

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

Elektroenzephalogramm und FOS-Expression  
bei der chirurgischen Kastration von Saugferkeln  
unter Lokalanästhesie

von Judith Maria Reiser

aus München

München 2022



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

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.- Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: Dr. Susanne Zöls

Angefertigt am Zentrum für Präklinische Forschung  
des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

Mentorin: Prof. Dr. 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. Mathias Ritzmann

**Korreferentin:** Priv.-Doz. Dr. Eva-Lotta C. von Rüden

**Tag der Promotion:** 30. Juli 2022



*Meinen Eltern*  
*und*  
*Elisabeth und Eugen*



## INHALTSVERZEICHNIS

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| <b>I.</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>II.</b>  | <b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1.</b>   | <b>Schmerz, Nozizeption und deren Erfassung .....</b>                            | <b>3</b>  |
| 1.1.        | Schmerzwahrnehmung peripherer noxischer Reize .....                              | 3         |
| 1.2.        | Schmerzen durch chirurgische Kastration.....                                     | 5         |
| 1.3.        | Parameter zur perioperativen Schmerzdetektion bei der<br>Ferkelkastration.....   | 6         |
| <b>2.</b>   | <b>Elektroenzephalogramm .....</b>   | <b>9</b>  |
| 2.1.        | Neurophysiologische Grundlagen des Elektroenzephalogramms ....                   | 9         |
| 2.2.        | Parameter der EEG-Beurteilung .....  | 11        |
| 2.3.        | Spektralanalyse und graphische Darstellungsformen des EEG .....                  | 13        |
| 2.4.        | EEG unter Inhalationsanästhesie.....   | 16        |
| 2.5.        | EEG unter Inhalationsanästhesie beim Neugeborenen .....                          | 17        |
| 2.6.        | EEG und Schmerz unter Narkose .....  | 18        |
| 2.7.        | EEG und Schmerzdetektion in Narkose bei neugeborenen Tieren                      | 20        |
| 2.8.        | EEG und Schmerzdetektion in Narkose bei Ferkeln und juvenilen<br>Schweinen ..... | 21        |
| <b>3.</b>   | <b>FOS-Protein .....</b>   | <b>22</b> |
| 3.1.        | Grundlagen FOS-Protein .....   | 22        |
| 3.2.        | FOS-Protein und Schmerz bzw. Nozizeption .....                                   | 24        |
| 3.3.        | FOS-Protein und Schmerz beim Schwein.....  | 26        |
| <b>III.</b> | <b>MATERIAL- UND METHODENTEIL .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>1.</b>   | <b>Zielsetzung des Versuchsvorhabens .....</b>                                   | <b>29</b> |
| <b>2.</b>   | <b>Genehmigung des Versuchsvorhabens.....</b>                                    | <b>29</b> |
| <b>3.</b>   | <b>Versuchsdurchführung .....</b>  | <b>29</b> |
| 3.1.        | Versuchstiere und -gruppen.....  | 29        |
| 3.2.        | Versuchsablauf .....   | 30        |
| 3.2.1.      | Vorbereitende Eingriffe .....  | 30        |
| 3.2.2.      | EEG-Ableitung und Aufzeichnung.....  | 31        |
| 3.2.3.      | Einstellung der Narkosetiefe .....   | 32        |
| 3.2.4.      | Injektionen.....   | 33        |

---

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 3.2.5.     | Kastration.....  | 34        |
| 3.2.6.     | Entnahme der Rückenmarkssegmente.....  | 35        |
| <b>4.</b>  | <b>Datenauswertung und Statistik.....</b>  | <b>36</b> |
| 4.1.       | Statistische Auswertung des EEG.....   | 36        |
| 4.1.1.     | Darstellung der EEG-Reaktion im Spektrogramm.....  | 37        |
| 4.1.2.     | Vergleich der Früh- und Spätreaktion.....  | 39        |
| 4.2.       | FOS-Protein.....   | 39        |
| 4.2.1.     | Histologische Gewebeparbeitung, histochemische Färbung und<br>Immunhistochemie.....          | 39        |
| 4.2.2.     | Semiquantitativer Score.....   | 41        |
| <b>IV.</b> | <b>ERGEBNISSE.....</b>   | <b>45</b> |
| <b>1.</b>  | <b>EEG-Untersuchungen.....</b>   | <b>45</b> |
| 1.1.       | EEG-Reaktion auf den Zwischenzehenreiz.....  | 46        |
| 1.2.       | EEG-Reaktion auf die Injektion.....  | 46        |
| 1.3.       | EEG-Reaktion auf den Hautschnitt.....  | 49        |
| 1.4.       | EEG-Reaktion auf die Samenstrangdurchtrennung.....   | 51        |
| 1.5.       | Vergleich der Früh- und Spätreaktion im EEG.....   | 53        |
| 1.6.       | Poweränderung einzelner Spektralparameter nach dem<br>Zwischenzehenreiz.....                 | 54        |
| <b>2.</b>  | <b>FOS-Protein.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>V.</b>  | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>61</b> |
| <b>1.</b>  | <b>Diskussion des Studiendesigns.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>2.</b>  | <b>Diskussion der Narkosetiefe.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>3.</b>  | <b>Diskussion der EEG-Auswertung.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>4.</b>  | <b>Diskussion der EEG-Reaktion auf den Zwischenzehenreiz.....</b>                            | <b>68</b> |
| <b>5.</b>  | <b>Diskussion der Reaktion auf die Injektion der Lokalanästhetika<br/>.....</b>              | <b>70</b> |
| <b>6.</b>  | <b>Diskussion der Reaktion auf den Hautschnitt und die<br/>Samenstrangdurchtrennung.....</b> | <b>72</b> |
| <b>7.</b>  | <b>FOS-Protein.....</b>  | <b>75</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Methodenkritik.....</b>   | <b>77</b> |

---

|              |                                    |            |
|--------------|------------------------------------|------------|
| <b>9.</b>    | <b>Schlussfolgerung</b> .....      | <b>78</b>  |
| <b>VI.</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....       | <b>81</b>  |
| <b>VII.</b>  | <b>SUMMARY</b> .....               | <b>83</b>  |
| <b>VIII.</b> | <b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....   | <b>85</b>  |
| <b>IX.</b>   | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> ..... | <b>87</b>  |
| <b>X.</b>    | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | <b>89</b>  |
| <b>XI.</b>   | <b>DANKSAGUNG</b> .....            | <b>111</b> |



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                  |  |
|------------------|--|
| ACTH             | Adrenocorticotropes Hormon   |
| AP-1             | Aktivatorprotein-1, Transkriptionsfaktor   |
| DAB              | 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid  |
| DGKN             | Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung |
| EEG              | Elektroenzephalogramm  |
| EKG              | Elektrokardiogramm   |
| FFPE             | Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet  |
| FI               | Inspiratorische Konzentration  |
| FI Iso           | Inspiratorische Konzentration von Isofluran                                      |
| HE               | Hämatoxylin-Eosin  |
| Hz               | Hertz, Schwingungen/Sekunde  |
| i. t.            | intratestikulär  |
| kDa              | Kilodalton   |
| KGW              | Körpergewicht  |
| L1, L2, L3       | Lumbale Rückenmarksegmente 1, 2, 3   |
| M.               | Musculus   |
| MAC              | Minimale alveoläre Konzentration   |
| N.               | Nervus   |
| n                | Anzahl   |
| P <sub>tot</sub> | Gesamtpower  |
| p                | Signifikanzwert  |
| QST              | Quantitative sensorische Testung   |
| s                | Sekunde  |

---

|             |  |
|-------------|--|
| S 1–3       | Sakrale Rückenmarkssegmente 1–3  |
| SEF50       | Spektrale Eckfrequenz 50 bzw. Medianfrequenz des EEG   |
| SEF80/90/95 | Spektrale Eckfrequenz 80 bzw. 90 bzw. 95, Frequenz unter der 80 bzw. 90 bzw. 95 % der Gesamtaktivität des EEG liegen |
| s.sc.       | subskrotal   |
| ZNS         | Zentrales Nervensystem   |
| ZZR         | Zwischenzehenreiz  |

## I. EINLEITUNG

Aus anatomischer und physiologischer Sicht besitzen Säugetiere alle notwendigen Rezeptoren, Nerven, Neurotransmitter und Gehirnstrukturen, um Empfindungen zu erfahren, die der Mensch als „Schmerz“ beschreibt (LIVINGSTON, 2010). Daraus resultierend herrscht weitgehender Konsens, dass alle Säugetiere Schmerzen empfinden können (LIVINGSTON, 2010; MATHEWS et al., 2014; STEAGALL et al., 2021). Auch die Definition der International Association for the Study of Pain (IASP) von Schmerz im Menschen, wurde für Tiere übernommen (PAUL-MURPHY et al., 2004), was die Ähnlichkeit von Schmerz bei Menschen und Tieren implementiert und die Forderung nach ausreichender Schmerzausschaltung bei Tieren unterstreicht (MURRELL & JOHNSON, 2006). Im deutschen Tierschutzgesetz ist der Grundsatz verankert, dass an einem Wirbeltier ohne Betäubung ein mit Schmerzen verbundener Eingriff nicht vorgenommen werden darf (TIERSCHUTZGESETZ, 2021). Ob die Lokalanästhesie die Forderung nach ausreichender Schmerzausschaltung bei der Saugferkelkastration erfüllt und dem Tierschutzgesetz damit gerecht wird, ist das Untersuchungsziel einer vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft beauftragten Studie. Diese Studie ist in einen hochstandardisierten Laborteil und in einen Feldstudienteil unterteilt. Die vorliegende Arbeit ist dabei Teil der Laborstudie.

Aufgrund des immer subjektiven Charakters von Schmerz gilt beim Menschen die Selbstauskunft als „Gold-Standard“ zur Schmerzbeurteilung (SCHIAVENATO & CRAIG, 2010). Da sich Tiere nicht verbal artikulieren können, erschwert dies die Untersuchung der Intensität von Schmerz oder die Beurteilung einer ausreichenden Analgesie im Tier. Die Erkennung und die Quantifizierung von Schmerz bei Tieren muss anhand verschiedener Parameter, deren Änderung im Mensch mit Schmerz assoziiert sind, hergeleitet werden (LIVINGSTON, 2010). Die multidimensionale Natur von Schmerz umfasst sensorische und emotionale Komponenten. Diese machen erst in ihrem Zusammenspiel die Gesamtheit der Schmerzerfahrung aus und stellen dabei eine weitere Schwierigkeit bei der Schmerzbeurteilung dar (ISON et al., 2016; RAJA et al., 2020). Durch z. B.

Angst, Stress und Erfahrung wird das Schmerzempfinden zudem verändert (MATHEWS et al., 2014). Um daher diesen emotionalen Einfluss auf das Schmerzempfinden auszuschließen und somit die sensorische Komponente von Schmerz, die Nozizeption, zu messen, wurde die vorliegende Untersuchung unter leichter Isoflurannarkose durchgeführt.

Ziel der Studie war die Untersuchung der FOS-Expression im spinalen Dorsalhorn und des Elektroenzephalogramms (EEG) als Parameter zur Evaluierung der Nozizeption während der chirurgischen Saugferkelkastration. Diese Parameter bilden unterschiedliche Lokalisationen der nozizeptiven Leitungsbahn ab: Änderungen der FOS-Expression wurden im Dorsalhorn des Rückenmarks untersucht, welches den ersten Umschaltpunkt peripherer nozizeptiver Übertragung darstellt. Änderungen des Elektroenzephalogramms repräsentieren die Aktivität der Großhirnrinde, die einen Endpunkt der nozizeptiven Signalübertragung darstellt.

Die Untersuchung von *c-FOS* bzw. FOS ist ein etablierter Parameter zur Untersuchung der Nozizeption (COGGESHALL, 2005) und wurde auch zur Untersuchung der Nozizeption bei der Ferkelkastration bereits angewendet (NYBORG, 2000; LACKNER, 2003; SVENDSEN, 2006). Auch EEG-Messungen wurden in einzelnen Studien bereits zur Untersuchung der chirurgischen Kastration bei Ferkeln in Narkose angewendet (WALDMANN et al., 1994; HAGA & RANHEIM, 2005; STEIGMANN, 2013).

Diese Messgrößen wurden als ergänzende Parameter erhoben, um in Kombination mit den Messungen der hämodynamischen und neurohumoralen Parameter sowie der Abwehrbewegungen aus der gleichen Untersuchung (SALLER et al., 2020) ein Gesamtbild der nozizeptiven Reaktionen während der Kastration abzubilden, und deren Veränderung durch die Verabreichung von Lokalanästhetika zu untersuchen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Schmerz, Nozizeption und deren Erfassung

#### 1.1. Schmerzwahrnehmung peripherer noxischer Reize

Schmerz ist per Definition immer eine subjektive Erfahrung, die aus sensorischen und kognitiven Anteilen besteht und – mindestens im Menschen – durch biologische, psychologische und soziale Faktoren beeinflussbar ist (RAJA et al., 2020). Er signalisiert Gefahr und ruft Vermeidungsverhalten hervor (PLONER et al., 2017). Grundsätzlich besteht der Signalweg von Schmerz aus vier Komponenten: Am Beginn der Schmerzwahrnehmung steht die Transduktion des Reizes, durch Transmission wird die Information weitergeleitet und durch Modulation verändert, am Ende der Signalkaskade steht die Perzeption, die bewusste Wahrnehmung des Schmerzes (KHERA & RANGASAMY, 2021). Nozizeption hingegen ist die Aktivierung des Nervensystems durch einen noxischen Reiz (RAJA et al., 2020).

Die Umwandlung eines akuten nozizeptiven Reizes in ein Signal (Transduktion) und die Lokalisation und Erfassung von Dauer und Intensität des Reizes erfolgt durch Rezeptoren an freien Endigungen spezieller Nervenfasern, sogenannten Nozizeptoren (BOURNE et al., 2014; SNEDDON, 2018). Nozizeptoren sind in einer Vielzahl von Geweben lokalisiert wie z. B. Haut, Mucosa, tiefe Faszien, Bindegewebe von Eingeweideorganen, Bänder, Sehnen und Gelenkskapseln, Muskeln und Arterien (ALMEIDA et al., 2004). Die Zellkörper der Nozizeptoren, welche Reize aus der Peripherie aufnehmen, liegen in den Spinalganglien (mit Ausnahme jener, die Reize vom Gesicht aufnehmen) (BELL, 2018). Durch einen noxischen Reiz kommt es zu Membranpotentialänderungen am Rezeptor und bei Überschreitung eines Schwellenwertes zur Auslösung eines Aktionspotentials (BOURNE et al., 2014). Dieses wird entlang der Nervenfasern, die in diesem Zusammenhang auch als 1. Neuron bezeichnet wird (ALMEIDA et al., 2004), zum Dorsalhorn des Rückenmarks weitergeleitet (BOURNE et al., 2014; BELL, 2018). Dort erfolgt die erste

synaptische Umschaltung auf ein nachfolgendes, zweites Neuron (BOURNE et al., 2014; BELL, 2018).

Nozizeptive Reize in Säugetieren sind (potentiell) gewebeschädigende Reize wie hoher mechanischer Druck, extreme Temperaturen ( $<10\text{ }^{\circ}\text{C}$  und  $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und Chemikalien wie z. B. Säuren (SNEDDON, 2018). Rezeptoren, die darauf ausgelegt sind, Gewebsschädigungen zu detektieren, reagieren daher auf mechanische, chemische und thermische Reize (BOURNE et al., 2014). Die Weiterleitung nozizeptiver Reize erfolgt primär über zwei Arten von Nozizeptoren: unmyelinisierte, daher langsam leitende (bis 2 m/s) C-Fasern, die für ein eher dumpfes, drückendes Schmerzempfinden verantwortlich sind sowie gering myelinisierte, daher schneller leitende (6-30 m/s) A-Delta-Fasern (A- $\delta$ ), die ein eher stechendes, scharfes Schmerzempfinden kurzer Latenz und guter Lokalisierbarkeit auslösen (ALMEIDA et al., 2004; BELL, 2018; SNEDDON, 2018). Sie sind für den intensiven ersten, akuten Schmerz verantwortlich und lösen Schutzreflexe aus (ALMEIDA et al., 2004).

Die graue Substanz des Rückenmarkes kann, basierend auf ihrem cytoarchitektonischen Aufbau, in 10 Laminae unterteilt werden, die Rexed Laminae (REXED, 1952). Das Dorsalhorn umfasst die Laminae I–VI (MILLAN, 1999), somatische Schmerzreize werden von den A- $\delta$ -Fasern und C-Fasern größtenteils in die oberflächlichen Laminae I und II weitergeleitet (TODD, 2010). Hier erfolgt die Umschaltung des Signals auf nachgeschaltete Neurone, sog. Neurone zweiter Ordnung (BELL, 2018). Die Neurone zweiter Ordnung haben unterschiedliche Funktionen: sie können entweder direkt oder indirekt Motoneurone aktivieren welche nozizeptive Reflexe auslösen, sie können den Reiz modulieren, oder sie leiten den Reiz nach Kreuzung des Rückenmarkes auf die gegenüberliegende Seite der weißen Substanz des Rückenmarke und weiter in Richtung subkortikaler Strukturen und Kortex (ANTOIGNINI & CARSTENS, 2002; ALMEIDA et al., 2004). Damit ein nozizeptiver Stimulus als Schmerz wahrgenommen werden kann, muss der Reiz in höhere Gehirnregionen weitergeleitet werden (BELL, 2018). Im Menschen wird Schmerz nicht in einer einzelnen Hirnregion verarbeitet, vielmehr kommt die Modulation und das Empfinden von Schmerz durch die komplexe

Interaktion einer Vielzahl Gehirnregionen zustande (APKARIAN et al., 2005). Bildgebende Verfahren im Menschen identifizierten auf subkortikaler Ebene die Beteiligung des periaquäduktalen Grau, des Hirnstammes, des Hypothalamus, der Amygdala, des Hippocampus und des Kleinhirnes (APKARIAN et al., 2005; LEE & TRACEY, 2013). Weiterhin spielen mehrere Kortexregionen eine wichtige Rolle bei der Schmerzwahrnehmung, so werden der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex sowie der präfrontale Kortex in der Regel aktiviert (APKARIAN et al., 2005; LEE & TRACEY, 2013). Die Aktivierung dieser Gehirnregionen, die auch als „Schmerzmatrix“ zusammengefasst werden, führt zu der multidimensionalen Erfahrung, welche Schmerz darstellt (BELL, 2018). Hier werden sensorisch-diskriminative und affektiv-kognitive Mechanismen des Schmerzempfindens aktiv (ALMEIDA et al., 2004; BELL, 2018). Der Thalamus stellt dabei die Haupt-Schaltstelle vor der Reizweiterleitung in andere Gehirnregionen dar (ALMEIDA et al., 2004; BOURNE et al., 2014). In Tieren ist die Datenlage zu funktionaler Bildgebung des Gehirns bei Schmerz geringer als im Menschen, die Zahl der durchgeführten Studien steigt aber zunehmend (BORSOOK & BECERRA, 2011). Bisher wurde funktionelle Magnetresonanztomographie nach nozizeptiven Reizen in Nagern und Affen durchgeführt, jedoch noch nicht in Schweinen (DA SILVA & SEMINOWICZ, 2019). Es scheinen in diesen Tierarten ähnliche Gehirnregionen aktiv zu werden wie im Mensch (DA SILVA & SEMINOWICZ, 2019).

## 1.2. Schmerzen durch chirurgische Kastration

Akute Schmerzen bei der chirurgischen Ferkelkastration werden durch die Durchtrennung von Nervenfasern bei der Eröffnung der Hodenhüllen mittels meist zweier vertikaler oder einem horizontalen Schnitt verursacht sowie durch die Durchtrennung des Samenstranges und seiner begleitenden Strukturen (RAULT et al., 2011). Auch Zug am *Processus vaginalis* durch die Vorverlagerung der Hoden, welcher sich auf das Peritoneum übertragen kann, verursacht Schmerzen (RAULT et al., 2011). Die Innervation der dabei relevanten Strukturen erfolgt durch eine Vielzahl sensibler Nerven unterschiedlichen Ursprungs: Der *N. iliohypogastricus* und der *N. ilioinguinalis*, die aus dem 1. bzw. 2. Lendennerven entspringen,

innervieren das Peritoneum der Inguinalgegend sowie die Haut in diesem Bereich (NICKEL et al., 1991). Der *Ramus genitalis* des *N. genitofemoralis*, der beim Schwein meist aus dem 4. Lendensegment entspringt, liegt dem Samenstrang an und versorgt den Samenstrang und die *Tunica vaginalis* des *Scrotums* (NICKEL et al., 1991). Der *N. pudendus* entspringt beim Schwein aus dem 2. und 3. Kreuznerz und innerviert die Haut des Dammes und den Hodensack (NICKEL et al., 1991). Die autonome Innervation des Hodens erfolgt durch sympathische Fasern des *Plexus mesentericus caudalis* und des *Plexus pelvinus* sowie parasymphatische Fasern des *N. vagus* und des *Plexus pelvinus*. Sie erreichen den Hoden und den Nebenhoden als *Plexus testicularis*, der die *A. testicularis* umspinnt und den Samenstrang begleitet (NICKEL et al., 1991).

### **1.3. Parameter zur perioperativen Schmerzdetektion bei der Ferkelkastration**

In Ferkeln und auch in adulten Schweinen existiert bisher kein „Gold-Standard“ für die Messung von Schmerz bzw. Nozizeption (ISON et al., 2016; SHEIL & POLKINGHORNE, 2020). Aufgrund der fehlenden verbalen Kommunikation muss Schmerz in Tieren durch Beobachtung des Verhaltens und Untersuchung von Parametern abgeleitet werden, deren Änderungen im Menschen mit Schmerz assoziiert sind (LIVINGSTON, 2010). Es stellen sich dabei diverse Schwierigkeiten (LIVINGSTON, 2010). Als potentielle Beutetiere vermeiden unsere landwirtschaftliche Nutztiere die offensichtliche Demonstration von Schwäche, Verletzbarkeit und schmerz-assoziiertem Verhalten, da dies die Wahrscheinlichkeit, in der Natur Ziel eines Beutegreifers zu werden, erhöht (JOHNSON, 2016; STEAGALL et al., 2021). Sie werden daher als eher stoisch in ihrem Verhalten beschrieben (STEAGALL et al., 2021). In wachen Tieren sind außerdem Verhaltensänderungen und Änderungen physiologischer Parameter aufgrund von Schmerz in wachen Tieren häufig schwierig von Stressreaktionen zu unterscheiden (LIVINGSTON, 2010).

Speziell bei der perioperativen Schmerzerfassung während der Saugferkelkastration besteht eine Schwierigkeit darin, dass Reaktionen auf

Schmerzen bei wachen Ferkeln mitunter nur kurzzeitig bzw. vorübergehend in Erscheinung treten und/oder unterschiedlich ausfallen können (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020). Zur Beurteilung der Schmerzhaftigkeit der Saugferkelkastration und der möglichen Verringerung der Schmerzhaftigkeit durch die Anwendung analgetischer Techniken, wurde bereits eine Vielzahl an biochemischen, physiologischer und verhaltensassoziierten Parameter untersucht (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020). Deren Sensitivität und Spezifität als Parameter für Schmerz und Nozizeption während der Saugferkelkastration wird unterschiedlich bewertet und deren Einsatz muss vor dem Hintergrund des jeweiligen Versuchsaufbaus beurteilt werden (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020). Eine Übersicht der bisher angewendeten Messparameter geben SHEIL und POLKINGHORNE (2020):

- Die Messung physiologischer Parameter, d. h. Parameter, die auf der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse, des sympathischen Nervensystems und der Ausschüttung von endogenen Opioiden basieren, z. B. Messung von ACTH, Cortisol, Adrenalin, Blutglucose und -lactat, Herzfrequenz und Blutdruck, Hauttemperatur,  $\beta$ -Endorphinen. Diese Parameter sind durch Stress und Gewebetraumen beeinflussbar, sodass die Spezifität für Schmerz nicht vollständig gegeben ist (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020). c-fos und FOS-Protein wurden als neuronale Marker untersucht (NYBORG et al., 2000; SVENDSEN, 2006)
- Die Untersuchung von Bewegungsreaktionen, d. h. die Messung von Abwehrbewegungen oder Fluchtversuchen, durch verschieden aufgebaute Bewertungssysteme, scheint eine sensitive und wiederholbare Methodik zu sein (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020).
- Die Messung der Vokalisation, d. h. Bewertung der Lautäußerungen durch Bewertung von z. B. Dauer, Lautstärke oder Frequenz der Vokalisation, Anzahl der Schreie oder Anzahl der Tiere, die Vokalisation zeigen, scheint ein sensitiver und wiederholbarer Parameter zu sein, wenn auch durch äußere Einflüsse leicht

beeinflussbar (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020).

