaufstillstand. Pentobarbital ist für nahezu alle in der Praxis vorkommenden Spezies das Mittel der Wahl zur Euthanasie. Im Therapienotstand könnte es mit ähnlich gutem Erfolg durch Thiobarbiturate in Überdosis ersetzt werden (Erhardt and Baumgartner, 2012). Bekanntester Vertreter ist Thiopental, das in Deutschland jedoch nur als humanmedizinisches Präparat im Handel ist.

Bei den topischen Verfahren hat sich aktuell das Auftragen eines 20%igen Benzocaingels als effektiv und praktikabel erwiesen. Benzocain ist ein weißes, kristallines, in Wasser schwer lösliches Pulver aus der Gruppe der Lokalanästhetika. Im Gegensatz dazu ist Benzocainhydrochlorid wasserlöslich und wird, häufig in Form eines Gels, zur Anästhesie oder Euthanasie von Amphibien eingesetzt (Chen and Combs, 1999, Leary et al., 2013).

Ein weiteres empfohlenes topisches Euthanasieverfahren ist ein einstündiges Bad mit Tricainmethansulfonat (MS222) in der Dosierung 10 g/L (Gentz, 2007, Mutschmann, 2010) oder 5 g/L (Torreilles et al., 2009). Letztere Studie kam zu dem Schluss, dass MS222 in der Dosierung 2590 mg/kg KGW via intracoelomiale Injektion nicht zu einer erfolgreichen

Euthanasie führt. Bei Reptilien hat sich die Injektion von 250 mg/kg KGW, gepuffert, zur Euthanasie bewährt (Conroy et al., 2009).

Die intrakardiale Injektion ist beim wachen Tier nicht zu empfehlen (Mader, 2006), unter Narkose jedoch akzeptabel (Leary et al., 2013). Die direkte Verbringung von Thiobarbital (100 mg/kg KGW) in den Herzventrikel führte in der vorliegenden Studie bei jedem Tier zu einem sofortigen Herzstillstand.

Zu den physikalischen Methoden zählen die Dekapitation oder das sogenannte „Pithing“, bei dem eine Metallsonde in das *Foramen magnum* eingeführt und das Gehirn mechanisch zerstört wird (Leary et al., 2013). Beide Methoden können jedoch erst als finaler Schritt im Zustand einer vorher herbeigeführten tiefen Bewusstlosigkeit durchgeführt werden (Köhler, 1996).

Obwohl selbst aktuellere Studien die Euthanasie durch Hypothermie rechtfertigen (Shine et al., 2015, Lillywhite et al., 2016), wird sie von den meisten Institutionen und Autoren zu den nicht akzeptablen Methoden gezählt (Leary et al., 2013, Warwick et al., 2018, Machin, 1999).

2.3. Applikation und Metabolisierung der Medikamente

Wie bei Säugern gibt es auch bei Amphibien verschiedene Applikationsrouten für Medikamente, dennoch muss auf einige Besonderheiten geachtet werden. Die sensible Haut von Amphibien ist hoch permeabel und stark vaskularisiert. Neben der Lungenatmung nimmt sie großen Anteil sowohl am Gasaustausch als auch am Wasser- und Elektrolythaushalt (Baitchman and Stetter, 2014). Das Fangen und das Handling der Tiere können zu Stress und unter Umständen zu einer iatrogen hervorgerufenen Schädigung der empfindlichen Amphibienhaut führen.

Die einfachste, schonendste und zuverlässigste Applikationsart ist demnach die topische, perkutane Verabreichung via Tauchbad oder Aufträufeln eines Wirkstoffes (Chinnadurai and Kane, 2014, Hadfield and Whitaker, 2005).

Die orale (p.o.) Gabe von Medikamenten ist bei Amphibien eher ungeeignet, da Flüssigkeiten auf diesem Weg relativ schlecht resorbiert werden (Helmer and Whiteside, 2005). Parenterale Applikationswege eignen sich dagegen besser.

Entsprechend aktueller Beschreibungen erfolgen Applikation von Antibiotika (Howard et al., 2010) und Analgetika (Chinnadurai and Kane, 2014) meist subkutan (s.c.), am besten an der

seitlichen Bauchwand (Hadfield and Whitaker, 2005) oder intramuskulär (i.m.) in die Muskulatur der Vorder- oder Hintergliedmaßen. Für Anästhetika oder zum Flüssigkeitsersatz ist auch die intracoelomiale Injektion (i.c.) in die Bauchhöhle möglich. Das Tier wird hierfür in Rückenlage positioniert. Zur Schonung der inneren Organe sollte die Nadel im 45° Winkel kranial einer Hintergliedmaße in kranialer Richtung eingeführt werden (Letcher, 1992, Hadfield and Whitaker, 2005).

Eine intravenöse (i.v.) Verabreichung von Medikamenten ist in der Literatur beschrieben (Lafortune et al., 2001, Longley, 2008, Hadfield and Whitaker, 2005). Diese erfordert allerdings eine gute Übung und sie ist zudem durch die Größe der Tiere limitiert. Mögliche Zugänge sind die oberflächliche Bauchvene (wie in der vorliegenden Studie), der sublinguale Plexus, die *Vena femoralis* und bei der Ordnung der *Caudata* die Schwanzvene (Baitchman and Stetter, 2014).

Die Metabolisierung der Medikamente hängt bei poikilothermen Amphibien auch stark von der Umgebungstemperatur ab, die ihrer Vorzugstemperatur (POTZ) entsprechen muss, damit ihr Stoffwechsel maximal leistungsfähig ist.

2.3.1. Narkosebad

Da sich die Haut von Amphibien aufgrund ihrer Permeabilität gut dazu eignet, Medikamente in flüssiger Form aufzunehmen (Helmer and Whiteside, 2005), ist die bevorzugte und einfachste Applikationsart von Anästhetika das Tauchbad (Paduano et al., 2013, Walker and Whitaker, 2000).

Für die vorliegende Studie wurde eine Konzentration von 1 g Tricainmethansulfonat pro Liter Wasser gewählt (Lalonde-Robert et al., 2012a). Die Lösung wurde mit Natriumhydrogenkarbonat auf einen pH-Wert von mindestens 7,0 gepuffert, um die Verträglichkeit und Effektivität der Narkosewirkung zu optimieren (Robinson and Scadding, 1983, Ohr, 1976). Die Immersionszeit sollte 30 Minuten betragen (Gentz, 2007). Vor dem Eingriff muss jedes Tier gewogen werden, um eine genaue Dosierung der Analgetika berechnen zu können (Longley, 2008).

Während der Narkoseeinleitung wird häufig eine gesteigerte Bewegungsaktivität bei den Patienten beobachtet. Die dafür verwendeten Wasserbecken sollten deshalb zuvor im Hinblick auf Verletzungsmöglichkeiten geprüft werden (Baitchman and Stetter, 2014).

Üblicherweise werden Amphibien nach erfolgreicher Narkoseinduktion aus dem MS222-Bad entnommen und in frisches Wasser gelegt (Gentz, 2007). Bei zu tiefer Anästhesie empfiehlt sich eine Umspülung der Tiere mit sauerstoffangereichertem Wasser. Bei abflachender Narkosetiefe wird die Rückführung in ein Tauchbad beschrieben, das nur die halbe Konzentration der Ausgangslösung beinhaltet (Downes, 1995, Baitchman and Stetter, 2014). Für die vorliegende Studie wurde deshalb folgendes Prozedere gewählt: die Krallenfrösche sollten nach dem Bad auf einer schiefen Ebene mit einem Gefälle von 10% platziert werden. Die Aufrechterhaltung der Narkose sollte über einen Perfusor, der den Rücken der Tiere permanent mit MS222 in 50% der Anfangskonzentration von 1 g/L umspült, erfolgen. Die sensible Haut der Amphibien ist mit unzähligen Schleimdrüsen angereichert und spielt eine große Rolle beim Gasaustausch (Harvey Pough, 2007). Um die normale Funktion der Haut und ihre Feuchtigkeitsbarriere nicht aus dem Gleichgewicht zu bringen, sollen die Tiere während der gesamten Operationsdauer mindestens drei Mal pro Minute mit Frosch-Ringerlösung umspült werden (Wright and Whitaker, 2001, Hadfield and Whitaker, 2005).

2.4. Wahl des geeigneten Anästhetikums

Die Art und vor allem die Dauer eines Eingriffs sind entscheidend bei der Auswahl eines Anästhetikums. In der Literatur finden sich dafür verschiedene Wirkstoffe.

2.4.1 Verwendetes Anästhetikum Tricainmethansulfonat

Tricainmethansulfonat (MS222) ist das Mittel der Wahl bei der Anästhesie von Amphibien (Cakir and Strauch, 2005, Downes, 1995, Stetter, 2001, Wright and Whitaker, 2001, Chinnadurai and Kane, 2014, Smith et al., 2018). In der Veterinärmedizin findet es hauptsächlich Anwendung als Anästhetikum für Fische, wofür es in den USA und Großbritannien eine Zulassung hat (Carter et al., 2011).

Schon vor 100 Jahren beschrieb Sandoz die pharmakologischen und lokalanästhetischen Eigenschaften von MS222 (Sandoz, 1920). Tricainmethansulfonat ist ein Isomer von Benzocain. Der Wirkstoff weist eine höhere Wasserlöslichkeit und Azidität als Benzocain auf. Er liegt als weiße, kristalline Substanz vor und ergibt eine klare, farblose und saure Lösung (Beckman, 2016, Longley, 2008).

MS222 ist dabei ein stark saures Salz. Wässrige Lösungen mit einer Konzentration von 1-2 g/L (eine Dosierung die häufig zur Immersion eingesetzt wird) haben einen pH-Wert von 3,0 (Downes, 1995). Aus mehreren Gründen ist es notwendig die Lösung auf einen neutralen pH-Wert von 7,0-7,5 zu puffern (Mitchell, 2009). Zum einen irritieren saure Lösungen die empfindliche Haut der Amphibien stark und können Hautirritationen und -schäden hervorrufen, zum anderen liegt in der sauren Lösung der Wirkstoff MS222 in seiner ionisierten Form dar (76% bei einem pH-Wert von 3,0) und kann daher nicht gut absorbiert werden (Mitchell, 2009, Downes, 1995). Es empfiehlt sich deshalb, die Lösung z.B. mit Natriumhydrogenkarbonat zu puffern. Durch die Erhöhung des pH-Wertes kann der Wirkstoff besser und schneller aufgenommen werden (Cakir and Strauch, 2005, Clayton and Gore, 2007) und die Zeit der Narkoseinduktion verkürzt sich (Ohr, 1976).

MS222 wird bei Fischen und Larvenstadien von Amphibien rasch über die Kiemen aufgenommen und ausgeschieden (Carter et al., 2011, Wayson et al., 1976b). Bei adulten Amphibien wird es über die Haut aufgenommen und langsamer metabolisiert (Wright and DeVoe, 2013, Downes, 1995). Insgesamt betrachtet und vor allem im Vergleich zu anderen Anästhetika bei Amphibien spricht die kurze Induktions- und Aufwachzeit in jedem Fall für die Verwendung von MS222 (Kölle et al., 2012, Cakir and Strauch, 2005).

In der Wirkungsweise ähnelt es der von Lokalanästhetika. Die Natriumionen-Permeabilität wird vorübergehend verändert, die Erregbarkeit von Nervengewebe herabgesetzt und die Weiterleitung von Nervenimpulsen blockiert (Stetter, 2001, Cakir and Strauch, 2005).

Für die entsprechende Dosierung ist nicht das Gewicht des Patienten ausschlaggebend, sondern das Entwicklungsstadium und der Lebensraum der Tiere. Kiementragende Larvenstadien benötigen niedrigere Dosierungen von 0,5 g/L (Wright, 2006) bzw. 0,2 - 0,5 g/L (Cakir and Strauch, 2005, Mutschmann, 2010). Bei adulten Tieren muss bei der Dosierung zwischen hauptsächlich aquatilen Fröschen und terrestrischen Kröten unterschieden werden. Die grundsätzliche Empfehlung für Adulte sind 1-2 g/L (Baitchman and Stetter, 2014, Longley, 2008), Wright empfiehlt speziell bei Kröten die Dosierung von 3 g/L (Wright, 2006). Die Immersionszeit sollte 10-30 Minuten betragen (Mutschmann, 2010), die Anästhesiedauer beträgt 30-60 Minuten (Lalonde-Robert et al., 2012a). Zum Anmischen der Lösung eignet sich die Verwendung des gewohnten Aquariumswassers am besten (Mitchell, 2009, Baitchman and Stetter, 2014). Die Lösung sollte nach einmaliger Verwendung entsorgt werden. Die Temperatur des Tauchbades sollte sich im Rahmen der speziesspezifischen

Vorzugstemperatur (POTZ) des Patienten bewegen (Baitchman and Stetter, 2014). Nur so bleibt die Narkose aufgrund einer einschätzbaren Metabolisierung steuerbar. Bei einer zu kalten Lösung verlängert sich die Induktionszeit, während bei einer zu warmen Lösung der Wirkstoff möglicherweise zu schnell metabolisiert wird (Mitchell, 2009). Wesentlich höhere Temperaturen müssen vermieden werden, da es dabei zu erhöhtem Sauerstoffbedarf kommt, was bei gleichzeitig reduzierter Sauerstoffaufnahme in der Narkose zum Erstickungstod führen kann (Guénette et al., 2013)

Für den Umgang mit Tricainmethansulfonat empfiehlt sich für den Anwender aufgrund der (schleim)hautreizenden Eigenschaften von MS222 das Tragen von Handschuhen (Carter et al., 2011).

Die Halbwertszeit von Tricainmethansulfonat beträgt bei Amphibien 3,2 Stunden (Lalonde-Robert et al., 2012a), bei Mäusen jedoch nur 1,5 Minuten (Wayson et al., 1976a). Bei Säugetieren wird MS222 extrem schnell in der Leber metabolisiert, sodass der Wirkstoff selbst in hoher Dosierung nur einen geringfügigen systemischen Effekt zeigt (Wayson et al., 1976a). Infolgedessen spielt MS222 bei der Anästhesie von Säugetieren und in der dazugehörigen Literatur kaum eine Rolle (Downes, 1995).

Tricainmethansulfonat findet nicht nur als Tauchbad Anwendung, sondern kann bei Amphibien und Reptilien auch in die Leibeshöhle, das *Coelom*, injiziert werden (Wright and Whitaker, 2001). Auch hier sollte unbedingt auf die Pufferung der Injektionslösung geachtet werden (Downes, 1995, Mitchell, 2009).

Für Ochsenfrösche wird eine Dosierung von 250-400 mg/kg KGW, für Leopardfrösche 100-250 mg/kg KGW angegeben (Letcher, 1992) bzw. für Amphibien allgemein eine Spannweite von 50-300 mg/kg KGW (Wright, 2006).

Insgesamt betrachtet ist MS222 ein Anästhetikum mit hoher Sicherheitsspanne. In einer Studie mit Leopardfröschen waren Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wenig beeinflusst, eine Atemdepression konnte jedoch nachgewiesen werden (Lalonde-Robert et al., 2012a). Bei Kröten wurde wiederum von einer MS222-bedingten Tachykardie berichtet (Smith, 1974). Tricainmethansulfonat wird hauptsächlich über die Leber abgebaut (Wayson et al., 1976b). In vitro Versuche haben gezeigt, dass MS222 von Mäuseleberhomogenaten 39-mal schneller metabolisiert werden als von denen der Frösche. Bei wechselwarmen Tieren wurde für Tricainmethansulfonat eine gewisse Lebertoxizität beschrieben (Wayson et al., 1976b).

2.4.2. Benzocain

Bei Benzocain handelt es sich um ein Lokalanästhetikum, das wie MS222 meist via Bad appliziert wird. Da es sich um ein schlecht wasserlösliches Pulver handelt, muss es vorher in Ethanol gelöst werden (Crawshaw, 2003). Alternativ kann es auch in Form eines kommerziell erhältlichen Gel (Orajel®) angewendet werden (Brown et al., 2004, Cecala et al., 2007). Im Gegensatz zu MS222 muss eine Tauchbadlösung nicht gepuffert werden. Dosierungen von 50 mg/L für Larven und 200 mg/L für Adulte sind beschrieben (Cakir and Strauch, 2005). Andere geben für Larven 0,005-0,01%ige Lösungen bzw. 0,01-0,03%ige für Adulte an (Mitchell, 2009). Eine aktuelle Empfehlung ist eine 0,1%ige Lösung (Smith et al., 2018). Benzocain erzielt eine Anästhesie für die Dauer von 15-60 Minuten (Guénette et al., 2013). Es ist ein sehr potentes Anästhetikum bei Amphibien, weist jedoch eine geringere therapeutische Breite als MS222 auf. Als Nebenwirkung wird eine starke Atemdepression beschrieben (Cakir and Strauch, 2005, Mitchell, 2009). Dennoch kommt es immer noch routinemäßig zum Einsatz, vor allem weil der Wirkstoff um ein vielfaches günstiger als MS222 ist (Green, 2001, Mitchell, 2009).

2.4.3. Eugenol

Eugenol kommt natürlicherweise in unterschiedlicher Konzentration in Nelkenöl vor (Baitchman and Stetter, 2014). Die beste Wirkung wird via ungepufferter Immersion erzielt. Ein 15-minütiges Bad mit einer Konzentration von 350 mg/L erzeugt bei adulten Krallenfröschen eine Narkosedauer von ca. 30 Minuten (Guénette et al., 2007). Für die unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Arten müssen die entsprechenden Dosierungen berücksichtigt werden (Goulet et al., 2010). Für aquatil lebende Tiere gibt es die Empfehlung von 318-350 mg/L, für terrestrische lebende 450 mg/L (Mitchell, 2009). In der Literatur wird es zum Teil als gutes Anästhetikum für Amphibien beschrieben (Goulet et al., 2010), andere Autoren heben die möglichen Nebenwirkungen im Vergleich zu MS222 hervor. Vermutlich aufgrund des schlechten Geschmacks kommt es häufig zu einem reversiblen Magenprolaps bei den Patienten (Mitchell, 2009, Lafortune et al., 2001, Wright, 2006), seltener zu einer Atemdepression und Bradykardie (Mitchell, 2009). Die direkte topische Anwendung bei Krallenfröschen hatte Hautnekrosen zur Folge und kann demnach nicht empfohlen werden (Mitchell, 2009).

2.4.4. Isofluran

Isofluran gilt als effektiver, sicherer Wirkstoff und kann Amphibien als Bad oder per Inhalation (Barbon et al., 2019, Morrison et al., 2016) verabreicht oder in flüssiger Form direkt aufgeträufelt werden; andere parenterale Applikationswege (z.B. als Gel) haben sich weniger bewährt (Baitchman and Stetter, 2014, Zec et al., 2014). Für ein Tauchbad wird meist eine Konzentration von 2-3 ml/L genutzt, hierfür wird flüssiges Isofluran per Spritze einfach in das Wasser gegeben (Baitchman and Stetter, 2014). Bei der direkten Applikation auf die Haut benötigen aquatile Spezies (z.B. *Xenopus* spp.) mit 0,007 ml/L eine geringere Dosis als Kröten (*Bufo* spp.) mit 0,015 ml/L (Mitchell, 2009).

Neben der Intubation ist auch die Verbringung der Tiere in luftdichte Narkoseboxen möglich, in die ein mit Narkotikum getränkter Wattebausch gelegt wird. Die Bewusstlosigkeit tritt dann bereits nach 2-3 Minuten ein. Der Autor empfiehlt Isofluran nur in Kombination mit einem Analgetikum (Mutschmann, 2010).

Isofluran gilt allgemein zwar als wirksames und relativ sicheres Anästhetikum bei Amphibien. Die Wirksamkeit und therapeutische Breite bei Amphibien sind jedoch weniger genau untersucht als für Tricainmethansulfonat, d.h. die Literaturangaben sind begrenzt. Der Wirkstoff kommt demnach deutlich seltener zum Einsatz als MS222.

2.4.5. Propofol

Das kurzwirksame Hypnotikum Propofol findet häufig Anwendung bei der Anästhesie von Säugern, Vögeln und Reptilien. Es muss entweder intravenös oder intraossär appliziert werden. Beide Routen sind bei Amphibien eine Herausforderung, weshalb es in praxi kaum Verwendung findet. 10 mg/kg perivaskulär in den sublingualen Plexus appliziert, führen zu einer schnellen Sedation, jedoch zu keiner Hypnose bei Leopardfröschen (Lafortune et al., 2001). Ein ähnliches Ergebnis wurde für die Anwendung von 88 mg/L als 15-minütiges Bad bei *Xenopus laevis* berichtet (Guénette et al., 2008).

2.4.6. Ketamin

Aussagen über die Verwendung von Ketamin bei Amphibien in der Literatur variieren stark. Die Wirkung scheint speziesspezifisch unterschiedlich zu sein (Letcher and Durante, 1995). Dosierungsempfehlungen schwanken zwischen 10-15 mg/kg in den dorsalen Lymphsack (Stoskopf, 1994), 20-210 mg/kg (Wright, 2001a) bzw. 50-150 mg/kg s.c. oder i.m. (Longley, 2008). In der Dosierung von 20-40 mg/kg i.m. wird Ketamin zur Narkoseeinleitung empfohlen (Mitchell, 2009). 70-100 mg/kg i.m. werden sogar als akzeptable Alternative zu MS222 beschrieben, obwohl die Aufwachphase 12-18 Stunden dauern kann (Gentz, 2007). Andere Autoren berichten, dass Ketamin selbst in hoher Dosierung nicht analgetisch wirkt (Guénette et al., 2013).

Mit Ketamin alleine kann es trotz ausgeschaltetem Rückziehreflex zu Spontanbewegungen kommen. Kombinationen von Ketamin-Medetomidin bzw. Ketamin-Dexmedetomidin, die teilantagonisierbar sind und analgetisch wirken, sind stark abhängig von der Dosis und der speziesspezifischen Verteilung der alpha-2-Rezeptoren (Kempf, 2008).

2.5. Verwendete Analgetika

2.5.1. Physiologische Voraussetzungen zur Beurteilung einer Schmerzkompetenz

In einer vielbeachteten Veröffentlichung von Bateson (Bateson, 1991) wurden verschiedene physiologische Voraussetzungen aufgelistet, die zur Beurteilung einer Schmerzkompetenz bei Tieren herangezogen werden können. Die Auflistung dieser Kriterien wurde 2004 von Sneddon aktualisiert (Sneddon, 2004):

- 1) Nozizeptoren
- 2) Leitungsbahnen zu höheren Gehirnstrukturen
- 3) Gehirnstrukturen
- 4) Opioidrezeptoren und endogene Opiode
- 5) Reduzierung einer nozizeptiven Antwort durch Analgetika
- 6) Vermeidungsverhalten
- 7) Abweichung vom Normalverhalten

Zu 1) Nozizeptoren sind freie sensorische Nervenendigungen, die durch Erzeugung von Aktionspotentialen schädliche mechanische, chemische oder thermale Reize weiterleiten. Amphibien besitzen Nozizeptoren in den oberflächlichen und tiefen Schichten der Haut (Spray, 1976, Habgood, 1950, Yamashita and Ogawa, 1991). Das periphere Nervensystem wird von unmyelinisierten und myelinisierten afferenten Nervenbahnen gebildet (Hamamoto and Simone, 2003). Bei Amphibien unterscheidet man hierbei drei Gruppen: stark myelinisierte A-Fasern, dünn myelinisierte B-Fasern und nicht-myelinisierte C-Fasern, die den A β -, A δ - und C-Fasern der Säugetiere entsprechen und sich in ihrer Charakteristik nicht voneinander unterscheiden (Stevens, 2004). Die A δ -Fasern mit großem Durchmesser leiten Schmerzreize schnell und zielgerichtet, die dünnen C-Fasern eher diffusen Schmerz (Guénette et al., 2013). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass der Essigsäuretest A δ - und C-Fasern zu gleichen Teilen erregt (Hamamoto and Simone, 2003).

TRP(transient receptor potential)-Kanäle spielen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Temperatur, Schmerz, chemischen und mechanischen Stimuli bei Säugern. TRPV1-Kanäle, die besonders in Nozizeptoren exprimiert werden, wurden bei Amphibien ebenso wie TRPA1-Kanäle, die als chemische Nozizeptoren fungieren, nachgewiesen (Sneddon, 2017).

Zu 2) Über die periphere Schmerzweiterleitung und die Verschaltung auf Rückenmarksebene gibt es unterschiedliche Meinungen, die meisten Untersuchungen gehen jedoch davon aus, dass afferent-sensorische Nervenbahnen der Haut bei Fröschen im Gebiet des Dorsalhorns des Rückenmarks umgeschaltet werden. Dieser Bereich entspricht den Laminae I-IV der Säugetiere (Stevens, 2004). Dies impliziert, dass sich das Rückenmark von Amphibien im Aufbau ein wenig von dem der Säugetiere unterscheidet (Guénette et al., 2013). Die weitere Schmerzleitung zu supraspinalen Zentren ist bei Amphibien weitgehend unbekannt (Spray, 1976), die Schmerzafferenzen erreichen jedoch Hirnstamm und Thalamus (Guénette et al., 2013, Sneddon et al., 2014). Bei Säugern erfolgt die Weiterleitung von Schmerzreizen durch Neurotransmitter, die inhibitorisch als auch exhibitorisch wirken können und in verschiedene Substanzklassen unterteilt werden können: Aminosäuren, Neuropeptide, Monoamine. Dazu gehören u.a. Substanz P, Met-enkephalin, GABA, Glutamat, die auch im Gehirn und Rückenmark von Anuren nachgewiesen werden konnten (Stevens, 2011, Guénette et al., 2013, Mosley and Mosley, 2015, Lorez and Kemali, 1981).

Zu 3) Das Gehirn von Amphibien besitzt weder ein limbisches System noch einen zerebralen Cortex (Stevens, 2011). Diese hochkomplexe, gefaltete Struktur ist die phylogenetisch jüngste und am weitesten entwickelte Hirnregion in der Evolution der Wirbeltiere. Stevens folgert daraus, dass Amphibien deshalb eine weitaus geringere Fähigkeit haben, Schmerzen zu empfinden (Stevens, 2004), da die Information „Schmerz“ bei Menschen im Cortex bewusst gemacht und im limbischen System emotional bewertet wird. Dennoch erreichen Projektionen des Rückenmarks Hirnstamm und Thalamus, die im non-olfaktorischen Telencephalon münden. Eine Autorin schließt jedoch aufgrund dieser Projektionen, die im Vergleich zu jenen von Säugern unstrukturierter erscheinen mögen, auf eine vorhandene Schmerzkompetenz bei Fröschen (Guénette et al., 2013).

Zu 4) Amphibien verfügen über ein gut entwickeltes endogenes Opioidsystem, das in der Lage ist, noxische Reize zentral zu verarbeiten (Green, 2003). In ihren Gehirnen konnte, im Vergleich zu Säugetieren, eine sehr hohe Anzahl an Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (Simon et al., 1982). Den höchsten Anteil daran haben die κ -Opioidrezeptoren (Benyhe et al., 1990), gefolgt von μ - und δ -Rezeptoren. Im Gegensatz zu Säugetieren weist der κ -Opioidrezeptor bei Amphibien jedoch eine höhere Affinität zu μ - und δ -selektiven Opioiden als zu κ -selektiven Opioiden auf. Daraus wird gefolgert, dass die Opioidrezeptoren von poikilothermen grundsätzlich weniger selektiv als die von endothermen Spezies sind (Stevens, 2009). Endogene Opioide wie Met-enkephalin, Beta-endorphin, Dynorphin und Dermorphine konnten ebenfalls bei Fröschen nachgewiesen werden (Stevens, 1988).

Zu 5) Mit der Entdeckung des endogenen Opioidsystems bei Amphibien, wurde eine Vielzahl von Opioidanalgetika via verschiedener Applikationsrouten mithilfe des Essigsäuretests an Leopardfröschen untersucht (Pezalla, 1983, Stevens, 2011, Stevens et al., 1994, Stevens, 1996). Der Schwellenwert der nozifensiven „wiping response“ konnte dadurch erhöht werden.

Zu 6) Akute Schmerzreize werden von Amphibien mit Vermeidungsverhalten beantwortet (Dobromylskyj et al., 2000). In einem modifizierten Hargreaves-Apparat reagierten Leopardfrösche auf Strahlungshitze mit dem Zurückziehen der betroffenen Gliedmaße (Willenbring and Stevens, 1995).

Die Schutztaktik des Aposematismus scheint auch bei Amphibien zu funktionieren. Beobachtungen zeigten, dass Kröten, die von Bienen gestochen wurden, diese daraufhin konsequent mieden (Kavaliers, 1988).

Zu 7) Als Beute- und Fluchttiere zeigen Amphibien erst sehr spät Anzeichen für Krankheit und Schmerz. Im Vergleich zu anderen Tierarten zeigen sie ein eher reduziertes Verhaltensmuster, auch aufgrund fehlender Mimik und eingeschränkter Vokalisation (Machin, 1999, Green, 2003). Dennoch gibt es, unter Berücksichtigung speziesspezifischer Unterschiede, einige Verhaltensweisen, die Hinweise auf Schmerzen geben können: protektives Verhalten wie Lecken, Reiben oder Schonen einer Wunde bzw. Verletzung (Sneddon et al., 2014), geschlossene Augen, Anorexie, Aggressivität oder Lethargie (Kempf, 2008). Die sogenannte „wiping response“ beim Essigsäuretest ist eine Verhaltensweise, die im Labor ausschließlich in Folge eines erfolgten Schmerzreizes beobachtet werden konnte (Stevens, 2011).

Alle sieben physiologischen Voraussetzungen, die zur Beurteilung der Schmerzkompetenz bei Tieren herangezogen werden können, treffen auf die Klasse der Amphibien zu.

2.5.2. Einsatz von Analgetika bei Amphibien

Der Einsatz von Analgetika bei Amphibien ist bis heute bei schmerzhaften, chirurgischen Eingriffen nicht selbstverständlich. In der aktuellen Literatur finden sich jedoch vermehrt Empfehlungen zur Gabe von Schmerzmitteln nach einer Laparotomie (Green, 2003). Mutschmann befürwortet sogar explizit eine Applikation von Analgetika vor einem schmerzhaften Eingriff bei Amphibien (Mutschmann, 2010).

Grundsätzlich sind Analgetika Stoffe, die das Schmerzempfinden unterdrücken. Sie sind bei Menschen und Säugetieren bereits sehr gut untersucht. Dabei gibt es große Unterschiede, sowohl zwischen den einzelnen Stoffgruppen in ihrer Wirkungsweise und ihrer jeweiligen analgetischen Potenz als auch zwischen den einzelnen Spezies z.B. durch unterschiedliche Rezeptorverteilung und Sensitivität. Schmerzursache, Schmerztypus bzw. -grad, Suchtpotenz und analgetische Eigenschaften eines Wirkstoffes sind deshalb ausschlaggebend bei der Auswahl des passenden Analgetikums. In der Versuchstierkunde kommt auch noch der Aspekt der Interaktion mit den Versuchsergebnissen hinzu.

Bei Amphibien kommen bislang grundsätzlich Analgetika der Stoffgruppen Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Opioide und Lokalanästhetika zum Einsatz:

- a) Nichtsteroidale Antiphlogistika sind Schmerzmittel mit schmerzlindernden, entzündungshemmenden und fiebersenkenden Eigenschaften. Sie hemmen die Prostaglandinsynthese durch Inhibition der Cyclooxygenasen. Prostaglandine sensibilisieren Nozizeptoren und gelten als Entzündungsmediatoren. Obwohl Amphibien alle physiologischen Voraussetzungen besitzen, die für die Wirkmechanismen von NSAIDs notwendig sind, ist deren Einsatz bei Amphibien nur unzureichend beschrieben (Kempf, 2008). Die NSAIDs Indomethacin und Ketorolac zeigten nach systemischer Gabe in einer Studie einen milden analgetischen Effekt bei Leopardfröschen (Stevens et al., 2001). Flunixin-Meglumin (25 mg/kg) erzeugte im Vergleich zu Meloxicam (0,2 mg/kg) nach Applikation in den dorsalen Lymphsack die besseren Resultate bei Krallenfröschen (Coble et al., 2011). Bei Leopardfröschen bewirkte Flunixin-Meglumin in der gleichen Dosierung eine Analgesie von 2-4 Stunden (Terril-Robb et al., 1996). Auch hier divergieren die Dosierungsangaben mehr oder weniger, andere Autoren empfehlen 0,3 mg/kg für Meloxicam und 1 mg/kg für Flunixin-Meglumin (Kölle et al., 2012).
- b) Die Lokalanästhesie ist in der Literatur bei Amphibien nur selten beschrieben. Bei kleineren Eingriffen im Bereich der äußeren Haut oder der Gliedmaßen, z.B. zur Entnahme von Biopsien, stellt sie eine praktikable analgetische Ergänzung dar. Mittel der Wahl ist dabei Lidocain-HCl, 2%ige Lösung, äußerlich appliziert (Mutschmann, 2010). Die subkutane Injektion von Lidocain zeigte eine sedierende Wirkung bei Ochsenfröschen, bei gleichzeitig ausbleibender lokaler Antinozizeption (Williams et al., 2017).
- c) In der vorliegenden Studie wurden die beiden Opioidanalgetika Fentanyl und Butorphanol gewählt.
Opioide sind halb- und vollsynthetische Substanzen, die an μ - bzw. κ - und δ -Opioidrezeptoren binden (Erhardt et al., 2012) und präsynaptisch die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern v.a. im ZNS hemmen. Diese können wiederum durch pharmakologische Klassifizierung in Subtypen, z.B. μ_1 -, μ_2 -, μ_3 -, bzw. κ_1 -, κ_2 -Rezeptoren unterteilt werden (Löscher, 2014).

Die Opioidrezeptoren befinden sich bei Säugern hauptsächlich im zentralen Nervensystem, zum Teil jedoch auch in der Peripherie, z.B. GIT, Gelenkkapseln, Herz und Nieren (Erhardt et al., 2012). Bei Amphibien konnten Opioidrezeptoren im Gehirn, jedoch nicht in Herz, Magen, Leber und Muskel nachgewiesen werden (Stevens et al., 2007). Zur genaueren Rezeptorverteilung bei Amphibien bedarf es noch weiterer Forschung, bekannt ist bisher, dass die intrazerebroventrikuläre, intraspinale und systemische Gabe von Opioiden beim Leopardfrosch einen analgetischen Effekt hervorruft (Stevens and Rothe, 1997, Stevens, 1996, Stevens et al., 1994).

In einer aktuelleren Studie konnten im Gehirngewebe von Amphibien drei Opioidrezeptoren unterschieden werden, die eine 70-84%ige Homologie zu den μ -, κ - und δ -Rezeptoren von Säugern aufweisen (Stevens et al., 2007). Untersuchungen an Gehirnen von Kröten (*Bufo marinus*) ergaben eine Rezeptorverteilung von 60-70% κ -Rezeptoren, 20-30% μ -Rezeptoren und sehr wenigen δ -Rezeptoren (Simon et al., 1982). Beim Teichfrosch (*Rana esculenta*) konnten die κ -Rezeptoren wiederum in κ_1 - und κ_2 -Subtypen unterteilt werden (Benyhe et al., 1990). Insgesamt gesehen enthält Gehirngewebe von Amphibien mehr Opioidrezeptoren als das von Säugetieren, jedoch ist die selektive Affinität der Säugerrezeptoren höher (Stevens, 2004, Stevens, 2009). Die Sequenzierung von Opioidrezeptoren verschiedener Tierarten von drei verschiedenen Wirbeltierklassen ergab, dass alle Wirbeltierarten μ -, κ - und δ -Rezeptoren besitzen. Außerdem wurde ermittelt, dass der κ -Rezeptor die phylogenetisch älteste Struktur ist und sich aus einem ursprünglich einzigen Opioidrezeptor entwickelt haben muss. Beim μ -Rezeptor handelt es sich wiederum um die phylogenetisch „jüngste“ Rezeptorart (Stevens, 2004).

Allgemein erfolgt die Klassifizierung der Opioide anhand der selektiven Bindung an die verschiedenen Rezeptoren. Das erklärt die unterschiedlich starke Analgesie und die unterschiedlichen Nebenwirkungen der verschiedenen Opioide, die auch Auswirkungen auf Atmung, Kreislauf, Darmmotilität und Thermoregulation haben. Für die analgetische Wirkung sind hauptsächlich die μ - und κ -Rezeptoren verantwortlich (ITIS-Empfehlungen, 2012).

Generell werden Opioide in reine Opiat-Agonisten, partielle Opiat-Agonisten, Opiat-Agonist-Antagonisten und reine Opiat-Antagonisten unterteilt (Erhardt et al., 2012):

- Reine Agonisten besitzen eine ausschließlich aktivierende (agonistische) Wirkung. Aktuell verfügbare Vertreter dieser Gruppe binden vor allem an die μ -Rezeptoren, deren Aktivierung sowohl eine starke Analgesie als auch eine im Vergleich besonders ausgeprägte Atemdepression bewirkt (ITIS-Empfehlungen, 2012). Typische Vertreter sind Morphin, Etorphin, Fentanyl und l-Methadon.
- Partielle Agonisten entfalten nur eine submaximale Wirkung am μ -Rezeptor, wodurch die Analgesie geringer als beim reinen Agonisten ausfällt. Ein Beispiel hierfür ist Buprenorphin, das sich durch eine starke Rezeptorbindung und damit durch eine besonders lange Wirkdauer auszeichnet (ITIS-Empfehlungen, 2012).
- Agonist-Antagonisten wirken am μ -Rezeptoren antagonistisch oder nur schwach agonistisch, ihr analgetischer Effekt wird über die Bindung an den κ -Rezeptoren bewirkt (Erhardt et al., 2012). Ein typisches Beispiel dieser Gruppe ist Butorphanol. Das Nebenwirkungsspektrum von partiellen Agonisten und Agonist-Antagonisten kann gegenüber den reinen Agonisten v.a. postoperativ am wachen Tier vorteilhafter sein, jedoch ist ihr Dosierungsspielraum begrenzt. Nach Erreichen einer bestimmten Schwellendosis kann keine Steigerung der Analgesie mehr erzielt werden und bei deren Überschreitung können eventuell Nebenwirkungen zunehmen. Gleichzeitig kann die Analgesie sogar reduziert sein. Diese Reaktion bezeichnet man als Ceiling-Effekt (ITIS-Empfehlungen, 2012).
- Reine Antagonisten können Agonisten kompetitiv von ihrer Bindungsstelle verdrängen und somit deren Wirkung blockieren bzw. aufheben. Sie selbst wirken nicht analgetisch. Der klassische Vertreter dieser Gruppe ist Naloxon (ITIS-Empfehlungen, 2012).

Bei Säugern werden die meisten Opiode in der Leber metabolisiert und über Galle und Urin ausgeschieden (Erhardt et al., 2012). Über den Metabolismus bei Amphibien gibt es keine Angaben in der Literatur.

2.5.3. Fentanyl

Das vollsynthetische Opioid Fentanyl unterscheidet sich mit einer ca. 100-mal höheren Potenz, jedoch mit einer deutlich kürzeren Wirkdauer von Morphin (Löscher, 2014, Erhardt et al., 2012). Als selektiver Agonist an μ -Opioidrezeptoren wird es zur peri- und intraoperativen Medikation sowie zur Behandlung stärkster Schmerzzustände eingesetzt (Ammer and Potschka, 2016). In der Tiermedizin findet es meist intraoperativ in Kombination mit anderen

Anästhetika zum Erreichen einer guten chirurgischen Toleranz Verwendung (Erhardt et al., 2012). Die analgetische Wirkung setzt rasch ein und hält etwa 20-30 Minuten an, dadurch ist es gut steuerbar und wird häufig als Dauertropfinfusion eingesetzt (Erhardt et al., 2012).

Zu den Nebenwirkungen zählen starke Sedierung, Erbrechen und Hypothermie (Ammer and Potschka, 2016). Außerdem bewirkt Fentanyl eine dosisabhängige Atemdepression, die beim Tier jedoch weniger stark als beim Menschen ausgeprägt ist (Löscher, 2014), und der intraoperativ durch Intubation und maschineller Beatmung entgegen gewirkt werden kann, bzw. bei Amphibien kann eine Umspülung mit sauerstoffangereichertem Wasser helfen. In Bezug auf das Herz-Kreislauf-System kann es eine ausgeprägte Sinusbradykardie induzieren, der arterielle Blutdruck wird jedoch nur unwesentlich verändert (Erhardt et al., 2012).

Bei Säugern findet die Metabolisierung in der Leber statt, die Ausscheidung erfolgt über die Nieren und den Darm. Fentanyl ist durch Naloxon kompetitiv antagonisierbar (Erhardt et al., 2012).

Fentanyl ist als Injektionslösung für den anästhesiologischen Einsatz und als transdermale Lösung zur Behandlung postoperativer Schmerzen als Tierarzneimittel für Hunde in Deutschland zugelassen (Löscher, 2014, Vetidata, 2020). Es ist außerdem in der sogenannten Positivliste für Equiden (VO (EU) Nr. 122/2013) aufgeführt und darf bei Schlachtequiden im Therapienotstand eingesetzt werden. Fentanyl fällt aufgrund seiner Sucht induzierenden Potenz in Deutschland unter das Betäubungsmittelgesetz (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2020).

Für Amphibien gibt es mehrheitlich den Dosierungsvorschlag von 0,5 mg/kg s.c. (Mutschmann, 2010, Longley, 2008, Ströse and Kempf, 2013, Machin, 1999), aber auch 1,0 mg/kg s.c. (Chinnadurai and Kane, 2014). Zur Pharmakologie von Fentanyl bei Krallenfröschen gibt es keine Angaben in der Literatur, jedoch eine Studie zur analgetischen Potenz einiger Opiode beim Leopoldfrosch. Fentanyl erwies sich nach systemischer Gabe als potentes Analgetikum. Ein ED₅₀-Wert von 1,4 nmol/g wurde ermittelt, während Dosierungen über 30 nmol/g bei den nicht-anästhesierten Tieren erst zu einer Starre und Reaktionslosigkeit und schließlich zum Tod führten (Stevens et al., 1994).

2.5.4. Butorphanol

Butorphanol ist ein synthetischer Opiat-Agonist-Antagonist, das heißt, er wirkt agonistisch am κ -Opioidrezeptor und antagonistisch oder nur schwach agonistisch am μ -Rezeptor (Erhardt et al., 2012). Die Wirksamkeit ist speziesspezifisch unterschiedlich, beim Pferd beträgt sie ca. das 5-fache von Morphin (Ammer and Potschka, 2016). Aufgrund seiner κ -agonistischen Wirkung findet es vor allem bei viszeralen Schmerzen Verwendung, die Wirkdauer beträgt jedoch nur ca. 2-4 Stunden, weshalb es nicht besonders gut für die länger andauernde Behandlung postoperativer Schmerzen geeignet ist (Erhardt et al., 2012).

Als Injektionslösung ist es in Deutschland für Hunde, Katzen und Pferde zugelassen (Vetidata, 2020). Aufgrund seiner agonistischen Wirkung am κ -Opioidrezeptor und seiner antagonistischen bzw. schwach agonistischen Wirkung am μ -Opioidrezeptor besitzt es im Vergleich zu reinen μ -Agonisten eine schwache Suchtpotenz und ist deshalb in Deutschland von der Betäubungsmittelpflicht ausgenommen (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2020).