- Beobachtung von postoperativen Verhaltensänderungen z. B. Beobachtung von Haltung (liegen, sitzen, stehen), Aufenthaltsort (unter Wärmelampe, bei der Sau/Gruppe, isoliert etc.), Aktivität (schlafen, spielen, saugen, gehen, exploratives/aggressives Verhalten etc.) oder spezifischem, schmerzassoziiertem Verhalten z. B. zittern, kyphotische Haltung, „huddling-up“ (liegen mit unter dem Körper versammelten Beinen), Steifheit beim Gehen, Schwanzschlagen, kratzen etc. Diese schmerzassoziierten Parameter scheinen sensitiv zu sein, allerdings fehlen bisher wirklich validierte Messmethoden (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020).
- Die quantitative sensorische Testung (QST) basiert auf der Tatsache, dass sich durch die Sensibilisierung afferenter Nerven im Bereich von Gewebstraumen, der Schwellenwert für eine Bewegungsreaktion auf einen definierten taktilen Reiz hin, z. B. mittels „Frey Filamenten“, erniedrigt. Bisher gibt es erst wenige Studien zu QST bei der Ferkelkastration, jedoch deuten diese darauf hin, dass diese Messmethode sensitiv und spezifisch für die pathophysiologischen Mechanismen ist, die der postoperative Hyperalgesie zugrunde liegen, und reproduzierbare Ergebnisse liefert (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020).
- Andere Parameter, z. B. die Anwendung eines „Grimace Scale“ scheint vielversprechend aber nicht ausreichend validiert, auch Infrarot-Thermographie zur Messung der Hauttemperatur oder Messung der Körpertemperatur ergaben keine zuverlässigen Ergebnisse zur Schmerzerfassung (SHEIL & POLKINGHORNE, 2020).
- Elektroenzephalographische Messungen wurden bisher in wenigen Studien verwendet (WALDMANN et al., 1994; HAGA & RANHEIM, 2005; STEIGMANN, 2013).

## **2. Elektroenzephalogramm**

### **2.1. Neurophysiologische Grundlagen des Elektroenzephalogramms**

1875 registriert Richard Caton erstmals elektrische Aktivität am Kortex von Affen und Kaninchen (CATON, 1875). Dem Neurologen Hans Berger (1873-1941) gelingt 1927 die erste gesicherte Aufzeichnung eines Elektroenzephalogramms (EEG) bzw. Elektroencephalogramms, wie er es nennt, am Menschen (BERGER, 1929). 1929 publiziert er erstmals seine Entdeckungen, nachdem es ihm gelingt, die Wellen auch über die intakte Schädeldecke aufzuzeichnen (BERGER, 1929; STAUDT, 2014).

Das EEG zeichnet an der Schädeloberfläche ableitbare elektrische Spannungsschwankungen auf und repräsentiert die aktuelle elektrische Aktivität des Gehirns (PURDON et al., 2015). Diese elektrischen Spannungsschwankungen haben ihren Ursprung vor allem in exzitatorischen aber auch inhibitorischen postsynaptischen Potentialen der Dendriten kortikaler Pyramidenzellen (SCHMID & TIRSCH, 1995; RAMPIL, 1998). Kommt es durch ein eintreffendes Aktionspotential zu einer Depolarisation am Dendritenbaum eines Neurons, verursacht dies an exzitatorischen Synapsen eine Depolarisation der synaptischen Membran mittels Natrium- oder Kaliumstrom in die bzw. vermindertem Kaliumausstrom aus der Zelle (WITTE, 2002). Durch diese synaptisch induzierten Membranpotentialänderungen kommt es zu ausgleichenden Ionenflüssen im angrenzenden Extrazellularraum und damit zu elektrischen Feldpotentialen (WITTE, 2002). Treten Membranpotentialänderungen an vielen perpendikulär zur Schädeloberfläche ausgerichteten Neuronen gleichzeitig auf, summieren sich deren elektrische Feldpotentiale auf. Dadurch entstehen ausreichend große, sich ständig ändernde Spannungen an der Kopfoberfläche, die im EEG messbar sind (RAMPIL, 1998). Für das EEG sind besonders die großen Pyramidenzellen des Kortex von Bedeutung, da sie nahe an der Schädeloberfläche liegen, parallel zueinander und radial zur Oberfläche des Kortex ausgerichtet sind (TONG & THAKOR, 2009; CONSTANT & SABOURDIN, 2012). Daher kann die

summierte, synchrone elektrische Aktivität Hunderttausender oder Millionen (je nach Montage der EEG-Elektroden) von Neuronen der Großhirnrinde nichtinvasiv im EEG abgebildet werden (VOSS & SLEIGH, 2007; KAISER et al., 2021).

Je mehr Nervenzellen synchron aktiviert werden, desto höher sind die Amplitude der Wellen, eine asynchrone Aktivierung ist hingegen durch eine höhere Frequenz und in der Regel niedrigere Amplituden gekennzeichnet (PURDON et al., 2015). So ergibt sich nach STERIADE (1990) und JABER (2015) im Wachzustand durch asynchrones Feuern, d. h. Aktivierung des Neurons (CONNORS & REGEHR, 1996), ein unregelmäßiges EEG-Muster hoher Frequenzen und niedriger Amplituden. Durch Synchronisation der neuronalen Aktivierung zeigt das EEG im unbewussten Zustand Wellen niedriger Frequenzen und hoher Amplituden (STERIADE et al., 1990; JABER et al., 2015).

Das EEG wird von der Schädeloberfläche abgeleitet (im Gegensatz zum Elektrokortikogramm, bei dem direkt am freigelegten Kortex gemessen wird) (MURRELL & JOHNSON, 2006). In der Humanmedizin geschieht dies meist mittels Standardelektroden, die häufig in spezielle Hauben eingearbeitet sind oder auf die Haut geklebt werden (HINRICHS, 2002). Alternativ können Nadelelektroden verwendet werden, die subkutan unter die Kopfhaut gesteckt werden (HINRICHS, 2002). Bei Tieren finden beide Arten von Elektroden Anwendung (MURRELL & JOHNSON, 2006). Die Deutsche Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie und Funktionelle Bildgebung (DGKN) empfiehlt für neurologische Diagnostik im Menschen eine Elektrodenplatzierung, bei der mind. 20 Messelektroden verwendet werden. Zur Narkoseüberwachung werden mind. 2 Messkanäle empfohlen, da die Bestimmung der Topographie der EEG-Wellen hier wenig zusätzlichen Nutzen bietet (RAMPIL, 1998). Auch in Tieren werden bisher meist nur 1–2 Messkanäle verwendet, wodurch die Gesamtaktivität in einer Kortexregion abgebildet wird (MURRELL & JOHNSON, 2006). Das im Vergleich zum Menschen kleine *Cranium* (Gehirnschädel) von Tieren begrenzt die Anzahl an Elektroden, die sinnvollerweise gemessen werden können, da die räumliche Auflösung des EEGs im Zentimeterbereich liegt (MURRELL & JOHNSON, 2006; SRINIVASAN et al., 2006).

Aufgrund der anatomischen Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies, gibt es kein universelles Muster für die Platzierung von EEG-Elektroden im Tier (MURRELL & JOHNSON, 2006). Jedoch beeinflusst die Platzierung der Elektroden auf dem Schädel die Messergebnisse, daher sollte in Veröffentlichungen die Lokalisation der Elektroden auf dem Schädel berücksichtigt werden (MURRELL & JOHNSON, 2006).

## 2.2. Parameter der EEG-Beurteilung

Gemäß der DGKN wird das Roh-EEG hinsichtlich seiner Frequenz, Amplitude, Lokalisation, Morphologie, Häufigkeit besonderer Potentialmuster, seines zeitlichen Verhaltens und der Reagibilität auf Reize beurteilt (ZSCHOCKE & HANSEN, 2012). Die Frequenz kann dabei als wichtigster Parameter angesehen werden und wird in Wellen/Sekunde oder in Hertz angegeben (HOPPE, 2002). Die Ober- und Untergrenze der EEG-Wellenfrequenzen ist zwar undeutlich aber aus physiologischer Sicht liegen die wichtigsten Frequenzen in einem Bereich von 0,1–30 Hz (OMERHODZIC et al., 2012). Von BERGER (1929) werden die ersten im Menschen beschriebenen EEG-Wellen als Alpha-Wellen bezeichnet, Theta-Wellen erhielten ihren Namen von WALTER und DOVEY (1944), da sie einen thalamischen Ursprung der Wellen vermuten. Die Benennung und Einteilung der EEG-Frequenzbereiche beim Menschen in meist vier oder fünf Bereiche ist daher historisch bedingt, sie werden als Alpha-, Beta-, Theta-, Delta- und Gamma-Wellen bzw. -Band bezeichnet (SUBASI et al., 2005; CONSTANT & SABOURDIN, 2012).

- Beta-Wellen liegen in einem Frequenzbereich von ca. 12–30 Hz mit Amplituden von ca. 30  $\mu$ V. Sie treten bei kortikaler Aktivierung auf und sind im menschlichen Wach-EEG typischerweise z. B. bei aktivem Nachdenken zu sehen (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Alpha-Wellen haben Frequenzen von ca. 8–12 Hz mit Amplituden von ca. 30–50  $\mu$ V. Beim Menschen treten diese im Wach-EEG bei geschlossenen Augen in Ruhe oder bei Meditation auf (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Theta-Wellen haben Frequenzen von ca. 4–8 Hz und Amplituden von 50–100  $\mu$ V. Sie werden z. B. in leichtem Schlaf beobachtet (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).

- Delta-Wellen liegen im Frequenzbereich von ca. 0–4 Hz und zeigen große Amplituden von 100–200  $\mu\text{V}$ . Sie sind assoziiert mit z. B. tiefem Schlaf oder Koma (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Wellen mit Frequenzen von mehr als 30 Hz werden als Gamma-Wellen bezeichnet (OMERHODZIC et al., 2012) und sind in der Grundlagenforschung relevanter als im klinischen Alltag (ZSCHOCKE & HANSEN, 2012).

Mitunter werden zusätzliche Unterteilungen der Frequenzbänder vorgenommen, z. B. können Wellen von 0–1 Hz als „Slow Waves“ bezeichnet werden (KAISER et al., 2021) oder der Beta-Frequenzbereich wird in hohe (18–30 Hz) und niedrige (13–17 Hz) Beta-Wellen unterteilt (SCHOLZ et al., 2017) bzw. können nach der DGKN für klinische Fragestellungen auch abgewandelte Einteilungen der Frequenzbänder vorgenommen werden. Die genaue Einteilung der Frequenzbereiche der vier Frequenzbänder wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegeben und ist nicht fest definiert (NEWSON & THIAGARAJAN, 2018). Daher ist die Angabe „Alpha-Welle“, „Beta-Welle“ etc. nicht zwingend identisch mit Angaben anderer Publikationen, die dieselbe Terminologie verwenden (NEWSON & THIAGARAJAN, 2018). Die Frequenzbereiche oder Frequenzbänder im Menschen sind willkürlich definiert und haben keine spezielle neurobiologische Bedeutung (KAISER et al., 2021). Ebenso ist nach MURRELL und JOHNSON (2006) im Tier die Einteilung der EEG-Wellenfrequenzen in Frequenzbänder willkürlich (MURRELL & JOHNSON, 2006).

Die Amplitudenhöhe der EEG-Wellen eines menschlichen EEGs gibt die Höhe der Spannungsschwankung an und liegt zwischen 10 und 100  $\mu\text{V}$  (CONSTANT & SABOURDIN, 2012). Da die Amplitudenhöhe entscheidend von der Montage der Elektroden abhängt (ZSCHOCKE, 2002), ist ihre Aussagekraft begrenzt und im klinischen Alltag reicht laut DGKN eine semiquantitative Abschätzung (niedrig, mittel, hoch) der Amplitude aus. Amplitude und Frequenz verhalten sich in der Regel umgekehrt proportional zueinander, so gehen hohe Frequenzen mit meist niedriger Amplitude einher, niedrige Frequenzen haben meist hohe Amplituden (NEUNDÖRFER, 2002).

### **2.3. Spektralanalyse und graphische Darstellungsformen des EEG**

Zur leichteren Auswertung und Interpretation des Roh-EEGs werden verschiedene Ansätze zur Signalanalyse verwendet. Vorwiegend findet die Spektralanalyse mittels Fourier-Transformation Anwendung, eine mathematische Technik benannt nach dem französischen Mathematiker Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830).

Durch die Spektralanalyse kann eine EEG-Welle, deren Amplitude eine Funktion der Zeit ist, in ein Signal umgewandelt werden, dessen Amplitude eine Funktion der Frequenz ist, d. h. eine Darstellung, die das Signal anhand der Amplitude und Phase einzelner Sinusschwingungen definierter Frequenz beschreibt (OTTE, 2010; HERFF & KRUSIENSKI, 2019). Die EEG-Welle kann als eine Summation von Sinus-Wellen verschiedener Frequenzen gesehen werden. Mittels der Spektralanalyse kann diese Welle in ihre Frequenzbereiche aufgeteilt werden. Es kann errechnet werden, mit welcher Leistung bzw. „Power“ eine bestimmte Frequenz im untersuchten EEG enthalten ist (OTTE, 2010; HERFF & KRUSIENSKI, 2019). Diese Daten können als „Leistungsspektrum“ dargestellt werden oder als „Spektrogramm“, welches den Vorteil bietet, dass der zeitliche Verlauf des Leistungsspektrums in der graphischen Darstellung mitberücksichtigt wird (KAISER et al., 2021).

Für die visuell graphische Darstellung des EEGs gibt es somit drei klassische Darstellungsformen (KAISER et al., 2021):

1. Roh-EEG (Abb. 1): Die EEG-Amplitude wird in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Morphologie der Wellen kann hierin beurteilt werden und die Frequenz einer Schwingung kann abgeschätzt werden oder auch pro Sekunde (s) ausgezählt werden (KAISER et al., 2021).
2. Leistungsspektrum (Abb. 2): Da das Roh-EEG aus Wellen unterschiedlicher Frequenzen und Amplituden besteht, kann durch die Analyse eines EEG-Abschnitts mittels Fourier-Transformation, ein Leistungswert („Power“), meist in Dezibel (dB) angegeben, für jeden Frequenzbereich berechnet werden. Dieser gibt an, mit welcher Leistung eine definierte Frequenz im EEG vertreten ist (PURDON et al., 2015; KAISER et al., 2021).

3. Leistungsdichtespektrum (vereinfacht Spektrogramm genannt oder auch Dichte-Spektral-Array) (Abb. 3): Aufeinander folgende EEG-Abschnitte werden fortlaufend durch Fourier-Transformation analysiert und die Leistungsspektren errechnet. Durch die Aneinanderreihung der Leistungsspektren, können diese in ihrem zeitlichen Verlauf dargestellt werden. Die Zeit wird dabei auf der x-Achse dargestellt, die Frequenz auf der y-Achse. Die Leistung wird farbcodiert als dritte Ebene abgebildet, wobei rot hohe Leistung und blau niedrige Leistung bedeutet (KAISER et al., 2021). Das Spektrogramm ermöglicht die visuelle Darstellung der zugrundeliegenden Spektralanalyse ohne Datenverlust (LEVY et al., 1980).

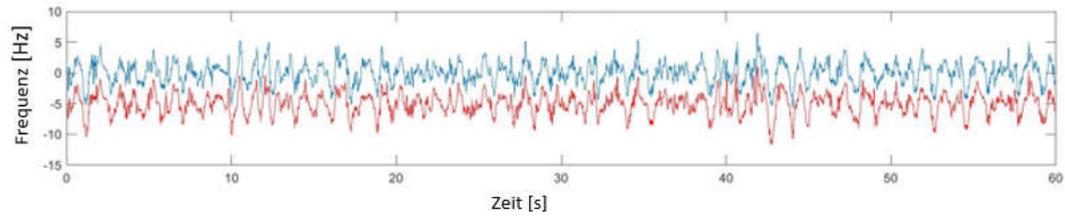


Abbildung 1: Abbildung des Roh-EEGs eines Ferkels über 60 s, abgebildet sind beide Messkanäle (rechte und linke Hemisphäre), zur leichteren Unterscheidung sind die Spuren um 5 µV versetzt.

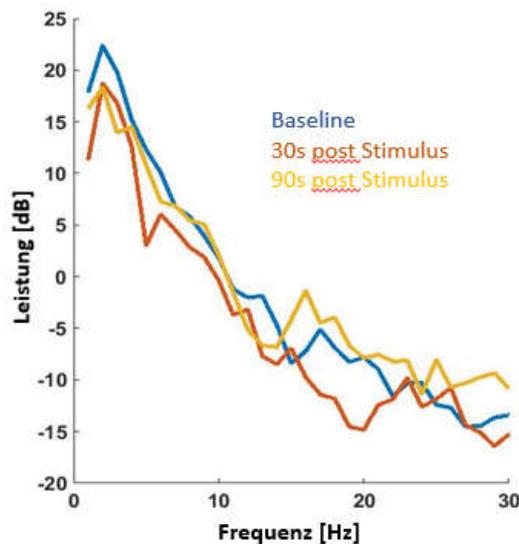


Abbildung 2: Beispielhafte Powerspektrumanalyse eines Ferkels vor und nach einem Schmerzreiz, Abbildung der Baseline und der Zeitpunkte 30 s und 90 s post Stimulus.

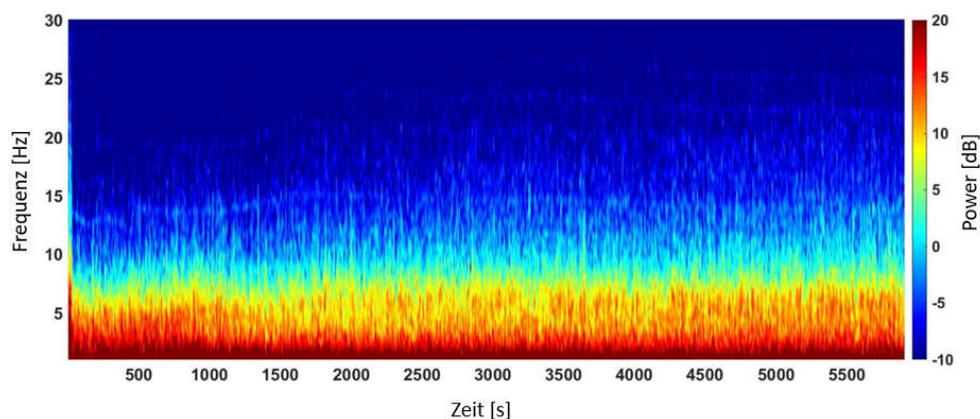


Abbildung 3: Spektrogramm eines Ferkels der Handling-Gruppe bei 1,6 % FI Iso, über eine Zeit von 6000 s. Abgebildet ist der Frequenzbereich von 0–30 Hz, die Power der Frequenzen ist farbcodiert in dB dargestellt.

Aus der Spektralanalyse können nach CONSTANT und SABOURDIN (2012) auch verschiedene weitere numerische, prozessierte Parameter abgeleitet werden, mittels derer weitere statistische Auswertungen durchgeführt werden können:

- Spektrale Gesamtpower in Mikrovolt ( $P_{\text{tot}}$ ): da das Powerspektrum mehr Power in den niedrigen Frequenzen beinhaltet, reagiert dieser Parameter sensibel auf Änderungen der niedrigen Frequenzen (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Spektrale Power der verschiedenen Frequenzbänder Alpha, Beta, Gamma und Delta: oft als prozentualer Anteil eines Frequenzbandes an der Gesamtpower angegeben (CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Spektrale Eckfrequenzen, meist 95, 90 oder 80 (F95, F90, F80): geben die Frequenz an, unter der 95%, 90% oder 80% der Gesamtpower liegen. Die Spektrale Eckfrequenz 95 z. B. ist ein sensibles Maß für Aktivität hoher Frequenzen (JOHNSON et al., 2008). Durch die Zunahme langsamer Wellen hoher Amplituden verringern sich die Spektralen Eckfrequenzen (SCHWENDER et al., 1998; CONSTANT & SABOURDIN, 2012).
- Spektrale Eckfrequenz 50 bzw. Medianfrequenz (F50): gibt die mittlere Frequenz des EEGs an. Sie liefert ein Gesamtbild der hohen und niedrigen EEG-Frequenzen (JOHNSON et al., 2008; CONSTANT & SABOURDIN, 2012).

#### **2.4. EEG unter Inhalationsanästhesie**

Allgemeinanästhetika verändern das EEG bei adulten Menschen und Tieren dosis- und substanzabhängig, wobei verschiedene Anästhetika jeweils charakteristische Veränderungen im EEG hervorrufen können (MURRELL et al., 2008; SILVA & ANTUNES, 2012; AKEJU et al., 2014; HAGIHIRA, 2015; PURDON et al., 2015). Moderne Inhalationsanästhetika (z. B. Sevofluran, Desfluran, Isofluran) erzeugen in adulten Menschen vergleichbare Muster im EEG (PURDON et al., 2015). Vereinfacht ausgedrückt, verändern sich die EEG-Wellen mit zunehmender Narkosetiefe von hohen Frequenzen mit niedriger Amplitude, hin zu

niedrigen Frequenzen hoher Amplituden (HAGIHIRA, 2015). Diese im Menschen sehr detailliert untersuchten und beschriebenen Änderungen des EEGs in Narkose sind in Tieren prinzipiell ähnlich (LOPES DA SILVA et al., 1972; OTTO & SHORT, 1991; SILVA & ANTUNES, 2012). In flacher Narkose sind die Amplituden niedrig und deren Frequenz hoch, bei Vertiefung der Narkose vergrößern sich die Amplituden zunehmend, wobei die Frequenz abnimmt (VOSS & SLEIGH, 2007; PURDON et al., 2015). Bei weiterer Vertiefung der Narkose tritt schließlich Burst-Suppression auf (NIEDERMEYER et al., 1999; KRATZER et al., 2020), ein Muster bei dem Abschnitte niedriger kortikaler Aktivität (Suppressions) mit Wellenamplituden meist  $< 5 \mu\text{V}$ , von kurzen Salven (0,1–max. 2 s) hochfrequenter Wellen mit großen Amplituden  $> 20\mu\text{V}$  (Bursts) durchbrochen werden (NIEDERMEYER et al., 1999; PURDON et al., 2015; KRATZER et al., 2020; KAISER et al., 2021). Die Häufigkeit dieser Bursts sowie deren Amplituden nehmen mit zunehmender Narkosetiefe ab, bis schließlich sehr tiefe Narkosestadien durch komplett unterdrückte Aktivität ohne Wellenaktivität gekennzeichnet sind (BROWN et al., 2010; HAGIHIRA, 2015).

RAMPIL et al. (1988) beschreiben in juvenilen Schweinen mit abgeschlossener Gehirnentwicklung, die EEG-Veränderungen durch Verabreichung steigender Konzentrationen von Isofluran und Desfluran. Beide Inhalationsanästhetika verändern das EEG in ähnlicher Weise, mit steigender Dosierung tritt vermehrt Burst-Suppression auf, es kommt zu einer Verlangsamung der Frequenz.

### **2.5. EEG unter Inhalationsanästhesie beim Neugeborenen**

Unter Inhalationsanästhesie zeigt das EEG beim menschlichen Neugeborenen deutliche Unterschiede im Vergleich zum EEG von Erwachsenen (HAYASHI et al., 2012). HAYASHI et al. (2012) und CORNELISSEN et al. (2015) erklären dies durch die unausgereifte Myelinisierung und synaptische Konnektivität des neuronalen Netzwerkes sowie durch den unterschiedlichen Glucose-Metabolismus. Die im adulten menschlichen EEG typischen, dosisabhängigen Veränderungen bestimmter Parameter unter Inhalationsnarkose verhalten sich im Neugeborenen unabhängig von der Konzentration des verwendeten

Inhalationsanästhetikums (HAYASHI et al., 2012). Erst ab einem Alter von ca. sechs Monaten reagiert das EEG in Kindern in der für Erwachsene typischen Weise, dass mit zunehmender Narkosetiefe eine Verlangsamung der Wellenaktivität auftritt und die Häufigkeit von Burst-Suppression zunimmt (HAYASHI et al., 2012). Je jünger die Kinder sind, desto weniger Einfluss hat die Narkosetiefe auf prozessierte EEG-Parameter (HAYASHI et al., 2012). Burst-Suppression Episoden treten in jüngeren Kinder häufiger auf und können bereits bei geringen Dosierungen von Inhalationsanästhetika vorhanden sein (HAYASHI et al., 2012). Das EEG von Babys und auch das EEG neugeborener Mäuse zeigt unter Isoflurannarkose häufig Diskontinuität, d. h. Abschnitte relativer Inaktivität wechseln sich mit „aktiven“ Abschnitten ab, diese „aktiven“ Phasen sind aber im Vergleich zum Wach-EEG wenig verändert (AGRAWAL et al., 2019; CHINI et al., 2019). SITDIKOVA et al. (2014) beschreiben auch in Ratten altersabhängig unterschiedliche EEG-Muster unter Isoflurannarkose. So wird während der ersten Lebenswoche das Spontan-EEG durch Isofluran-Konzentrationen von 1,5–2 % vollständig unterdrückt, im Alter von ca. einer Woche verändern sich die EEG-Reaktionen unter Isofluran zunehmend in Richtung des Reaktionsmusters adulter Ratten (SITDIKOVA et al., 2014). JOHNSON et al. (2015) beschreiben die prozessierten Parameter Medianfrequenz, Gesamtpower und SEF95 unter Halothannarkose niedriger in einen Tag alten Ferkeln als in fünf Tage alten Ferkeln. Das detaillierte EEG-Muster von Ferkeln in der ersten Lebenswoche unter Inhalationsnarkose wurde aber bisher nicht beschrieben.

## **2.6. EEG und Schmerz unter Narkose**

Neurophysiologische Reaktionen des Gehirns auf noxische Reize während der Allgemeinanästhesie sind laut GARCÍA et al. (2021) klare Hinweise darauf, dass die Anästhesie für die Unterdrückung von Gehirnreaktionen auf chirurgische Reize nicht ausreicht. Im adulten Menschen unter Allgemeinanästhesie sind mindestens drei Reaktionsmuster auf Schmerzreize möglich:

- „Klassische“ Arousal-Reaktion mit EEG-Desynchronisation und Frequenzsteigerung (BISCHOFF, 1994), kann typischerweise unter niedrigen Dosierungen von Inhalationsanästhetika von 0,5–1,0

Minimaler alveolärer Konzentration (MAC) auftreten (GARCÍA et al., 2021).