Butorphanol wird bei Pferden häufig in Kombination mit einem zentral wirksamen α_2 -Adrenorezeptoragonisten eingesetzt, da dies den analgetischen Effekt verstärkt und sedierend wirkt (Ammer and Potschka, 2016). Zu den Nebenwirkungen zählen bei Pferden leichte Ataxie und Unruhe. Bei Hunden kann in seltenen Fällen Ataxie, Anorexie und Diarrhöe beobachtet werden. Allgemein kann es die Darmmotilität herabsenken. Bei schneller intravenöser Gabe kann eine ausgeprägte kardiopulmonäre Depression auftreten (Löscher, 2014).

Butorphanol wird bei Säugern über die Leber metabolisiert und über die Nieren und Galle ausgeschieden (Erhardt et al., 2012). Aufgrund der hohen Bindungsaffinität ist es in der Lage andere Opioide, reine μ -Agonisten kompetitiv aus deren Bindung zu verdrängen. Butorphanol selbst kann mit höheren Dosen Naloxon antagonisiert werden (Bauer, 2019).

Die Dosierungsvorschläge von Butorphanol für Amphibien in der Literatur variieren stark. Sie reichen von 0,05 - 1,0 mg/kg i.v., p.o., i.m., s.c. (Ströse and Kempf, 2013) für eine Wirkdauer von 12 Stunden bis hin zu 25 mg/kg (Terril-Robb et al., 1996, Schultz and Dawson, 2003) oder 33 mg/kg (Stevens et al., 2001). Eine häufige Empfehlung ist die Anwendung von 0,2-0,4 mg/kg i.m. (Mutschmann, 2010, Longley, 2008, Schuhmacher, 1996). Über die Pharmakologie von Butorphanol bei Krallenfröschen ist in der Literatur nichts beschrieben, es finden sich für

Amphibien nur die verschiedenen, genannten Dosierungsangaben. Die Studien von Terril-Robb und Stevens wurden an Leopardfröschen durchgeführt, weshalb sich ihre Dosierungsempfehlungen auch auf diese Art beziehen (Stevens et al., 2001, Terril-Robb et al., 1996). Stevens gibt an, dass in seinen Untersuchungen kein Tier eine Dosierung von 300 nmol/g Butorphanol überlebt hat (Stevens et al., 2001).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Publikation 1

Der Originalartikel „A comparison of the analgesic effects of fentanyl and butorphanol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) under tricaine methanesulfonate (MS222) anaesthesia“ wurde am 15. Juni 2018 zur Publikation beim Fachjournal „SOJ Anesthesiology & Pain Management“ eingereicht, am 16. Juli 2018 akzeptiert und am 26. Juli 2018 online veröffentlicht.

A Comparison Of The Analgesic Effects Of Fentanyl And Butorphanol In African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) Under Tricaine Methanesulfonate (MS222) Anaesthesia

Sophie Strobel¹, Alexa Hagedorn², Sibylle Ott³, Hermann Kempf, Birgit Waschulzik², Michael Gröger⁴, Sandra Kress⁴, Peter Radermacher⁴, Heidrun Potschka⁵ and Christine M. Baumgartner^{1*}

¹Centre of Preclinical Research, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich (81675 Munich, Germany)

²Institute for Medical Statistics and Epidemiology, Technical University of Munich (81675 Munich, Germany)

³Tierforschungszentrum, University of Ulm (89081 Ulm, Germany)

⁴the Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung University of Ulm (89081 Ulm, Germany).

⁵ the Institute for Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutics Ludwig-Maximilians-University of Munich (80539 Munich, Germany).

Received: June 15 2018; Accepted: July 16 2018; Published: July 26 2018

*Corresponding author: Christine M. Baumgartner, Centre Of Preclinical Research, Klinikum r. d. Isar, Technical University of Munich, Ismaninger Str. 22, D-81675 Munich, Germany. Tel: +49 89 4140 4472; E-mail: Christine.Baumgartner@tum.de

Abstract

In this two-part study, the potency of two analgesics on nociception was assessed in African Clawed Frogs (ACFs). First, three different Pain Stimuli (PSs) were evaluated in the frogs during Tricaine Methanesulfonate (MS222) anaesthesia. Using the most effective PS from the preliminary study, the analgesic effects of three different doses of fentanyl and butorphanol were examined in frogs under MS222 anaesthesia.

Comparing the three different PSs (5% acetic acid onto skin, toe pinch by a clamp and pull on the ovaries), continuous Blood Pressure (BP) and Heart Rate (HR) recordings of the frogs indicated a sharp and reproducible increase in both parameters in response to acetic acid. That result clearly indicated an increased nociception during MS222 anaesthesia. Therefore, MS222 alone does not provide sufficient analgesia for painful interventions in ACFs. From all tested analgesic groups only 5 mg/kg butorphanol showed a short lasting decreased BP and HR response. In contrast, neither lower dosed butorphanol nor fentanyl in general reduced BP and HR response to a PS, only producing considerable side effects on the haemodynamic system.

These findings argue against using fentanyl as an analgesic in ACFs. Butorphanol significantly reduced the nociception in the high dose group. However, considering its limited duration of action and potential adverse effects, further analgesics (e.g., ketamine and metamizole) should be evaluated to improve intraoperative analgesia when using MS222 anaesthesia in ACFs.

Key words: Analgesic Effects; Fentanyl; Butorphanol; African Clawed Frogs; Tricaine Methanesulfonate (MS222);

Introduction

Xenopus laevis, the African Clawed Frog (ACF), is a widely used laboratory animal and the most frequently used amphibian species in biomedical research [1-3]. *Xenopus* has retained its status as a widely used animal model with various uses in research. In addition to its ethological aspects, various qualities have made *Xenopus laevis* popular; e.g., its robustness, its simple

husbandry and the possibility of working with three different developmental stages (oocytes/larvae/adults) [4 & 5]. Of those three, oocytes are the most commonly used developmental stage. They are harvested via laparotomy and the excision of a small portion of the ovarian mass, which is the most common surgery for *Xenopus* and is repeatedly performed in female animals [6 & 7]. Surgeries are usually conducted under anaesthesia with MS222 with no additional analgesics. Currently, MS222 is the agent of choice for inducing general anaesthesia in fish and amphibians [8-11]. As an isomer of benzocaine, it is water-soluble and has a short induction time, a tolerance phase that can be variously prolonged and a short recovery phase [12]. With few exceptions and when given via immersion, MS222 is described as being a safe anaesthetic with a low impact on heart rate and oxygen saturation [13-15 & 19]. In pain research, amphibians have gradually established a small but adequate status as animal models, even though their ability for nociception and to pain perception, has been controversially discussed in the past [20-22]. In 1969, Kaplan declared that pain perception is not particularly developed in all poikilotherms due to their low phylogenetic position and underdeveloped brain [23]. However, according to Guénette et al., it is now commonly accepted that amphibians possess neuroanatomical pathways conductive of a complete nociceptive experience. In general, nociception is defined as the transmission of pain from a peripheral receptor; usually an unmyelinated nerve ending, to the central nervous system and brain processing is the final process where pain perception occurs in conscious animals [24]. According to several studies frogs have nociceptors in superficial and deep layers of the skin transducing mechanical and chemical noxious stimuli [25-28]. And furthermore frogs also have both myelinated and unmyelinated afferent fibres that compose the peripheral sensory nervous system [29]. These fibres, identified as large diameter Aδ fibres and C fibres are similar to those found in mammals [24

& 30). Pathways via the spinothalamic or trigeminal tract have been relatively underexplored, but studies have shown these are comparable with mammals [30 & 31]. These findings indicate that frogs perceive nociception during anaesthesia and therefore whenever painful surgical procedures are performed, a proper anaesthetic regime including sufficient analgesia must be chosen.

Commonly, general anaesthesia in animals including surgical tolerance is defined by inducing hypnosis (unconsciousness), muscle relaxation and analgesia. To cover all three aspects, combination of drugs is necessary in mammals. This allows lower doses of each drug, therefore less side effects and increased safety respectively. In the sense of a balanced anaesthetic regime it is therefore necessary based on the duration of the experiment and the painful stimuli to combine anaesthetics which induce hypnosis and muscle relaxation with analgesics to ensure a sufficient depth of anaesthesia and to ensure a highly controllable anaesthetic management [32].

Currently, very little literature can be found that discusses intraoperative pain management in the belief that MS222, as an ideal anaesthetic, guarantees hypnosis, muscle relaxation and analgesia [14, 18 & 33]. Therefore, the aim of this study was to clarify whether different Pain Stimuli (PSs) lead to nociception during anaesthesia with MS222. According to Dincklage, the Nociceptive Flexion Reflex Threshold best predicts movement and heart rate responses to noxious stimuli under general anaesthesia [34]. However, as this measurement system is not validated for poikilothermic animals, we used in accordance with Richter and Arras et al. the changes of Blood Pressure (BP) and Heart Rate (HR) response as an indicator for nociception [35 & 36]. In the first part of the study, three different PSs were evaluated to identify the most sensitive and reproducible stimulus for nociception under MS222 anaesthesia. In the second part of the study, two opioids, fentanyl and butorphanol were evaluated at three different doses using the most reproducible nociceptive stimulus to investigate their analgesic potency under MS222.

Animals, Materials and Methods

Animals and Husbandry

In this explorative, not blinded study, 42 (n=6 in 7 groups: 1 preliminary and 6 analgesic testing groups) non breeding female ACFs with a mean body weight of 122.9 ± 17.4 g (expressed as mean \pm SD) were used.

The frogs were obtained from an experimental breeding colony and were group-housed in 300 L aquariums, with a maximum number of 25 animals per group [a & b]. The aquarium water was carbon-filtrated, dechlorinated tap water at a temperature of $18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ and a room temperature of 23°C . The maintained pH value of the water was 8.2 ± 2 . The water quality of the aquariums was monitored monthly by bacteriological analysis and every second month by measurement of nitrate (5 - 10 mg/L) and nitrite (0.025 - 0.1 mg/L). Every week, approximately one-third of the water was replaced.

A cycle of 14 h of light followed by 10 h of dark was maintained.

The animals were fed an alternating commercial pelleted diet and fresh beef heart twice a week [c]. Each aquarium offered two half pipes as enrichment items. Prior to anaesthesia, the animals were starved for at least 24 h.

The study was approved by the governmental institution of Baden-Württemberg, Regierungspräsidium Tübingen (case number: 35/9185.81-3) and performed in accordance with the German Animal Welfare Act.

Anaesthesia

On the day of the experiment, the frogs were caught from the aquarium and placed in a non-transparent 10L bucket filled with 2L dechlorinated, carbon-filtrated water. For transportation, the bucket was covered and sudden movements avoided.

The experiments were conducted from 8 am to 4 pm under standardised room temperature conditions with an average room temperature of 23°C . Prior to the surgery, anaesthesia was induced by immersion of the frog in 1 g/L MS222 (tricaine methanesulfonate) in a covered dark container for 30 minutes [d]. As the pure solution of MS222 has a pH of 1-2, it was buffered to a pH of 7.0 by adding sodium bicarbonate [e]. Once the corneal, swallowing, wiping and righting reflexes were no longer evident, the frogs were weighed and then placed at a 10° incline. Anaesthesia was maintained via continuous flushing of 0.5g/L MS222 at an infusion rate of 1 mL/30sec [f]. The tube of the syringe pump was placed on top of the incline operation field and rinsed the backside of the animal [f]. To keep their skin moist, the animals were covered with a soft wet gauze pad and rinsed with frog ringer (0.65% saline solution) at least 3 times per minute [g & h].

Experimental protocol

As experiments were final, operations were not conducted under sterile surgical conditions. Each frog was placed on its back, and a paramedian incision of 3cm was made in the cranial third of the body to open the coelom. A small silicon tube was inserted into the superficial abdominal vein to enable the intravenous application of the placebo or the two different opioids [i]. For HR and systolic BP measurement, a micro-tip catheter was placed in the heart ventricle. To gain access to the heart, it was necessary to remove the main part of the chest cartilage. The ventricle was punctured by a 20G cannula and the micro-tip catheter was quickly inserted and fixed by a prepared purse-string suture [j, k & l]. The catheter was connected to a recording device that monitored the intraventricular BP and HR every two seconds [m]. After the surgical procedures, a 10-minute period of rest was taken, during which the skin was constantly kept moist by rinses with the frog ringer.

In the preliminary study, three different PSs according to a randomized study plan were applied to six animals:

- 1) An Acetic acid Test (AAT): 5% acetic acid was dropped onto the skin of the thigh and washed off with 20mL of frog ringer after 5 sec [n].
- 2) A pinch by a bulldog clamp in the dactyls of the forelimbs for

5 sec.

3) A pull on the ovaries by forceps for 5 sec. After the first PS, the placebo (500µL frog ringer) was given intravenously. Then, each PS was given twice at intervals of 10 minutes in a randomized sequence.

In the second part of the study, after identification of the most sensitive and reproducible PS, additional fentanyl and butorphanol were examined in three different doses each in accordance with literature [o & p] [37-42]. The chosen doses for fentanyl were 0.05, 0.25 and 0.5 mg/kg, and for butorphanol 0.05, 1.0 and 5.0mg/kg, respectively. Six randomly allocated animals were investigated per dosage group.

Painful test stimuli using the formerly identified PS were executed before application of the analgesics (PS 1) and thereafter in 10 minutes intervals (until 50 minutes after application, PS 2-5). BP and HR were continuously observed before and after applying the PS. The data one minute prior to a PS were taken as baseline reference value. During the minute directly after the PS, the peak value of both BP and HR were highlighted. The difference between maximum and baseline, delta (Δ), showed the increase in BP and HR.

At the end of the experimental protocol, 1 mL of heart blood was taken directly before euthanasation of the frog by an intracardiac overdose of thiopental (100mg/kg) [q] [9, 15 & 43]. Drug serum level was measured from the blood sample afterwards.

Statistical evaluation

The statistical analysis was performed using the software package SPSS [r]. Descriptive statistics regarding the distribution of the group differences in systolic BP and HR are given by the mean and standard deviation as well as by the percentage change. As the study was explorative, no adjustment for multiple comparisons was necessary. For pair wise group comparisons, either paired sample t-tests (comparison of the five different PS) or independent paired t-tests were conducted in an explorative manner and at a significance level of 0.05 (two-sided). To compare the three different serum levels of fentanyl and butorphanol, a one-way analysis of variance (ANOVA) and (in case of statistical significance) post hoc tests (Tuckey-HSD) were performed (significance level of 0.05; two-sided). Illustrations are given by dynamic plots (with mean and error bars) or box plots.

Results

Preliminary study

Results from five animals were evaluated. One frog was excluded due to cardiovascular depression while baseline data monitoring. Overall, each PS provoked an increase in the HR and systolic BP of the anaesthetised *Xenopus* (Figure 1). The delta of the BP was 1.65 ± 1.82 mmHg (mean \pm SD) after pinches by the bulldog clamp, which corresponds to an increase of 6.0%. The delta of the HR was 4.10 ± 3.54 bpm, which is an increase of 10.5%.

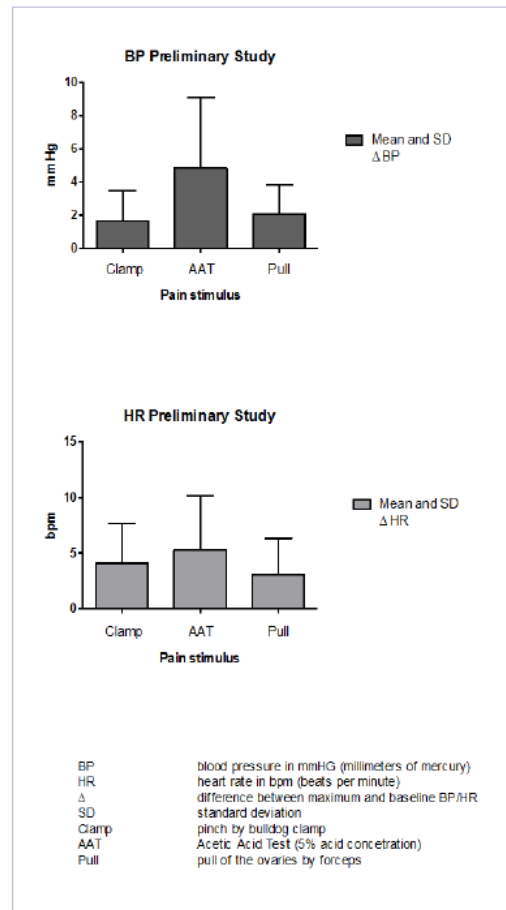


Figure 1: Preliminary Study: Comparison of three different pain stimuli under MS 222 anaesthesia

The AAT resulted in a delta of 4.86 ± 4.22 mmHg for the BP and a delta of 5.30 ± 4.81 bpm for the HR. The increases in percent were 17.4% and 14.4%, respectively.

The pull of the ovaries by forceps provoked a delta of 2.05 ± 1.76 mmHg for the BP and a delta of 3.10 ± 3.24 bpm for the HR, which represents increases of 7.4% and 8.2%, respectively.

There with, the results of the preliminary study identified the AAT being the most reproducible nociceptive stimulus during MS222 anaesthesia. It was taken to test the analgesic potency of additional butorphanol and fentanyl in the further study design.

Main Study: Analgesic addition to MS222

Using the AAT as test pain stimulus under MS222 anaesthesia, the systolic BP and HR increased by 10.3% and

18.9%, respectively, after the first PS prior to application of low dose fentanyl (0.05mg/kg). The second stimulation 10 minutes after drug application (PS 2) even showed a further increase of both parameters: 21.5% for the systolic BP and 37.6% for the HR compared to baseline. However, data variance was quite high, no statistically significant differences were observed between any of the recorded time points within the low dose fentanyl group (Figure 2). Administration of the medium dose of fentanyl

(0.25mg/kg) did not obviously influence BP or HR increase after a PS. The paired t-test showed no significant differences between the effects of the low and medium fentanyl dose (Figure 2). Application of the high fentanyl dose (0.5mg/kg) even showed a statistically significant increase in BP and HR 20 minutes after drug application (PS 3) compared to stimulation prior to the analgesia injection.

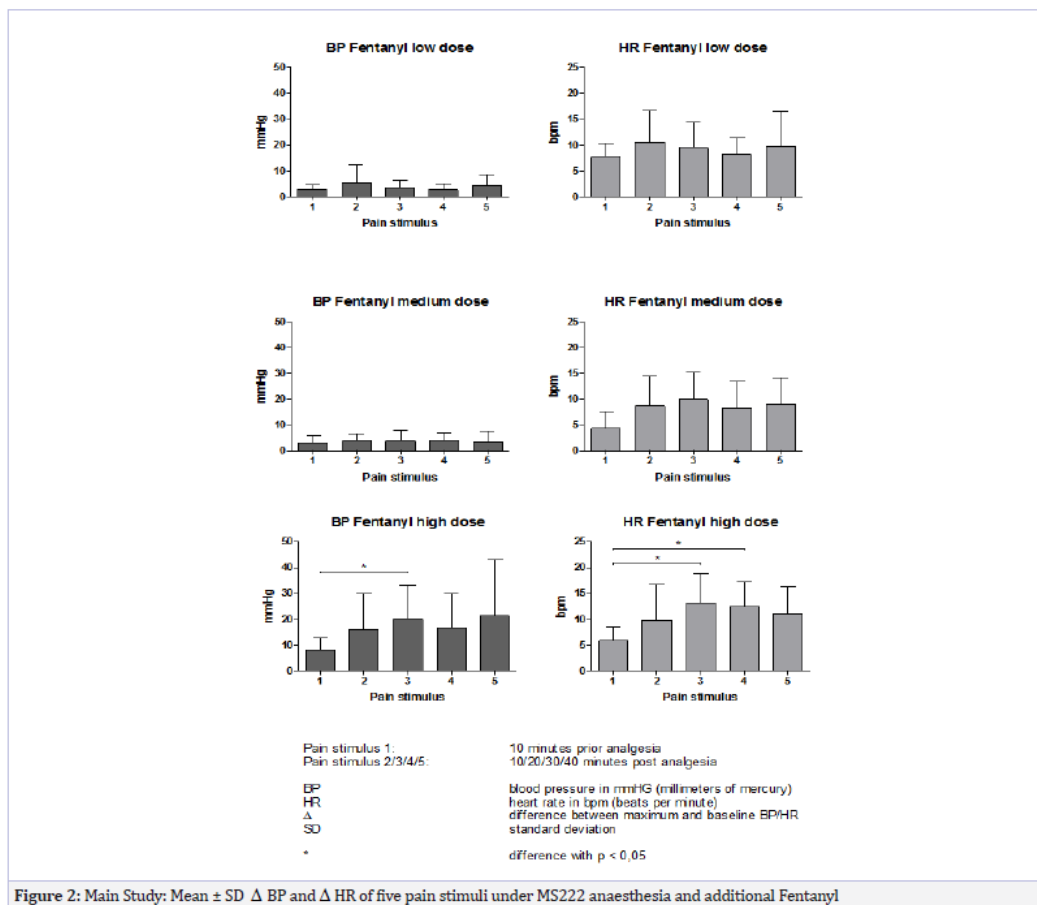
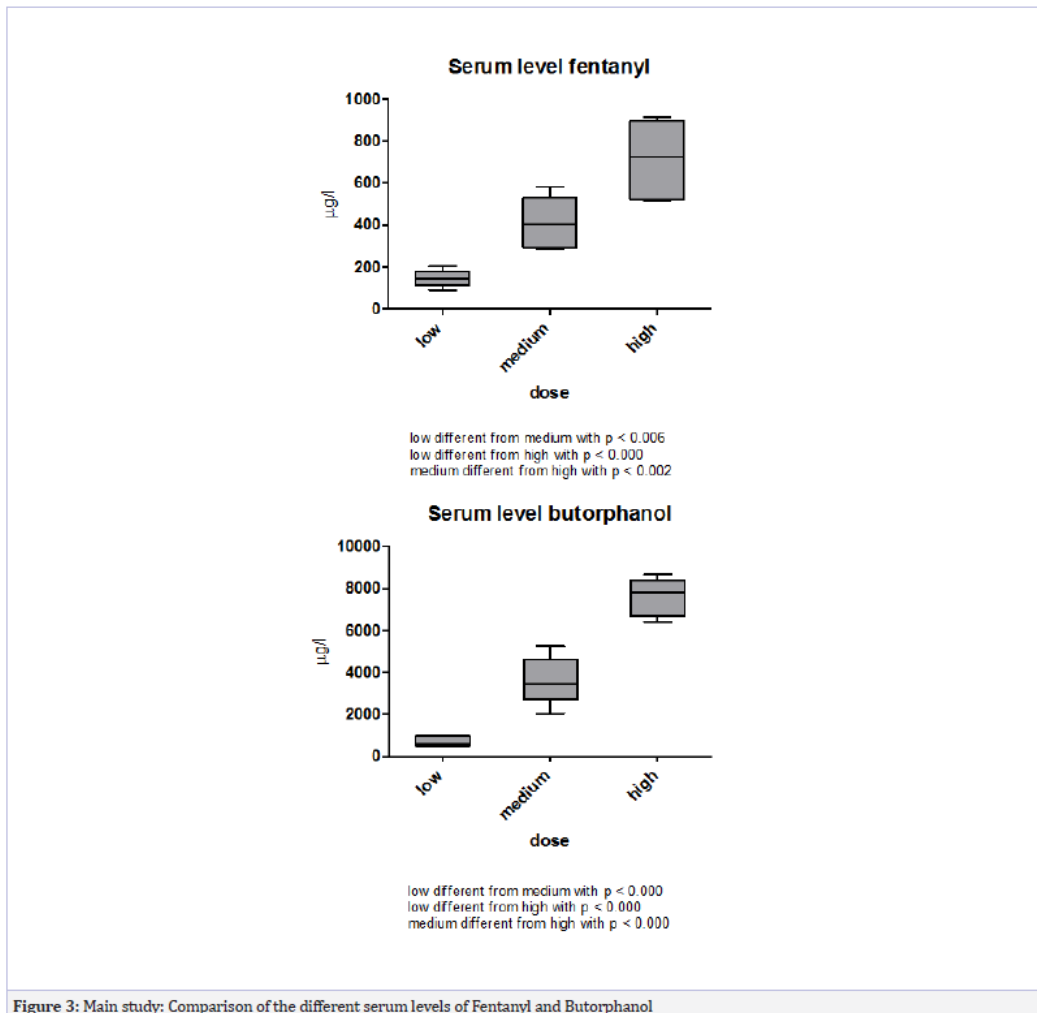


Figure 2: Main Study: Mean ± SD Δ BP and Δ HR of five pain stimuli under MS222 anaesthesia and additional Fentanyl

As shown in figure 3, the drug serum level difference between the low, medium and high doses both of fentanyl (p<0.006)

and butorphanol (p<0.000) could be statistically significantly confirmed.



The BP and HR results for butorphanol are shown in figure 4. The low dose of butorphanol (0.05mg/kg) had no statistically significant effect on BP or HR. Interestingly, the application of the medium dose of butorphanol (1.0mg/kg) affected the blood pressure significantly, it even increased from PS 3 on compared to PS 1. However, HR was not significantly changed.

Only the high dose of butorphanol (5mg/kg) significantly decreased BP (HR not significantly) at PS 2 after drug administration compared to PS 1 before. This effect could not be reproduced though at the later time points PS 3-5 when an increase of cardiac data was observed again.

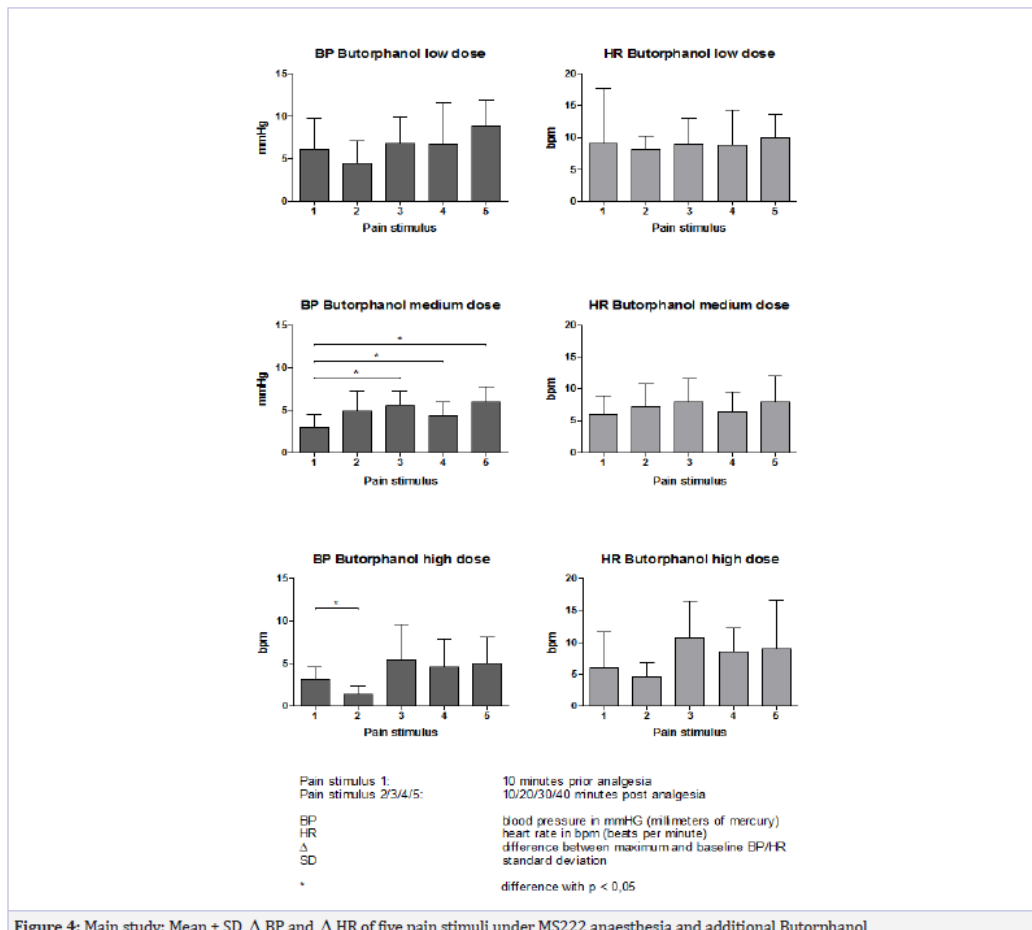


Figure 4: Main study: Mean \pm SD Δ BP and Δ HR of five pain stimuli under MS222 anaesthesia and additional Butorphanol

Discussion

As there is only poor current knowledge about intraoperative pain management in the ACF, the aim of this study was to clarify whether different Pain Stimuli (PSs) lead to nociception during anaesthesia with MS222. We used invasive systolic blood pressure and heart rate monitoring as indicators for intraoperative nociception. First, we evaluated the most sensitive and reproducible stimulus for nociception under MS222 anaesthesia before the analgesic potency of two additional opioids, fentanyl and butorphanol, was investigated at three different doses. Due to animal welfare aspects we abdicated an extra placebo control group. The preliminary study, performed with no additional analgesia, provided important information regarding that point instead. However, this was limited by the lack of potential sensitisation assessment.

In the past, several anaesthetic agents with different routes of administration have been examined in amphibians. Eugenol, benzocaine and MS222 induce general anaesthesia via immersion [18, 33 & 44-46]. In this field, MS222 is currently the agent of choice [12, 17, 24, 47 & 48]. It is an isomer of benzocaine, is characterized by better water solubility and has an average half-life of 3.2h. [8, 18 & 49]. Different doses of MS222 can be found in the literature: [12] 0.5g/L [50], 1-3g/L [51] or 1.5g/L [17]. the exact mechanism of action has not been determined, but a block of sodium currents is certainly provoked [12 & 52]. After 30 minutes of immersion, a tolerance phase is reached in which the withdrawal, corneal and righting reflexes are lost [12]. To achieve a surgically tolerant anaesthesia though, including muscle relaxation, hypnosis and analgesia, most anaesthetic agents must be used in combination. However, some studies have asserted that this is not necessary with MS222 [18 & 33].

In contrast, the results of our preliminary study showed an increase in HR and systolic BP after a painful stimulus.

Why is it important to control pain during surgery? Briefly, besides its ethical aspect, proper analgesia provides a deeper anaesthesia using lower doses. Regarding the cardiovascular system, acute pain sensation leads to a release of catecholamines, which results in an increase in HR and constriction of the peripheral vessels. These effects cause an increase in BP. In 2008, Arras demonstrated mild-to-moderate post-laparotomy pain states in laboratory mice by recording their HR and HR variability [36].

In the preliminary study, three different pain stimuli were examined in frogs under MS222. A standardised pinch by a bulldog clamp in the cloves of the forelimb is a somatic PS. The average percentage increase in BP was 6.0%, and that of the HR was 10.5%. Although the increase did not exceed 15%, a twitch of the forelimb could be recognised at the end of the experiment, when anaesthetic level got lighter. The pulling of the ovaries by forceps is a visceral PS, and it provoked a 7.4% increase in BP and an 8.2% increase in HR. The AAT is a somatic PS again. Currently, it is the method of choice for assessing nociception in amphibians [7, 18, 29 & 53-56]. Briefly, the AAT is regularly performed on awake animals with an increasing series of acid concentrations to examine the nociceptive threshold of the animal. In our study, we applied the lowest evocative acid concentration (5%) which was dropped onto the lateral area of the lower leg for 5sec where 61% of afferent fibres have their receptive field [29, 45, 54 & 55]. The percentage increase in BP in the preliminary study was 17.4%, and that of the HR was 14.4%. Of the three different PS, the AAT was the most effective and the best to standardise. This conclusion supports the results of earlier clinical trials in the literature [7, 18, 21, 22, 29, 54 & 55].

The increases in sympathetic tone after a PS demonstrate that amphibians probably have intact and active nociceptive pathways under MS222 anaesthesia resulting in intraoperative stress. This is certainly not a proof for pain perception in conscious animals. However, in 2004 Sneddon named seven indicating criteria whether an animal is capable of perceiving pain: 1) Nociceptors, 2) Brain structure, 3) Pathways to a higher brain structure, 4) Opioid receptors and substances, 5) Reduction of the nociceptive response with analgesics, 6) Avoidance learning and 7) Suspension of normal behaviour. All of these criteria refer to the class of amphibians [57]. Amphibian nociception has been recently reviewed in detail elsewhere [58]. Three different groups of primary afferent fibres have been identified in amphibians [27, 57 & 59]. Stevens assumes that there are no major differences between the amphibian and mammalian nociceptive afferent fibres [22]. Thirty-nine percent of all primary afferent fibres become excited by the AAT, which are mainly the A δ and C fibres [29]. Nociceptive information is transmitted via ascending pathways from the spinal cord to the brain. However, the brain structures differ significantly. In regard to amphibian pain perception, the biggest difference from mammalian pain perception is the lack of cortical tissue in both the cerebrum and limbic regions. Consequently, the appreciation of pain is

presumably diminished in amphibians rather than in mammals [58].

In Sneddon's numeration, point 5 is a reduced nociceptive response in conscious animals after analgesia [57]. In our study, two different opioids, fentanyl and butorphanol, were tested in three different doses each in anaesthetised *Xenopus* to enable the use of BP and HR to assess intraoperative stress and antinociception and therewith help to refine animal welfare due to post-operative pain and faster healing.

To ensure that the analgesic agent was totally absorbed, it was given intravenously, although the practicality of this approach might be questioned and therefore is a limitation of this study and may especially affect the time course of action of the drugs.

Fentanyl is a strongly lipophilic derivate of phenylpiperidin and has a high selectivity to the μ -opioid-receptor in mammals. Its potency is 80-120 times higher than that of morphine, and its duration of effect is relatively short, ranging from 20-30 min. The side effects are strong sedation, hypothermia, bradycardia, respiratory depression and vomitus. Dosage data for amphibians in the literature range from 0.5mg/kg s.c. to 1mg/kg s.c. [37-39 & 60]. In rodents, Fentanyl is commonly used as an analgesic in combination with midazolam and medetomidine to induce general anaesthesia [61].

Butorphanol is a partial μ -agonist/antagonist and a partial κ -agonist in mammals. The efficacy is dose-dependent, and high doses can have an antagonist effect. Its plasma half-life depends on species specific liver enzyme metabolism [60]. Data concerning the dosage vastly vary in the literature. For some authors it is the agent of choice for analgesia at a dose of 0.05-1 mg/kg i.v., p.o., i.m. or s.c. for a duration of 12h, while others recommend 0.2-0.4 mg/kg i.m. or even 25 mg/kg i.p [40-42]. In comparison to rodents, butorphanol is recommended for use in mice by Cagle et al. in combination with dexmedetomidine, tiletamine, zolazepam and by Kawai et al., in combination with medetomidine and midazolam [62 & 63]. It was shown that additional butorphanol improves the intraoperative analgesia and the efficacy of the anaesthesia.

For the refinement of animal experiments and the aim of giving proper dosage guidelines, we assayed three different dosages in accordance with the references. The results of our study have to be judged as explorative data using n=6, not reference-based and statistically pre-calculated. Therefore, some data show quite a wide variance. In our study, all three doses of fentanyl showed no analgesic effect. In contrast, BP and HR even increased to higher levels after painful stimulation than without analgesia, irrespective of the fentanyl dose, signifying a possible induction of hyperalgesia. In sum, the drug showed no analgesic effect but considerable side effects on the haemodynamic system of the animals. The use of fentanyl is therefore not advisable in frogs.

Butorphanol did not show any significant effect on BP and HR in the low dose group, whereas in the medium dosed group a significant BP increase could be observed compared to PS 1. In

conclusion, neither a low dose nor a medium dose of butorphanol provided efficient analgesia in ACF. The only significant decreases in BP and HR after a noxious input, meaning the only demonstrable analgesic effect of this study, were temporarily observed with the high butorphanol dose 10 min after its application at PS 2. However, in consideration of the short duration of the analgesic effect by simultaneous cardiovascular depressive side effects, its practical benefit was not particularly evident.

In summary, we conclude that ACFs have intact and active nociceptive pathways under anaesthesia with MS222. The current anaesthetic agent of choice in amphibians induced a good unconsciousness and muscle relaxation but insufficient analgesia during the painful stimulations in our study [12, 17, 24, 47 & 48]. The two opioids fentanyl and butorphanol did not effectively relieve this pain. Therefore, further non-opioid analgesics (e.g., ketamine, metamizole) should be evaluated to improve intraoperative analgesia in ACFs under MS222 anaesthesia. To stay with these examples, dosages in the literature range from 20-210 mg/kg i.m., s.c., i.v. for ketamine [9]. Dosage recommendations for metamizole in amphibians are extremely rare and follow the ones for mammals: 20-100 mg/kg i.m., slowly i.v. [64]. In our first preliminary trial we observed a markedly lower increase of BP and HR after a PS at a relatively low dose of 20 mg/kg ketamine given i.v. In conclusion, this might be a reference point for further studies, particularly using ketamine in the ACF for improving intraoperative analgesia with fewer side effects on the cardiovascular system.

Acknowledgements

We thank Sandra Hummel, the animal keeper, for providing good care of the animals and Dr. Johanna Brandl for her valuable input to the manuscript.

Funding

The research was gratefully supported by the Ingo- and Waltraud-Pauler-Fonds.

H. Potschka's group receives funding for the development of evidence-based severity assessment schemes from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG FOR 2591; PO 681/9-1).

Declaration of conflicting interests

The authors declare no conflicts of interest to disclose.

Notes

- a. Nasco, Fort Atkinson, Wisconsin, USA.
- b. Tierforschungszentrum, Universität Ulm, Ulm, Germany.
- c. Krallenfrosch Extrudat 3mm, Provimi Kliba AG, Kaiseraugst, Switzerland.
- d. Ethyl-3-aminobenzoatemetanesulfonate 98%, Sigma-Aldrich Chemistry, St. Louis, Missouri, USA.
- e. Natriumhydrogencarbonat, Merck KGaA, Darmstadt, Germany.
- f. Syringe Pump, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA.

USA.

- g. Gazin®, Lohmann & Rauscher GmbH&Co.KG, Rengsdorf, Germany.
- h. Isotone Kochsalzlösung 0.9%, B. Braun-Melsungen-AG, Melsungen, Germany.
- i. Silicon tube 7mm, FMI Föhr-Medical-Instruments-GmbH, Seeheim, Germany.
- j. Sterican® Gr:1 G20x1½"/0.90x40mm, B. Braun-Melsungen-AG, Melsungen, Germany.
- k. Mikro-Tip® catheter transducers, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, USA.
- l. PDS II 6-0 BV-1, violet monofilament absorbable suture, Johnson & Johnson Medical GmbH, Ethicon Deutschland, Norderstedt, Germany.
- m. Type "Aria", FMI Föhr-Medical-Instruments-GmbH, Seeheim Germany.
- n. Essigessenz, Surig, Speyer & Grund GmbH&Co.KG, Mainz, Germany.
- o. Fentanyl-hameln 50mikrogramm/mL Injektionslösung, Hameln pharmaceuticals GmbH, Hameln, Germany.
- p. Morphasol®-4 ad. us. vet. Injektionslösung, Albrecht GmbH, Aulendorf, Germany.
- q. Thiopental-Rotexmedica, 0.5g, Trockensubstanz, Rotexmedica GmbH, Trittau, Germany.
- r. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 23.0. IBM Corporation, Armonk, NY, USA.

References

1. Major N and Wassersug RJ. Survey of current techniques in the care and maintenance of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemp Top Lab Anim Sci.*1998;37(5):57-60.
2. Straka H and Simmers J. *Xenopus laevis*: an ideal experimental model for studying the developmental dynamics of neural network assembly and sensory-motor computations. *Dev Neurobiol.* 2012;72(4):649-663. Doi: 10.1002/dneu.20965.
3. Burggren WW and Warburton S. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR J.* 2007;48(3):260-269.
4. Hardwick LJ and Philpott A. An oncologists friend: how *Xenopus* contributes to cancer research. *Dev Biol.* 2015;408(2):180-187. Doi: 10.1016/j.ydbio.2015.02.003.
5. Beck CW and Slack JM. An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome Biol.* 2001;2(10):reviews1029.1-reviews 1029.5
6. Green SL. Postoperative analgesics in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) after surgical harvest of oocytes. *Comp Med.* 2003;53(3):244-247.

7. Coble DJ, Taylor DK and Mook DM. Analgesic effects of meloxicam, morphine sulfate, flunixin meglumine, and xylazine hydrochloride in African-clawed frogs (*Xenopus laevis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011;50(3):355–360.
8. Downes H. Tricaine anesthesia in Amphibia: a review. *Bull ARAV*. 1995;5(2):11–16.
9. Wright KM. Restraint techniques and euthanasia. In: Wright KM and Whitaker BR (eds) *Amphibian medicine and captive husbandry*. Malabar, FL: Krieger Publishing Company. 2001; pp.111–222.
10. IACUC. Texas Tech University Health Sciences Center and Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) Guidelines. Egg and oocyte harvesting from laboratory frogs (*Xenopus laevis*). IACUC. 2015.
11. ARAC. Animal Research Advisory Committee (ARAC) Guidelines. Guidelines for egg and oocyte harvesting in *Xenopus laevis*. Animal Research Advisory Committee, 2016.
12. Kölle P, Lendl C and Henke J. Amphibien. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, et al. (eds) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2012; pp.870–890.
13. Wayson KA, Downes H, Lynn RK and Gerber N. Studies on the comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate: metabolism as a basis of the selective toxicity in poikilotherms. *J Pharmacol Exp Ther*. 1976;198(3):695–708.
14. Williams CJA, Alstrup AKO, Bertelsen MF, Jensen HM, Leite CAC and Wang T. When local anesthesia becomes universal: Pronounced systemic effects of subcutaneous lidocaine in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2017;209: 41–46. Doi: 10.1016/j.cbpa.2017.03.019.
15. Lalonde-Robert V, Desgent S, Duss S and Vachon P. Electroencephalographic and physiologic changes after tricaine methanesulfonate immersion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(5):622–627.
16. Paduano M, Colafrancesco KC, Wong SA, Caldwell MS and Papp MG. The response of gray tree frogs to anesthesia by tricaine methanesulfonate (TMS or MS-222). *ISRN Zoology*. 2013;635704:9.
17. Cakir Y and Strauch SM. Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Pharmacol Rep*. 2005;57(4):467–474.
18. Lalonde-Robert V, Beaudry F and Vachon P. Pharmacologic parameters of MS222 and physiologic changes in frogs (*Xenopus laevis*) after immersion at anesthetic doses. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2012;51(4):464–468.
19. Hernández SE, Sernia C and Bradley AJ. The effect of three anaesthetic protocols on the stress response in cane toads (*Rhinella marina*). *Vet Anaesth Analg*. 2012;39(6):584–590. Doi: 10.1111/j.1467-2995.2012.00753.x.
20. Koustubhan P, Kaplan DL and Levin M. Humane anesthesia and pain management in amphibian limb surgery of *Rana pipiens*. *Cold Spring Harb Protoc*. 2013;2013(2):149–155. Doi: 10.1101/pdb.prot071977.
21. Stevens CW. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life Sciences*. 1992;50(13):901–912.
22. Stevens CW. Analgesia in amphibians: preclinical studies and clinical applications. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2011; 14(1):33–44. Doi: 10.1016/j.cvex.2010.09.007
23. Kaplan HM. Anesthesia in amphibians and reptiles. *Fed Proc*. 1969;28(4):1541–1546.
24. Guénette SA, Giroux MC and Vachon P. Pain perception and anaesthesia in research frogs. *Exp Anim*. 2013;62(2):87–92.
25. Fox H and Whitear M. Observations of Merkel cells in amphibians. *Biol Cell*. 1978;32(2):223–232.
26. Habgood JS. Sensitization of sensory receptors in the frog's skin. *J Physiol*. 1950;111(1-2):195–213.
27. Spray DC. Pain and temperature receptors of Anurans. In: Llinás R and Precht W (eds) *Frog neurobiology, a handbook*. Berlin: Springer. 1976;pp.607–628.
28. Yamashita Y and Ogawa H. Slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units associated with Merkel cells and effects of direct currents. *Somatosens Mot Res*. 1991;8(1):87–95.
29. Hamamoto DT and Simone DA. Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *J Neurophysiol*. 2003;90(2):566–577. DOI: 10.1152/jn.00324.2003
30. Sneddon LU. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology*. 2018;33(1):63-73. Doi: 10.1152/physiol.00022.2017.
31. Vesselkin NP, Agayan AL, Nomokonova LM. A study of thalamo-telencephalic afferent systems in frogs. *Brain Behav Evol*. 1971; 4(4):295–306. DOI: 10.1159/000125439.
32. Erhardt W. Definition, Aufgaben und Bedeutung der tierärztlichen Anästhesie. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, C. Baumgartner and S. Tacke. *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Stuttgart: Schattauer Verlag, 2012, pp.7–9.
33. Ramlochansingh C, Branoner F, Chagnaud BP and Straka H. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PLoS One*. 2014;9(7):e101606.
34. von Dincklage F, Correll C, Schneider MH, Rehberg B and Baars JH. Utility of Nociceptive Flexion Reflex Threshold, Bispectral Index, Composite Variability Index and Noxious Stimulation Response Index as measures for nociception during general anaesthesia. *Anaesthesia*. 2012;67(8):899-905. Doi: 10.1111/j.1365-2044.2012.07187.x.