- (Paradoxe) Arousal-Reaktion mit EEG-Synchronisation (BISCHOFF, 1994) tritt eher unter höheren Anästhetika-Dosierungen und auch in Verbindung mit Analgetika auf und ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Delta-Frequenzen, weshalb auch die Bezeichnung „Delta-Arousal“ verwendet wird (GARCÍA et al., 2021).
- *Alpha dropout* tritt ebenfalls unter höheren Anästhetika-Dosierungen, auch in Verbindung mit Analgetika auf, und drückt sich durch Abnahme der Alpha-Frequenzen aus. *Alpha dropout* und *Delta arousal* können kombiniert auftreten (GARCÍA et al., 2021; KAISER et al., 2021).

Der Begriff „Arousal“ bezeichnet allgemein eine zentralnervöse Aktivierung mit Frequenzsteigerung im EEG (MORUZZI & MAGOUN, 1949; BISCHOFF, 1994). In Narkose kann dies als Änderung des EEG in Richtung des EEG bei Bewusstsein betrachtet werden (RAMPIL, 1998; OTTO & MALLY, 2003; HAGA & DOLVIK, 2005) und spricht für stärkere Aktivität des Kortex (RAMPIL, 1998). Bei Tieren wurden sowohl „klassische“ Arousal-Reaktionen nach Schmerzreizen beobachtet (WALDMANN et al., 1994; MURRELL et al., 2003; OTTO & MALLY, 2003; JOHNSON et al., 2005; MURRELL et al., 2007; OTTO, 2007; JOHNSON et al., 2009). Es wurden aber auch paradoxe Arousal-Reaktionen beobachtet, d. h. eine gegenteilige Reaktion mit Zunahme langsamer Wellenfrequenzen (DERBYSHIRE et al., 1936; OTTO & MALLY, 2003). Die EEG-Reaktion wird durch die Art des Reizes und auch durch die Narkosetiefe beeinflusst (OTTO & MALLY, 2003; MURRELL et al., 2007).

Neurophysiologische Untersuchungen wie EEG-Messungen werden in Tiermodellen verwendet, um beispielsweise die Effektivität von Analgetika zu untersuchen (MURRELL & JOHNSON, 2006). Die Untersuchung von Schmerz bzw. Nozizeption in Narkose hat u.a. den Vorteil, dass die untersuchten Tiere den Reiz nicht bewusst wahrnehmen, wodurch die Untersuchung einer Kontrollgruppe ohne Analgesie ethisch besser vertretbar ist und den Tieren vor dem Wiedererwachen Analgetika

verabreicht werden können (JOHNSON et al., 2008). Da aber Allgemeinanästhetika Reaktionen auf noxische Reize abschwächen, entwickelten MURRELL et al. (2003) ein „Minimalanästhesiemodell“, bei dem die Reaktionen auf nozizeptive Reize in nur leicht anästhesierten Tieren untersucht wird (MURRELL et al., 2003).

### **2.7. EEG und Schmerzdetektion in Narkose bei neugeborenen Tieren**

Das Elektrokortikogramm neugeborener Ratten unter leichter Halothannarkose in der ersten Lebenswoche beschreiben DIESCH et al. (2009) als weitgehend isoelektrisch, das bedeutet es treten nur wenige, kurze Spannungsausschläge auf. Auf einen Schmerzreiz durch Klemmen des Schwanzes reagieren die Tiere in diesem Alter kaum (DIESCH et al., 2009). Mit zunehmendem Alter verkürzen sich die isoelektrischen Abschnitte, das EEG zeigt zunehmend kontinuierlichen Charakter und die EEG-Reaktion auf eine Schwanzklemme hin wird deutlicher (DIESCH et al., 2009). Im Alter von ca. 2 Wochen sind moderate Reaktionen im EEG erkennbar, im Alter von ca. 3 Wochen können dann signifikante Änderungen von EEG-Parametern gemessen werden (DIESCH et al., 2009). Die zunehmende Änderung der kortikalen Aktivität und Reaktivität dieser Tierart wird auf Reifungsprozesse des Zentralen Nervensystems zurückgeführt, welche z. B. Myelinisierung, Proliferation von Axonen, Zunahme synaptischer Vesikel und zunehmende synaptische Verschaltung umfassen. Diese spiegeln sich auch in der zunehmenden Aktivität und der Komplexität an Verhaltensweisen wacher Rattenwelpen wieder (DIESCH et al., 2009). Diese Korrelation zwischen dem Eintritt komplexer Verhaltensweisen und der Entwicklung eines differenzierten, kontinuierlichen EEG-Musters wird auch in Tammar-Wallabies (Känguruart) beobachtet (DIESCH et al., 2008). Diese bei der Geburt extrem unreifen Tiere zeigen anfangs ein isoelektrisches EEG, die Entwicklung hin zu einem adulten EEG-Muster ist auch noch nicht vollständig abgeschlossen, wenn die Wallabies den Beutel der Mutter bereits zeitweise verlassen (DIESCH et al., 2008). Unter Halothan-Narkose ist daher im EEG sehr junger Wallaby-Jungen auf einen Schmerzreiz durch Klemmen einer Zehe keine messbare Reaktion festzustellen, mit steigendem Alter wird die EEG-

Reaktion zunehmend deutlicher (DIESCH et al., 2008). Im Gegensatz dazu, sind Lämmer bei der Geburt neuronal bereits weit ausgereift (MELLOR & GREGORY, 2003; DIESCH et al., 2008). So deuten nach JOHNSON et al. (2008) mehrere EEG-Parameter darauf hin, dass die Sensitivität von Lämmern während den ersten zehn Lebenstagen unter Halothan-Narkose für eine Kastration mittels Gummiring mit steigendem Alter zunimmt.

## **2.8. EEG und Schmerzdetektion in Narkose bei Ferkeln und juvenilen Schweinen**

HAGA et al. (2001) untersuchen in juvenilen Schweinen den Einfluss von mechanischen Reizen ohne Gewebeverletzung auf die Spektrale Eckfrequenz 95, die Medianfrequenz, die Verhältnisse Alpha/Delta, Beta/Delta und Theta/Delta, die Gesamtpower und die Burst-Suppression Rate. Bei mittleren endexpiratorischen Isofluran-Dosierungen von 1,88% und höher, werden keine signifikanten Änderungen der Parameter auf einen Schmerzreiz hin beobachtet (HAGA et al., 2001). KELLS et al. (2017b) verwenden EEG-Messungen unter leichter Halothan-Narkose zur Beurteilung der Reaktion auf das Kupieren der Schwänze bei zwei und 20 Tage alten Ferkeln und zeigen, dass die Reaktionen altersabhängig unterschiedlich ausfallen. Neugeborene Ferkel reagieren im EEG deutlich weniger auf den Eingriff als 20 Tage alte Tiere, zwei Tage alte Tiere zeigen mit einer nur kurzzeitigen Abnahme der Medianfrequenz und keinen Änderungen der weiteren Parameter wenig messbare Reaktionen (KELLS et al., 2017b). Die 20 Tage alten Ferkel reagieren mit Anstiegen der Medianfrequenz, der spektralen Eckfrequenz 95 und der Gesamtpower, was eine Änderung des EEGs in Richtung Arousal beschreibt (KELLS et al., 2017b). Die prozessierten Parameter wurden in der Studie in einem Zeitraum von 180 Sekunden (s) nach dem Stimulus über aufeinander folgende Zeitabschnitte von jeweils 15 s berechnet (KELLS et al., 2017b). Über 30 s gemittelte Werte nach Schwanzkupieren ohne Analgesie unter leichter Halothannarkose, weisen auf eine ähnliche Arousal-Reaktion bei rund 21 Tage alten Ferkeln hin (KELLS et al., 2017a). JOHNSON et al. (2015) finden Hinweise, dass die EEG-Reaktionen von Ferkeln unter Halothannarkose auf Schwanzkupieren in den ersten 15 Lebenstagen mit steigendem Alter deutlicher ausfallen.

Die erste Anwendung von EEG-Messungen zur Schmerzdetektion bei der Saugferkelkastration unter Narkose wurde von WALDMANN et al. (1994) durchgeführt. Unter Thiopental-Narkose zeigen sie in einzelnen Ferkeln verstärkte Desynchronisation des EEG-Musters mit Zunahme der Beta-Wellen (WALDMANN et al., 1994). Ebenfalls unter leichter Halothannarkose untersuchen HAGA und RANHEIM (2005) die Reaktion von etwa drei Wochen alten männlichen Ferkeln auf die chirurgische Kastration mit und ohne Lokalanästhesie. Sie berechnen eine Vielzahl prozessierter Parameter, die Power der Alpha-, Beta-, Theta- und Delta-Wellen, die Verhältnisse Alpha/Delta, Beta/Delta, Theta/Delta, die spektrale Gesamtpower sowie die spektrale Eckfrequenz 95 und die Medianfrequenz. Über Zeiträume, die dem Schmerzstimulus äquivalent sind, d. h.  $30 \pm 9,1$  s nach Injektion und  $62,7 \pm 6,3$  s nach Kastration, sind diese Parameter gemittelt. Auch hier zeichnet sich eine Arousal-Reaktion ab, die Alpha-, Theta- und Delta-Power, also langsame Wellen sowie die Gesamtpower sind reduziert nach Kastration ohne Analgesie, die Medianfrequenz steigt an (HAGA & RANHEIM, 2005). STEIGMANN (2013) verwendet in ihrer Dissertation zur Evaluierung der Schmerzausschaltung unter automatisierter Isoflurannarkose eine Auswertemethode mittels Schablone zur Bestimmung der Anteile der einzelnen Frequenzbänder Alpha, Beta, Theta und Delta am Gesamt-EEG und zur Feststellung von Bewegungsartefakten. Bei wachen Ferkeln detektiert sie vorwiegend Beta-Aktivität, während der automatisierten Isoflurannarkose mit 5 % Isofluran verlangsamt sich die Frequenz bis hin zu Burst-Suppression-Mustern (STEIGMANN, 2013). Bewegungsartefakte und EEG-Änderungen während der Emaskulation treten in Ferkeln ohne Narkose am häufigsten auf (STEIGMANN, 2013).

### **3. FOS-Protein**

#### **3.1. Grundlagen FOS-Protein**

Die Nomenklatur für Gene und Proteine ist uneinheitlich, im Menschen werden Gene mit (in der Regel drei) Großbuchstaben, in kursiver Schrift bezeichnet werden, um sie von Proteinen zu unterscheiden, die mit Großbuchstaben bezeichnet werden (BRUFORD et al., 2020). Diese

Nomenklatur soll auch für Vertebraten übernommen werden (BRUFORD et al., 2020), weshalb sie im Folgenden für das Schwein und allgemein angewendet wird, d. h. das beschriebene Gen wird als *c-FOS* bzw. *FOS* bezeichnet, das Protein als FOS.

*C-FOS* ist ein Proto-Onkogen und wird zu den *Immediate Early*-Genen gezählt, deren mRNA auf einen Stimulus hin sehr schnell innerhalb von Minuten exprimiert wird (AHMAD & ISMAIL, 2002). Der Entdeckung der Proto-Onkogene ging die Entdeckung retroviraler Onkogene voraus, die als *v-ONC* bezeichnet werden (AHMAD & ISMAIL, 2002). Onkogene Retroviren codieren Nukleotidsequenzen mit zelltransformierenden Eigenschaften, sie induzieren morphologische Zellveränderungen *in vitro* und die Bildung von Neoplasien *in vivo* (CURRAN et al., 1983). Die viralen Onkogenesequenzen *v-ONC* stammen ursprünglich von homologen zellulären Nukleotidsequenzen des Wirtsorganismus ab, die durch die Viren integriert wurden (BISHOP, 1981). Diese homologen Wirts-DNA-Sequenzen werden daher als Vorgänger der viralen Onkogene als Proto-Onkogene oder auch als zelluläre Onkogene bezeichnet (BISHOP, 1981; CURRAN et al., 1983). Um den zellulären („*cellular*“) Charakter deutlich zu machen und sie von den viralen Onkogenen zu differenzieren, werden sie auch als *c-ONC* bezeichnet (AHMAD & ISMAIL, 2002). Beispiele für Proto-Onkogene sind *c-JUN*, *c-MYC*, *c-RAS*, *c-SRC* oder *c-FOS* (BISHOP, 1983; AHMAD & ISMAIL, 2002). Der Entdeckung des *c-FOS*-Proto-Onkogens geht die Isolation des nach seinen Entdeckern Finkel, Biskis und Jinkins benannten *FBJ murine osteogenic sarcoma virus* (FBJ-MSV) aus murinen Osteosarkomen voraus (FINDEL et al., 1966). CURRAN und TEICH (CURRAN et al.) identifizieren daraufhin ein 55 kDa Phosphoprotein des FBJ-MSV als dessen Onkogen und bezeichnen es erstmals als *FOS*. Sie wiesen homologe *c-FOS* Sequenzen dieses viralen Onkogens in murinen und auch in humanen Zellen nach (CURRAN et al., 1982).

*In vivo* induzieren zelluläre Onkogene in ihrer Grundstruktur keine Neoplasien, die starke Konservierung dieser Gene deutet vielmehr darauf hin, dass sie lebenswichtige Aufgaben im Organismus erfüllen (BISHOP, 1983). In geringer Kopienzahl sind sie wahrscheinlich in allen Tierarten zu finden und weisen zwischen verschiedenen Spezies eine hohe Homologie

auf (VAN STRAATEN et al., 1983; AHMAD & ISMAIL, 2002). Beispielsweise weisen das humane und das murine *c-FOS*-Gen eine Homologie von 90 % auf (HERRERA & ROBERTSON, 1996), das humane und das porcine FOS-Protein sind zu 84,8 % identisch (REINER et al., 2000). Die Expression von *c-FOS* ist in den meisten Zellen gering oder nicht nachweisbar, jedoch ist die Expression induzierbar (MÜLLER, 1986; PIECHACZYK & BLANCHARD, 1994). Die Induktion von *c-FOS* passiert dabei sehr schnell und nur temporär (AHMAD & ISMAIL, 2002). Die messenger RNA (mRNA) tritt innerhalb weniger Minuten mit einer kurzen Halbwertszeit von unter 30 Minuten in Erscheinung (SHYU et al., 1989; AHMAD & ISMAIL, 2002). *C-FOS* wird daher zu den *Immediate Early*-Genen gezählt (MORGAN & CURRAN, 1991).

FOS, das Proteinprodukt von *c-FOS*, ist ein nukleäres Phosphoprotein und besteht aus 380 Aminosäuren (CURRAN et al., 1984). Es bildet mit Proto-Onkogenen der JUN-Familie Heterodimere, die als Aktivatorprotein-1 (AP 1) an die entsprechende Bindungsstelle der Wirts-DNA binden und dort als Transkriptionsfaktor die Expression weiterer Gene induzieren (KARIN et al., 1997; HARRIS, 1998). Dadurch ist *c-FOS* Teil einer Signalkaskade, die durch extrazelluläre Stimulation zu einer Langzeit-Anpassung der Zelle führt (HARRIS, 1998).

### **3.2. FOS-Protein und Schmerz bzw. Nozizeption**

HUNT et al. (1987) beschreiben nach peripherer noxischer Stimulation in Ratten eine vermehrte FOS-Proteinexpression in Zellkernen von Neuronen des spinalen Dorsalhorns, seitdem ist die Analyse des *Immediate Early*-Gens *c-FOS* und seines Proteinproduktes FOS ein weit verbreitetes Mittel zur Untersuchung von Schmerz und Nozizeption (COGGESHALL, 2005). Allgemein wird das FOS-Protein als Marker für neuronale Aktivierung angesehen (TODD, 2010), wobei es nicht als spezifischer Marker nozizeptiver Zellaktivierung gilt (ABBADIE et al., 1994).

Eine vermehrte *c-FOS*- oder FOS-Expression in Nervenzellen des Dorsalhorns wird nach einer Vielzahl nozizeptiver Reize, einschließlich thermischer Reize (sowohl Wärme als auch Kälte), chemischer und mechanischer Reize, sowohl an viszeralen als auch an somatischen

Lokalisationen, nachgewiesen (COGGESHALL, 2005).

Bereits 20 Minuten nach kurzer peripherer, noxischer Stimulation kann FOS-Protein in postsynaptischen Neuronen des Dorsalorns vorübergehend immunhistochemisch nachgewiesen werden (HUNT et al., 1987). Der Protein-Peak tritt bei Ratten unabhängig von der Art des Schmerzreizes ca. ein bis zwei Stunden nach der Stimulation auf (SUN et al., 2004; BOJOVIC et al., 2015). FOS-positive Neurone treten nach kurzer peripherer Stimulation v. a. in Neuronen der oberflächlichen Laminae I und II des Rückenmarkes auf, in geringerem Maß auch in tieferen Laminae (BULLITT et al., 1992; LIMA et al., 1993; ABBADIE et al., 1994; MUNGLANI & HUNT, 1995). Dauer und Intensität des Reizes wirken sich in Ratten auf die Intensität der Färbung, die Anzahl und die Verteilung der FOS-positiven Zellkerne im Dorsalhorn aus (BULLITT et al., 1992; ABBADIE et al., 1994; YI & BARR, 1995). ABBADIE et al. (1994) berichten von einem Anstieg der Färbeintensität und der Anzahl immunreaktiver Neurone im Rückenmark sowie deren zahlenmäßige Zunahme in tieferen Laminae mit steigender Dauer und Intensität einer Wärmestimulation der Pfote. Eine Korrelation zwischen Intensität und Dauer eines noxischen Reizes und der Anzahl FOS-positiver Neurone finden auch YI und BARR (1995). Die Dauer der elektrischen Stimulation einer Hinterpfote verändert sowohl die Anordnung der FOS-positiven Zellen im Rückenmark als auch die Intensität der Färbung und den zeitlichen Verlauf der FOS-Expression (BULLITT et al., 1992). Nach elektrischer Stimulation über 3 s oder 20 Minuten erreicht die Anzahl FOS-positiver Neuronen 1,5–2,5 Stunden nach Stimulus ein Maximum v. a. in den Laminae I und II (BULLITT et al., 1992). Je länger die Stimulation durchgeführt wird, desto höher ist die Anzahl der gefärbten Neurone und desto stärker ist die Färbeintensität (BULLITT et al., 1992). Auch weitet sich das Verteilungsmuster immunreaktiver Neurone auf tiefere Laminae aus und die Expression hält länger an (BULLITT et al., 1992). Die Intensität des Schmerzreizes scheint einen bestimmten Schwellenwert überschreiten zu müssen, um FOS-Proteinexpression zu induzieren, z. B. führt eine intramuskuläre Injektion von hypertoner Kochsalzlösung beim Schwein oder leichte Temperaturstimulation bei der Ratte zu keiner erhöhten Expression (ABBADIE et al., 1994; SVENDSEN et al., 2005).

### 3.3. FOS-Protein und Schmerz beim Schwein

Immunhistochemische Bestimmungen von FOS-Protein zur Quantifizierung von Schmerz bzw. Nozizeption infolge peripherer noxischer Stimulation wurden auch im Schwein bereits angewendet (NYBORG et al., 2000; LYKKEGAARD et al., 2005; SVENDSEN et al., 2006; LYKKEGAARD et al., 2008). SVENDSEN et al. (2006) verwenden in juvenilen Schweinen eine immunhistochemische FOS-Evaluation, um den intramuskulären Injektionsschmerz durch ein Oxytetracyclinpräparat zu untersuchen, dessen Injektion als schmerzhaft beschrieben wird. In der Studie ist die FOS-Expression vergleichbar mit der von Tieren, die einer Isoflurannarkose unterzogen werden (SVENDSEN et al., 2006). In Einzeltieren ergibt die Untersuchung des intramuskulären Injektionsschmerzes durch hypertone Kochsalzlösung keine signifikante Änderung der FOS-Expression (SVENDSEN et al., 2005). Die Untersuchung von 10–12 Wochen alten Ferkeln unter Isoflurannarkose, die einer Laparotomie mit bzw. ohne Lokalanästhesie unterzogen werden, ergibt zwei Stunden nach der Operation signifikant erhöhte Zahlen FOS-positiver Zellen im Rückenmark von Tieren, denen keine Analgesie verabreicht wurde (LYKKEGAARD et al., 2005). Eine vorhergehende Injektion von Lokalanästhetika reduziert die Anzahl der FOS-positiven Zellen auf Werte, die vergleichbar mit den sham-operierten Tieren sind (LYKKEGAARD et al., 2005). Auch die intravenöse Injektion von Morphin reduziert die Anzahl FOS-exprimierender Zellen nach einer Laparotomie (LYKKEGAARD et al., 2008).

Auch zur Quantifizierung von Schmerz bzw. Nozizeption speziell bei der chirurgischen Saugferkelkastration mittels FOS-Messungen, wurden mehrere Studien veröffentlicht (NYBORG et al., 2000; LACKNER, 2003; SVENDSEN, 2006). Der Vergleich FOS-positiver Neurone in Rückenmarksschnitten von 4–7 Tage alten, wach kastrierten Ferkeln, die vor der Kastration eine Injektion von Bupivacain intrafunikulär und subkutan erhalten, zeigt eine deutliche Reduktion der FOS-Expression im Vergleich mit Tieren, denen keine Analgesie verabreicht wird (NYBORG et al., 2000). SVENDSEN (2006) erreicht durch die Anwendung einer CO<sub>2</sub>-Narkose vor der Kastration eine weitere Reduktion der immunreaktiven Neurone im

Vergleich zu NYBORG (2000) indem die Ferkel vor dem Eingriff für ein oder zwei Minuten in eine CO<sub>2</sub>-Kammer verbracht werden. Die Autoren schließen auf eine Schmerzreduktion durch die Kastration unter Lokalanästhesie (NYBORG et al., 2000) bzw. auf völlige Ausschaltung der Nozizeption durch eine CO<sub>2</sub>-Narkose (SVENDSEN, 2006). LACKNER (2003) untersucht in ihrer Dissertation Rückenmarksschnitte der Lendensegmente einzelner Ferkel, die im Alter von vier bzw. 28 Tagen unter Ketamin-Stresnil-Narkose kastriert wurden, auf FOS-Expression. Sie findet keine Unterschiede zu den nicht kastrierten Kontrolltieren (LACKNER, 2003). Lediglich ein Tier, das unter Propofol-Narkose kastriert wurde, zeigt erhöhte FOS-Expression (LACKNER, 2003). Da in der Arbeit nur eine geringe Probenzahl zur Verfügung steht und zudem nur geringe Unterschiede in der immunhistochemischen Untersuchung auftreten, können keine definitiven Aussagen mittels der FOS-Analyse getroffen werden.



## **III. MATERIAL- UND METHODENTEIL**

### **1. Zielsetzung des Versuchsvorhabens**

Ziel der vorliegenden Studie war es, das EEG-Reaktionsmuster und die FOS-Expression im spinalen Dorsalhorn bei unter 8 Tage alten Saugferkeln nach chirurgischer Kastration unter leichter Isoflurannarkose mit und ohne Lokalanästhesie mit verschiedenen Lokalanästhetika (Bupivacain 0,5 %, Lidocain 2 %, Mepivacain 2 % und Procain 4 %) zu untersuchen. Die vorliegende Studie ist Teil eines Verbundprojektes zur Untersuchung der Lokalanästhesie als Möglichkeit zur Schmerzausschaltung bei der Kastration von unter 8 Tage alten Ferkeln. Die Studie wurde durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung als Entscheidungshilfe in Auftrag gegeben, ob Lokalanästhesie zur Schmerzausschaltung bei der Saugferkelkastration zugelassen werden kann (Förderkennzeichen: 2817HS016, 2817HS013).

### **2. Genehmigung des Versuchsvorhabens**

Die Versuche wurden durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen ROB-55.2-2532.Vet\_02-19-11 genehmigt und wurden von Juni 2019 bis Februar 2020 durchgeführt. Die Versuchsdurchführung fand in Übereinstimmung mit der EU-Richtlinie 2010/63/EU und dem Deutschen Tierschutzgesetz (*TierSchG*, 2021) statt.

### **3. Versuchsdurchführung**

#### **3.1. Versuchstiere und -gruppen**

In den Versuch wurden 58 normalanatomische, männliche Ferkel (Piétrain x Deutsches Edelschwein / Deutsche Landrasse) über 1,4 kg (Mittelwert: 2,09 kg  $\pm$  0,4 kg) mit einem Lebensalter zwischen 3 und 7 Tagen (Mittelwert: 5,3  $\pm$  1,1 Tage) eingeschlossen. Trächtige Sauen wurden spätestens zwei Wochen vor der Geburt zur Abferkelung in die Klinik für Schweine der LMU transportiert. Den Ferkeln wurde innerhalb der ersten Lebensstunden ein oraler Eisenbolus (1 ml pro Ferkel;

URSOFERRAN® 150 mg/ml, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, Deutschland) verabreicht. Bis zum Versuchstag wurden die Tiere täglich auf ihren Gesundheitszustand überprüft und gewogen. In den Versuch wurden nur gesunde Ferkel miteinbezogen. Am Versuchstag wurden die Tiere randomisiert sechs verschiedenen Versuchsgruppen zugeordnet (Tab. 1).

**Tabelle 1: Übersicht Versuchsgruppen, verwendete Präparate, Wirkstoffe, Injizierte Volumina, Kastration +/-**

| Versuchsgruppe            | Procain (P)  | Lidocain (L)  | Bupivacain (B)  | Mepivacain (M)   | Natriumchlorid (NaCl)   | Handling (H) |
|---------------------------|--|---|---|--|---|--------------|
| <b>Präparat</b>           | Procaine hydrochloride 4 % - VMD, V.M.D. sa, Arendonk, Belgien | Xylocitin® 2 % Mibe GmbH Arzneimittel Brehna, Deutschland | Bupivacain 0,5 % JENA-PHARM, Mibe GmbH Arzneimittel Brehna, Deutschland | Mepidor® 20 mg/ml Injektionslösung für Pferde, Richter Pharma AG, Wels, Österreich | Isotone Kochsalzlösung 0,9 % Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland | -            |
| <b>Wirkstoff</b>          | Procain 4 %  | Lidocain 2 %  | Bupivacain 0,5 %  | Mepivacain 2 %   | NaCl 0,9 %  | -            |
| <b>Injektion je Seite</b> | 0,5 ml i.t.<br>0,5 ml s.c                                      | 0,5 ml i.t.<br>0,5 ml s.c                                 | 0,5 ml i.t.<br>0,5 ml s.c   | 0,5 ml i.t.<br>0,5 ml s.c  | 0,5 ml i.t.<br>0,5 ml s.c   | -            |
| <b>Kastration</b>         | +  | +   | +   | +  | +   | -            |
| <b>Tierzahl n</b>         | 9  | 10  | 9   | 10   | 10  | 10           |

### 3.2. Versuchsablauf

Einen Überblick über den zeitlichen Versuchsablauf gibt SALLER et al. (2020). Die Versuchsdurchführenden waren während des Versuches geblindet, ausser bei der Handling-Gruppe.

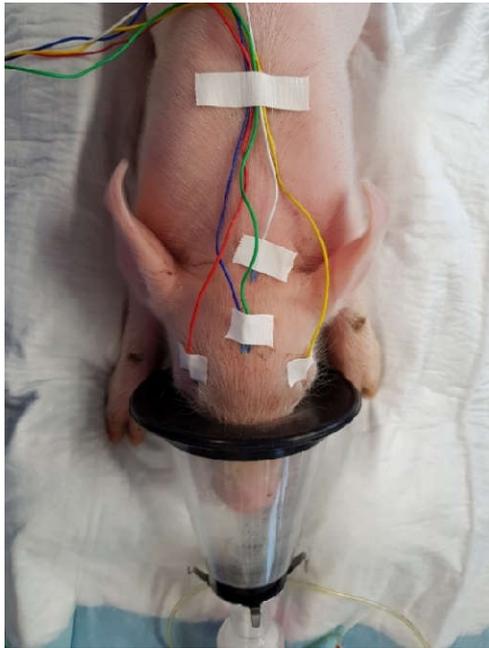
#### 3.2.1. Vorbereitende Eingriffe

30 Minuten vor Versuchsbeginn wurde eine lokalanästhetische Creme (Emla®, AstraZenecea GmbH, Wedel, Deutschland) in dem für die Inzision der Präparation der A. carotis communis vorgesehenen Bereich auf den Hals aufgetragen. Die Narkose wurde mittels Maske mit 5 % Isofluran (Isofluran Baxter vet., Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim,

Deutschland) und einer Flussrate von 3 L/Minute Sauerstoff eingeleitet. Nach vollständiger Relaxation mit Ausfall des Stellreflexes wurde die inspiratorische Isoflurankonzentration (FI Iso) auf 3 % reduziert. In- und expiratorisches Isofluran wurden während des gesamten Versuches gemessen (Vamos® plus, Dräger Medical Deutschland GmbH, Unterhaching, Germany). Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) wurde aufgetragen und Watte wurde in den Ohren platziert, um akustische Reize zu unterdrücken. Zur kontinuierlichen Erfassung der Sauerstoffsättigung wurde ein Pulsoximeter (2500A VET, Nonin Medical Inc., Plymouth, MN, USA) am Schwanz angebracht.

### **3.2.2. EEG-Ableitung und Aufzeichnung**

Zur Ableitung des EEGs wurden 5 Nadelelektroden aus rostfreiem Stahl (27 Gauge, Technomed, Maastricht-Airport, Niederlande) subkutan auf dem Schädel des Ferkels platziert. Die Messelektroden wurden beidseits am Kopf, dorsal der *Orbita* im Bereich des *Os Frontale*, angebracht. Zwei Referenzelektroden wurden direkt nebeneinander parallel in der Medianen auf dem höchsten Punkt des Schädels platziert. Eine Neutralelektrode wurde im Nacken des Ferkels gesteckt. Die Position der Nadelelektroden wurden mit Klebestreifen gesichert (siehe Abb. 4). Es wurden zwei bipolare Kanäle mit einer Abtastrate von 128 Hz abgeleitet. Die Signale wurden dabei fortlaufend mittels einem kommerziellen EEG-Monitor (Narcotrend®, MT Monitortechnik GmbH & Co., KG, Bad Bramstedt) aufgezeichnet.



**Abbildung 4: Platzierung und Fixation der EEG-Nadelelektroden**

Zur weiteren Versuchsdurchführung wurde das Ferkel in Rückenlage positioniert und zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur auf Wärmehandschuhen gelagert.

Für die invasive Blutdruckmessung und die Blutentnahmen erfolgte die Präparation der *A. carotis communis* und der *V. jugularis externa* über einen ca. 3 cm langen Hautschnitt, der zuvor mit 0,3 ml Lidocain s. c. (Lidocainhydrochlorid 2 %, bela-pharm Arzneimittelfabrik, Vechta, Deutschland) betäubt wurde. Mittels eines Mikro-Tip-Katheters in der *A. carotis communis* und entsprechender Software wurden Blutdruck und Herzfrequenz aufgezeichnet. Über eine Schleuse in der *V. jugularis externa* wurden regelmäßig Blutproben entnommen und kontinuierlich Flüssigkeit infundiert (genaue Beschreibung der Vorgehensweise und Publikation der Ergebnisse bei SALLER et al. (2020)).

### **3.2.3. Einstellung der Narkosetiefe**

Ab dem Zeitpunkt der Narkoseeinleitung bis zum Ende der Präparation der Halsgefäße wurde das FI Iso zunächst kontinuierlich bis auf 1,5 % reduziert. Die Narkosetiefe für das Experiment wurde dann mittels der Reaktion auf einen nozizeptiven Zwischenzehenreiz an der Hintergliedmaße für jedes Tier individuell eingestellt. Ziel war es, das Narkosestadium III.1 nach

Guedel (Hypnosestadium) zu erreichen. Dafür wurde eine anatomische Pean-Klemme auf die Haut des Zwischenzehenspaltes einer Hinterklaue aufgesetzt, maximal bis zum Einrasten der ersten Zacke geschlossen und für maximal 5 s belassen. Traten Bewegungen vor dem Einrasten oder vor dem Ablauf von 5 s auf, wurde die Klemme entfernt. Traten infolge des Schmerzreizes Bewegungen des Rückens oder mehrerer Gliedmaßen, anhaltende Beinbewegungen oder Aufstehversuche auf, wurde FI Iso um 0,2 % erhöht und 3 Minuten gewartet, bis ein erneuter Zwischenzehenstimulus an der kontralateralen Hinterklaue angewendet wurde. Blieb eine motorische Reaktion aus, wurde FI Iso um 0,2 % erniedrigt und 3 Minuten bis zum nächsten Reiz abgewartet. Eine einmalige motorische Reaktion auf den Stimulus wurde als adäquate Narkosetiefe definiert. Die mittels dieses Vorgehens ermittelte mittlere FI Iso für die Tiere, die im EEG ausgewertet wurden, war  $1,6 \pm 0,3 \%$ , für die Tiere, die in die FOS-Analyse einbezogen wurden, war FI Iso  $1,7 \pm 0,3 \%$ .

#### **3.2.4. Injektionen**

Drei Minuten nachdem die adäquate Narkosetiefe erreicht war, erhielten alle Ferkel mit Ausnahme der Handling-Tiere eine Injektion pro Hoden von 0,5 ml i. t. und 0,5 ml s.sc. Die Injektionen wurden mit Procainhydrochlorid 4 % (procaine hydrochloride 4 % - VMD, V.M.D. sa, Arendonk, Belgien), Lidocainhydrochlorid 2 % (Xylocitin® 2 %, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland), Bupivacainhydrochlorid 0,5 % (Bupivacain 0,5 % JENAPHARM®, Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland) oder Mepivacainhydrochlorid (Mepidor® 20 mg/ml Injektionslösung für Pferde, Richter Pharma AG, Wels, Österreich) durchgeführt. Da in einem Vorversuch (SALLER et al., 2020) die Beeinflussung der hämodynamischen Messwerte durch die Verwendung von Sperrkörpern demonstriert wurde, wurden alle Lokalanästhetika ohne Sperrkörper verwendet.

Zwei Kontrollgruppen wurden in die Studie eingeschlossen. Als „Positivkontrolle“ diente eine Gruppe, in der 0,9 %ige Kochsalzlösung appliziert wurde (NaCl 0,9 % Ecoflac® plus, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Als „Negativkontrolle“ diente eine Gruppe, in der die Ferkel lediglich fixiert wurden, aber alle Eingriffe nur simuliert wurden.

Die Injektionen wurden mit einer Automatikspritze (HSW ECO-MATIC®, Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und einer Kanüle der Stärke 25G (0,5x16 mm, B. Braun TravaCare GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) vorgenommen. Der Hoden wurde dafür mit Daumen und Zeigefinger leicht fixiert um i. t. zu injizieren, anschließend wurde eine Hautfalte über dem Hoden gebildet und die Kanüle so weit retrahiert, bis die Kanülenspitze subkutan zu liegen kam. Hier wurde die s.sc. Injektion durchgeführt. In der Handling-Gruppe wurde die Injektion durch leichten Druck einer gedeckelten Kanüle auf den Hoden simuliert. Die Injektion dauerte ca. 9 s pro Hoden.

### **3.2.5. Kastration**

20 Minuten nach der Injektion bzw. nach der simulierten Injektion wurde der Hautschnitt über dem Skrotum für die chirurgische Kastration durchgeführt bzw. simuliert. Mit zwei sagittalen Schnitten bis auf die viszerale Schicht der *Tunica vaginalis*, wurde das *Skrotum* über beiden Hoden mit einem Skalpell eröffnet und die Hoden durch leichten Druck durch die Öffnung vorgelagert. Zur Stabilisierung von Blutdruck und Herzfrequenz folgte eine Wartezeit von zwei Minuten, dies ermöglichte die separate Beurteilung der Nozizeption nach dem Hautschnitt und nach der Samenstrangdurchtrennung. Anschließend wurden die exponierten Hoden nacheinander händisch fixiert und der Samenstrang und seine begleitenden Strukturen durch einen Emaskulator durchtrennt. In der Handling-Gruppe wurde der Hautschnitt durch leichtes Streichen der stumpfen Skalpellseite über die Hodenhaut angedeutet, für die Simulation der Samenstrangdurchtrennung erfolgte lediglich eine Fixation analog zu den Lokalanästhesiegruppen und der Schluss des Emaskulators ohne Hodenkontakt. Die Dauer eines Hautschnitts inkl. der Vorverlagerung des Hodens sowie die Durchtrennung des Samenstranges betragen jeweils ca. 6 s pro Hoden.

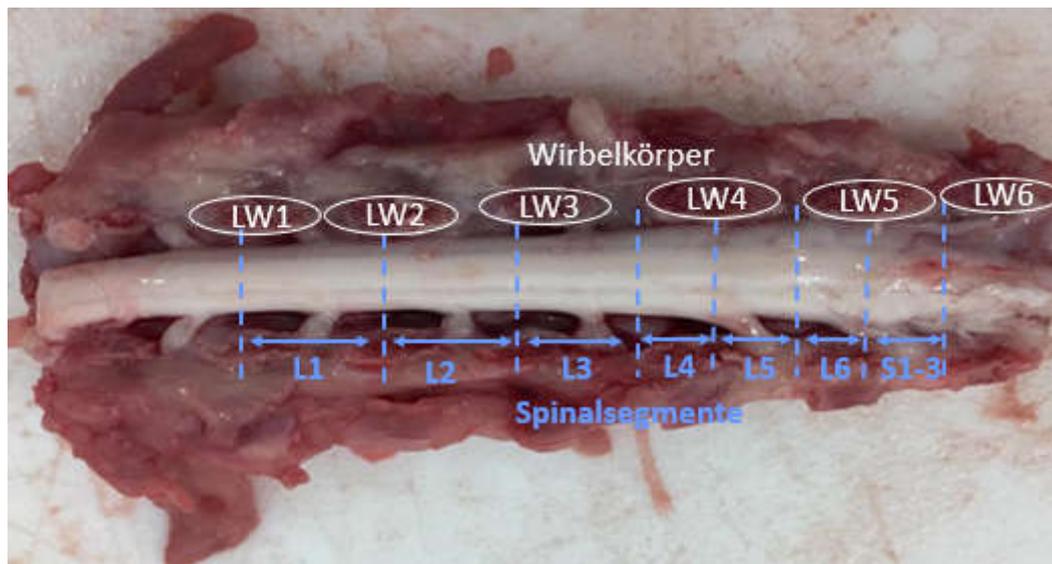
Um die Narkosetiefe erneut zu überprüfen, wurde vier Minuten nach Durchtrennung der Samenstränge ein weiterer ZZR durchgeführt und die Reaktion beobachtet. Die Narkose wurde für weitere 90 Minuten aufrechterhalten. Anschließend erfolgte die Euthanasie in tiefer Allgemeinnarkose durch Pentobarbital i.v. (Euthadorm 500 mg/ml Injektionslösung, CP Pharma Burgdorf, Burgdorf, Deutschland).

### 3.2.6. Entnahme der Rückenmarkssegmente

Unmittelbar nach der Euthanasie wurde zunächst die gesamte Wirbelsäule mit angrenzenden Strukturen ab dem letzten Thorakalwirbel bis zu den Kreuzwirbeln entnommen, die letzte Rippe und das Kreuzbein dienten als Orientierungspunkte. Der Wirbelkanal wurde anschließend vorsichtig mit einer Schere beidseits horizontal eröffnet, ohne das Rückenmark zu verletzen. Dadurch konnte der dorsale Teil der das Rückenmark umgebenden Strukturen vorsichtig abgehoben und das Rückenmark freigelegt werden (Abb. 5). Anschließend wurde es vorsichtig aus dem verbliebenen Wirbelkanal gehoben.

Während des embryonalen Stadiums bestehen noch enge Lagebeziehungen zwischen Rückenmarkssegmenten und den entsprechenden Wirbelkörpern (STOFFEL, 2021). Durch das unterschiedliche Wachstum dieser Strukturen kommt es zum sog. „*Ascensus medullae spinalis*“ wodurch sich die Lage der Rückenmarksegmente im Verhältnis zu den korrespondierenden Wirbeln, nach kranial verschiebt (NICKEL et al., 1991; STOFFEL, 2021). Deutlich zum Ausdruck kommt dies im Bereich des Lenden- und Kreuzmarkes (NICKEL et al., 1991) (Abb. 5). So wurde das Rückenmark mittels einer Mikrotomklinge, unter Zuhilfenahme der anatomischen Strukturen als Orientierung, gemäß der von NICKEL et al. (1991) beschriebenen Segmenttopographie im Schwein in Lenden- und Sakralsegmente geteilt (Abb. 5).

Die Lendensegmente L1, L2, L3 sowie das Sakralsegment S1–3 wurden für die weitere Untersuchung entnommen. In der Literatur (NICKEL et al., 1991; LAKOMY et al., 1997; KALECZYC et al., 2002; BOTTI et al., 2006; SIENKIEWICZ, 2010) wird angegeben, dass die Afferenzen der sensiblen Nerven des Hodens vornehmlich in diesen Rückenmarkssegmenten enden, in einer eigenen Vorstudie (Ergebnisse nicht präsentiert) wurden in den ausgewählten Segmenten die höchsten FOS-Scores festgestellt.



**Abbildung 5: Freigelegtes Rückenmark mit Lokalisation der Lendenwirbel (LW1–LW6) und der Spinalsegmente (L1–L6, S1–3)**

Die Segmente L1, L2 und L3 wurden transversal halbiert, der kaudale Teil ging in die immunhistochemische FOS-Evaluierung ein, der kraniale Teil wurde für weitere Untersuchungen archiviert. Von dem S1–3-Segment wurden kranial und kaudal jeweils ca. 2 mm für weitere Untersuchungen archiviert, der zentrale Teil ging in die FOS-Evaluierung ein.

## 4. Datenauswertung und Statistik

### 4.1. Statistische Auswertung des EEG

Von jedem Ferkel wurden aus der fortlaufenden EEG-Aufzeichnung vier Datensätze generiert, d.h. es wurden jeweils Zeitspannen von 90 s nach dem Zwischenzehenreiz (ZZR), nach der Injektion, nach dem Hautschnitt und nach der Samenstrangdurchtrennung ausgewertet. Falls mehrere ZZR zur Bestimmung der Narkosetiefe angewendet wurden, wurde der Reiz ausgewertet, bei dem die Narkosetiefe als adäquat definiert wurde. Da Injektion, Hautschnitt und Durchtrennung des Samenstranges jeweils beidseitig und im Abstand weniger Sekunden durchgeführt wurden, wurden 90 s ab dem Start des zweiten, bilateral durchgeführten Stimulus ausgewertet.

Für die Analyse wurde zunächst das Roh-EEG in einem Zeitraum von 90 s post Stimulus visuell nach Burst-Suppression Mustern oder Messartefakten

inspiziert. Alle Datensätze in denen Burst-Suppression oder Messartefakte auftraten, wurden von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Von insgesamt 196 Messungen konnten 27 aufgrund des Auftretens von Burst-Suppression-Episoden, auch wenn diese während der Messung nur kurzzeitig auftraten, nicht in die Auswertung aufgenommen werden. Wie beschrieben, weichen die EEG-Merkmale des Burst-Suppression-Musters stark von den EEG-Mustern unter Vollnarkose ohne Burst-Suppression ab (NIEDERMEYER et al., 1999). Sie können daher zu irreführenden Ergebnissen bei der Spektralanalyse führen (SCHWILDEN & STOECKEL, 1987). Drei weitere Messungen mussten wegen Messartefakten ausgeschlossen werden. Als Artefakte werden Potentialschwankungen im EEG bezeichnet, deren Quelle nicht das Gehirn ist (SCHULZ, 2002). Man unterscheidet biologische Artefakte, z. B. Aktivität von Herz- oder Skelettmuskeln, Bewegungen des Patienten oder Berührungen, und technische Artefakte, z. B. Wackeln an einer Elektrode oder elektrische Geräte im Umfeld (SCHULZ, 2002; KAISER et al., 2021).

#### **4.1.1. Darstellung der EEG-Reaktion im Spektrogramm**

Der Versuchsablauf war in allen Tieren bis einschließlich zur Anwendung des ZZR identisch, weshalb für die Auswertung dieses Reizes die Daten aller Tiere zusammengefasst werden konnten. Daraus resultierte eine weitaus höhere Anzahl an Stichproben, wodurch eine höhere statistische Aussagekraft erreichte wurde.

Die spektrale Leistungsdichte der ausgewählten EEG-Datensätze wurde mit der MATLAB-Funktion *pwelch* berechnet. Für die Frequenzauflösung wurde 1 Hz für die Reaktion auf Injektion, Hautschnitt und Samenstrangdurchtrennung gewählt. Aufgrund der höheren Stichprobengröße für die Auswertung des ZZR, konnte hier eine höhere Frequenzauflösung von 0,25 Hz gewählt werden. Dies ermöglichte eine genauere Darstellung des Reaktionsmusters im Spektrogramm. Um den zeitlichen Verlauf der spektralen EEG-Muster darzustellen, wurden Spektrogramme erstellt. Die Ergebnisse zeigen die Änderungen der EEG-Power im Frequenzbereich 0–30 Hz über 90 s nach dem Beginn eines Schmerzstimulus im Verhältnis zur Baseline. Die Baseline wurde als Zeitraum 50–40 s vor dem Stimulus definiert und wurde über diese Zeit

gemittelt. Der Wert nach dem Stimulus wurde durch den Baseline-Wert geteilt. Werte  $<1$  zeigen daher erniedrigte Power nach dem Stimulus an, Werte  $>1$  zeigen einen Anstieg der Power nach dem Stimulus an. Der Wert 1 bedeutet, dass keine Veränderung nach dem Stimulus im Vergleich zur Baseline auftrat. Die Änderungen der Power wurden farbcodiert dargestellt: Grün- und Blautöne bedeuten erniedrigte Power, Orange- und Rottöne codieren erhöhte Power, dunkles Rot zeigt beispielsweise eine Verdopplung der Power an, Dunkelblau eine Halbierung der Power. Der Farbcode ist neben den Spektrogrammen abgebildet. Dieser Auswertungsansatz ermöglichte es, die durch die Stimuli induzierten EEG-Veränderungen detailliert im gesamten Frequenzbereich von 0–30 Hz darzustellen und in ihrem zeitlichen Verlauf zu zeigen. Da für die Auswertung die Änderungen im Einzeltier im Vergleich zur Baseline berechnet wurden, konnten individuelle Unterschiede in der EEG-Grundaktivität der Tiere bei der Auswertung vernachlässigt werden.

Die Spektrogramme wurden aus 5 s-EEG-Abschnitten abgeleitet, die sich um jeweils 4 s überlappten. Für jedes Pixel der Spektrogramme wurde ein gepaarter Wilcoxon Rangsummen-Test durchgeführt, indem die Leistung der betrachteten Frequenz zum beobachteten Zeitpunkt mit der Leistung der jeweiligen Frequenz während der Baseline verglichen wurde. Pixel, die entweder einen p-Wert  $<0,05$  (Auswertung der gepoolten Reaktion auf den ZZR) oder einen p-Wert  $<0,1$  (Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen, alle anderen Reize) aufwiesen, und zusätzlich in Clustern auftraten, wurden als signifikant bewertet und sind im Spektrogramm in Vollfarbe dargestellt. Der Cluster-Ansatz basiert auf der Annahme, dass sich Effekte im EEG zeitlich und räumlich als Cluster anhäufen, und angrenzende Zeitpunkte ähnliche Muster zeigen (SASSENHAGEN & DRASCHKOW, 2019). Daher wurde eine Clustergröße definiert, d. h. ein 4 s x 2 Hz-Cluster für die gepoolte Reaktion auf den ZZR bzw. ein 4 s x 4 Hz-Cluster für die anderen Reize. Um die Veränderungen in der EEG-Power im zeitlichen Verlauf zu verfolgen, wurde die Area under the curve (AUC) zusammen mit 10000-fach gebootstraptem 95 %-Konfidenzintervallen verwendet. Wenn das 95 %-Konfidenzintervall die 0,5-Linie nicht kreuzte, wurde dieses Ergebnis als signifikant betrachtet (HENTSCHE & STÜTTGEN, 2011), sofern es in

mindestens zwei benachbarten Zeitpunkten auftrat, also auch wieder gruppiert. Dieser Ansatz wurde bereits für die Berechnung der AUC als auch für andere statistische Maße verwendet (AKEJU et al., 2014; KREUZER et al., 2020).

#### **4.1.2. Vergleich der Früh- und Spätreaktion**

Um einen statistischen Vergleich zwischen der NaCl-Gruppe und den weiteren Versuchsgruppen anzustellen, wurden die Früh- und Spätreaktion der NaCl-Gruppe mit den anderen Gruppen verglichen. In der NaCl-Gruppe traten während der „Frühreaktion“, ca. 5–10 s post Stimulus, primär Änderungen im Bereich 5–15 Hz und während der „Spätreaktion“, ca. 30–40 s post Stimulus, primär Änderungen im Bereich 20–30 Hz auf. Der Medianwert der Power des Frequenzbereiches 5–15 Hz im Zeitraum 5–10 s post Stimulus und der Medianwert der Power des Frequenzbereiches 20–30 Hz im Zeitraum 30–40 s post Stimulus in der NaCl-Gruppe wurde mit den Medianwerten dieser Zeiträume in den anderen Versuchsgruppen mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Für die statistische Analyse wurde MATLAB R2017a verwendet. Für die AUC-Berechnung fanden zusätzlich Funktionen aus der „Measures of the Effect Size Toolbox“ Anwendung (HENTSCHKE & STÜTTGEN, 2011). Die Streudiagramme wurden mit der MATLAB-Funktion „plotSpread“ erstellt.

### **4.2. FOS-Protein**

#### **4.2.1. Histologische Gewebeparbeitung, histochemische Färbung und Immunhistochemie**

Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in 4-prozentiger neutral gepufferter Formaldehydlösung für mind. 48 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach dieser Zeit wurden die Proben in 70%igen Ethanol verbracht und anschließend in einer Entwässerungsmaschine (Leica ASP300S, Leica, Wetzlar, Germany) mittels aufsteigender Alkohol-/Xylolreihe (Tab. 2) dehydriert, gecleared und mit Paraffin infiltriert. Die Einbettung des entwässerten Gewebes in Paraffin (ca. 70 C) erfolgte dabei manuell mit Hilfe einer beheizbaren Paraffinausgießstation (Leica EG 1150 H). Nach der Aushärtung der Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte

wurden, vom kranialen Anschnitt der Spinalsegmente ausgehend, mittels eines Rotationsmikrotoms (Leica, RM2245) Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 2 µm angefertigt. Die Schnitte wurden direkt in ein raumtemperiertes und danach in ein warmes (48 °C) Wasserbad transferiert, faltenfrei auf Objektträger aufgezogen und über Nacht im Wärmeschrank (ca. 37 °C) getrocknet, um Formalin-fixierte-Paraffin-eingebettete (FFPE)-Schnitte zu erhalten.