35. Richter T. Evaluation of metamizole vs. fentanyl as intraoperative analgesia – a clinical study in dogs. München, Germany: Ludwig-Maximilians-Universität, 2007.
36. Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP and Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res.* 2007;3:16. doi: 10.1186/1746-6148-3-16.
37. Machin KL. Amphibian pain and analgesia. *J Zoo Wildl Med.* 1999;30(1):2–10.
38. Machin KL. Fish, amphibian, and reptile analgesia. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract.* 2001;4(1):19–33.
39. Chinnadurai SK and Kane LP. Advances in Amphibian clinical therapeutics. *J Exot Pet Med.* 2014;23(1):50–55.
40. Ströse D and Kempf H. Dosierungsvorschläge bei Amphibien. In: Ströse D, Schütz S, Schütz S, et al. (eds) *Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen.* Stuttgart: Schattauer Verlag, 2013. pp.228–229.
41. Schuhmacher J. Anesthesia and immobilization of specific species. Reptiles and amphibians. In: Thurmon JC, Tranquilli WJ and Benson GJ (eds) *Lumn and Jones' veterinary anesthesia.* Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. pp.670–685.
42. Terril-Robb L, Suckow M and Grigdesby C. Evaluation of the analgesic effects of butorphanol tartrate, xylazine hydrochloride, and flunixin meglumine in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Contemp Top Lab Anim Sci.* 1996;35(3):54–56.
43. Torrelles SL, McClure DE and Green SL. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2009;48(5):512–516.
44. Guénette SA, Hélie P, Beaudry F and Vachon P. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Anaesth Analg.* 2007;34(3):164–170.
45. Goulet F, Hélie P and Vachon P. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010;49(4):460–463.
46. Zahl IH, Samuelsen O and Kiessling A. Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiol Biochem.* 2012;38(1):201–218. Doi:10.1007/s10695-011-9565-1.
47. Gentz EJ. Medicine and surgery of amphibians. *ILAR J.* 2007;48(3):255–259.
48. Beckman M. Therapeutic review: tricaine methanesulfonate. *J Exot Pet Med.* 2016;25(3):261–263.
49. Longley LA. Amphibian anesthesia. In: Longley LA (ed) *Anaesthesia of exotic pets.* Edinburgh: Saunders Elsevier, 2008;pp.245–252.
50. Chai N and de Luze A. Medicine and surgery in amphibians. In: *Proceedings of the 7th Scientific Meeting of the European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians.* Leipzig, Germany. 2008;pp.185–188.
51. Bonath K. *Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische.* Berlin: Paul Parey, 1977.
52. Frazier DT and Narahashi T. Tricaine (MS-222): effects on ionic conductances of squid axon membranes. *Eur J Pharmacol.* 1975;33(2):313–317.
53. Stevens CW. Opioid antinociception in amphibians. *Brain Res Bull.* 1988;21(6):959–962.
54. Pezalla PD. Morphine-induced analgesia and explosive motor behavior in an amphibian. *Brain Res.* 1983;273:297–305.
55. Hamamoto DT, Forkey MW, Davis WL, Kajander KC and Simone DA. The role of pH and osmolarity in evoking the acetic acid-induced wiping response in a model of nociception in frogs. *Brain Res.* 2000;862(1-2):217–229.
56. Vachon P. Hargreaves does not evaluate nociception following a surgical laparotomy in *Xenopus laevis* frogs. *Res Vet Sci.* 2014;97(2):470–473. Doi: 10.1016/j.rvsc.2014.06.009.
57. Sneddon LU. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46(2):123–130. DOI:10.1016/j.brainresrev.2004.07.007.
58. Stevens CW. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004;46(2):204–215. Doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.07.003.
59. Stevens CW and Willenbring S. Pain sensation and analgesia in amphibians and reptiles. In: Ackerman L (ed) *The biology, husbandry and health care of reptiles and Amphibians.* Neptune City: TFH Publications, 1997; pp.309–324.
60. Ammer H and Potschka H. Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In: Löscher W and Richter A (eds) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin.* Stuttgart: Enke Verlag, 2016;pp.151–153.
61. Henke J, Erhardt W, Nager. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, et al. (eds) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen.* Stuttgart: Schattauer Verlag, 2012;pp.703-725.
62. Cagle LA, Franz LM, Epstein SE, Kass PH, Last JA and Kenyon NJ. Injectable anesthesia for mice: combined effects of dexmedetomidine, tiletamine-zolazepam, and butorphanol. *Anesthesiol Res Practice.* 2017;2017: 7.
63. Kawai S, Takagi Y, Kaneko S and Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim.* 2011;60(5):481-487.
64. Henke J, Tacke S, Erhardt W. Analgesie. In: Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, et al. (eds) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen.* Stuttgart: Schattauer Verlag, 2012; pp.383-434.

3.2. Publikation 2

Der folgende Artikel erschien in der Ausgabe 1/2019 der „elaphe“, der Mitgliederzeitschrift der DGHT, der Deutschen Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde e.V.



Vergleich der analgetischen Wirkung von Fentanyl und Butorphanol unter Anästhesie mit Tricainmethansulfonat beim **Afrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*)**



Das deutsche Tierschutzgesetz gibt vor, dass an einem Wirbeltier ohne Betäubung kein mit Schmerzen verbundener Eingriff vorgenommen werden darf. In der durch den Ingo- und Waltraud-Pauler-Fonds der AG Amphibien- und Reptilienkrankheiten der DGHT geförderten Studie wird untersucht, ob dies auch für Krallenfrösche, stellvertretend für die Klasse der Amphibien, zutrifft und ob mit einer zusätzlichen Gabe von Analgetika die Allgemeinanästhesie verbessert werden könnte.

Text und Abbildungen von S. Strobel¹, H. Kempf², A. Hagedorn³, S. Ott³, B. Waschulzik⁵, M. Gröger⁴, S. Kress⁴, P. Radermacher⁴, H. Potschka⁶, C. M. Baumgartner¹

¹Zentrum für Präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar

²Tierärztliche Praxis für Exoten, Augsburg

³Tierforschungszentrum, Universität Ulm

⁴Universitätsklinikum Ulm, Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung

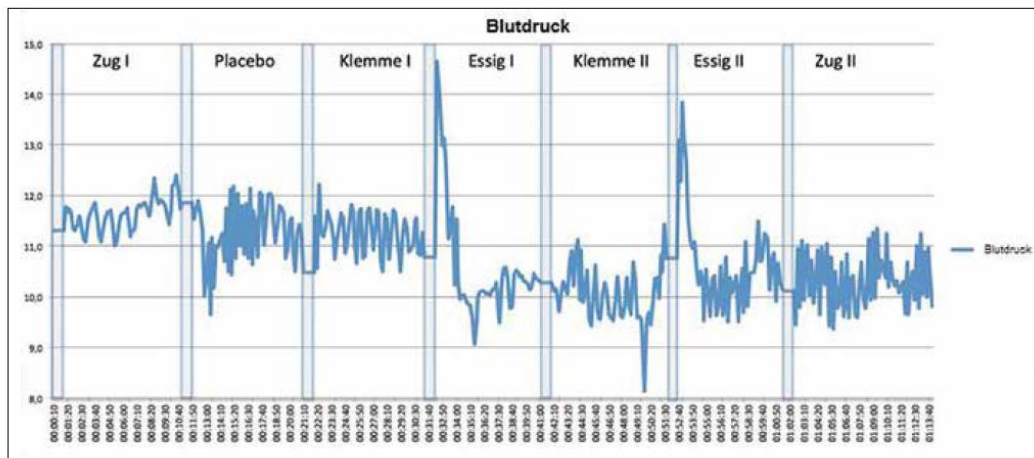
⁵Institute für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie, Technische Universität München

⁶Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Krallenfrösche (*Xenopus laevis*) wurden schon in den 1940er-Jahren als sogenannte Apothekerfrösche zu Versuchszwecken in der Schwangerschaftsdiagnostik eingesetzt und haben bis heute ihren Platz in der Versuchstierkunde behauptet. Vor allem in der Forschung zur menschlichen



Ein Afrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) unter Allgemeinanästhesie. Das Tier wird auf einer schrägen Fläche feucht gehalten und permanent mit einer niedrigen Dosis MS222 umspült.



Im Vergleich mit den verschiedenen Schmerzreizen zeigt sich die deutlichste Reaktion beim Essigsäuretest

Genetik werden zahllose *Xenopus*-Eier verwendet. Diese werden den weiblichen Tieren unter MS222-Narkose und mittels Laparotomie entnommen.

Tricainmethansulfonat (MS222) ist unter den Anästhetika für Amphibien derzeit das Mittel der Wahl, da es eine kurze Einleitungszeit, eine beliebig aufrechtzuerhaltende Toleranzphase und zudem eine relativ kurze Aufwachzeit aufweist. Bis heute werden zahlreiche Eingriffe bei Amphibien oft ausschließlich mit Tricainmethansulfonat vorgenommen, in der Annahme, dass MS222 auch eine ausreichend analgetische Wirkung habe. Die in der Literatur zu findenden Angaben zur ergänzenden Schmerztherapie bei Amphibien variieren zum Teil stark.

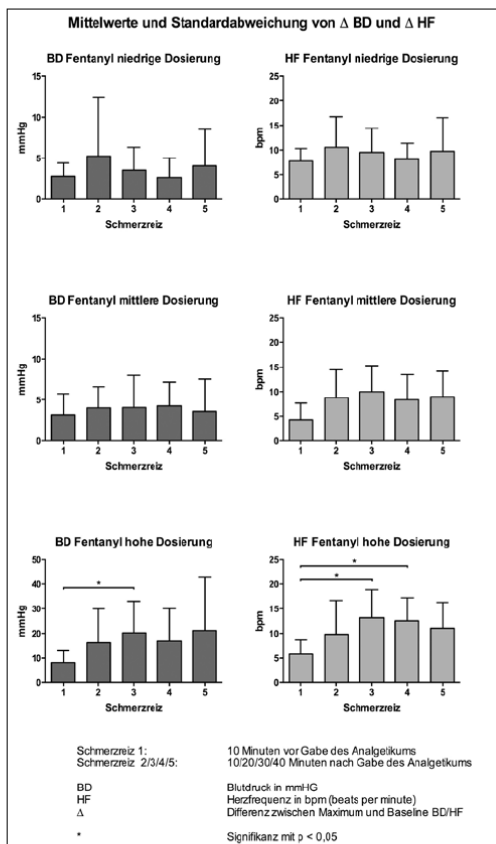
Grundsätzlich ist immer noch wenig über das Schmerzempfinden bei Amphibien im Allgemeinen und Krallenfröschen im Speziellen bekannt. Zum Teil wird sogar immer noch angenommen, dass Amphibien aufgrund ihrer niedrigen phylogenetischen Stellung Schmerz nur geringfügig bzw. gar nicht bewusst wahrnehmen können, da sie im Gegensatz zu Säugetieren kein Neopallium ausgebildet haben. Jedoch verfügen sie über alle neurobiologischen Voraussetzungen, inklusive eines Großhirns, um Schmerzreize von den peripheren Rezeptoren zum ZNS zu übertragen und besitzen auch antinozizeptive Mechanismen zur Schmerzmodulation.

Das 3R-Prinzip ist heutzutage Grundlage in der Versuchstierkunde. Ziel ist es, Tierversuche möglichst vollständig zu vermeiden (Replacement), die Zahl der Tiere (Reduction) und ihr Leiden (Refinement) in Versuchen auf das unerlässliche Maß zu beschränken. In Bezug auf letzteren Punkt ist ein Ziel dieser Studie, zu überprüfen, ob MS222 als „ideales Anästhetikum“ alle Anteile einer Allgemeinanästhesie – 1) Muskelrelaxation, 2) Bewusstseins- und vor allem 3) Schmerzausschaltung – induzieren kann.

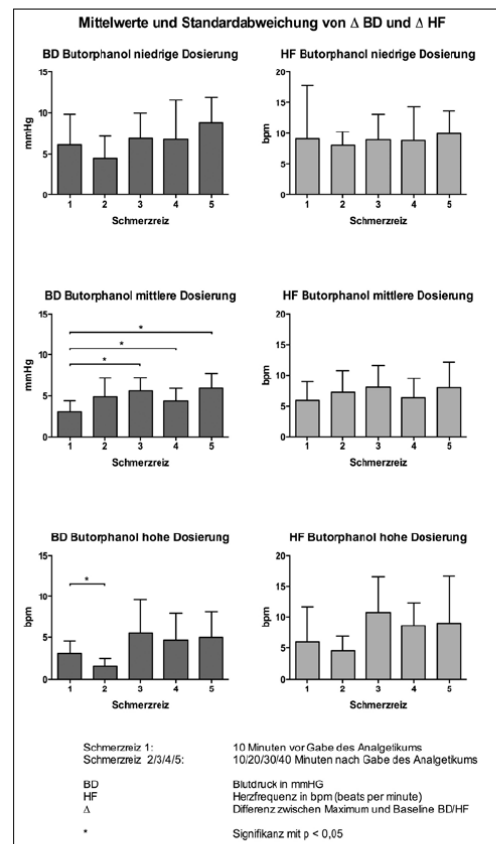
Dazu wurde im ersten Teil des Projekts zunächst untersucht, ob es unter einer MS222-Anästhesie neben der Bewusstlosigkeit (Hypnose) und Muskelrelaxation auch zur Ausschaltung bzw. -verringering der Schmerzweiterleitung zum Gehirn (Nozizeption) und damit zu einer therapeutischen Schmerzreduktion (Analgesie) kommt. Entsprechend wurden drei verschiedene Schmerzreize an narkotisierten Krallenfröschen untersucht, um den am besten reproduzier- und standardisierbaren Reiz zu finden. Mit diesem sollten dann im zweiten Teil der Studie verschiedene praxistaugliche Anästhetikum-Analgetikum-Kombinationen untersucht werden. Dazu wurden zwei Analgetika aus der Gruppe der Opiode (Fentanyl und Butorphanol) daraufhin getestet, ob und in welchem Maße sie in Kombination mit MS222 die Nozizeption reduzieren.



Beim Essigsäuretest wird 5%ige Essigsäure auf die Hintergliedmaße des narkotisierten Krallenfroschs aufgetragen und, wie im Bild zu sehen, mit reichlich Wasser wieder abgespült



Veränderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz nach Fentanyl-Applikation: Bei allen Dosierungen reagieren Blutdruck und Herzfrequenz auf die gesetzten Schmerzreize gleich stark oder stärker als beim ersten Schmerzreiz ohne Analgetikum.



Veränderungen des Blutdrucks und der Herzfrequenz nach Butorphanol-Applikation: Nur bei der (sehr) hohen Dosierung konnte beim ersten Schmerzreiz, 10 Minuten nach Gabe des Analgetikums, eine verminderte Reaktion von Blutdruck und Herzfrequenz gemessen werden.

Teil I: Induziert MS222 eine Allgemeinanästhesie mit potenter Analgesie?

Da Schmerz eine komplexe, subjektive Sinneswahrnehmung ist, die ein Bewusstsein voraussetzt, wird im Folgenden im Hinblick auf eine Bewusstlosigkeit unter Narkose nur von Nozizeption gesprochen. Nozizeption definiert die physiologische Schmerzaufnahme und -weiterleitung. Nozizeption ist nicht gleichbedeutend mit Schmerzempfindung, jedoch ist Schmerzempfinden ohne Nozizeption nicht möglich. Während einer Allgemeinanästhesie soll die Nozizeption so gering wie möglich sein. Ein entsprechend starker Schmerzreiz kann bis zum Erwachen führen.

Da es für narkotisierte Amphibien kein etabliertes Verfahren gibt, um intraoperative Nozizeption zu messen, wurde auf Methoden, die beim Säugetier etabliert sind, zurückgegriffen. Ein Anstieg von Herz-Kreislauf-Parametern (Blutdruck und Herzfrequenz) als direkte Reaktion auf einen Schmerzreiz wurde in der Studie als deutlicher Hinweis auf Nozizeption gewertet.

Die praktische Umsetzung der Vitalparametermessung gestaltet sich bei Krallenfröschen allerdings nicht einfach. Der basale Blutdruck von Afrikanischen Krallenfröschen ist sehr niedrig. Zudem sind Messverfahren mit Blutdruckmanschetten bei dieser Tierart nicht ohne weiteres umsetzbar, geschweige denn zuverlässig evaluiert. Im Rahmen dieser Studie wurden der intrakardiale Blutdruck und die Herzfrequenz daher invasiv mittels einer Sonde (Mikro-TIP-Katheter) direkt im Herzventrikel permanent gemessen. Nun konnte im Folgenden untersucht werden, ob auf einen Schmerzreiz hin hämodynamische Veränderungen auftreten oder ob die MS222-Narkose eine ausreichende analgetische Wirkung zeigt.

Der Literatur entsprechend wurden im ersten Teil der Studie folgende drei Schmerzreize bei Krallenfröschen unter MS222-Anästhesie untersucht:

1. Essigsäuretest: Auftropfen einer definierten Menge verdünnter Essigsäure auf die sensible Froshhaut der Hin-

Forschung

tergliedmaße, nach fünf Sekunden Abspülen mit reichlich Wasser,

2. Druckschmerzzeugung an einer Zehe der Vordergliedmaßen mit einer sogenannten Bulldog-Klemme, die mittels eines Federmechanismus mit einer standardisierten Stärke schließt, und

3. Zug an einem Bauchhöhlenorgan, hier am Eierstock.

Der Essigsäuretest findet sich häufig in der Literatur und gilt als Methode der Wahl. Die Bulldog-Klemme sollte vergleichend getestet werden, weil sie am wenigsten invasiv erschien. Beim Zug an den Eierstöcken handelt es sich um einen viszeralen Schmerzreiz. Dieser orientiert sich an der gängigen Praxis von Krallenfrosch-Operationen, wenn Laich aus der Bauchhöhle herausgezogen und als Gewebestück teillamputiert wird. Alle drei Schmerzreize hatten messbare Effekte, jedoch waren die des Essigsäuretests am zuverlässigsten und am deutlichsten reproduzierbar. Daher wurde dieser Test für den zweiten Teil der Studie als Standard-schmerzreiz festgelegt.

MS222 scheint entsprechend der aktuellen Studienergebnisse keine ausreichende Analgesie beim Krallenfrosch zu induzieren, d. h., eine zusätzliche Gabe eines Analgetikums ist bei schmerzvollen Eingriffen notwendig.

Teil 2: Lässt sich die Nozizeption beim Afrikanischen Krallenfrosch unter MS222-Narkose mit Opioiden (Fentanyl und Butorphanol) reduzieren oder ausschalten?

Grundsätzlich gibt es verschiedene Formen der Schmerzhemmung. Zum einen lässt sich eine Entzündungsreaktion unterdrücken (z. B. durch Nichtsteroidale Antiphlogistika), andererseits kann die Schmerzweiterleitung reduziert (z. B. durch Opioide) und dadurch indirekt die Schmerzwahrnehmung limitiert werden. Opioide binden unterschiedlich stark an den verschiedenen Rezeptoren. Die unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen sind wiederum bei jeder Tierart unterschiedlich stark exprimiert, und über ihre genaue Verteilung ist bisher bei Amphibien nur wenig bekannt. Um eine möglichst sichere Schmerzmittelwirkung messen zu können, wurden zwei verschiedene Wirkstoffe aus der Opioidgruppe, Fentanyl und Butorphanol, getestet. Diese binden an jeweils unterschiedlichen Opiatrezeptoren. Wie bereits einleitend erwähnt, gibt es bislang lediglich eine überschaubare Anzahl an Studien zum Thema Schmerzempfinden bei Amphibien.

Beim Thema Schmerzausschaltung besteht Handlungsbedarf im Sinne des Tierschutzes

Dosisempfehlungen in der Literatur variieren sehr stark. Entsprechend wurden jeweils eine niedrige, mittlere und hohe Dosierung auf der Basis der Literaturangaben für die aktuelle Studie ausgewählt.