Um Hämatoxylin-Eosin (HE)-gefärbte Gewebeschnitte zu fertigen, die als Überblick der Morphologie der Gewebeschnitte dienen, erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte in absteigender Alkoholreihe (Tab.2). Anschließend wurde pro Block ein Schnitt mit Hämatoxylin-Eosin (Hämalaun nach Mayer) gemäß Standardprotokoll gefärbt und anschließend mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Die gefärbten Schnitte wurden mit einem Eindeckautomaten (CTM6, Thermo Scientific, USA) mit Cytoseal™XYL (Thermo Scientific, USA) eingedeckt.

**Tabelle 2: Entparaffinierung der Schnitte vor HE-Färbung mittels absteigender Alkoholreihe**

| Schritt | Reagenz     | Inkubationszeit [min] |
|---------|-------------|-----------------------|
| 1       | Xylol       | 2                     |
| 2       | Xylol       | 2                     |
| 3       | Isopropanol | 2                     |
| 4       | Isopropanol | 2                     |
| 5       | Alkohol 96% | 2                     |
| 6       | Alkohol 70% | 2                     |

Die immunhistochemische Reaktion wurde vollautomatisch im Färbeautomaten Leica Bond RX<sup>m</sup> durchgeführt. FFPE-Schnitte wurden dabei zunächst entparaffiniert und anschließend mit Citrat pH 6 (Bond Epitope Retrieval Solution 1, AR9961, Leica Biosystems) bei 72 °C einer 30-minütigen Vorbehandlung zur Demaskierung der Epitope unterzogen. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid 5 Minuten inkubiert. Hierauf folgte die 15-minütige Inkubation der Gewebeschnitte mit dem polyklonalen Primärantikörper Kaninchen-Anti-c-fos Antikörper (ab209794). Dieser wurde 1:200 verdünnt

mit Bond™ Primary Antibody Diluent (AR9352). Zur Signalvisualisierung wurde das Bond DAB Polymer Refine Detection Kit (DS9800) eingesetzt. Die Positivreaktion wurde durch das im Kit enthaltene Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) als braunes Präzipitat sichtbar gemacht. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, erfolgte die Gegenfärbung durch das ebenfalls im Kit enthaltene Hämatoxylin. Zwischen den beschriebenen Schritten erfolgten jeweils mehrere Waschschriffe mit Bond Waschpuffer (Leica Biosystems) und/oder destilliertem Wasser (Tab. 3).

**Tabelle 3: Immunhistochemisches Protokoll**

| Schritt | Reagenz                         | Inkubationszeit [min] |
|---------|---------------------------------|-----------------------|
| 1       | Wasserstoffperoxid              | 5                     |
| 2       | Kaninchen-Anti-c-fos Antikörper | 15                    |
| 3       | Polymer                         | 8                     |
| 4       | Mixed DAB Refine                | 10                    |
| 5       | Hämatoxylin                     | 5                     |

Nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung erfolgte die manuelle Entwässerung der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe und der Eindeckvorgang mit Cytoseal™XYL (Thermo Scientific, USA) mittels Eindeckautomat (CTM6, Thermo Scientific, USA). Für die anschließende Auswertung erfolgte die Digitalisierung der Schnitte mittels eines Scanners für Mikroskop-Objekträger Aperio®AT2 (Leica Biosystems). Die Auswertung wurde mit dem Auswertungsprogramm Aperio Image Scope x64 (Leica Biosystems) durchgeführt.

#### 4.2.2. Semiquantitativer Score

Für die Auswertung der FOS-Expression wurde eine Methode, die bereits bei SVENDSEN et al. (2005) angewendet wurde, modifiziert. Die verwendete Färb- und Auswertungsmethode wurde zunächst bei 7 Tieren in einer Vorstudie validiert (Ergebnisse nicht präsentiert), um einen semiquantitativen Bewertungsansatz für gefärbte FFPE-Gewebeschnitte zu

entwickeln und zu definieren. Bei jedem Tier wurden vier Gewebeschnitte aus verschiedenen Rückenmarkssegmenten (L1, L2, L3, S1-3) ausgewertet. Die Gesamtfläche des rechten und linken Dorsalhorns des Rückenmarkes wurde in die Auswertung einbezogen (Abb. 7). Die Ergebnisse der Vorstudie zeigten eindeutig die höchsten Scores bei Tieren, die ohne Analgesie kastriert wurden. Daher wurde dieser methodische Ansatz als adäquat für die Auswertung befunden und für die weitere Auswertung verwendet. Das Dorsalhorn, bzw. die für die Auswertung herangezogene Fläche, wurde definiert als die graue Substanz dorsal einer horizontalen Linie durch den Zentralkanal des Rückenmarks (Abb. 6).



**Abbildung 6: Ausgewertete Fläche für den FOS-Score.**

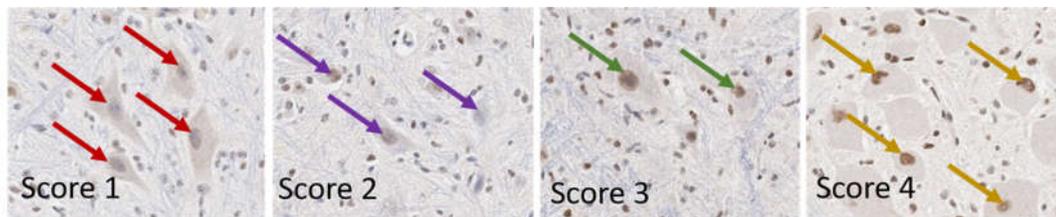
Der Bewertungsansatz umfasste zwei Parameter:

- die vorherrschende Färbintensität der Zellkerne d. Neurone (keine, leichte, mäßige, starke Färbintensität)
- den Prozentsatz FOS-positiver Neurone ( $\leq 25\%$ ,  $\leq 50\%$ ,  $100\%$ )

Die Kombination dieser Parameter ergab einen semiquantitativen Bewertungsscore von 0–5 (Tab. 4). Beispielhafte Bilder der aufgetretenen Scores sind in Abb.7 dargestellt.

**Tabelle 4: Semiquantitativer FOS Bewertungsscore**

| Bewertungsscore | Parameter                                  |
|-----------------|--|
| Score 0         | Keine Färbung                              |
| Score 1         | Leichte Färbung in $\leq 25$ % der Neurone |
| Score 2         | Leichte Färbung in $\leq 50$ % der Neurone |
| Score 3         | Mäßige Färbung in $\leq 50$ % der Neurone  |
| Score 4         | Starke Färbung in $\leq 50$ % der Neurone  |
| Score 5         | Starke Färbung in 100 % der Neurone        |

**Abbildung 7: Beispielbilder für Score 1–4 des FOS-Scores.**

Für jedes Ferkel wurde der mediane FOS-Score der vier Gewebeschnitte ermittelt. Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde die NaCl-Gruppe mit den Lokalanästhesie-Gruppen und der Handling-Gruppe verglichen.



## IV. ERGEBNISSE

### 1. EEG-Untersuchungen

Für die Evaluierung der EEG-Reaktionen auf die Schmerzreize konnten Datensätze von 49 Ferkeln verwendet werden. Die Tiere hatten ein mittleres Alter von  $5,3 \pm 1,1$  Tage und wogen im Durchschnitt  $2,14 \text{ kg} \pm 0,45 \text{ kg}$ .

Von den insgesamt 196 Messzeiträumen (vier je Ferkel) mussten 30 Datensätze aus der Analyse ausgeschlossen werden. In 27 Messzeiträumen traten während der 90 s post Stimulus mindestens kurzzeitig Burst-Suppression-Episoden auf, 3 Messzeiträume wurden aufgrund von Artefakten nicht ausgewertet. Eine Übersicht der Zahl der Datensätze, die pro Gruppe ausgewertet wurden, gibt Tabelle 5.

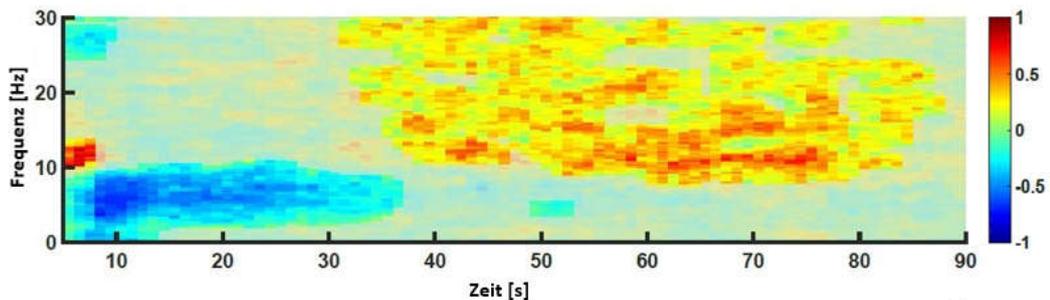
**Tabelle 5: Übersicht der im EEG ausgewerteten Anzahl Tiere in den Versuchsgruppen**

| Versuchsgruppe           | Zwischen-<br>zehenreiz | Noxischer Reiz                 |             | Samen-<br>strang-<br>durch-<br>trennung |
|--------------------------|------------------------|--------------------------------|-------------|---|
|                          |                        | Injektion                      | Hautschnitt |   |
| NaCl, n=8 Tiere          | n=44                   | n=7                            | n=6         | n=6                                     |
| Lidocain, n=10 Tiere     |                        | n=7                            | n=8         | n=7                                     |
| Bupivacain, n=9 Tiere    |                        | n=9                            | n=9         | n=9                                     |
| Mepivacain, n=6 Tiere    |                        | n=5                            | n=5         | n=5                                     |
| Procain, n=8 Tiere       |                        | n=6                            | n=5         | n=5                                     |
| Handling, n=8 Tiere      |                        | n=7                            | n=8         | n=8                                     |
| <b>Gesamt n=49 Tiere</b> |                        | <b>Gesamt n=166 Datensätze</b> |             |   |

Die Ergebnisse der EEG-Reaktionen sind als Spektrogramme dargestellt. Die Bereiche in Vollfarbe kennzeichnen dabei Frequenz- und Zeitabschnitte mit signifikanten, in Clustern auftretenden Unterschieden im Vergleich zwischen post-Stimulus-Messungen und der Baseline. Die Farbskala zeigt die Stärke der Leistungsänderungen nach dem Reiz im Vergleich zur Baseline an. Der Stimulus beginnt jeweils bei  $t=0$ .

### 1.1. EEG-Reaktion auf den Zwischenzehehreiz

Die Auswertung der gepoolten Daten von  $n=44$  Ferkeln ergab im Spektrogramm signifikante, in Clustern auftretende Änderungen nach dem ersten ZZR. Der Beginn des ersten ZZR liegt bei  $t=0$ . In den ersten ca. 5 s nach Beginn des Reizes zeichnet sich eine starke Zunahme von Wellen im Bereich von ca. 10–15 Hz (Alpha- und niedriges Beta-Band) ab. Darauf folgt ein signifikanter Abfall der Power im Bereich von ca. 0,5–8 Hz (Delta- und Theta-Band, „frühe Reaktion“), welcher bis etwa 35 s nach Beginn der Stimulation andauerte. Daran schließt sich ein Leistungsanstieg in Frequenzen  $>10$  Hz an, der bis ca. 90 s nach  $t=0$  anhält („späte Reaktion“). Zusammenfassend kann das Reaktionsmuster im Spektrogramm auf den ZZR1 als biphasisch beschrieben werden, mit einer Früh- und einer Spätreaktion. Abb. 8 zeigt das Spektrogramm der Poweränderung im Vergleich zur Baseline.



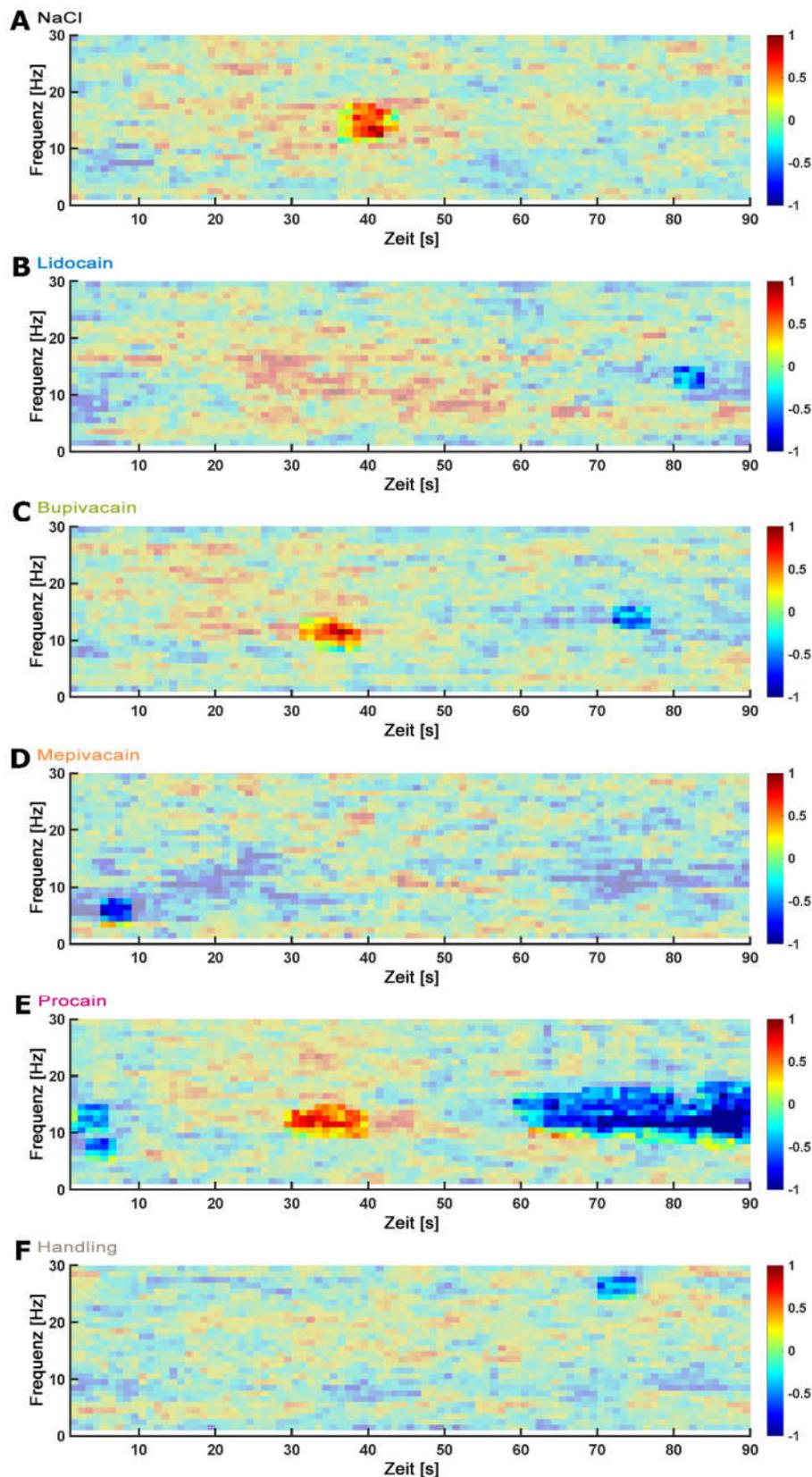
**Abbildung 8: Spektrogramm der Poweränderung im EEG nach dem ZZR über 90 s post Stimulus ( $n=44$ ). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt.**

### 1.2. EEG-Reaktion auf die Injektion

Die spektralen Reaktionsmuster auf die kombinierte i.t. und s.c. Injektion fallen bei den einzelnen Substanzen unterschiedlich aus. Die NaCl-Gruppe reagiert ca. 30–40 s nach Beginn der Injektion mit einer signifikanten Aktivierung von Frequenzen im Bereich von ca. 10–15 Hz. Die Bupivacain-Gruppe reagiert nach ca. 30–40 s mit einer ähnlichen Aktivierung im ca. 10–15 Hz-Bereich. Zusätzlich wird eine Reduktion in einem ähnlichen Frequenzbereich kurzzeitig signifikant, ca. 80 s nach der Injektion.

In der Lidocain-Gruppe zeigt sich ebenfalls diese späte, ca. 80 s nach der

Injektion einsetzende, kurze signifikante Reduktion im Frequenzbereich von ca. 10–15 Hz. Die Mepivacain-Gruppe reagiert unmittelbar nach dem Injektionsreiz mit einer kurzen, signifikanten Leistungsminderung in niedrigen Frequenzen von <10 Hz. In der Procain-Gruppe tritt unmittelbar nach Injektionsbeginn eine kurze, signifikante Verminderung von Frequenzen von ca. 8–12 Hz auf. 30–40 s nach  $t=0$  erfolgt eine Aktivierung der Frequenzen von ca. 10–15 Hz. Im weiteren Verlauf fällt eine anhaltende Reduktion der 10–15 Hz-Oszillationen auf, die etwa 60 s nach  $t=0$  einsetzt und bis 90 s und offenbar darüber hinaus, anhält. Auch in der Handling-Gruppe tritt ca. 70 s nach Beginn des Stimulus kurzzeitig eine Aktivierung hoher Wellenfrequenzen von ca. 25–30 Hz auf. Ansonsten zeigt sich das Gesamtbild dieser Versuchsgruppe gleichbleibend homogen ohne Änderungen im Vergleich zur Baseline. Abb. 9 zeigt die Spektrogramme der Poweränderungen im Vergleich zur Baseline über einen Zeitraum von 90 s nach Beginn der i.t.- und s.sc.-Injektion. Die Änderung der Werte ist farbcodiert als Vielfaches vom Baseline-Wert angegeben.



**Abbildung 9:** Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0,1–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der i.t. und s.sc. Injektion (NaCl: n=7, Lidocain: n=7, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=6, Handling: n=7). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt.

### 1.3. EEG-Reaktion auf den Hautschnitt

In der NaCl-Gruppe tritt unmittelbar nach der Inzision ein deutlicher Abfall von Wellenfrequenzen von ca. 5–15 Hz in Erscheinung, der ca. 15 s andauert. Ab ca. 15 s nach dem Schnitt kommt es zu einer signifikanten Aktivierung hoher Frequenzen von ca. 20–30 Hz, die bis etwa  $t=40$  dauert. Das beobachtete Reaktionsmuster stellt sich als biphasisch dar, mit „früher“ Depression niedriger Wellenfrequenzen, der eine „späte“ Aktivierung höherer Wellenfrequenzen folgt. In den Lokalanästhesie- und in der Handling-Gruppe werden keine Änderungen im EEG signifikant. Lediglich in der Bupivacain-Gruppe kommt es 60–70 s nach dem Hautschnitt zu einer Änderung in sehr hohen Frequenzen um ca. 30 Hz. Abb. 10 zeigt die Spektrogramme der Poweränderungen im Vergleich zur Baseline über einen Zeitraum von 90 s nach der Inzision. Die Änderung der Power ist farbcodiert als Vielfaches vom Baseline-Wert angegeben.

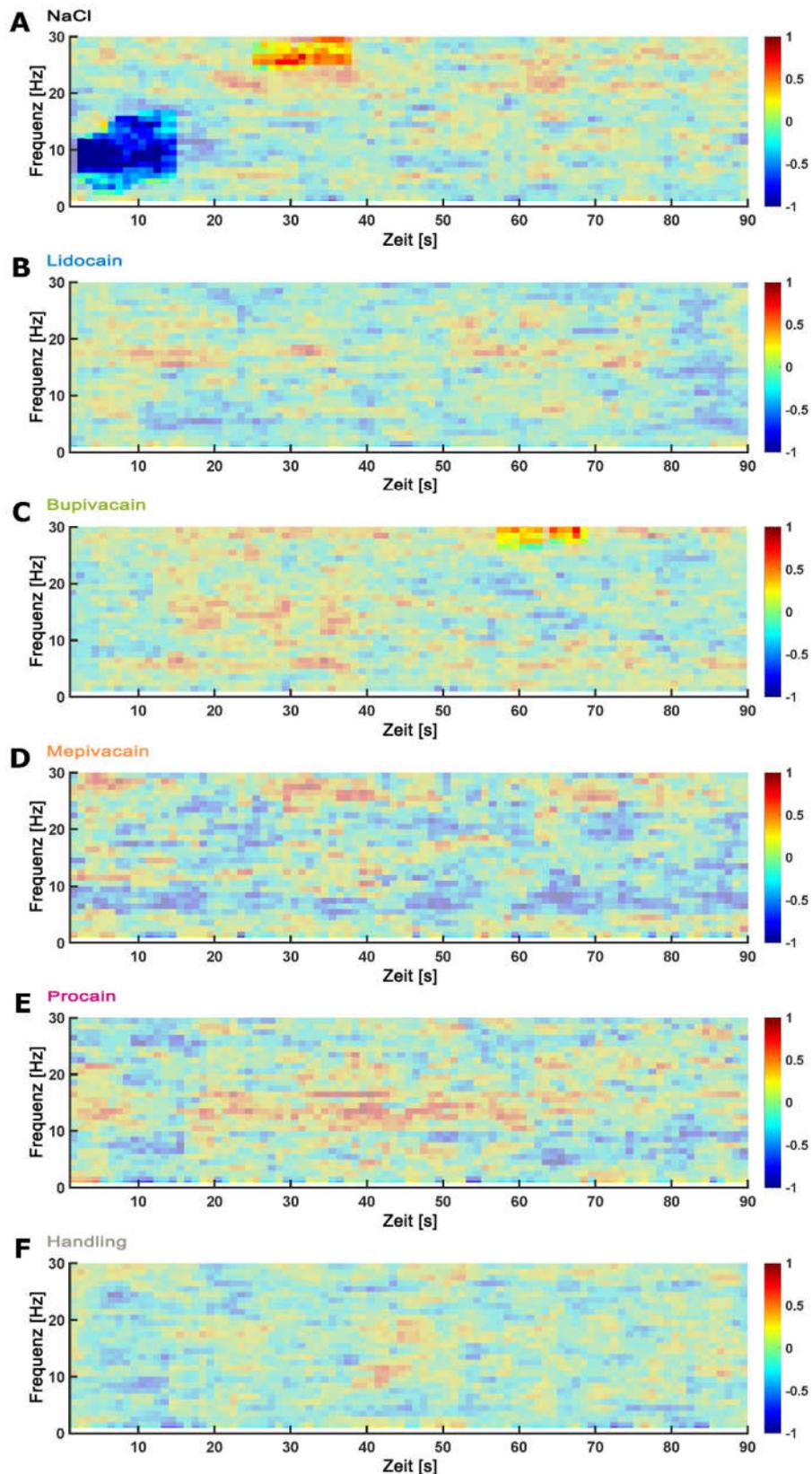


Abbildung 10: Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der Inzision (NaCl: n=6, Lidocain: n=8, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=5, Handling: n=8). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt.

#### **1.4. EEG-Reaktion auf die Samenstrangdurchtrennung**

Die NaCl-Gruppe reagiert direkt nach der Samenstrangdurchtrennung mit einer ca. 10 s andauernden Abnahme niedriger Frequenzen von ca. 5–15 Hz. Darauf folgt eine ca. 10 s dauernde Aktivierung höherer Frequenzen im Bereich von etwa 10–30 Hz, die ca. 40 s nach dem Schmerzreiz erneut auftritt. Auch dieses Reaktionsmuster kann als biphasisch beschrieben werden. In der Lidocain-Gruppe zeigt sich etwa 40 s nach Beginn der Samenstrangdurchtrennung ein Anstieg der Leistung im Frequenzbereich von etwa 10 Hz. In allen anderen Versuchsgruppen treten keine Änderungen in Erscheinung. Abb. 11 zeigt die Spektrogramme der Poweränderungen im Vergleich zur Baseline über einen Zeitraum von 90 s nach der Durchtrennung des Samenstranges.

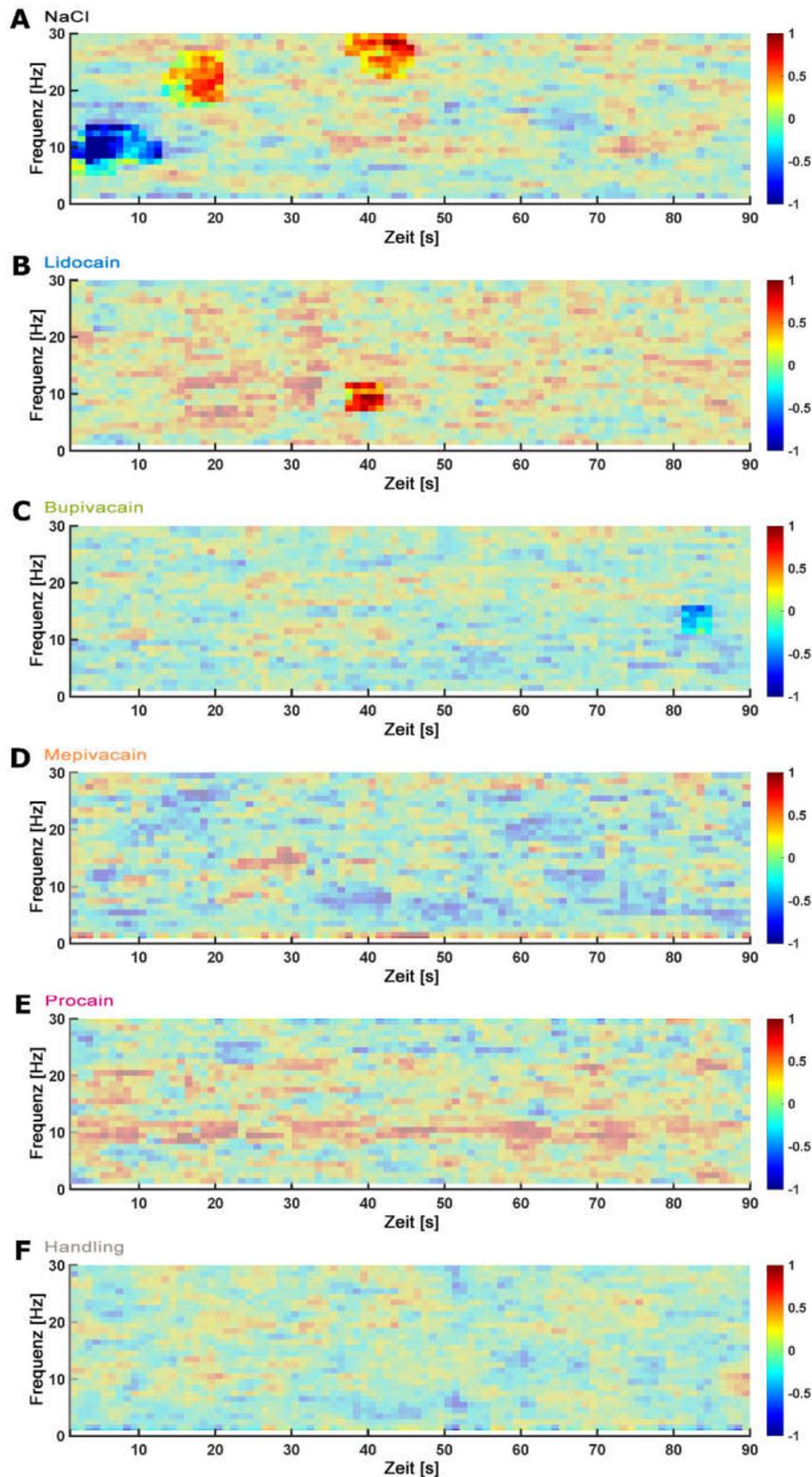
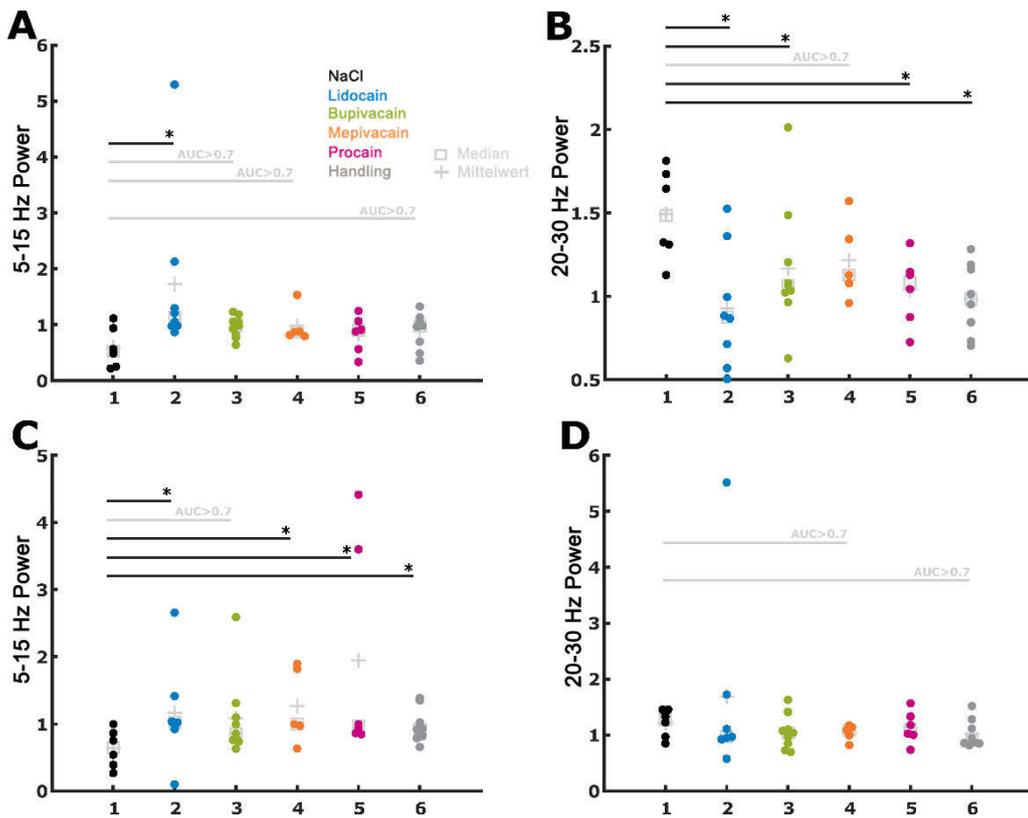


Abbildung 11: Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der Samenstrangdurchtrennung (NaCl: n=6, Lidocain: n=7, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=5, Handling: n=8). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt.

### **1.5. Vergleich der Früh- und Spätreaktion im EEG**

Beim Vergleich der Medianwerte der Frühreaktion auf den Hautschnitt ca. 5–10 s post Stimulus mittels Mann-Whitney-U-Test trat in der Lidocain-Gruppe ein signifikanter Unterschied zur NaCl-Gruppe auf. In der Mepivacain-, der Bupivacain- und der Handling-Gruppe sind die Unterschiede der Medianwerte zur NaCl-Gruppe nicht signifikant, möglicherweise aber von klinischer Relevanz ( $AUC > 0,7$ ) (Abb. 12 A). Beim Vergleich der Spätreaktion auf den Hautschnitt traten signifikante Unterschiede zur NaCl-Gruppe in allen Versuchsgruppen außer in der Mepivacain-Gruppe auf, in der aber ein möglicherweise klinisch relevanter Unterschied festgestellt wurde ( $AUC > 0,7$ ) (Abb. 12 B). Nach der Durchtrennung des Samenstranges ergab der Vergleich der Frühreaktion wiederum signifikante Unterschiede in allen Versuchsgruppen, hier bildet die Bupivacain-Gruppe die Ausnahme, in der kein signifikanter, aber möglicherweise klinisch relevanter Unterschied ( $AUC > 0,7$ ) bestand (Abb. 12 C). Beim Vergleich der Spätreaktion bestanden keine signifikanten Unterschiede zur NaCl-Gruppe, in der Handling- und in der Mepivacain-Gruppe zeigten sich möglicherweise klinisch relevante ( $AUC > 0,7$ ) Unterschiede zur NaCl-Gruppe (Abb. 12 D).



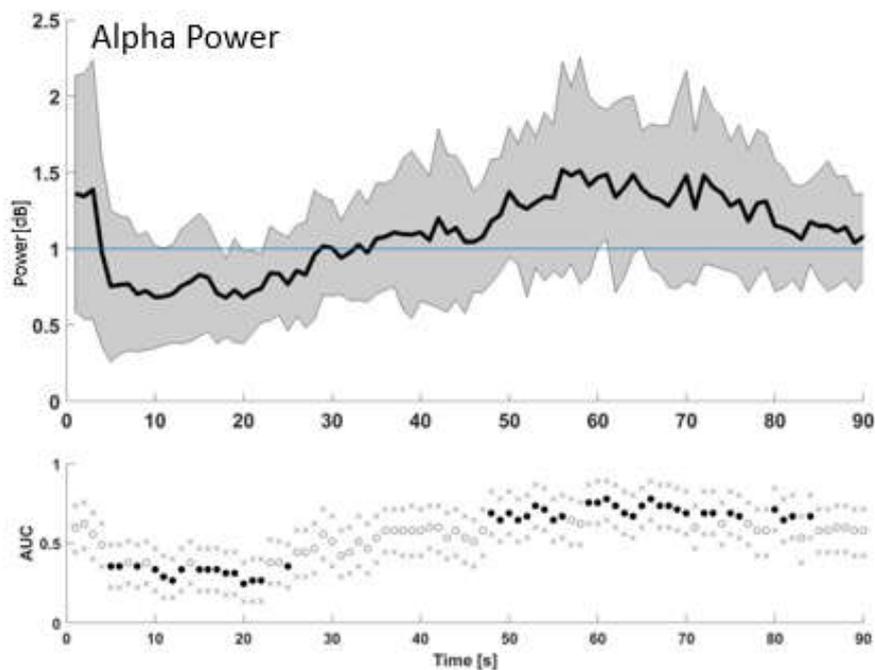
**Abbildung 12: Vergleich der Poweränderung im EEG während der Frühreaktion (A, C) und Spätreaktion (C, D) nach Hautinzision (A, B) und nach Samenstrangdurchtrennung (C, D) im Vergleich zur NaCl-Gruppe.**

### 1.6. Poweränderung einzelner Spektralparameter nach dem Zwischenzehenreiz

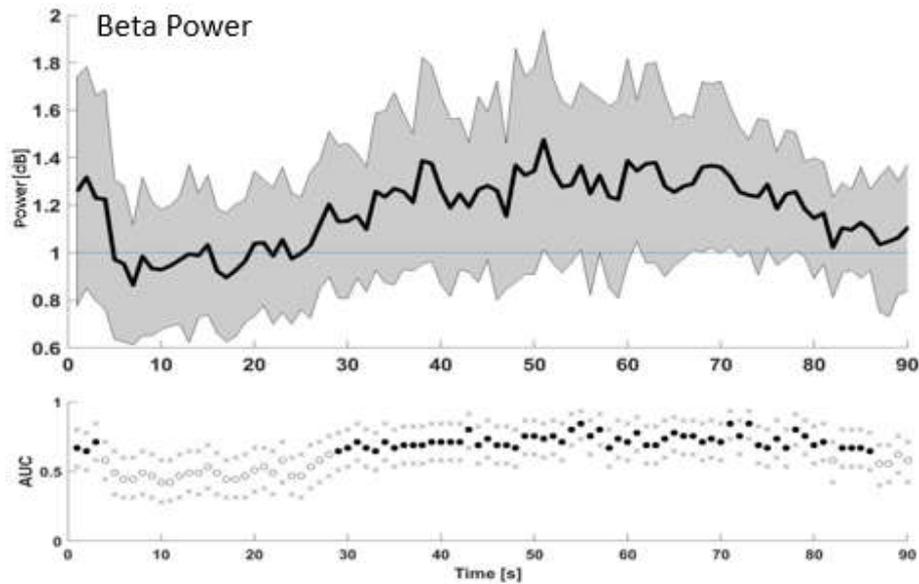
Eine weitere graphische Darstellung der Reaktion im EEG auf einen Schmerzreiz zeigen die Abbildungen 14–19. Hier sind die zeitlichen Verläufe der Änderungen der spektralen Einzelparameter Alpha-, Beta-, Theta- und Deltapower sowie die Änderung der Gesamtpower und der spektralen Eckfrequenz 95 (SEF95) über einen Zeitraum von 90 s nach dem ZZR abgebildet.

Die Alpha-Power sinkt im Vergleich zur Baseline-Messung zunächst im Zeitraum 5–25 Sekunden post Stimulus signifikant ab, und ist dann 50–80 Sekunden nach dem Reiz signifikant erhöht. In der Beta-Power zeichnet sich zusätzlich zu einem wenige Sekunden dauernden starken Anstieg der Power direkt nach/während dem Reiz, eine langanhaltende Power-Erhöhung, ca. 30–90 Sekunden post Stimulus ab. Die Power der Theta-Wellen sinkt unmittelbar nach dem Reiz für ca. 35 Sekunden signifikant ab. Die Delta-Power zeigt lediglich in den ersten ca. 10 Sekunden nach dem

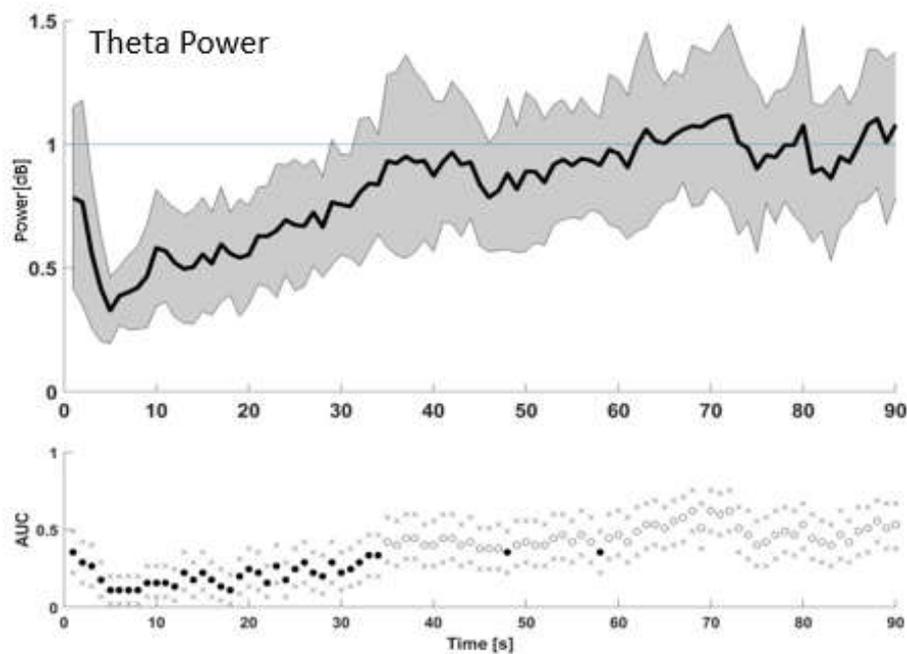
Schmerzreiz eine signifikante Reduktion. Die Änderung der Gesamt-Power zeigt wenig signifikante Änderungen, lediglich in den ersten 10 Sekunden nach dem Schmerzreiz ist sie signifikant reduziert und im weiteren Verlauf treten nach ca. 40 und 70 Sekunden kurze, signifikant erhöhte Abschnitte auf. Die SEF95 ist ca. 10–20 Sekunden post Stimulus signifikant reduziert. Ab ca. 30 Sekunden post Stimulus ist sie, mit immer wieder auftretenden Unterbrechungen, erhöht.



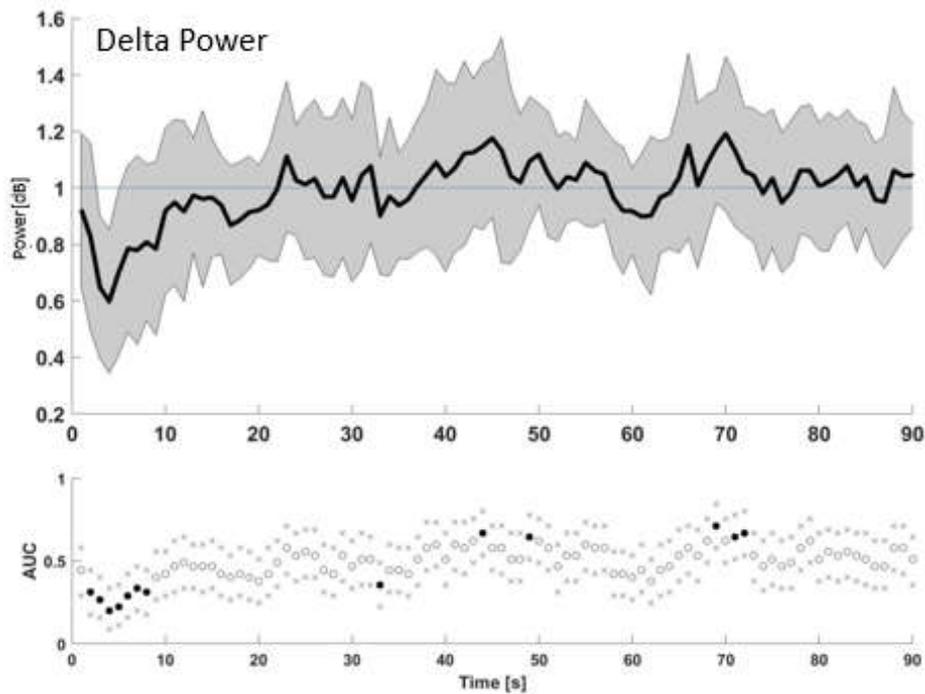
**Abbildung 13: Verlauf der Alpha-Bandleistung (8–12 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve mit 95 % Konfidenzintervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.**



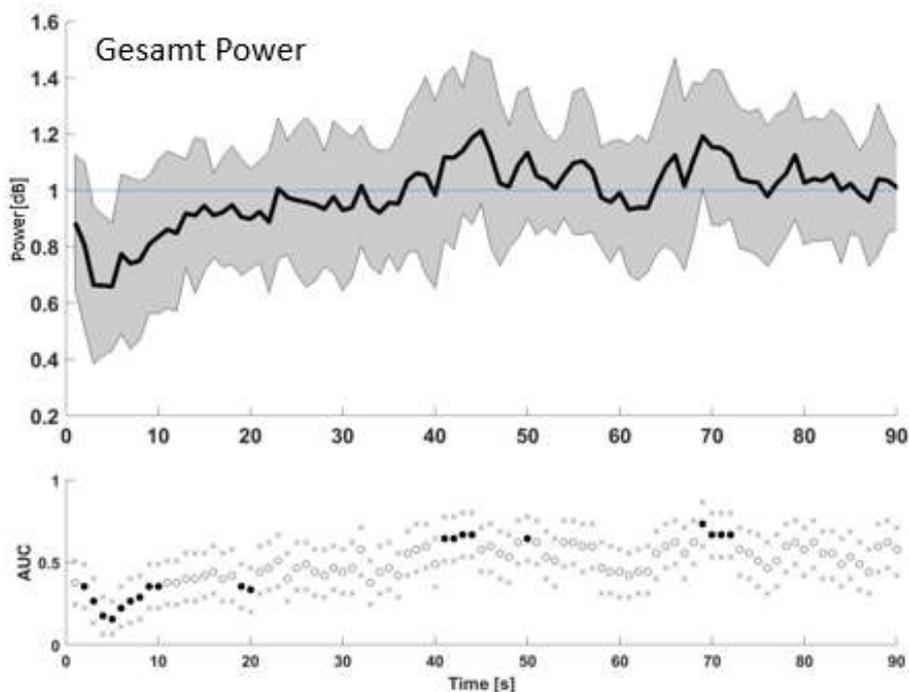
**Abbildung 14:** Verlauf der Beta-Bandleistung (12–30 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.



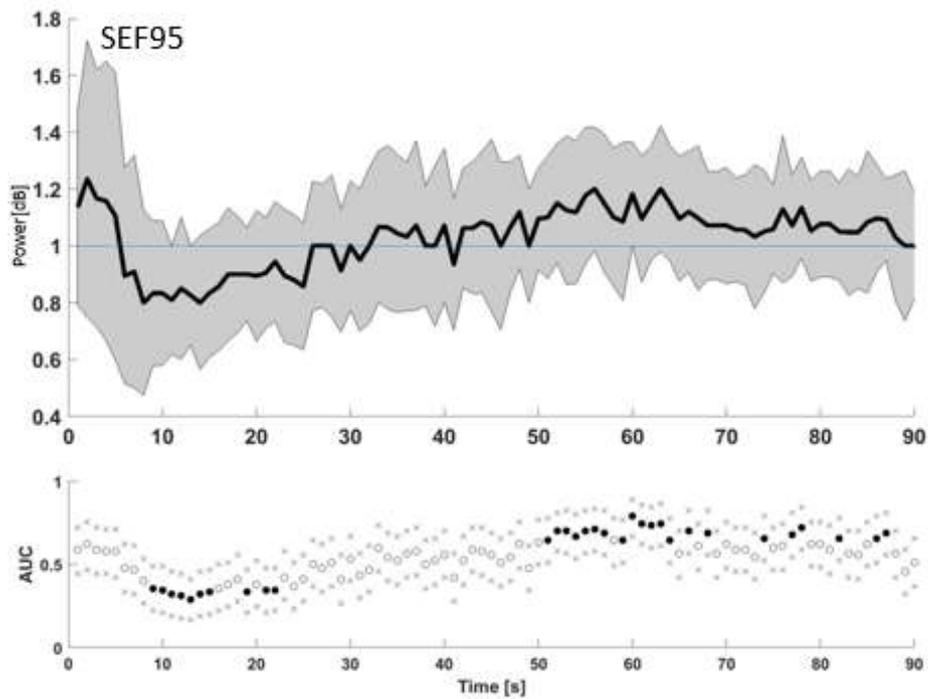
**Abbildung 15:** Verlauf der Theta-Bandleistung (4–8 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.



**Abbildung 16:** Verlauf der Delta-Bandleistung (0,1–4 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.



**Abbildung 17:** Verlauf der Gesamt-Power über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.



**Abbildung 18: Verlauf der SEF95 über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenzintervallen, • zeigen signifikante Änderungen an.**

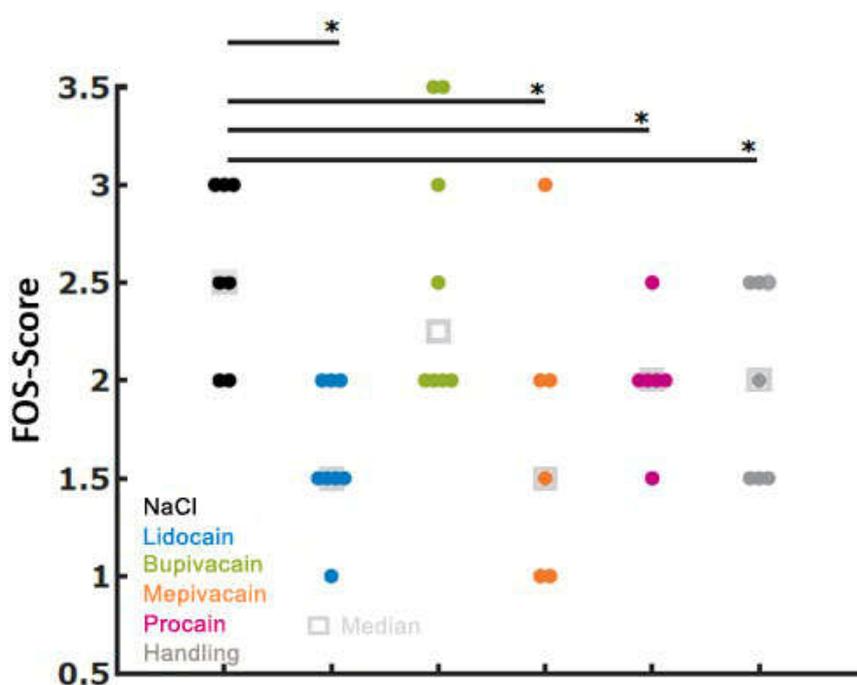
## 2. FOS-Protein

Für die Analyse der FOS-Expression konnten 42 Tiere in die Auswertung aufgenommen werden, eine Übersicht der Anzahl ausgewerteter Tiere pro Versuchsgruppe gibt Tabelle 6. Die Tiere waren im Mittel  $5,5 \pm 1,0$  Tage alt. Aufgrund von Ungenauigkeiten bei der Probennahme und bei der weiteren Probenaufbereitung konnten einzelne Gewebeschnitte von sieben Tieren nicht ausgewertet werden, weshalb diese Tiere aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die angewandte Färbe- und Auswertemethode wurde zunächst in sieben Tieren etabliert (Daten nicht präsentiert).

**Tabelle 6: Übersicht der immunhistochemisch ausgewerteten Anzahl Tiere in den Versuchsgruppen**

| Versuchsgruppe     | NaCl | Lidocain | Bupivacain | Mepivacain | Procain | Handling |
|--------------------|------|----------|------------|------------|---------|----------|
| Gesamt: n=42 Tiere | n=7  | n=7      | n=8        | n=7        | n=6     | n=7      |

In der Handling-Gruppe und in drei Lokalanästhesiegruppen trat in den untersuchten lumbalen und sakralen Segmenten des Dorsalhorns eine signifikant geringere FOS-Expression im Vergleich zur NaCl-Gruppe auf. In der Bupivacain-Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied zur NaCl-Gruppe festgestellt. Alle Tiere, einschließlich der Tiere der Handling-Gruppe, wiesen in allen Gewebeschnitten zumindest eine leichte Anfärbung in <25 % der Neurone auf (Score 1). Abb. 19 zeigt das entsprechende Streudiagramm.



**Abbildung 19: Streudiagramm des FOS-Scores, \*stat. signifikant.**



## V. DISKUSSION

Die in dieser Studie präsentierten Ergebnisse zu EEG- und FOS-Messungen sind Teilergebnisse eines Verbundprojektes zur Untersuchung der „Wirksamkeit der Schmerzausschaltung durch Lokalanästhesie bei der Ferkelkastration“. In diesem Verbundprojekt soll die Effektivität von vier Lokalanästhetika mit verschiedenen Applikationsstellen und -techniken daraufhin untersucht werden, wie effektiv sie zur Schmerzausschaltung während der chirurgischen Kastration von unter acht Tage alten Ferkeln eingesetzt werden können.