Wider Erwarten zeigte Fentanyl in allen drei Dosierungen keine Reduktion der Nozizeption unter MS222-Narkose. Mit Butorphanol konnte nur in der hohen Dosierung (5 mg/kg) eine kurzzeitige und signifikante Reduktion der Blutdruck-

und Herzfrequenzanstiege nach einem Schmerzstimulus gemessen und damit als reduzierte Nozizeption gewertet werden. Blutdruck und Herzfrequenz stiegen 10 Minuten nach Verabreichung der Essigsäure deutlich geringer an als im Vergleichsversuch ohne Analgetikum. Doch bereits 20 Minuten nach Applikation von Butorphanol war dieser Effekt nicht mehr zu messen. Die hohe Butorphanol-Dosis zeigte als Nebenwirkung jedoch auch einen starken Abfall von Blutdruck und Herzfrequenz, sodass keine sichere Narkosesteuerung mehr garantiert werden konnte. Mit dem Einsatz von Butorphanol und Fentanyl gelang es somit nicht, die intraoperative Analgesie nebenwirkungsarm zu verbessern. Das bedeutet, dass weitere Untersuchungen mit anderen Wirkstoffklassen oder Wirkstoffkombinationen durchgeführt werden sollten. Dabei kann aber auf das etablierte Schmerzmodell aufgebaut werden.

Zusammenfassung

Die erste und wichtigste Erkenntnis der Studie ist, dass Tricainmethansulfonat beim Afrikanischen Krallenfrosch keine ausreichende Schmerzausschaltung induziert. Da eine internationale Empfehlung in der Versuchstierkunde die alleinige Anwendung des Wirkstoffes vorsieht, besteht unserer Meinung nach dringender Handlungsbedarf, einerseits diese Empfehlung anzupassen und andererseits bessere Methoden der Schmerzausschaltung beim Krallenfrosch zu untersuchen. Die aktuellen Dosierungsempfehlungen zu Fentanyl und Butorphanol in der Literatur konnten in der aktuellen Studie nicht bestätigt werden. Da der „Kaiserschnitt“ beim Afrikanischen Krallenfrosch Bestandteil vieler Versuche in der Forschung zur Embryonalentwicklung ist, ist basierend auf den neuen Erkenntnissen zu hinterfragen, ob dieser Eingriff unter den bestehenden Bedingungen weiterhin ohne eine gesonderte Analgesie/Schmerztherapie genehmigungsfähig ist. Auch wenn in der durchgeführten Studie noch kein ideales Analgesie-Protokoll gefunden wurde, konnte doch eine methodische Basis geschaffen werden, um zeitnah die Wirkung weiterer Analgetika zu untersuchen.

Bedarf weiterer Förderung

Die aktuelle Studie zeigt, dass beim Thema Schmerzausschaltung von Amphibien in der Versuchstierkunde noch dringend Handlungsbedarf im Sinne des Tierschutzes besteht. Leider handelt es sich dabei um keine gesellschaftlich zentralen oder wirtschaftlich gewinnbringenden Fragestellungen, sodass es extrem schwierig ist, für entsprechende Untersuchungen Mittel zu bekommen. In diesem Zusammenhang danken wir ganz besonders dem Ingo-und-Waltraud-Pauler-Fonds der AG Amphibien- und Reptilienkrankheiten der DGHT für die großzügige Unterstützung des Projektes. ■

Die ausführliche Veröffentlichung zum Artikel finden Sie unter:

STROBEL S., A. HAGEDORN, S. OTT, H. KEMPF, B. WASCHULZIK, M. GRÖGER, S. KRESS, P. RADERMACHER, H. POTSCHKA & C.M. BAUMGARTNER (2018): A comparison of the analgesic effects of fentanyl and butorphanol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) under tricaine methanesulfonate (MS222) anaesthesia. – *SOJ Anesthesiology and Pain Management* (2018): 5(2): 1–10.

4. Diskussion

Der Grundgedanke der vorliegenden Studie war das Refinement von Tierversuchen. Das Ziel des ersten Studienteils war entsprechend die Untersuchung, ob die Verwendung von MS222 bei der Anästhesie von Krallenfröschen nicht nur zu Hypnose und Muskelrelaxation führt, sondern bei schmerzhaften Reizen auch die Nozizeption unterdrückt bzw. analgetisch wirkt. Im zweiten Teil folgte die Überprüfung, ob die Verwendung von Fentanyl und Butorphanol nozizeptive Reize beim Krallenfrosch unter MS222-Narkose reduzieren kann.

Wie einleitend bereits erwähnt, besteht zwischen Nozizeption und der bewussten Schmerzempfindung ein wichtiger Unterschied. Nozizeption muss nicht zwangsläufig mit dem bewussten Empfinden von Schmerzen, bzw. Leiden verbunden sein, aber die komplexe, bewusste Sinneswahrnehmung von Schmerz im Gehirn (Perzeption) ist ohne Nozizeption nicht möglich. Bei letzterer handelt es sich um die Weiterleitung eines Schmerzreizes von einem peripheren Rezeptor zum Gehirn, in dem dieser dann durch verschiedene Hirnregionen verarbeitet wird. Beim wachen Tier wird daraus ein bewusstes Schmerzerlebnis, das es je nach Tierart unterschiedlich zum Ausdruck bringen kann. Unter Narkose können mindestens vegetative Stressantworten (Anstieg von Blutdruck, Herz- und Atemfrequenz) gemessen werden, da auftretende Schmerzreize zu einer Stimulation des sympathischen Nervensystems führen. Dadurch werden u.a. Katecholamine ausgeschüttet, die wiederum eine Steigerung der Herzfrequenz und, aufgrund der Konstriktion peripherer Gefäße, einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks zur Folge haben (Henke et al., 2012). Diese neurovegetative Reaktion bleibt auch bei Bewusstseinsverlust erhalten (Richter, 2007).

Amphibien haben als Wirbeltiere anatomisch und physiologisch die neurobiologischen Voraussetzungen, um auf Schmerzreize zu reagieren, diese sowohl weiterzuleiten (Nozizeption), in ihrem ZNS zu verarbeiten, als auch bewusst wahrzunehmen (Perzeption) (Guénette et al., 2013, Stevens, 2004, Coble et al., 2011, Machin, 1999).

4.1. Ein neues Untersuchungsmodell zum Nachweis von intraoperativer Nozizeption unter MS222-Narkose bei Krallenfröschen

Für die vorliegende Studie wurde ein neues Untersuchungsmodell entwickelt, um die intraoperative Nozizeption bei Krallenfröschen unter MS222-Narkose erstmals invasiv

untersuchen und so die analgetische Potenz von Tricainmethansulfonat bewerten zu können. Zunächst wurden drei verschiedene Schmerzreize an mit MS222 anästhesierten Krallenfröschen untersucht, dabei sollte zwischen viszeralem und somatischem Schmerz unterschieden werden. Bei ersterem wurde mit einer Pinzette am Ovar gezogen, bei den somatischen Schmerzreizen handelte es sich einerseits um den Essigsäuretest und andererseits um eine Druckausübung auf die Zehen mithilfe einer Bulldog-Klemme. Der Essigsäuretest erwies sich dabei als der effektivste Reiz, da die Applikation von 5%iger Essigsäure einen durchschnittlichen prozentualen Anstieg von 17,4% beim Blutdruck und 14,4% bei der Herzfrequenz induzierte. Zum Teil konnten dabei Zuckungen der betroffenen Gliedmaße beobachtet werden. In Untersuchungen im Zusammenhang mit Nozizeption oder im Rahmen der Bewertung der Anästhesietiefe bei Amphibien gilt der Essigsäuretest momentan auch als Schmerzreiz der Wahl (Lalonde-Robert et al., 2012a). Er sollte dennoch kritisch betrachtet werden, da die Haut als sehr wichtiges Organ der Amphibien durch einen mehrfach durchgeführten Essigsäuretest starken Schaden nehmen kann. Bei den betroffenen Hautstellen kann es in der Folge zu Ulzerationen, sekundären bakteriellen Infektionen und sogar Sepsis kommen (Coble et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnten keine Hautveränderungen beobachtet werden, da zum einen nur mit 5%iger Essigsäure gearbeitet wurde und es sich zum anderen um einen Terminalversuch handelte, sodass keine Aussage über weitere Folgeerscheinungen gemacht werden kann.

Alle drei Schmerzreize wurden im ersten Teil der Studie jeweils zweimal pro Tier getestet. Vor jedem Schmerzreiz wurde eine 10-minütige Ruhephase eingehalten, in der sich die beiden Parameter Blutdruck und Herzfrequenz gleichmäßig bewegten. Nach erfolgtem Schmerzreiz schnellten beide Werte innerhalb von Sekunden in die Höhe. Obwohl statistisch kein signifikanter Unterschied zu den anderen beiden Testschmerzreizen nachgewiesen werden konnte, wurde der Essigsäuretest als effektivster Schmerzreiz festgelegt, da dieser mit den größten Unterschieden zwischen dem Ruhewert und dem reizinduzierten Maximalwert verbunden war.

Dieses entwickelte Modell diente im folgenden Versuchsteil der Überprüfung, ob die Verwendung von Fentanyl und Butorphanol nozizeptive Reize beim Krallenfrosch unter MS222-Narkose reduzieren kann.

In einem aktuellen Review wurden die verschiedensten Methoden von Klinik und Forschung zur Messung von Schmerz und Nozizeption bei Säugetieren zusammengefasst. Als Empfehlung

geht daraus die Kombination verschiedener Methoden hervor, um die Aussage eines Versuches so klar wie möglich zu gestalten (Johnson, 2016). Laut Arras und Kollegen (Arras et al., 2001) sind die physiologischen Parameter Herz- und Atemfrequenz sowie Blutdruck die sensibelsten und objektivsten Indikatoren für die chirurgische Toleranz bei Kleinsäugetieren. Dennoch empfiehlt sie neben diesem „Goldstandard“ die Untersuchung von weiteren Parametern, die Aufschluss über die Anästhesietiefe geben könnten, wie z.B. die Reaktion des Patienten auf einen noxischen Reiz. Hierbei hat sich der Fußrückziehreflex als der beste und sensibelste Parameter erwiesen (Arras et al., 2001). Der in der vorliegenden Studie durchgeführte Schmerzreiz in Form von Druck mit einer Bulldog-Klemme wurde in Anlehnung dazu ausgewählt. Dieser Schmerzreiz erzeugte bei den Krallenfröschen jedoch nicht so starke Auswirkungen auf Blutdruck und Herzfrequenz wie der momentane Schmerzreiz der Wahl bei Amphibien, der Essigsäuretest. Im Gegensatz zu Säugertieren zählt die Haut von Amphibien zu deren wichtigsten Organen, ist stark vaskularisiert und von zahlreichen Nozizeptoren in den oberflächlichen und tiefen Schichten durchsetzt (Habgood, 1950, Spray, 1976, Yamashita and Ogawa, 1991).

Klinisches Narkose-Monitoring ist rein anatomisch (Körperbau und -größe), aber auch physiologisch (wechselwarme, z.T. aquatisch lebende Tiere mit ausgeprägter Resistenz gegenüber temporärer Hypoxie bzw. Anoxie) eine große Herausforderung beim Krallenfrosch. Die beim Säuger etablierten Basis-Methoden wie die Erfassung von Puls- und Atemfrequenz, nichtinvasiv abgeleitetem Blutdruckwert, ggf. Elektrokardiographie (EKG), Körpertemperatur, Urinproduktion und oxymetrischer Sauerstoffsättigung können oft nicht aussagekräftig angewandt werden. Da die Mundbodenatmung der Krallenfrösche unter der MS222-Narkose sistierte, musste in der vorliegenden Studie auf die Zählung der Atemzüge verzichtet werden, und nur die beiden Parameter Blutdruck und Herzfrequenz konnten invasiv mithilfe des Mikro-Tip-Katheters gemessen werden. In Anlehnung an die Literatur wurden die hierbei intrakardial gemessenen hämodynamischen Veränderungen, bzw. der Anstieg von Blutdruck und Herzfrequenz in Folge eines Schmerzreizes, als positive Reaktion gewertet (Arras et al., 2001, Richter, 2007). Die Messung erfolgte kontinuierlich alle zwei Sekunden. Die verwendeten hochsensiblen Instrumente messen intrakardiale und intravasale Druckzustände äußerst genau, da der im Gefäß liegende Drucksensor kaum von äußeren Einflüssen gestört wird (Erhardt et al., 2007, Trevino et al., 2010). Sicherlich birgt jede Gefäßpunktion das Risiko von Hämatabildung, thrombotischen Komplikationen oder Sepsis

(Janssens et al., 2016), doch für die vorliegende Studie überwog der Vorteil der exakten und kontinuierlichen Aufzeichnung der Messdaten in Anbetracht von mangelnden nicht-invasiven Alternativen. So konnten geringste hämodynamische Schwankungen dargestellt werden. Der Tip-Katheter wurde bei den Krallenfröschen intrakardial platziert. Zu bevorzugen wäre sicherlich eine weniger invasive Messung von Blutdruck und Herzfrequenz. Bei Ochsenfröschen konnte in einer aktuellen Studie ein Katheter in der Femoralarterie platziert werden, das Körpergewicht der Tiere betrug dabei 281 ± 30 g (Williams et al., 2017). Da die in diesem Projekt verwendeten Krallenfrösche weniger als die Hälfte davon wogen, war aufgrund des Größenunterschiedes eine Kanülierung des Gefäßes jedoch nicht möglich.

Anästhetika haben grundsätzlich Auswirkungen auf das hämodynamische bzw. kardiopulmonäre System. Diese Auswirkungen scheinen auch bei Amphibien abhängig von Spezies und Anästhetikum zu sein. Wie unter Punkt 4.2. näher erläutert, führten die Autoren die bei Aga-Kröten beobachteten hämodynamischen Störungen nach einem Benzocain-Tauchbad auf das Anästhetikum zurück (Andersen and Wang, 2002). Auch unter MS222-Narkose konnte bei dieser Tierart eine Erhöhung der Herzfrequenz beobachtet werden (Smith, 1974). Bei Leopardfröschen zeigte eine Tauchbad-Narkose mit Tricainmethansulfonat kardiodepressive Auswirkungen, vor allem in höheren Dosierungen. Demzufolge wird für Leopardfrösche eine niedrigere Dosis von 200 mg/L empfohlen, verbunden mit einer längeren Induktionszeit von 40 Minuten (Cakir and Strauch, 2005). In einer aktuelleren Studie von 2012 wurde wiederum festgestellt, dass MS222 als Tauchbad in der Dosierung von 1 g/L zwar eine atemdepressive Wirkung, jedoch relativ wenig Einfluss auf Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung bei Krallenfröschen hat (Lalonde-Robert et al., 2012a). In Anlehnung an diese Studie und aus oben genannten Gründen schien uns der Verzicht auf eine Kontrollgruppe im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit vertretbar, auch wenn die Aussagekraft der Studie dadurch etwas gemindert wird. Zum einen sollte aus Tierschutzgründen die Tierzahl so niedrig wie möglich gehalten werden, zum anderen wurde bereits im ersten Teil der Studie mit einer reinen MS222-Narkose ohne zusätzliche Analgetika gearbeitet. Bei zukünftigen Untersuchungen könnte jedoch eine Kontrollgruppe in Betracht gezogen werden, um mögliche Reaktionen des hämodynamischen Systems auf eine wiederholte Anwendung des Essigsäuretest auszuschließen.

Eine MS222-Narkose kann unseren Beobachtungen zu Folge zwar eine gute Bewusstseinsausschaltung und Muskelrelaxation gewährleisten, jedoch ist die analgetische

Potenz nicht stark genug ausgeprägt, um eine gute chirurgische Toleranz zu erreichen. Viele Studien und internationale Empfehlungen (Animal Research Advisory Committee ARAC, 2019, Ramlochansingh et al., 2014, Beckman, 2016, Lalonde-Robert et al., 2012a) sprechen sich jedoch für den alleinigen Gebrauch von Tricainmethansulfonat als Anästhetikum bei schmerzhaften Eingriffen aus. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie besteht einerseits Handlungsbedarf diese Empfehlungen zu überdenken und andererseits die Notwendigkeit bessere Methoden der Schmerzausschaltung bei Krallenfröschen zu untersuchen.

4.2. Analgesie beim Krallenfrosch

Davon ausgehend, dass Amphibien in der Lage sind Schmerz zu empfinden und dem Nachweis einer messbaren Nozizeption unter MS222-Narkose im ersten Teil der vorliegenden Studie, war die Zielsetzung des zweiten Teils die Ermittlung einer praxistauglichen Anästhetikum-Analgetikum-Kombination für Krallenfrösche.

Wie bereits unter 2.5.1. erläutert, besitzen Amphibien, ebenso wie Säugetiere, ein gut entwickeltes endogenes Opioidsystem, das noxische Reize zentral verarbeiten kann (Green, 2003, Stevens et al., 1987). In Folge dieser Erkenntnis und mit der Entwicklung des Essigsäuretest wurde zunächst die Wirkung von Morphin (Pezalla, 1983) und im Weiteren die einiger weiterer Opioidanalgetika bei Leopardfröschen untersucht (Stevens, 2011, Stevens, 1996, Stevens et al., 1994, Stevens and Rothe, 1997). Im Rahmen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass durch die Applikation von Opioidanalgetika (Stevens, 1996, Stevens et al., 1994) bzw. endogener Opioide, wie Met-enkephalin, Dynorphin und Beta-endorphin (Stevens et al., 1987), der Schwellenwert der Verhaltensantwort auf einen noxischen Reiz, die sogenannte „wiping response“, beim nicht-narkotisierten Tier erhöht werden konnte.

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse von Opioidanalgetika bei Leopardfröschen wurden für die vorliegende Studie Fentanyl und Butorphanol für die Untersuchung beim Krallenfrosch ausgewählt. Butorphanol wirkt agonistisch an den κ -Rezeptoren, die phylogenetisch die älteste Opioidrezeptor-Struktur darstellen. Fentanyl wirkt als Agonist an den μ -Rezeptoren, bei denen es sich wiederum um die phylogenetisch jüngste Rezeptorart handelt (Stevens, 2004). Der Vergleich dieser beiden unterschiedlichen Opioidrezeptoren im Hinblick auf die analgetische Potenz ist bei Amphibien insofern interessant als μ -Rezeptoren

sich phylogenetisch aus den κ -Rezeptoren entwickelt haben und deshalb bei Fischen, Amphibien und Archosauriern von geringer Bedeutung als beim Säuger sind. Die Opioidrezeptorverteilung im ZNS von Amphibien weist einen Anteil von 60-70% κ -Rezeptoren auf (Simon et al., 1982). Im Gegensatz zu Säugetieren weist der κ -Opioidrezeptor bei Amphibien jedoch eine höhere Affinität zu als μ - und δ -selektiv eingestuften Opioiden als zu κ -selektiven Opioiden auf. Daraus wird gefolgert, dass die Opioidrezeptoren von Poikilothermen grundsätzlich weniger selektiv als die von endothermen Spezies sind (Stevens, 2009). Die Dosierungen von 0,05 mg/kg, 0,25 mg/kg und 0,5 mg/kg für Fentanyl bzw. 0,05 mg/kg, 1,0 mg/kg und 5 mg/kg für Butorphanol wurden anhand der zur Verfügung stehenden Literaturangaben ausgewählt (Ströse and Kempf, 2013, Mutschmann, 2010, Longley, 2008). Im Ergebnis konnte nur bei Butorphanol in der hohen Dosierung von 5 mg/kg eine signifikante Limitierung des Blutdruckanstiegs nach Schmerzstimulus beobachtet werden. Dieser Effekt war jedoch nur 10 Minuten nach Applikation des Medikaments messbar. Eine weitere Dosiserhöhung von Butorphanol kann gemäß unseren Ergebnissen jedoch nicht empfohlen werden, da die hohe Dosierung von Butorphanol gleichzeitig die Nebenwirkungen erhöhte. Zu diesen Nebenwirkungen zählte eine zunehmende Depression von Blutdruck und Herzfrequenz. Fentanyl zeigte in allen drei Dosierungen keinen analgetischen Effekt. In der hohen Dosierung hatte Fentanyl jedoch ebenfalls negative Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem der Tiere. Entgegen unseren Erwartungen konnten weder Butorphanol noch Fentanyl die Nozizeption unter MS222-Narkose zufriedenstellend reduzieren. Grund dafür könnte eine speziesspezifisch unterschiedliche Opioidrezeptorverteilung bei Krallen- und Leopardfrosch sein, wozu es jedoch leider keine näheren Angaben in der Literatur gibt.

Auf die Einhaltung der POTZ von 20-26°C (Kölle et al., 2012) von *Xenopus laevis* wurde bei den Experimenten genau geachtet. Auch die Applikationsroute kann entscheidend für die Wirksamkeit eines Medikaments bei Amphibien sein (Sykes IV and Greenacre, 2006). Neben dem Pfortadersystem der Leber ist eine anatomische Besonderheit bei Amphibien, Reptilien und Vögeln das Nierenpfortadersystem (Holz, 1999). Venöses Blut der kaudalen Körperhälfte fließt zunächst durch Nieren und Leber und gelangt dann erst zum Herz (Killorn and Toews, 2001, Stetter, 1995). Dieser sogenannte First-Pass-Mechanismus sollte bei Applikation von Medikamenten Berücksichtigung finden, die entweder durch die Nieren bzw. Leber metabolisiert werden oder nephro- bzw. hepatotoxisch sind (Stetter, 1995). Demzufolge empfiehlt sich die Applikation von Medikamenten in die kraniale Körperhälfte von Amphibien

(Stetter, 1995, Killorn and Toews, 2001). Um eine vollständige Absorption des Wirkstoffes zu erreichen, wurden die Analgetika in dieser Studie intravenös in die Mitte der oberflächliche Bauchvene appliziert. Um das Pfortadersystem zu umgehen, könnten zukünftig andere Applikationsrouten in die kraniale Körperhälfte in Betracht gezogen werden. Eine intravenöse Applikation ist aufgrund der guten Absorptionrate sicherlich für die Aussage eines Experiments von Vorteil. Über die Möglichkeit der Applikation in den sublingualen Plexus ist bei zungenlosen Krallenfröschen bisher nichts in der Literatur beschrieben. Andere Applikations-Routen in die kraniale Körperhälfte, wie z.B. eine i.m. Applikation in die Muskulatur der Vordergliedmaße, könnten zwar die Praktikabilität für den Anwender verbessern, sind aber ebenfalls noch nicht für Krallenfrösche untersucht.