Da Einzelparameter bei der Erfassung von Schmerz teilweise eine geringe Spezifität oder Validität haben, sollten sie nicht als Einzelparameter für die Untersuchung von Schmerz und Nozizeption herangezogen werden (ISON et al., 2016). Vielmehr ist ein multiparametrischer Ansatz zur Schmerzdetektion erforderlich und die Betrachtung vieler Parameter in ihrer Gesamtheit ist notwendig (SNEDDON et al., 2014). JOHNSON (2016) empfiehlt zur Beantwortung komplexer klinischer Fragestellungen zu Schmerz und Nozizeption die Aufteilung des Problems in Einzelaspekte. Diese können mit angepassten Herangehensweisen untersucht werden und die Ergebnisse formen letztlich durch ihre Kombination ein Gesamtbild (JOHNSON, 2016). Die Kombination mehrerer Parameter zur Erfassung von Schmerz erhöht den Informationsgehalt einer Studie, mögliche Schwächen von Einzelparametern können dadurch kompensiert werden (JOHNSON, 2016). Die Gesamtstudie sieht daher zunächst eine Laborstudie und eine anschließende Feldstudie vor, mit der Auswertung einer Vielzahl an Parametern sowohl in anästhesierten, als auch in wachen Tieren. Erste Ergebnisse sind bereits bei SALLER et al. (2020) und ABENDSCHÖN et al. (2020) veröffentlicht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstanden im Rahmen des ersten Teils der Laborstudie unter leichter Isoflurannarkose. Die korrespondierenden Ergebnisse aus gleicher Untersuchung (hämodynamische Parameter Blutdruck und Herzfrequenz, Abwehrbewegungen, hormonelle Blutwerte (Katecholamine, Kortisol,

Chromogranin A) sind bereits veröffentlicht (SALLER et al., 2020). Ergänzend zu diesen Parametern wurden weitere Parameter für Nozizeption an verschiedenen Stellen der nozizeptiven Signalübertragung untersucht: die FOS-Protein-Expression in Zellkernen von Neuronen des spinalen Dorsalhorns, was die erste Umschaltstelle der nozizeptiven Übertragung peripherer Reize ist, und Veränderungen der kortikalen, elektrischen Aktivität, die als EEG aufgezeichnet wird und die letzte Stufe der nozizeptiven Signalübertragung darstellt – das Gehirn.

EEG-Messungen beim Tier gewinnen in der Forschung und Klinik zunehmend an Bedeutung. Auch beim Schwein wurden bereits EEG-Untersuchungen vor dem Hintergrund einer Vielzahl von Fragestellungen durchgeführt. Schon in den 1960er und 70er Jahren wurden in Ferkeln EEG-Wellen abgeleitet, um die Wach-/Schlafrythmik zu erfassen (STROMBERG et al., 1962; PAMPIGLIONE, 1965, 1971). Im Bereich der Neurobiologie geben EEG-Untersuchungen Einblicke in die Hirnaktivität von Schweinen bei der Mensch-Tier-Interaktion (RAULT et al., 2019). Neugeborene Ferkel werden u.a. als translationale Modelle für Asphyxie und hypoxische Ischämie verwendet, wobei in mehreren Studien auch EEG-Untersuchungen zur Anwendung kommen (ZHANG et al., 2008; ZHANG et al., 2012; WANG et al., 2014). Ebenso wurden Tierschutz und Tierwohl betreffende Fragestellungen mit Hilfe von EEG-Messungen bearbeitet, beispielsweise im Rahmen der Schlachtung als Parameter zur Beurteilung der Betäubung (LLONCH et al., 2013; VERHOEVEN et al., 2016; KELLS et al., 2018). Zur Beurteilung der Schmerzhaftigkeit zootecnischer Eingriffe wie Schwanzkupieren wurden bereits Untersuchungen des EEGs herangezogen (JOHNSON et al., 2015; KELLS et al., 2017b; KELLS et al., 2017a).

WALDMANN et al. (1994) führen erste EEG-Messungen in Ferkeln bei der Kastration durch und zeigen Arousal-Reaktionen in Einzeltieren. Zur Beurteilung der Kastration von Ferkeln und der Wirksamkeit von Lokalanästhetika führen HAGA and RANHEIM (2005) eine Studie unter Halothannarkose in ca. drei Wochen alten Ferkeln durch. STEIGMANN (2013) verwendet eine relativ grobe Auswertetechnik des EEGs mittels einer speziellen Schablone. Aufgrund von Unterschieden im

Versuchsaufbau sind die bisher durchgeführten Studien zum EEG bei der Ferkelkastration mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aber nur schwer vergleichbar. Da auch in vorhergehenden Studien zur Ferkelkastration bereits Untersuchungen der FOS-Protein-Expression zur Beurteilung der Schmerzhaftigkeit eingesetzt wurden (NYBORG et al., 2000; LACKNER, 2003; SVENDSEN, 2006), fand dieser Parameter auch in der aktuellen Arbeit Anwendung.

## 1. Diskussion des Studiendesigns

Im sog. „Laborteil“ der Gesamtstudie sollte unter definierten standardisierten Bedingungen zunächst unter leichter Isoflurannarkose die Wirksamkeit von Lidocain, Procain, Mepivacain und Bupivacain bei der chirurgischen Kastration von Saugferkeln untersucht werden.

Aufgrund der subjektiven, individuellen Erfahrung von Schmerz, wurde ein Versuchsaufbau gewählt, durch den die Auswirkungen der affektiv-kognitiven Komponenten des Schmerzempfindens wie Angst und Stress auf die Messungen ausgeschaltet werden. Ziel war, die sensorische Komponente des Schmerzes – die Nozizeption – weitgehend unbeeinflusst zu erfassen. Als Narkosestadium für das Experiment wurde daher das Stadium III<sub>1</sub> nach Guedel, das Stadium der Hypnose, gewählt. In diesem Stadium sind die Tiere bewusstlos, zeigen gute Muskelentspannung und Reaktionslosigkeit auf Umweltreize wie Licht und Lärm, es besteht aber weiterhin Schmerzempfinden (HENKE et al., 2012). Die Wahl der Injektionsmethode, der Dosierung und der Einwirkzeit der Lokalanästhetika basierte auf mehreren Überlegungen:

Bei der chirurgischen Ferkelkastration wird die Haut mit den Hodenhüllen sowie der Samenstrang mit seinen Begleitstrukturen durchtrennt. Folglich erfordert eine Schmerzausschaltung durch Lokalanästhetika eine ausreichende Wirkstoffmenge im Bereich dieser Strukturen. RANHEIM et al. (2005) zeigen, dass radioaktiv markiertes Lidocain nach i.t. Injektion zwar in Richtung Samenstrang, aber nicht durch die Tunica vaginalis in die Subkutis diffundiert. Um sowohl den Samenstrang als auch das Skrotum zu anästhesieren, wurde daher die i.t. Applikation der Lokalanästhetika mit zusätzlichem subkutanem Depot kombiniert.

Die Infiltration eines Lokalanästhetikums verursacht Schmerz einerseits durch die mechanische Gewebeerletzung durch die Injektionsnadel (STRAZAR et al., 2013). Andererseits werden durch die Flüssigkeitsinfiltration auch polymodale Nozizeptoren aktiviert, die auf chemische Reize und die schnelle Gewebedehnung durch das Flüssigkeitsvolumen reagieren (STRAZAR et al., 2013). Um mögliche Unterschiede beim Injektionsschmerz durch die Verwendung unterschiedlicher Volumina auszuschließen, wurde daher für alle Lokalanästhetika ein identisches Injektionsvolumen von 0,5 ml i.t. und 0,5 ml s.c. gewählt. In dieser Dosierung wurde eine ausreichende Analgesie der zu betäubenden Strukturen erwartet, gleichzeitig sollten aber keine toxischen Nebenwirkungen der Lokalanästhetika auftreten. In einer Vorstudie wurde eine Beeinflussung des Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Katecholaminwerte durch den Zusatz von Adrenalin zu einer Kochsalzlösung, die i.t. und s.c. injiziert wurde, demonstriert (SALLER et al., 2020). Alle Lokalanästhetika wurden deshalb ohne Zusatz von Sperrkörpern verwendet.

Die Wartezeit zwischen der Injektion der Lokalanästhetika und der Kastration wurde ebenfalls für alle Lokalanästhetika einheitlich festgelegt. Für Bupivacain ist der Eintritt der Wirkung mit 20–30 Minuten in der Literatur am spätesten angegeben, die Wirkung von Procain lässt nach 30 Minuten bereits wieder nach (LEMKE & DAWSON, 2000). 20 Minuten Wartezeit liegen daher innerhalb der Wirkzeit aller verwendeten Lokalanästhetika. Deshalb und auch da unterschiedliche Wartezeiten die Verblindung der versuchsdurchführenden Personen erschwert hätten, wurde eine einheitliche Einwirkzeit von 20 Minuten für alle Lokalanästhetika gewählt.

## **2. Diskussion der Narkosetiefe**

Mittels ZZR, der durch Druck mit einer Klemme auf die Zwischenzehenfalte einer Hinterklaue durchgeführt wurde, wurde für jedes Ferkel individuell die Isoflurandosierung bestimmt, durch welche die gewünschte Narkosetiefe erreicht wurde. Ziel war eine Narkosetiefe, in der ein nozizeptiver Flexorreflex bei den Ferkeln provoziert werden konnte, ohne jedoch

Erwachen oder starke Bewegungen des ganzen Körpers hervorzurufen. Zu starke Bewegungsreaktionen hätten die EEG-Messungen und auch die weiteren Messungen, die im Rahmen der Studie durchgeführt wurden, stark beeinflusst und verfälscht. Der nozizeptive Flexorreflex ist ein anerkannter Indikator für das Vorhandensein von Nozizeption unter Narkose in verschiedenen Tierarten, so auch in Schweinen (ARRAS et al., 2001; LEBARS et al., 2001; RINTISCH et al., 2012; BAARS et al., 2013).

Der ZZR fand in vorhergehenden Studien bereits Anwendung zur Bestimmung des MAC von Isofluran für Saugferkel bei verschiedenen Schmerzreizen. Da er in juvenilen Schweinen noch Bewegungsreaktionen unter Isoflurankonzentrationen provozierte, bei denen auf einen Hautschnitt bereits keine Bewegungsreaktion mehr erfolgte, definieren LUNDEEN et al. (1983) den ZZR als supramaximalen Reiz. EGER et al. (1988) benötigen ebenfalls höhere Dosierungen von Isofluran um Bewegungsreaktionen auf einen ZZR hin auszuschalten, als bei der Verwendung einer Schwanzklemme. Auch SATAS et al. (1996) sowie HAGA et al. (2002) beschreiben, dass Klemmen der Zwischenzehenfalte in juvenilen Schweinen einen starken Schmerzreiz erzeugt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isoflurankonzentration zur Erreichung der erforderlichen Narkosetiefe in jedem Tier individuell bestimmt. SCHIEBER et al. (1986) finden ebenfalls bei Saugferkeln intra- und interindividuelle Varianzen des MAC für Isofluran, weshalb sie die Narkosetiefe für ihre Untersuchung hämodynamischer Auswirkungen von Isofluran auf neugeborene Ferkel jeweils in jedem Tier individuell bestimmen. Übereinstimmend mit SCHIEBER et al. (1986), wurden in der vorliegenden Arbeit Unterschiede in der benötigten Isoflurandosierung zur Erreichung der gewünschten Narkosetiefe für den Eingriff festgestellt. Dies lässt auf eine breite Varianz in der Wirksamkeit von Isofluran in der untersuchten Altersgruppe von Ferkeln schließen. Möglicherweise spiegelt dieses variable Ansprechen auf das Narkosegas unterschiedliche Entwicklungsgrade der neurologischen Strukturen der Ferkel wider.

Im Allgemeinen unterdrückt Isofluran dosisabhängig die kortikale elektrische Aktivität in Jungschweinen, jedoch können Burst-Suppression-Episoden bereits bei Dosierungen auftreten, die unterhalb des MAC liegen

(RAMPIL et al., 1988). Die Tatsache, dass auch einige Ferkel der vorliegenden Arbeit Zeitspannen mit Burst-Suppression zeigten, stimmt mit Ergebnissen früherer Studie an juvenilen Schweinen überein, die unter Isoflurannarkose noch Bewegungsreaktionen auf einen Schmerzreiz hin zeigten, obwohl bereits Burst-Suppression auftritt (HAGA et al., 2002; HAGA et al., 2011). Dies wird auch in Ratten demonstriert (RAMPIL & LASTER, 1992). Der Grund hierfür könnte sein, dass die Wirkung von Inhalationsanästhetika nicht nur im Cerebralen Kortex ansetzt, sondern auch im Rückenmark (RAMPIL et al., 1993; RAMPIL, 1994). HAGA et al. (2011) zeigen, dass die Sensitivität für die Bewegungsunterdrückung und die cerebrale Wirkung von Inhalationsanästhetika tierartlich unterschiedlich ist. Schweine scheinen im Vergleich zu Ziegen weniger empfindlich auf die bewegungsausschaltende Wirkung von Isofluran zu reagieren, als auf die cerebral depressive Wirkung (HAGA et al., 2011). Auch innerhalb der Tierart (Schwein) bestehen individuelle Unterschiede in der Sensitivität bezüglich der unterschiedlichen Wirkorte von Inhalationsanästhetika (HAGA et al., 2002). Das Alter der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere könnte ein Grund für die auftretenden Burst-Suppression Episoden sein. Studien am Menschen zeigen, dass Säuglinge umso mehr Burst-Suppression zeigen, je jünger sie sind, Neugeborene unter Sevofluran-Narkose zeigen sogar dosierungsunabhängig Burst-Suppression (HAYASHI et al., 2012; CORNELISSEN et al., 2017). Im Menschen sind Alterseinflüsse auf das Spektrogramm bereits ausführlich untersucht (JOHN & PRICHEP, 2005; KRATZER et al., 2020; OBERT et al., 2021), weshalb Ergebnisse aus EEG-Studien nur mit gleichaltrigen Probanden verglichen werden können (MALVER et al., 2014). Weitere Studien sind daher erforderlich, um zu untersuchen, ob auch im Schwein altersabhängige Unterschiede in der Empfindlichkeit für die bewegungsausschaltende und die cortical-depressive Wirkung von Isofluran bestehen.

### **3. Diskussion der EEG-Auswertung**

Für die Erstellung der Spektrogramme wurde das Leistungsspektrum aus 5 s-EEG-Abschnitten mit einer Überlappung von 1 s berechnet. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine EEG-Reaktionen mit kurzer Dauer

übersehen wurden. Die Herangehensweise, nur Änderungen als signifikant zu bewerten, die in Clustern auftreten, basiert auf der Annahme, dass sich Effekte im EEG in der Regel zeitlich und räumlich in Clustern häufen, weshalb die Wahrscheinlichkeit, dass sich falsch positive Ergebnisse in Clustern ansammeln gering ist (SASSENHAGEN & DRASCHKOW, 2019). Es sollten die Informationen aus dem gesamten Frequenzspektrum verwendet und dargestellt werden, weshalb weitgehend darauf verzichtet wurde, Veränderungen in vordefinierten Frequenzbändern oder in prozessierten Parametern zu beschreiben. So ist die Einteilung des EEG-Leistungsspektrums in die Frequenzbänder Alpha, Beta, Delta und Theta bei Menschen und Tieren willkürlich (MURRELL & JOHNSON, 2006). Zudem bestehen Unterschiede im spezifischen Frequenzbereich, der jedes Band definiert (NEWSON & THIAGARAJAN, 2018). Auch können verarbeitete Parameter wie die Medianfrequenz oder breite Frequenzbänder wie z. B. der Beta-Bereich von ~ 12 Hz bis ~ 30 Hz biphasische Effekte maskieren. Beispielsweise würde eine Leistungssteigerung im Bereich 12–16 Hz, kombiniert mit einer gleichzeitigen Leistungsabnahme im Bereich 20–30 Hz, keinen Effekt bei der Auswertung des Beta-Bands ergeben. Spektrale Eckfrequenzen (90, 95) oder Medianfrequenz reduzieren das EEG auf eine Zahl, wodurch Informationen über die Frequenzen verloren gehen (TONNER & BEIN, 2006).

In der vorliegenden Arbeit wird der Schwerpunkt auf die unverarbeitete spektrale Reaktion im EEG gelegt. Die Verwendung von Spektrogrammen und der Verzicht auf verarbeitete EEG-Parameter ermöglicht die Darstellung der chronologischen Veränderungen der EEG-Aktivität im gesamten Frequenzbereich. Dieser Ansatz beschreibt die EEG-Reaktion detaillierter als die Verwendung verarbeiteter EEG-Parameter oder die Auswertung einzelner Band-Frequenzen. Dem Spektrogramm der Poweränderungen nach dem ZZR in Abb. 8 kann die gesamte Information entnommen werden, die aus den Abbildungen der Einzelparameter (Abb. 13–18) hervorgeht. Die separate Abbildung der Verläufe der Einzelparameter ermöglicht jedoch eine fokussiertere Betrachtung von Einzelparametern. Durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten

Spektrogramme werden zudem auch wichtige Pilot-Daten für zukünftige Studien über die EEG-Antwort im neugeborenen Ferkel auf einen peripheren, mechanischen noxischen Reiz geliefert.

Generell erschweren Unterschiede im Versuchsaufbau wie z. B. des verwendeten Anästhetikums, des noxischen Reizes, der Tierart, des Alters der Tiere, der untersuchten Parameter, der untersuchten Zeiträume etc., den Vergleich von EEG-Auswertungen aus verschiedenen Studien. So können die genannten Faktoren Unterschiede des Spektrogramms verursachen und die EEG-Reaktion auf einen noxischen Reiz beeinflussen.

#### **4. Diskussion der EEG-Reaktion auf den Zwischenzehe reiz**

Der Versuchsablauf war bis einschließlich des ersten ZZR in allen Tieren identisch, dieser wurde bei allen Tieren standardisiert und ohne Analgesie durchgeführt. Daher wurden die Messdaten aller Tiere – nach Ausschluss der Datensätze mit Burst-Suppression – für die Auswertung des ZZR zusammengefasst. Somit ergab sich die hohe Tierzahl von  $n=44$  für die Auswertung dieses Reizes.

Die Spektralanalyse der EEG-Reaktionen auf den ZZR ergab signifikante Änderungen mit zweiphasigem Muster im Spektrogramm, dessen Phasen im Folgenden als „Früh-“, und „Spätreaktion“ bzw. als „frühe“ und „späte“ Reaktion bezeichnet werden. Das demonstrierte Reaktionsmuster im Spektrogramm zeigt das kortikale Reaktionsmuster von Saugferkeln über einen Zeitraum vom 90 s nach dem Stimulus unter leichter Isoflurannarkose auf einen peripheren, mechanischen noxischen Reiz. In der frühen Reaktion, die bis ca. 35 s nach Beginn des Stimulus dauert, zeigte sich eine verringerte Power in Frequenzen unter 10 Hz, in der Spätreaktion, die nach ca. 35 s begann, kam es zu einem Anstieg der Power hoher Frequenzen über 10 Hz. Der in den ersten Sekunden nach Beginn des Reizes auftretende starke Anstieg der Leistung im Bereich von 10–15 Hz bildet den Zeitraum ab, während dem die Klemme an der Haut befestigt war. Diese nach dem ZZR signifikanten Änderungen der Wellenfrequenzen im EEG bestätigen, dass mit dem gewählten Versuchsaufbau Reaktionen auf einen

nozizeptiven Reiz im EEG darstellbar sind und er aussagekräftige Ergebnisse liefert. Die Auswertung des ZZR diene dadurch als „Proof of Concept“ der EEG-Auswertung. Aus der Tatsache, dass kortikale Reaktionen auf den Schmerzstimulus hin gemessen wurden, kann geschlussfolgert werden, dass Isofluran in der verwendeten Dosierung keine vollständige Ausschaltung der Nozizeption verursacht und dass periphere nozizeptive Reize in den Cerebralen Kortex weitergeleitet werden.

Nach aktuellem Stand gibt es bisher keine Untersuchungen dazu, wie die detaillierte unverarbeitete Reaktion auf einen somatischen Schmerzreiz beim Saugferkel im Spektrogramm aussieht. Die vorliegende Studie liefert daher wichtige durch EEG erhebbare Daten zur Untersuchung der Nozizeption in Ferkeln. Das beobachtete Reaktionsmuster mit der Veränderung des EEGs hin zu gesteigerter Aktivität in höheren Frequenzen wird oft mit erhöhtem Arousal-Level assoziiert, d. h. einer Erhöhung des allgemeinen Aktivierungsgrades des ZNS. Eine Arousal-Reaktion im EEG ist nicht spezifisch für Nozizeption. Als Reaktion auf einen schmerzhaften Reiz wird sie jedoch häufig im Menschen (BIMAR & BELLVILLE, 1977; BISCHOFF, 1994; GARCÍA et al., 2021; KAISER et al., 2021) und auch im Tier beschrieben (WALDMANN et al., 1994; MURRELL et al., 2003; OTTO & MALLY, 2003; JOHNSON et al., 2005; MURRELL et al., 2007; OTTO, 2007; JOHNSON et al., 2009).

In Schweinen wurde bereits untersucht, ob sich prozessierte EEG-Parameter nach mechanischen nozizeptiven Reizen ohne Gewebeverletzung unter Narkose verändern. HAGA et al. (2001) werten in juvenilen Schweinen unter verschiedenen Isoflurankonzentrationen und nach verschiedenen mechanischen Schmerzreizen eine Vielzahl prozessierter Spektralparameter aus. Sie berechnen für alle untersuchten Parameter die Mittelwerte über 90 Sekunden und können in keinem der Parameter signifikante Änderungen auf einen der Schmerzreize hin feststellen. Möglicherweise war die Zeitspanne von 90 s, über die die Ergebnisse gemittelt wurden, zu lang, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Im Gegensatz dazu reagierten die Ferkel in den in der vorliegenden Studie dargestellten Spektrogrammen nicht mit einer

einheitlichen Gesamtreaktion, sondern die Reaktion setzte sich aus mehreren Teilen zusammen, die sich deutlich voneinander unterschieden. Dies deutet darauf hin, dass signifikante Ergebnisse z. B. der Gesamtpower maskiert werden könnten, wenn die gesamte Zeitspanne von 90 s gemittelt wird. Übereinstimmend demonstrieren OTTO und SHORT (1991), bei mit Isofluran anästhesierten Hunden, dass, je länger die gemittelten Zeitspannen gewählt werden, desto weniger prozessierte EEG-Parameter zeigen signifikante Änderungen.

## **5. Diskussion der Reaktion auf die Injektion der Lokalanästhetika**

Die vorliegenden Ergebnisse der EEG-Auswertung zeigen, dass die i.t. und s.sc. Injektion, unabhängig von der injizierten Substanz, signifikante Reaktionen im EEG auslösen. Diese fielen nach der rein visuellen Beurteilung unterschiedlich zwischen den Versuchsgruppen aus, je nach injizierter Substanz. Da beide Injektionen (i.t. und s.sc.) kurz aufeinander folgend durchgeführt und darum gemeinsam analysiert wurden, lässt sich mit dem gewählten Versuchsaufbau nicht feststellen, ob möglicherweise die Injektion in eine der beiden Strukturen eine stärkere Reaktion im EEG hervorruft als die andere.

Die augenscheinliche Bewertung der Spektrogramme deutet darauf hin, dass die Injektion von Procain den intensivsten noxischen Reiz darstellt, da hier die deutlichsten EEG-Änderungen festgestellt wurden. Rückschlüsse von physikalisch-chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften von Lokalanästhetika auf EEG-Effekte und *vice versa*, lassen sich zum derzeitigen Stand der Wissenschaft jedoch nicht ziehen. Um näher zu untersuchen, welche klinischen Wirkungen die signifikanten Reaktionen nach der Injektion abbilden, sind weitere Studien notwendig. So muss z. B. in weiteren Studien geklärt werden, ob die EEG-Reaktion nach der Injektion von Procain möglicherweise ein Gefühl von „Brennen“ durch den stark sauren pH-Wert abbildet. Da auch bei den Tieren der Handlings-Gruppe, bei denen der Hodenbereich lediglich fixiert wurde, nach der nur simulierten Injektion eine kurze signifikante Änderung im EEG auftrat, müssen die präsentierten EEG-Ergebnisse hinsichtlich Wirksamkeit und

Schmerzhaftigkeit vorsichtig interpretiert werden. Ob und in wie fern kleine signifikante Cluster im Spektrogramm klinische Relevanz haben, muss ebenfalls in weiterführenden Studien geklärt werden.