Bei der Untersuchung der Opioidanalgetika konnte das Erstellen einer Dosis-Wirkungskurve im vorliegenden Projekt leider nicht realisiert werden, da die Entnahme von 1 ml Blut in einem Vorversuch, trotz Volumensubstitution durch die gleiche Menge an Frosch-Ringer, zu massiven hämodynamischen Problemen führte. Daraufhin wurde auf eine Blutprobenentnahme während des Versuches verzichtet. Erst an dessen Ende, vor der Euthanasie, wurde 1 ml Herzblut entnommen, um den Serumspiegel der Medikamente bestimmen zu können, siehe 3.1.. Grundsätzlich darf eine Blutprobe bei gesunden Tieren maximal 1%, bei kranken Tieren maximal 0,5% des Körpergewichts betragen (Gentz, 2007). Bei Aga-Kröten konnten unter Benzocain-Narkose große Störungen der hämatologischen und kardiologischen Parameter beobachtet werden, was die Autoren auf das Anästhetikum zurückführten. In dieser Studie wurde den Tieren zum Zeitpunkt 0, 2, 5, 24, 48 Stunden nach der Narkose jeweils 1 ml Blut abgenommen (Andersen and Wang, 2002). Obwohl das Volumen substituiert wurde und Aga-Kröten ein höheres Körpergewicht als Krallenfrösche aufweisen, könnten die häufigen Blutentnahmen die hämodynamischen Turbulenzen, nach Meinung der Autorin, verstärkt haben.

4.3. Ausblick

Obwohl die beiden untersuchten Opioidanalgetika nicht den erhofften Effekt erzielten, konnte im ersten Teil der Studie zumindest ein Untersuchungsmodell implementiert werden, auf deren Basis zukünftig weitere Analgetika auf ihre Wirkung beim Krallenfrosch untersucht

werden können. Mit den Erfahrungen der vorliegenden Studie könnte die Methodik noch verfeinert werden.

Das Nicht-steroidale Antiphlogistikum Flunixin-Meglumin zeigte zum Beispiel in ersten Untersuchungen einen analgetischen Effekt bei Leopardfröschen (Terril-Robb et al., 1996). In einer aktuelleren Studie schnitt es bei Krallenfröschen im Vergleich zu Xylazin, Meloxicam und Morphin sogar am besten ab (Coble et al., 2011). Anderen Autoren erscheint Flunixin-Meglumin in der Dosierung von 25 mg/kg bei Krallenfröschen als relativ sicher, während bei der Dosierung von 50 mg/kg Todesfälle beobachtet werden konnten (Smith et al., 2018).

Über die Wirkungsweise von Metamizol ist bei Amphibien bisher so gut wie nichts bekannt. Im Tierversuch mit Ratten wurde nach der Gabe von Metamizol neben der bekannten Hemmung der Cyclooxygenasen und dem spasmolytischen Effekt eine Ausschüttung endogener Opioiden und deren Interaktion an κ -Opioidrezeptoren beobachtet. Letztere hatte eine indirekte, periphere Anti-Nozizeption zur Folge (Silva et al., 2016). Im ZNS von Amphibien machen die κ -Rezeptoren einen Anteil von 60-70% der Opioid-Rezeptoren aus (Simon et al., 1982). Dieser Aspekt und die allgemein mangelnden Datenlage zur Wirkungsweise von Metamizol bei Amphibien machen das Nicht-Opioidanalgetikum zu einer sehr interessanten Test-Option für zukünftige Studien.

5. Zusammenfassung

Die Schmerzkompetenz von Amphibien wird bis heute kontrovers diskutiert. Ein Stellvertreter dieser Klasse, der Afrikanische Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) hat in der Versuchstierkunde seit langem einen festen Platz eingenommen. Weltweit gelten in der tierexperimentellen Forschung die Prinzipien der **3R**. Ziel ist es, Tierversuche möglichst zu vermeiden (**R**eplacement), die Zahl der Tiere zu reduzieren (**R**eduction) und ihr Leiden in Versuchen auf das unerlässliche Maß zu beschränken (**R**efinement). In Bezug auf letzteren Punkt war ein Ziel dieser Studie, die Überprüfung, ob Tricainmethansulfonat (MS222) als „ideales Anästhetikum“ alle Komponenten einer Allgemeinanästhesie mit chirurgischer Toleranz – Bewusstlosigkeit (Hypnose), Muskelrelaxation, Unterdrückung vegetativer Reflexe und damit eine adäquate Analgesie induzieren kann.

Dazu wurde im ersten Teil des Projekts zunächst untersucht, ob es unter einer MS222-Anästhesie neben der Bewusstlosigkeit und Muskelrelaxation auch zur Ausschaltung bzw. Verringerung der Schmerzweiterleitung (Nozizeption) und damit zu einer effektiven Schmerzreduktion (Analgesie) kommt. Entsprechend wurden drei verschiedene Schmerzreize an narkotisierten Krallenfröschen untersucht, um den am besten reproduzier- und standardisierbaren Schmerzreiz zu finden. Da es für narkotisierte Amphibien kein etabliertes Verfahren gibt, um intraoperative Nozizeption zu messen, wurde auf Methoden, die beim Säuger etabliert sind, zurückgegriffen. Folglich wurde ein Anstieg der Herz-Kreislauf-Parameter Blutdruck und Herzfrequenz in der Studie als Hinweis auf Nozizeption gewertet. Zur Messung dieser Vitalparameter beim Frosch wurde in diesem Projekt ein Mikro-Tip-Katheter verwendet, der direkt im Herzventrikel platziert wurde. Alle drei Schmerzreize erzeugten hämodynamische Veränderungen unter MS222-Narkose. Obwohl kein signifikanter Unterschied zu den anderen Reizen bestand, wurde der sogenannte Essigsäuretest als Schmerzreiz der Wahl festgelegt, da dieser mit den größten Unterschieden zwischen dem Ruhewert und dem reizinduzierten Maximalwert verbunden war.

Die in der Literatur zu findenden Angaben zur ergänzenden Schmerztherapie bei Amphibien variieren zum Teil stark. Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil des Projekts die Wirkung der beiden Opioiden Fentanyl und Butorphanol in jeweils drei unterschiedlichen

Konzentrationen untersucht. Die Dosierungen der Analgetika wurde auf der Basis der vorhandenen Literatur ausgewählt. Sie betragen 0,05 mg/kg, 0,25 mg/kg und 0,5 mg/kg für Fentanyl bzw. 0,05 mg/kg, 1,0 mg/kg und 5,0 mg/kg für Butorphanol. Die Reaktionen des hämodynamischen Systems auf den Essigsäuretest wurden vor und nach Gabe der Analgetika kontinuierlich aufgezeichnet. Wider Erwarten zeigte Fentanyl in allen drei Dosierungen keine Reduktion der Nozizeption unter MS222-Narkose. Mit Butorphanol konnte nur in der hohen Dosierung eine kurzzeitige und signifikante Limitierung des maximalen Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegs nach einem Schmerzstimulus gemessen und damit als reduzierte Nozizeption gewertet werden. Nach Verabreichung der Essigsäure stiegen beide Parameter 10 Minuten nach Applikation von Butorphanol deutlich geringer an als im Vergleichsversuch ohne Analgetikum. Doch bereits 20 Minuten nach der Butorphanol-Gabe war dieser Effekt nicht mehr messbar. Die hohe Butorphanol-Dosis kann aufgrund starker Nebenwirkungen auf Blutdruck und Herzfrequenz nicht empfohlen werden. Mit dem Einsatz der beiden Opioide gelang es somit nicht, die intraoperative Analgesie nebenwirkungsarm zu verbessern.

Zusammenfassend konnte im ersten Teil der Studie gezeigt werden, dass Tricainmethansulfonat eine gute Hypnose und Muskelrelaxation bewirkt, aber keine ausreichende Schmerzausschaltung induziert. Eine zusätzliche Analgesie ist bei schmerzhaften Operationen entsprechend indiziert. Da internationale Empfehlungen in der Versuchstierkunde aktuell jedoch die alleinige Anwendung von MS222 zur Operation von Krallenfröschen vorsehen, besteht Handlungsbedarf, einerseits diese Empfehlung zu überdenken und andererseits bessere Methoden zur Schmerzausschaltung beim Krallenfrosch zu untersuchen.

Die aktuellen Dosierungsempfehlungen zu Fentanyl und Butorphanol in der Literatur konnten in der aktuellen Studie nicht bestätigt werden. Mit dem entwickelten Modell, unter Verwendung von mit MS222 anästhesierten Krallenfröschen, 5%iger Essigsäure als Schmerzreiz und einem genauen Messinstrument für hämodynamische Veränderungen (Tip-Katheter), können in Zukunft weitere Analgetika auf ihre Wirkung beim Krallenfrosch untersucht werden.

6. Summary

Until today the ability to percept pain has been controversially discussed in amphibians. Over the years a representative of this class, the African clawed frog (*Xenopus laevis*), has established his position in laboratory animal science. Worldwide the principles of the **3R** apply in animal experimental research, the aim is to avoid the use of animals (**R**eplacement), to minimize the number of animals (**R**eduction) and to limit their suffering to the essential minimum (**R**efinement). Focusing on refinement, the aim of this study was to assess if tricaine methanesulfonate (MS222) as an “ideal anaesthetic” guarantees all three components of general anaesthesia including surgical tolerance – hypnosis, muscle relaxation, depression of vegetative responses and an adequate analgesia.

In the first part of the study it was therefore determined if MS222 anaesthesia, besides muscle relaxation and hypnosis, induces reduction or rather elimination of the conduction of a noxious stimulus (nociception) and results in a therapeutic reduction of pain (analgesia).

First, three different pain stimuli were evaluated to identify the most sensitive and reproducible stimulus for nociception under MS222 anaesthesia.

Due to the lack of a well-established method to measure intraoperative nociception in anaesthetized amphibia, the same method as in mammals was used. The increase of the cardiovascular parameters blood pressure and heart rate was considered as a clear indication for nociception. For the continuous monitoring of the vital parameters, a micro-tip-catheter was placed directly in the frog’s heart ventricle. All three pain stimuli caused haemodynamic changes under MS222 anaesthesia. Even though there was no significant difference between the increases of BP and HR after the three different pain stimuli, the Acetic acid test (AAT) was defined as the most reproducible nociceptive stimulus.

Currently, very little is known in literature about additional analgesia in amphibians and dosage guidelines vary tremendously. Therefore, in the second part of the study the analgesic potency of the two opioids fentanyl and butorphanol was evaluated with the aim to find a proper dose. Based on current literature, three different dosages (low/medium/high) were chosen. Data of the haemodynamic reactions after a noxious stimulus were continuously recorded before and after administration of the analgesics. Contrary to our expectation,

fentanyl in all three doses did not show any reduction of nociception under MS222 anaesthesia. The only significant effects observed were a limitation of blood pressure and heart rate increases after a noxious input. This transient effect was only evident with the high butorphanol dose. In comparison to PS 1 (pain stimulus without analgesia) 10 minutes after application of butorphanol both parameters increased less after administration of acetic acid. However, 20 minutes following administration no difference was measured between treatment groups. Moreover, the high dose of butorphanol was associated with a strong cardiovascular depressant effect. Therefore, this dose cannot be recommended as it would not allow a safe anaesthetic and analgesic management. Consequently, the use of the two opioids could not improve intraoperative analgesia without considerable adverse effects.

In summary, we conclude that African clawed frogs have intact and active nociceptive pathways under MS222 anaesthesia. In our study, the current anaesthetic drug of choice in amphibians induced unconsciousness and muscle relaxation but insufficient analgesia. Appropriate additional analgesia is required during painful interventions and procedures. As international recommendations of laboratory animal science currently still suggest the single use of MS222 as anaesthetic agent, the results of this study state, that there is a great need for action not only to adjust these recommendations but also to evaluate further analgesic agents in African clawed frogs.

Current dosage recommendations of fentanyl and butorphanol could not be confirmed in our study. However, during this research project, we have developed a methodological basis, that will help to further evaluate other analgesics in future studies.

7. Literaturverzeichnis

- AMMER, H. & POTSCHKA, H. 2016. Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In: LÖSCHER, W. & RICHTER, A. (eds.) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 4 ed. Stuttgart: Enke Verlag.
- ANDERSEN, J. B. & WANG, T. 2002. Effects of anaesthesia on blood gases, acid–base status and ions in the toad *Bufo marinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 131, 639-646.
- ANIMAL RESEARCH ADVISORY COMMITTEE ARAC. 2019. *Guidelines for Egg and Oocyte Harvesting in Xenopus Species* [Online]. Available: https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/b11_xenopus_oocyte_collection_guideline_27feb2019.pdf [Accessed 19.10.2019].
- ARRAS, M., AUTENRIED, P., RETTICH, A., SPAENI, D. & RÜLICHE, T. 2001. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comparative medicine*, 51, 443-456.
- ARRAS, M., RETTICH, A., CINELLI, P., KASERMANN, H. P. & BURKI, K. 2007. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC veterinary research*, 3, 16.
- BAITCHMAN, E. & STETTER, M. 2014. Amphibians. *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*, 303-311.
- BARBON, A. R., ROUTH, A. & LOPEZ, J. 2019. Inhalatory isoflurane anesthesia in mountain chicken frogs (*Leptodactylus fallax*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 50, 453-456.
- BATESON, P. 1991. Assessment of pain in animals. *Animal behaviour*, 42, 827-839.
- BAUER, C. C. 2019. *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*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- BECK, C. W. & SLACK, J. M. 2001. An amphibian with ambition: a new role for *Xenopus* in the 21st century. *Genome biology*, 2, reviews1029. 1.
- BECKMAN, M. 2016. Therapeutic review: Tricaine Methanesulfonate. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 3, 261-263.
- BENYHE, S., VARGA, E., HEPP, J., MAGYAR, A., BORSODI, A. & WOLLEMANN, M. 1990. Characterization of kappa 1 and kappa 2 opioid binding sites in frog (*Rana esculenta*) brain membrane preparation. *Neurochemical research*, 15, 899-904.
- BONATH, K. 1977. *Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische*, Berlin, Paul Parey.
- BROWN, E. N., PAVONE, K. J. & NARANJO, M. 2018. Multimodal general anesthesia: theory and practice. *Anesthesia and analgesia*, 127, 1246.
- BROWN, E. N., SOLT, K., PURDON, P. L. & JOHNSON-AKEJU, O. 2014. Monitoring brain state during general anesthesia and sedation. In: MILLER, R. D., COHEN, N. H., ERIKSSON, L. I., FLEISHER, L. A., WIENER-KRONISH, J. P. & YOUNG, W. L. (eds.) *Miller's anesthesia*. 8 ed. Philadelphia: Elsevier.
- BROWN, H. H. K., TYLER, H. K. & MOUSSEAU, T. A. 2004. Orajel® as an amphibian anesthetic: refining the technique. *Herpetological Review*, 35, 252.

- BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ. 2019. *Tierschutzgesetz* [Online]. Available: <http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> [Accessed 12.11.2019].
- BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ. 2020. *Gesetz über den Verkehr mit Betäubungsmitteln (Betäubungsmittelgesetz - BtMG)* [Online]. Available: https://www.gesetze-im-internet.de/btmg_1981/BJNR106810981.html [Accessed 14.01.2020].
- BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG UND LANDWIRTSCHAFT BMEL. 2018. *Versuchstierzahlen 2018* [Online]. Available: https://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/Versuchstierdaten2018.pdf?__blob=publicationFile [Accessed 12.02.2020].
- BURGGREN, W. W. & WARBURTON, S. 2007. Amphibians as animal models for laboratory research in physiology. *ILAR journal*, 48, 260-269.
- CAKIR, Y. & STRAUCH, S. M. 2005. Tricaine (MS-222) is a safe anesthetic compound compared to benzocaine and pentobarbital to induce anesthesia in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Pharmacol Rep*, 57, 467-474.
- CARTER, K. M., WOODLEY, C. M. & BROWN, R. S. 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 21, 51-59.
- CECALA, K. K., PRICE, S. J. & DORCAS, M. E. 2007. A comparison of the effectiveness of recommended doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for amphibian anesthesia. *Herpetological Review*, 38, 63.
- CHEN, M. H. & COMBS, C. A. 1999. An alternative anesthesia for amphibians: ventral application of benzocaine. *Herpetological Review*, 30, 34.
- CHINNADURAI, S. K. & KANE, L. P. 2014. Advances in amphibian clinical therapeutics. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 23, 50-55.
- CHUM, H., FELT, S., GARNER, J. & GREEN, S. 2013. Biology, behavior, and environmental enrichment for the captive African clawed frog (*Xenopus* spp). *Applied Animal Behaviour Science*, 143, 150-156.
- CLAYTON, L. A. & GORE, S. R. 2007. Amphibian emergency medicine. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10, 587-620.
- COBLE, D. J., TAYLOR, D. K. & MOOK, D. M. 2011. Analgesic effects of meloxicam, morphine sulfate, flunixin meglumine, and xylazine hydrochloride in African-clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 50, 355-360.
- CONROY, C. J., PAPPENFUSS, T., PARKER, J. & HAHN, N. E. 2009. Use of tricaine methanesulfonate (MS222) for euthanasia of reptiles. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 28-32.
- CRAWSHAW, G. 2003. Anurans (anura, salienta): frogs, toads. In: FOWLER, M. E. & MILLER, R. E. (eds.) *Zoo and wild animal medicine*. 5 ed. St. Louis, Missouri: Saunders.
- DE GRAAF, A. R. 1957. Investigations into the distribution of blood in the heart and aortic arches of *Xenopus laevis* (Daud.). *Journal of Experimental Biology*, 34, 143-172.
- DENARDO, D. 1995. Amphibians as laboratory animals. *Ilar Journal*, 37, 173-181.
- DEUSE, U. 2004. *Vergleich zweier Beatmungsgeräte für Mäuse, vorwiegend unter dem Aspekt der klinischen Tauglichkeit*. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- DOBROMYLSKYJ, P., FLECKNELL, P., LASCELLES, B., LIVINGSTON, A., TAYLOR, P. & WATERMAN-PEARSON, A. 2000. Pain assessment. In: FLECKNELL, P. & WATERMAN-PEARSON, A. (eds.) *Pain management in animals*. St. Louis: Elsevier.

- DOWNES, H. 1995. Tricaine anesthesia in Amphibia: a review. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 5, 11-16.
- DUMONT, J. N., SCHULTZ, T. W., BUCHANAN, M. V. & KAO, G. L. 1983. Frog Embryo Teratogenesis Assay: Xenopus (FETAX) — A Short-Term Assay Applicable to Complex Environmental Mixtures. In: WATERS, M. D., SANDHU, S. S., LEWTAS, J., CLAXTON, L., CHERNOFF, N. & NESNOW, S. (eds.) *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures III*. New York: Plenum Press.
- ERHARDT, W. 2012. Definition, Aufgaben und Bedeutung der tierärztlichen Anästhesie. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- ERHARDT, W. & BAUMGARTNER, C. 2012. Euthanasie von Tieren in der tierärztlichen Praxis und im Labor. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- ERHARDT, W., HENKE, J., CARR, A. & EGNER, B. 2007. Technik. In: EGNER, B., CARR, A. & BROWN, S. (eds.) *Blutdruck auf den Punkt gebracht*. 4 ed. Babenhausen: VBS VetVerlag.
- ERHARDT, W., HENKE, J., TACKE, S., BAUMGARTNER, C. & KROKER, R. 2012. Pharmaka im Rahmen der Anästhesie und der perioperativen Schmerzlinderung. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- FENT, K. 2013. *Ökotoxikologie. Umweltchemie - Toxikologie - Ökologie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- GALLI MAININI, C. 1947. Pregnancy test using the male toad. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 7, 653-658.
- GENTZ, E. J. 2007. Medicine and surgery of amphibians. *Ilar Journal*, 48, 255-259.
- GOULET, F., HÉLIE, P. & VACHON, P. 2010. Eugenol anesthesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) of different body weights. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49, 460-463.
- GREEN, D. E. 2001. Anesthesia of amphibians in the field. *USGS Standard Operating Procedure. ARMI SOP*.
- GREEN, S. L. 2003. Postoperative analgesics in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) after surgical harvest of oocytes. *Comparative medicine*, 53, 244-247.
- GREEN, S. L. 2010. *The Laboratory Xenopus spp.*, Boca Raton, Florida, CRC Press.
- GUÉNETTE, S. A., BEAUDRY, F. & VACHON, P. 2008. Anesthetic properties of propofol in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47, 35-38.
- GUÉNETTE, S. A., GIROUX, M.-C. & VACHON, P. 2013. Pain perception and anaesthesia in research frogs. *Experimental animals*, 62, 87-92.
- GUÉNETTE, S. A., HÉLIE, P., BEAUDRY, F. & VACHON, P. 2007. Eugenol for anesthesia of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 34, 164-170.
- GURDON, J. B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*, 10, 622-640.

- GURDON, J. B. 1996. Introductory comments: *Xenopus* as a laboratory animal. In: TINSLEY, R. C. & KOBEL, H. R. (eds.) *The Biology of Xenopus*. Oxford: Zoological Society of London.
- GURDON, J. B. & HOPWOOD, N. 2003. The introduction of *Xenopus laevis* into developmental biology: of empire, pregnancy testing and ribosomal genes. *International Journal of Developmental Biology*, 44, 43-50.
- GUTLEB, A. C., BRONKHORST, M., VAN DEN BERG, J. H. J. & MURK, A. J. 2001. Latex laboratory-gloves: an unexpected pitfall in amphibian toxicity assays with tadpoles. *Environmental toxicology and pharmacology*, 10, 119-121.
- HABGOOD, J. S. 1950. Sensitization of sensory receptors in the frog's skin. *The Journal of physiology*, 111, 195-213.
- HADFIELD, C. A. & WHITAKER, B. R. Amphibian emergency medicine and care. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, 2005. Elsevier, 79-89.
- HAMAMOTO, D. T. & SIMONE, D. A. 2003. Characterization of cutaneous primary afferent fibers excited by acetic acid in a model of nociception in frogs. *Journal of neurophysiology*, 90, 566-577.
- HARDWICK, L. J. & PHILPOTT, A. 2015. An oncologist's friend: How *Xenopus* contributes to cancer research. *Developmental biology*, 408, 180-187.
- HARVEY POUGH, F. 2007. Amphibian biology and husbandry. *ILAR journal*, 48, 203-213.
- HELMER, P. J. & WHITESIDE, D. P. 2005. Amphibian anatomy and physiology. In: O'MALLEY, B. (ed.) *Clinical Anatomy and Physiology of Exotic Species: Structure and Function of Mammals, Birds, Reptiles, and Amphibians*. Edinburgh: Elsevier Saunders.
- HENKE, J. & ERHARDT, W. 2012. Narkoseüberwachung. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- HENKE, J., TACKE, S. & ERHARDT, W. 2012. Analgesie. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- HOGBEN, L. 1939. *Xenopus* test for pregnancy. *British medical journal*, 2, 38.
- HOLZ, P. H. 1999. The reptilian renal portal system-a review. *Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 9, 4-14.
- HOWARD, A. M., PAPICH, M. G., FELT, S. A., LONG, C. T., MCKEON, G. P., BOND, E. S., TORREILLES, S. L., LUONG, R. H. & GREEN, S. L. 2010. The pharmacokinetics of enrofloxacin in adult African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 49, 800-804.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN IASP. 2019. *IASP Terminology* [Online]. Available: <https://www.iasp-pain.org/terminology?navItemNumber=576> [Accessed 22.10.2019 2019].
- ITIS-EMPFEHLUNGEN 2012. Empfehlungen für die Schmerztherapie bei Kleintieren. In: SCHMERZTHERAPIE., I. I. T. (ed.).
- JANSSENS, U., JUNG, C., HENNERSDORF, M., FERRARI, M., FUHRMANN, J., BUERKE, M., EBELT, H., GRAF, T., THIELE, H. & KELM, M. 2016. Empfehlungen zum hämodynamischen Monitoring in der internistischen Intensivmedizin. *Der Kardiologe*, 10, 149-169.
- JAROFKE, D. & HERRMANN, H. J. 1997. Umgang und Narkose. In: JAROFKE, D. & H.J., H. (eds.) *Amphibien Biologie - Haltung - Krankheiten - Bioindikation*. Stuttgart: Henke Verlag.

- JOHNSON, C. 2016. Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception. *Animals*, 6, 71.
- KAPLAN, H. Anesthesia in amphibians and reptiles. Federation proceedings, 1969. 1541-1546.
- KAVALIERS, M. 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Research Bulletin*, 21, 923-931.
- KEMPF, H. 2008. Anästhesie und Analgesie bei Amphibien. *DVG-ZWE Amphibienseminar*.
- KILLORN, E. E. & TOEWS, D. P. 2001. The dynamics of venous return and response to hypervolemia in the toad, *Bufo marinus* (L.). *BMC physiology*, 1, 13.
- KOBEL, H. R., LOUMONT, C. & TINSLEY, R. C. 1996. The extant species. In: TINSLEY, R. C. & KOBEL, H. R. (eds.) *The Biology of Xenopus*. Oxford: Zoological Society of London.
- KÖHLER, G. 1996. *Krankheiten der Reptilien und Amphibien*, Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag.
- KÖLLE, P., LENDL, C. & HENKE, J. 2012. Amphibien. In: ERHARDT, W., HENKE, J., HABERSTROH, J., BAUMGARTNER, C. & TACKE, S. (eds.) *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2 ed. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- KOUSTUBHAN, P., KAPLAN, D. L. & LEVIN, M. 2013. Humane anesthesia and pain management in amphibian limb surgery of *Rana pipiens*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, 149-155.
- LAFORTUNE, M., MITCHELL, M. A. & SMITH, J. A. 2001. Evaluation of medetomidine, clove oil and propofol for anesthesia of leopard frogs, *Rana pipiens*. *Journal of herpetological medicine and surgery*, 11, 13-18.
- LALONDE-ROBERT, V., BEAUDRY, F. & VACHON, P. 2012a. Pharmacologic parameters of MS222 and physiologic changes in frogs (*Xenopus laevis*) after immersion at anesthetic doses. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51, 464-468.
- LALONDE-ROBERT, V., DESGENT, S., DUSS, S. & VACHON, P. 2012b. Electroencephalographic and physiologic changes after tricaine methanesulfonate immersion of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51, 622-627.
- 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. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature methods*, 7, 447.
- LEARY, S., UNDERWOOD, W., ANTHONY, R., CARTNER, S., COREY, D., GRANDIN, T., GREENACRE, C. & AL., E. 2013. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition*. [Online]. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association. Available: <https://www.avma.org/sites/default/files/resources/euthanasia.pdf> [Accessed 12.12.2019].
- LETCHER, J. 1992. Intracelomic use of tricaine methanesulfonate for anesthesia of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) and leopard frogs (*Rana pipiens*). *Zoo biology*, 11, 243-251.
- LETCHER, J. & DURANTE, R. 1995. Evaluation of use of tiletamine/zolazepam for anesthesia of bullfrogs and leopard frogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207, 80-82.
- LILLYWHITE, H. B., SHINE, R., JACOBSON, E., DENARDO, D. F., GORDON, M. S., NAVAS, C. A., WANG, T., SEYMOUR, R. S., STOREY, K. B. & HEATWOLE, H. 2016. Anesthesia and euthanasia of amphibians and reptiles used in scientific research: should hypothermia and freezing be prohibited? *Bioscience*, 67, 53-61.
- LONGLEY, L. A. 2008. *Anaesthesia of Exotic Pets*, Edinburgh, Elseviers Saunders.

- LOREZ, H. P. & KEMALI, M. 1981. Substance P-, Met-enkephalin- and somatostatin-like immunoreactivity distribution in the frog spinal cord. *Neuroscience letters*, 26, 119-124.
- LÖSCHER, W. 2014. Pharmaka mit Wirkung auf das Zentralnervensystem. In: LÖSCHER, W., RICHTER, A. & POTSCHKA, H. (eds.) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 9 ed. Stuttgart: Enkeverlag.
- MACHIN, K. L. 1999. Amphibian pain and analgesia. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2-10.
- MADER, D. R. 2006. Euthanasia. In: MADER, D. R. (ed.) *Reptile Medicine and Surgery*. 2 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- MAJOR, N. & WASSERSUG, R. J. 1998. Survey of current techniques in the care and maintenance of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 37, 57-60.
- MITCHELL, M. A. 2009. Anesthetic considerations for amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18, 40-49.
- MORRISON, K. E., STRAHL-HELDRETH, D. & CLARK-PRICE, S. C. 2016. Isoflurane, sevoflurane and desflurane use in cane toads (*Rhinella marina*). *Veterinary record open*, 3, e000185.
- MOSLEY, C. I. & MOSLEY, C. A. 2015. Comparative Anesthesia and Analgesia of Reptiles, Amphibians and Fishes. In: GRIMM, K. A., LAMONT, L. A., TRANQUILLI, W. J., GREENE, S. A. & ROBERTSON, S. A. (eds.) *Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. 5 ed. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc.
- MUTSCHMANN, F. 2010. *Erkrankungen der Amphibien*, Stuttgart, Enke Verlag.
- NOBEL MEDIA AB. 2019. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012* [Online]. NobelPrize.org. Available: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/summary/> [Accessed 30.10.2019].
- OHR, E. A. 1976. Tricaine methanesulfonate—I. pH and its effects on anesthetic potency. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 54, 13-17.
- PADUANO, M., COLAFRANCESCO, K. C., WONG, S. A., CALDWELL, M. S. & GRIDI-PAPP, M. 2013. The response of gray treefrogs to anesthesia by tricaine methanesulfonate (TMS or MS-222). *ISRN zoology*, 2013.
- PARKER, G. H. 1939. General anesthesia by cooling. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 42, 186-187.
- PEZALLA, P. D. 1983. Morphine-induced analgesia and explosive motor behavior in an amphibian. *Brain research*, 273, 297-305.
- RAMLOCHANSINGH, C., BRANONER, F., CHAGNAUD, B. P. & STRAKA, H. 2014. Efficacy of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. *PloS one*, 9, e101606.
- RICHTER, T. 2007. *Evaluation of metamizole vs. fentanyl as intraoperative analgesia - a clinical study in dogs*. Ludwig-Maximilians-Universität.
- ROBINSON, M. E. & SCADDING, S. R. 1983. The effect of pH on tricaine methanesulfonate induced anaesthesia of the newt *Notophthalmus viridescens*. *Canadian Journal of Zoology*, 61, 531-533.
- SANDOZ, M. 1920. Recherches expérimentales sur les anesthésiques locaux: I. Préparations et propriétés physiologiques de la tricaine. *Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat*, 53, 263-302.

- SCHMIDT, V. 2015. Euthanasie. In: PEES, M. (ed.) *Leitsymptome bei Reptilien*. Stuttgart: Enke Verlag.
- SCHUHMACHER, J. 1996. Anesthesia and immobilization of specific species. Reptiles and amphibians. In: THURMON, J. C., TRANQUILLI, W. J. & BENSON, G. J. (eds.) *Lunn and Jones' veterinary anesthesia*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- SCHULTZ, T. W. & DAWSON, D. A. 2003. Housing and husbandry of *Xenopus* for oocyte production. *Lab animal*, 32, 34-39.
- SHAPIRO, H. A. & ZWARENSTEIN, H. 1935. A Test for the Early Diagnosis of Pregnancy on the South African Clawed Toad (*Xenopus laevis*). *South African Medical Journal*, 9, 202-4.
- SHELTON, G. & JONES, D. R. 1965. Central blood pressure and heart output in surfaced and submerged frogs. *Journal of Experimental Biology*, 42, 339-357.
- SHELTON, G. & JONES, D. R. 1968. A comparative study of central blood pressures in five amphibians. *Journal of Experimental Biology*, 49, 631-643.
- SHINE, R., AMIEL, J., MUNN, A. J., STEWART, M., VYSSOTSKI, A. L. & LESKU, J. A. 2015. Is "cooling then freezing" a humane way to kill amphibians and reptiles? *Biology open*, 4, 760-763.
- SILVA, L. C. R., E CASTOR, M. G. M., NAVARRO, L. C., ROMERO, T. R. L. & DUARTE, I. D. G. 2016. κ -Opioid receptor participates of NSAIDs peripheral antinociception. *Neuroscience letters*, 622, 6-9.
- SIMON, E. J., HILLER, J. M., GROTH, J., ITZHAK, Y., HOLLAND, M. J. & BECK, S. G. 1982. The nature of opiate receptors in toad brain. *Life sciences*, 31, 1367-1370.
- SMITH, B. D., VAIL, K. J., CARROLL, G. L., TAYLOR, M. C., JEFFERY, N. D., VEMULAPALLI, T. H. & ELLIOTT, J. J. 2018. Comparison of etomidate, benzocaine, and MS222 anesthesia with and without subsequent flunixin meglumine analgesia in African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52, 202-209.
- SMITH, D. G. 1974. Sympathetic cardiac stimulation in *Bufo marinus* under MS-222 anesthesia. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 226, 367-370.
- SMITH, J. M. & STUMP, K. C. 2000. Isoflurane anesthesia in the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 39, 39-42.
- SNEDDON, L. U. 2004. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Research Reviews*, 46, 123-130.
- SNEDDON, L. U. 2017. Comparative physiology of nociception and pain. *Physiology*, 33, 63-73.
- SNEDDON, L. U., ELWOOD, R. W., ADAMO, S. A. & LEACH, M. C. 2014. Defining and assessing animal pain. *Animal behaviour*, 97, 201-212.
- SOTOCINA, S. G., SORGE, R. E., ZALOUM, A., TUTTLE, A. H., MARTIN, L. J., WIESKOPF, J. S., MAPPLEBECK, J. C., WEI, P., ZHAN, S. & ZHANG, S. 2011. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 7, 1744-8069-7-55.
- SPRAY, D. C. 1976. Pain and temperature receptors of Anurans In: LLINÁS, R. & PRECHT, W. (eds.) *Frog neurobiology, a handbook*. Berlin: Springer Verlag.
- STETTER, M. D. Noninfectious medical disorders of amphibians. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 1995. Elsevier, 49-55.
- STETTER, M. D. 2001. Fish and amphibian anesthesia. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 4, 69-82.
- STEVENS, C. W. 1988. Opioid antinociception in amphibians. Elsevier.

- STEVENS, C. W. 1992. Alternatives to the use of mammals for pain research. *Life sciences*, 50, 901-912.
- STEVENS, C. W. 1996. Relative analgesic potency of mu, delta and kappa opioids after spinal administration in amphibians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276, 440-448.
- STEVENS, C. W. 2004. Opioid research in amphibians: an alternative pain model yielding insights on the evolution of opioid receptors. *Brain Research Reviews*, 46, 204-215.
- STEVENS, C. W. 2009. The evolution of vertebrate opioid receptors. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 1247.
- STEVENS, C. W. 2011. Analgesia in amphibians: preclinical studies and clinical applications. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 14, 33-44.
- STEVENS, C. W., BRASEL, C. M. & MOHAN, S. 2007. Cloning and bioinformatics of amphibian mu, delta, kappa, and nociceptin opioid receptors expressed in brain tissue: evidence for opioid receptor divergence in mammals. *Neuroscience letters*, 419, 189-194.
- STEVENS, C. W., KLOPP, A. J. & FACELLO, J. A. 1994. Analgesic potency of mu and kappa opioids after systemic administration in amphibians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 269, 1086-1093.
- STEVENS, C. W., MACIVER, D. N. & NEWMAN, L. C. 2001. Testing and comparison of non-opioid analgesics in amphibians. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 40, 23-27.
- STEVENS, C. W., PEZALLA, P. D. & YAKSH, T. L. 1987. Spinal antinociceptive action of three representative opioid peptides in frogs. *Brain Research*, 402, 201-203.
- STEVENS, C. W. & ROTHE, K. S. 1997. Supraspinal administration of opioids with selectivity for μ -, δ - and κ -opioid receptors produces analgesia in amphibians. *European journal of pharmacology*, 331, 15-21.
- STOSKOPF, M. K. 1994. Pain and analgesia in birds, reptiles, amphibians, and fish. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35, 775-780.
- STRAKA, H. & SIMMERS, J. 2012. *Xenopus laevis*: An ideal experimental model for studying the developmental dynamics of neural network assembly and sensory-motor computations. *Developmental neurobiology*, 72, 649-663.
- STRÖSE, D. & KEMPF, H. 2013. Teil III - Amphibien. In: STRÖSE, D., SCHÜTZ, S., SCHÜTZ, S. & KEMPF, H. (eds.) *Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- SYKES IV, J. M. & GREENACRE, C. B. 2006. Techniques for drug delivery in reptiles and amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 15, 210-217.
- TERRIL-ROBB, L. A., SUCKOW, M. A. & GRIGDESBY, C. F. 1996. Evaluation of the analgesic effects of butorphanol tartrate, xylazine hydrochloride, and flunixin meglumine in leopard frogs (*Rana pipiens*). *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 35, 54-56.
- TORREILLES, S. L., MCCLURE, D. E. & GREEN, S. L. 2009. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 512-516.
- TREVINO, R. J., JONES, D. L., ESCOBEDO, D., PORTERFIELD, J., LARSON, E., CHISHOLM, G. B., BARTON, A. & FELDMAN, M. D. 2010. Validation of a new micro-manometer pressure sensor for cardiovascular measurements in mice. *Biomedical instrumentation & technology*, 44, 75-83.
- VETIDATA. 2020. Available: <https://www.vetidata.de> [Accessed 03.02.2020].

- VILLENEUVE, P., ESNAULT, G., BENOIT, E., MOLGÓ, J. & ARAOZ, R. 2011. A monitoring study of repetitive surgical oocyte harvest in *Xenopus laevis*. In: BARBIER, J., BENOIT, E., GILLES, N., LADANT, D., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., MATTÉI, C., MOLGÓ, J., POPPOF, M. R. & SERVENT, D. (eds.) *Toxins and Ion transfers, Collection Rencontres en Toxinologie*. Gif-sur-Yvette: SFET Publications.
- WALKER, I. D. F. & WHITAKER, B. R. 2000. Amphibian therapeutics. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 3, 239-255.
- WALTERS, E. T. & WILLIAMS, A. C. D. C. 2019. Evolution of mechanisms and behaviour important for pain. The Royal Society.
- WARWICK, C., BATES, G., ARENA, P. C. & STEEDMAN, C. 2018. Reevaluating the use of hypothermia for anesthetizing and euthanizing amphibians and reptiles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 253, 1536-1539.
- WAYSON, K. A., DOWNES, H., LYNN, R. K. & GERBER, N. 1976a. Anesthetic effects and elimination of tricaine methanesulphonate (MS-222) in terrestrial vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 55, 37-41.
- WAYSON, K. A., DOWNES, H., LYNN, R. K. & GERBER, N. 1976b. Studies on the comparative pharmacology and selective toxicity of tricaine methanesulfonate: metabolism as a basis of the selective toxicity in poikilotherms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 198, 695-708.
- WILLENBRING, S. & STEVENS, C. W. 1995. Thermal, mechanical and chemical peripheral sensation in amphibians: opioid and adrenergic effects. *Life sciences*, 58, 125-133.
- WILLIAMS, C. J. A., ALSTRUP, A. K. O., BERTELSEN, M. F., JENSEN, H. M., LEITE, C. A. C. & WANG, T. 2017. When local anesthesia becomes universal: pronounced systemic effects of subcutaneous lidocaine in bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 209, 41-46.
- WRIGHT, K. M. 2001a. Restraint techniques and euthanasia. In: WRIGHT, K. M. & WHITAKER, B. R. (eds.) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.
- WRIGHT, K. M. 2001b. Surgical techniques. In: WRIGHT, K. M. & WHITAKER, B. R. (eds.) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.
- WRIGHT, K. M. 2006. Overview of Amphibian Medicine. In: MADER, D. R. (ed.) *Reptile Medicine and Surgery*. 2 ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier
- WRIGHT, K. M. & DEVOE, R. S. 2013. Amphibians. In: CARPENTER, J. W. (ed.) *Exotic Animal Formulary Avian and Exotic Pets*. 4 ed. St. Louis, MO Saunders Elsevier.
- WRIGHT, K. M. & WHITAKER, B. R. 2001. Pharmacotherapeutics. In: WRIGHT, K. M. & WHITAKER, B. R. (eds.) *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*. Malabar, Florida: Krieger Publishing Company.
- YAMASHITA, Y. & OGAWA, H. 1991. Slowly adapting cutaneous mechanoreceptor afferent units associated with Merkel cells in frogs and effects of direct currents. *Somatosensory & motor research*, 8, 87-95.
- ZEC, S., CLARK-PRICE, S. C., COLEMAN, D. A. & MITCHELL, M. A. 2014. Loss and Return of Righting Reflex in American Green Tree Frogs (*Hyla cinerea*) after Topical Application of Compounded Sevoflurane or Isoflurane Jelly: A Pilot Study. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery*, 24, 72-76.
- ZIMMER, H. G. & MILLAR, H. D. 1998. Technology and application of ultraminiature catheter pressure transducers. *The Canadian journal of cardiology*, 14, 1259-1266.

ZIMMERMANN, M. 1986. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, 554, 221-233.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. med. vet. Heidrun Potschka für die Annahme meiner Dissertation an ihrem Lehrstuhl und ihre stets sehr freundliche Unterstützung.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Prof. Dr. med. vet. Christine Baumgartner. Danke für die Betreuung, die wertvollen Tipps und die Geduld rund um die Veröffentlichung und das Erstellen der Dissertation.

Vielen herzlichen Dank Dr. med. vet. Johanna Brandl für ihre nette Betreuung, die außerordentliche Mühe und die vielen hilfreichen Tipps für die Dissertation und die Veröffentlichung.

Großen Dank an Dr. med. vet. Alexa Hagedorn und Dr. med. vet. Sibylle Ott vom Tierforschungszentrum der Universität Ulm für die Hilfe bei den Versuchen und bei der Erstellung des Themas.

Vielen Dank an Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher vom Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung der Universitätsklinik Ulm für die Überlassung der Räumlichkeiten und des Equipments, sowie an Dr. hum. biol. Michael & Anja Gröger und Sandra Kress für die nette Unterstützung und das technische Know-how bei den Versuchen.

Danke Hermann Kempf von Tierärztliche Praxis für Exoten für die Tipps bei den Telkos und bei der Literatur.

Dankeschön an Frau Birgit Waschulzik für ihre Hilfe bei der Statistik.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine lieben Eltern und der besten Schwester von allen – ihr seid meine größte Stütze in allen Lebenslagen!

Tausend Dank an meinen geliebten Seppi, durch die Schwangerschaft konnte ich diese Arbeit abschließen und an Tom für seine Geduld und Unterstützung. Jetzt sitzt endlich nix mehr im Gnack!

Vielen lieben Dank an alle meine Freunde aus Studienzeiten oder von daheim, an meine Kolleginnen und den Rest der Familie für die notwendige Ablenkung und schönen Zeiten, egal ob aufm Berg, am See, im Stall, kulinarisch oder feuchtfröhlich!