Der noxische Reiz durch die Injektion stellt wegen den Unterschieden zwischen den verwendeten Substanzen keinen einheitlichen Reiz dar. Aus diesem Grund kann auch ein Vergleich der EEG-Reaktion nur vorsichtig erfolgen. Unterschiede zwischen den verwendeten Substanzen, Überlegungen zur Ätiologie von Schmerz durch Injektion und Ansätze zur möglichen Erklärung der verschiedenen EEG-Reaktionen auf die Injektion, werden im Folgenden kurz dargestellt: Alle Injektionen wurden zwar mit identischem Volumen und identischer Injektionstechnik durchgeführt, die injizierten Substanzen unterschieden sich jedoch in ihren physikalisch-chemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften. Die heterogenen EEG-Muster nach der Injektion sind daher sehr wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Flüssigkeiten zurückzuführen. Schmerz durch eine Injektion von Lokalanästhetika wurde u. a. in humanmedizinischen Studien näher beleuchtet. Die Ätiologie des Injektionsschmerzes durch Lokalanästhetika ist höchstwahrscheinlich multifaktoriell (HANNA et al., 2009). Der Schmerz durch die Insertion der Nadel in Gewebe wird von EGEKVIST et al. (1999) als meist scharfer, akuter, stechender Schmerz beschrieben. Die anschließende Infiltration eines Lokalanästhetikums wird als intensiver und länger andauernder (STRAZAR et al., 2013), vom Charakter als brennender oder auch stechender Schmerz (HOGAN et al., 2011) beschrieben. Mögliche Erklärungen für die Schmerzhaftigkeit sind z. B. der saure pH-Wert von Lokalanästhetika, die Druckwirkung bei der Infiltration, sowie eine lokale Neurotoxizität von Lokalanästhetika (DULLENKOPF & BERGEAT, 2003). Die pharmakologische Darreichungsform von Lokalanästhetika ist ein Hydrochloridsalz des Wirkstoffes mit einem sauren pH-Wert zwischen fünf und sechs (DULLENKOPF & BERGEAT, 2003). Der pH-Wert der Lokalanästhetika in der vorliegenden Arbeit variierte. Laut Herstellerangaben hat das im aktuellen Versuch verwendete Procain-Präparat den niedrigsten pH-Wert mit einem Bereich von 3–4,5, der pH-Wert des Bupivacain-Präparates lag bei 4–6, das Mepivacain-Präparat

hatte einen pH-Wert von etwa 5,4 und das Lidocain-Präparat lag bei 5,5–6,5. Auch die verwendete 0,9 %ige Kochsalzlösung hat laut Herstellerangaben einen leicht sauren pH-Wert von 5–7. Der saure pH-Wert aller Substanzen inkl. der Kochsalzlösung trug wahrscheinlich zur Schmerzhaftigkeit bei (MCKAY et al., 1987; STRAZAR et al., 2013). Untersuchungen im Menschen ergeben jedoch, dass die Schmerzhaftigkeit der Injektion von Lokalanästhetika nicht genau mit dem pH-Wert korreliert. MORRIS et al. (1987) evaluieren die Schmerzhaftigkeit einer Procain-Injektion im Vergleich zu Lokalanästhetika mit weniger saurem pH-Wert und 0,9 %ige Kochsalzlösung. Procain schneidet hier nur leicht schlechter ab als Kochsalzlösung.

Eine Studie von HAGA und RANHEIM (2005) untersucht ebenfalls EEG-Reaktionen unter Halothannarkose auf die Injektion von Lidocain. Ferkel reagierten nach intratestikulärer sowie intrafunikulärer Injektion von Lidocain mit signifikanten Verringerungen der Alpha-, Theta- und Delta-Banden, was Frequenzen von < 12 Hz entspricht, sowie Erniedrigung der Gesamtpower. Die Daten werden gemittelt über Zeiträume äquivalent zur Injektionszeit, welche in der Studie  $30 \pm 9,1$  s beträgt (HAGA & RANHEIM, 2005). Im vorliegenden Experiment dauerte die kombinierte Injektion nur ca. 9 Sekunden pro Hoden. Änderungen, wie die von HAGA und RANHEIM (2005) beschriebenen, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt. Aufgrund der unterschiedlichen Versuchsaufbauten, v. a. Verwendung unterschiedlicher Narkosegase, Unterschiede bei der Injektionszeit, Altersunterschied der untersuchten Kohorte und der unterschiedlich präsentierten Daten, lassen sich die Studien aber schwer miteinander vergleichen.

## **6. Diskussion der Reaktion auf den Hautschnitt und die Samenstrangdurchtrennung**

Die Ferkelkastration umfasst zwei potentiell schmerzhaft Aspekte: zunächst den Einschnitt der Skrotalhaut zur Eröffnung der Hodenhüllen, wobei auch der *M. cremaster* verletzt werden kann, und den anschließenden Zug am Samenstrang und dessen Durchtrennung. In der vorliegenden Untersuchung sollten beide Eingriffe separat analysiert

werden, weshalb nach dem Hautschnitt zwei Minuten gewartet wurde, bevor im nächsten Schritt der Samenstrang durchtrennt wurde. Dadurch sollten mögliche Diskrepanzen in der Effektivität der Analgesie zur Betäubung der verschiedenen Strukturen identifiziert werden. Eine separate Analyse der Schmerzausschaltung durch Lokalanästhesie für den Hautschnitt und die Samenstrangdurchtrennung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Die noxische Stimulation durch Hautschnitt und Samenstrangdurchtrennung wurde in der NaCl-Gruppe als am intensivsten eingeschätzt, da kein Analgetikum verabreicht wurde. Damit stellt die EEG-Reaktionen in dieser Gruppe die maximale, nozizeptive Übertragung unter leichter Isoflurannarkose dar. In dieser Versuchsgruppe wurde eine zweiphasige Reaktion auf den Hautschnitt als auch auf die Samenstrangdurchtrennung gemessen. Dieses Reaktionsmuster ähnelt dem, welches bereits nach dem ZZR beobachtet wurde: zunächst eine Verringerung niederfrequenter Wellen, gefolgt von einem Anstieg hochfrequenter Wellen. Daher kann geschlussfolgert werden, dass das detektierte Reaktionsmuster mit hoher Wahrscheinlichkeit die Reaktion auf den noxischen Reiz abbildet.

In drei der Lokalanästhesie-Gruppen folgten auf den Hautschnitt keine signifikanten Reaktionen. Eine Ausnahme bildet hier die Bupivacain-Gruppe in der ca. 60 s nach dem Hautschnitt eine kurze signifikante Aktivierung sehr hoher Beta-Frequenzen festgestellt wurde. Ob diese kurze Aktivierung eine nozizeptive Reaktion darstellt, muss in weiteren Studien untersucht werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass eine deutliche Verringerung der Weiterleitung noxischer Reize während des Hautschnitts durch Lokalanästhesie in allen Gruppen auftrat.

Auch nach der Samenstrangdurchtrennung waren in der Mehrzahl der Lokalanästhesie-Gruppen keine signifikanten Reaktionen im Kortex messbar. Hier bildeten die mit Lidocain behandelten Tiere eine Ausnahme. In dieser Gruppe trat ca. 40 s nach Beginn des Reizes eine kurzzeitige signifikante Aktivierung von Wellen im Frequenzbereich von v. a. Alpha-Wellen auf. Ebenso zeigt die Bupivacain-Gruppe eine kurzzeitige

Verringerung von Wellenfrequenzen. Auch hier sind weitere Studien nötig um eine Aussage zu treffen, ob diese Reaktionen auf Nozizeption zurückzuführen sind und welche klinische Relevanz diese haben. Auf Grundlage der EEG-Daten zeigen die Lokalanästhetika eine Wirkung zur Schmerzausschaltung während der Samenstrangdurchtrennung, da in zwei Gruppen keine signifikanten Reaktionen mehr auftreten, bzw. sich die signifikanten Reaktionsmuster deutlich von der NaCl-Gruppe unterscheiden bzw. geringer ausfallen.

Durch die deskriptive Darstellung der Ergebnisse als Spektrogramme, kann ein Vergleich zwischen den Versuchsgruppen nur visuell und subjektiv vorgenommen werden. Um einen objektiven, statistischen Vergleich zwischen der NaCl-Gruppe und den weiteren Versuchsgruppen anzustellen, wurde die in der NaCl-Gruppe detektierte Früh- und Spätreaktionen auf den Hautschnitt und die Samenstrangdurchtrennung mit den anderen Versuchsgruppen verglichen. Im Vergleich der Früh- und Spätreaktion sind alle Lokalanästhesie-Gruppen und die Handlings-Gruppe in mindestens einem Vergleich statistisch signifikant unterschiedlich zur NaCl-Gruppe. Dies unterstreicht die Veränderung der EEG-Reaktion durch Lokalanästhesie.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, in dem verwendeten Versuchsaufbau unter leichter Isoflurannarkose durch die Verwendung von Lokalanästhetika in der beschriebenen Dosierung und mit der beschriebenen Injektionstechnik, die Reaktionen des Kortex auf noxische Reize verringert sind. Frühere Studien, die EEG-Messungen während der Saugferkelkastration verwenden, kommen zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Unter Barbiturat-Narkose, zeigen WALDMANN et al. (1994) in einzelnen Tieren eine Arousal-Reaktion nach der Kastration, was sich in einer Erhöhung des Beta/Delta-Verhältnisses niederschlägt. Dies deckt sich im Grundsatz mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. WALDMANN et al. (1994) zeigen auch beispielhaft das Gesamtfrequenzband eines Tieres vor und nach der Kastration, wodurch eine chronologische Verfolgung der Gesamt-Gehirnaktivität möglich ist. Wegen der niedrigen Auflösung und der unterschiedlichen Darstellung sind jedoch Vergleiche mit den hier gezeigten Spektrogrammen kaum möglich.

In einer Untersuchung von HAGA und RANHEIM (2005) fällt die Gesamtpower sowie die Power in Frequenzen <12 Hz bei Tieren, die ohne Lokalanästhesie kastriert wurden, während der Kastration ab. Bei Tieren, denen Lidocain intrafunikulär oder i.t. injiziert wird, ändern sich im Vergleich mit den ohne Analgesie kastrierten Tieren, weniger Parameter signifikant. Die Kastration umfasst in der Studie den Hautschnitt und die Durchtrennung des Samenstranges und dauert im Schnitt rund 62 s. Über einen äquivalenten Zeitraum nach der Kastration wurden die Werte gemittelt. Im vorliegenden Experiment dauerten sowohl die Hautschnitte und die Samenstrangdurchtrennungen jeweils ca. 6 s und wurden separat ausgewertet. Wegen des unterschiedlichen experimentellen Aufbaus und der unterschiedlich präsentierten Daten, lassen sich schwer Vergleiche zwischen den beiden Studien ziehen. Die Ergebnisse decken sich aber insofern, dass in Tieren, die Lokalanästhesie erhalten, die Reaktionen im EEG auf die Kastration weniger deutlich ausfallen.

## **7. FOS-Protein**

Der für diese Studie entwickelte semiquantitative Score für die Untersuchung der Expression von FOS-Protein in Zellkernen spinaler Neurone war bei Ferkeln, die nach Anwendung eines Lokalanästhetikums kastriert wurden und bei den Tieren der Handling-Gruppe, signifikant niedriger als bei Tieren, die ohne Analgesie kastriert wurden. Eine Ausnahme bildet die Bupivacain-Gruppe, in der kein Unterschied im Vergleich zur NaCl-Gruppe gemessen wurde. Die immunhistochemischen Daten stützen daher weitgehend die Ergebnisse der EEG-Auswertung, dass Lokalanästhetika zu einer verminderten nozizeptiven Reaktion führen. Außer bei Tieren der Bupivacain-Gruppe wurde die geringere Weiterleitung nozizeptiver Reize bereits am Umschaltplatz vom ersten auf das zweite nozizeptive Neuron erkennbar.

Dieses Ergebnis geht mit Daten einer Studie von NYBORG et al. (2000) einher, die die Analyse von FOS-Protein ebenfalls nutzen, um die Nozizeption bei der Ferkelkastration mit und ohne Lokalanästhesie zu messen. Dabei wird eine geringere Anzahl FOS-positiver Neurone im spinalen Dorsalhorn bei Ferkeln gefunden, denen vor der Kastration

Lidocain intrafunktulär und subkutan verabreicht wurde, als bei Ferkeln, die ohne Lokalanästhesie kastriert wurde (NYBORG et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurden in allen Tieren leichte Färbung in einzelnen Neuronen ( $\leq 25\%$  der Neurone) des Dorsalhorns gefunden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die FOS-Expression in diesem Experiment die kumulative Reaktion auf noxische Stimulationen darstellt, die in einem Zeitfenster von etwa 90–120 Minuten vor der Entnahme des Rückenmarks stattfanden und die über die Rückenmarksegmente L1, L2, L3 und S1–3 weitergeleitet werden. Hier ist v. a. der zweite ZZR anzuführen, der vier Minuten nach der Samenstrangdurchtrennung durchgeführt wurde und somit im relevanten Zeitfenster liegt, aber auch der erste ZZR, der etwa 130 Minuten vor der Rückenmarksentnahme angewendet wurde. Da die sensorischen Nervenbahnen, die den Zwischenzehenbereich der Hinterklaue innervieren, ähnlichen spinalen Ursprungs sind wie die Nerven des Hodens und des Skrotums, trugen die ZZR sehr wahrscheinlich in gewissem Ausmaß zur FOS-Expression bei. Ebenfalls muss erwähnt werden, dass im vorliegenden Versuch Reaktionen auf die Herzfrequenz und den mittleren arteriellen Blutdruck auch in der Handling-Gruppe nach der Injektion, dem Hautschnitt und der Samenstrangdurchtrennung beobachtet wurden (SALLER et al., 2020). Dies bestätigt, dass bereits die Berührung und Fixation der Hoden zu aversiven Reaktionen führte, die möglicherweise zur Baseline-FOS-Expression beigetragen haben. Im Allgemeinen verwenden die meisten Studien, die FOS im Dorsalhorn analysieren, noxische Stimuli, allerdings können auch nicht-noxische Reize in einigen Fällen FOS-Expression auslösen (COGGESHALL, 2005). Ein weiterer Grund für die leichte Anfärbung neuronaler Zellkerne des Dorsalhorns in allen Tieren, könnte die hohe Auflösung und die dünnen Gewebeschnitte ( $2\ \mu\text{m}$ ) sein. Daher wurde entschieden, einen ordinalen, semiquantitativen Scoring-Ansatz für die Auswertung anzuwenden, der sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl der gefärbten Zellkerne berücksichtigt. Dieses Vorgehen wird in der (Veterinär-)Pathologie in präklinischen Studien sehr häufig für die Auswertung von immunhistochemisch gefärbtem Gewebe verwendet (MEYERHOLZ & BECK, 2018). Weitere Studien im Schwein zur FOS-

Analyse im Dorsalhorn verwenden meist einen auf der reinen Zellzahl basierenden Ansatz zur Bewertung von Free-Floating-Gewebeschnitten mit einer deutlich höheren Schichtdicke von ca. 100 µm (LYKKEGAARD et al., 2005).

Die Tatsache, dass die Bupivacain-Gruppe ähnliche FOS-Expression zeigte, wie die NaCl-Gruppe, könnte dadurch erklärt werden, dass im Menschen die Injektion von Bupivacain als schmerzhaft beschrieben wird, und normalerweise sogar als schmerzhafter empfunden wird, als die Injektion von Kochsalzlösung (MORRIS et al., 1987; HOWE & WILLIAMS, 1994). Allerdings sieht in der vorliegenden Arbeit das EEG-Reaktionsmuster nach der Injektion von Kochsalzlösung und Bupivacain subjektiv nicht sehr unterschiedlich aus. Auch die hämodynamischen Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede nach der Injektion von Bupivacain und NaCl (SALLER et al., 2020).

Trotz der Baseline-FOS-Expression in allen Tieren waren in der vorliegenden Untersuchung signifikante Unterschiede in der FOS-Expression zwischen Tieren ohne Analgesie und Tieren mit lokaler Anästhesie (außer Bupivacain) oder den Handling-Tieren erkennbar. Die Injektion von Lidocain, Mepivacain oder Procain führte zu einer signifikant geringeren Expression von FOS-Protein was auf Schmerzreduktion schließen lässt

## **8. Methodenkritik**

Für die vorliegende Untersuchung wurde Isofluran als Narkosegas verwendet. Im Hinblick auf die EEG-Auswertung wären bei der Verwendung von Halothan möglicherweise stärkere Reaktionen im EEG auf die verschiedenen noxischen Reize aufgetreten, da Halothan eine geringere Depression des cerebralen Kortex verursacht (JOHNSON & TAYLOR, 1998; HAGA & DOLVIK, 2005; MURRELL et al., 2008; WILLIAMS et al., 2016). Denkbar wäre auch, dass unter der Verwendung von Halothan weniger Tiere Burst-Suppression Episoden gezeigt hätten, wodurch die Auswertung einer höheren Anzahl an Datensätzen möglich gewesen wäre.

Die statistische Berechnung der erforderlichen Stichprobengröße der

Gesamtstudie erfolgte auf Grundlage der erwarteten Änderungen der hämodynamischen Parameter. Diese waren die Hauptparameter für Nozizeption in der Gesamtstudie. Die EEG-Messungen und die Untersuchung der FOS-Expression wurden, um eine möglichst umfassende Aussage zur Nozizeption in dieser Studie treffen zu können, als ergänzende Parameter erhoben. Um anhand von EEG- und FOS-Messungen als Einzelparameter eindeutige, statistisch signifikante Schlussfolgerungen über die Wirksamkeit der verwendeten Lokalanästhetika bei der Ferkelkastration zu ziehen und die Wirkstoffe miteinander vergleichen zu können, war die Anzahl der untersuchten Tiere zu gering. Wegen des Risikos falsch negativer Ergebnisse muss deshalb letztlich auch davon abgesehen werden, nicht signifikante Befunde als „kein Effekt“ zu bewerten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen in Studien mit höherer Tierzahl bestätigt werden. Auch um valide Vergleiche zwischen den Lokalanästhesiegruppen anzustellen, sind weitere Studien mit höherer Stichprobenzahl erforderlich.

## **9. Schlussfolgerung**

Mittels des gewählten experimentellen Aufbaus war es möglich, EEG-Reaktionen von 3 bis 7 Tage alten Ferkeln auf einen noxischen Reiz mittels einer im Zwischenzehenbereich der Hinterklaue aufgesetzten Klemme zu messen. Das EEG der Ferkel war kontinuierlich und differenziert, was Schmerzkompetenz der Tiere in diesem Alter impliziert. Die Reaktion im EEG lässt sich als biphasisches Reaktionsmuster mit einer Früh- und einer Spätreaktion beschreiben. Es zeigte sich eine anfängliche Depression von Wellen niedriger Frequenzbereiche von bis zu 15 Hz, gefolgt von einer Aktivierung von Wellen höherer Frequenzen. Dieses EEG-Reaktionsmuster wurde in ähnlicher Weise auch in den Tieren beobachtet, die ohne Analgesie kastriert wurden. Tiere, die ein Lokalanästhetikum vor der Kastrationen intratestikulär und subkutan erhalten hatten, und Tiere, in denen kein Kastrationsschmerz verursacht wurde, zeigten deutlich geringere Reaktionen. Die Injektion verursachte unabhängig von der verwendeten Substanz Reaktionen im EEG. Die Aussage der EEG-Ergebnisse wird durch die signifikant verringerte FOS-Expression in lumbalen und sakralen Rückenmarkssegmenten gestützt, insbesondere bei

Tieren denen Lidocain, Mepivacain oder Procain als Lokalanästhetikum verabreicht wurde. Diese Befunde sind auch im Einklang mit den von SALLER et al. (2020) beschriebenen Daten.

Die beschriebenen EEG-Reaktionsmuster können mit hoher Wahrscheinlichkeit mit nozizeptiven kortikalen Reaktionen bei Ferkeln assoziiert werden. Daher kann geschlussfolgert werden, dass die Verwendung von Lokalanästhetika bei Ferkeln, die unter leichter Isoflurannarkose chirurgisch kastriert werden, sehr wahrscheinlich die nozizeptive Übertragung peripherer Noxen auf die Großhirnrinde unter standardisierten Laborbedingungen abschwächt. Die geringere nozizeptive Aktivierung ist bereits auf spinaler Ebene, durch die in einigen Lokalanästhesie-Gruppen signifikant verringerte FOS-Expression, sichtbar.

Die in dieser Arbeit präsentierten Teilergebnisse einer Gesamtstudie liefern wichtige Informationen um, in Kombination mit den hämodynamischen Daten und den Daten der Abwehrbewegungen während der Kastration, ein Gesamtbild der nozizeptiven Reaktion von Ferkeln auf die chirurgische Kastration mit oder ohne Lokalanästhetika abzubilden. Die Ergebnisse der EEG- und FOS-Analysen stellen zudem wichtige Pilotdaten für weitere Studien zur Untersuchung der Nozizeption bei Ferkeln dar.

Letztendlich muss Schmerz immer in der Gesamtheit seiner Dimensionen gesehen werden. Darum müssen die unter leichter Isoflurannarkose gewonnenen Erkenntnisse in weiteren Studienteilen in wachen Ferkeln überprüft werden. Dabei muss beachtet werden, dass z. B. Angst und Stress das Erleben von Schmerz verändern können.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

An einem Wirbeltier darf ohne Betäubung ein mit Schmerzen verbundener Eingriff nicht vorgenommen werden (TierSchG § 5). Dieser Grundsatz gilt seit dem 1.1.2021 auch für die Kastration von unter acht Tage alten Ferkeln. Die Untersuchung, ob Lokalanästhesie eine ausreichende Schmerzausschaltung für diesen Eingriff gewährleistet und die Forderung des Tierschutzgesetzes erfüllt, ist Ziel einer umfassenden, aus mehreren Abschnitten bestehenden Gesamtstudie. Die vorliegende Arbeit präsentiert Ergebnisse aus dem ersten Studienteil, in dem die nozizeptive Reaktion der Ferkel auf die Kastration unter Isoflurannarkose untersucht wurde. Änderungen im EEG und in der FOS-Expression im Dorsalhorn des Rückenmarks wurden ergänzend zu den „klassischen“ hämodynamischen und neurohumoralen Parametern erhoben, um ein Gesamtbild der nozizeptiven Reaktion zu erhalten.

Mittels eines noxischen ZZR wurde in jedem Tier die individuelle Isoflurandosierung bestimmt, um das Narkosestadium III.1 (nach Guedel), das Stadium der Hypnose, zu erreichen. Bupivacain 0,5 %, Lidocain 2 %, Mepivacain 20 mg/ml oder Procain 4 %, wurden i.t. mit zusätzlichem subkutanem Depot injiziert. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten erfolgte die Kastration. Als Vergleich diente eine Gruppe, der Kochsalz injiziert wurde und eine Gruppe, in der die Eingriffe lediglich simuliert wurden.

Während dem ZZR und während der einzelnen Kastrationsschritte wurde die kortikale Aktivität mittels eines Zweikanal-EEGs aufgezeichnet. Die Änderung der Wellenaktivität im Vergleich zur Baseline wurde über 90 Sekunden im Spektralbereich von >0–30 Hz ausgewertet und als Spektrogramm dargestellt. Nach Abschluss der Messungen wurden die Ferkel in Narkose schmerzfrei euthanasiert. Unmittelbar danach wurden lumbale (L1, L2, L3) und sakrale (S1–3) Abschnitte des Rückenmarkes entnommen. Nach histologischer Aufarbeitung der Gewebeproben und immunhistochemischer Färbereaktion von Gewebeschnitten, wurde die FOS-Expression im Dorsalhorn mittels einer semiquantitativen Bewertungsmethode evaluiert.

Die EEG-Auswertung des ZZR s zeigte ein biphasisches Reaktionsmuster, welches in dem gewählten Versuchsaufbau das Reaktionsmuster von Ferkeln auf einen peripheren noxischen Reiz über 90 s darstellt. Ähnliche Muster traten nach dem Hautschnitt und nach der Samenstrangdurchtrennung bei den Tieren auf, die ohne Analgesie kastriert wurden. In den Lokalanästhesie-Gruppen und in der Handling-Gruppe waren die EEG-Reaktionen nicht vorhanden bzw. deutlich geringer. Nach der i.t. und s.sc. Injektion einer Substanz treten in allen Gruppen zumindest kurze, signifikante Reaktionen auf. Die FOS-Expression war, außer in der Bupivacain-Gruppe, in den Lokalanästhesie-Gruppen und in der Handling-Gruppe im Vergleich zur NaCl-Gruppe verringert.

Auf der Grundlage der EEG- und FOS-Daten kann davon ausgegangen werden, dass in dem gewählten Versuchsaufbau, die Verwendung von Lokalanästhetika zur Saugferkelkastration, sehr wahrscheinlich die nozizeptive Übertragung peripherer Noxen auf die Großhirnrinde vermindert. Die geringere nozizeptive Aktivierung wurde ebenfalls auf Ebene des Rückenmarks festgestellt. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den signifikant reduzierten Abwehrbewegungen und kardiovaskulären Reaktionen bei der Kastration durch die Anwendung eines Lokalanästhetikums (SALLER et al., 2020).

Weitere Untersuchungen am wachen Tier sind notwendig um den Schmerz während der Saugferkelkastration und seine Verringerung durch Lokalanästhetika in der Gesamtheit seiner Dimensionen zu beurteilen.

## VII. SUMMARY

No procedure involving pain may be performed on vertebrates without anesthesia (TierSchG § 5). Since 1.1.2021, this principle also applies to the castration of piglets less than eight days old. The investigation of whether local anesthesia provides sufficient analgesia for this procedure and fulfills the requirements of the Animal Welfare Act is the aim of a comprehensive overall study consisting of several sections. The present paper presents results from the first part of the study, in which the nociceptive response of piglets to castration under isoflurane anesthesia was investigated. Changes in EEG and FOS expression in the spinal dorsal horn were collected in addition to the "classical" hemodynamic and neurohumoral parameters to obtain an overall picture of the nociceptive response.

Using a noxious interdigital pinch, the individual isoflurane dosage was determined in each animal individually, to reach anesthetic stage III.1 (according to Guedel), the stage of hypnosis. Bupivacaine 0.5%, lidocaine 2%, mepivacaine 20 mg/ml or procaine 4% were injected intratesticularly with an additional subcutaneous depot. After an exposure time of 20 minutes, castration was performed. A group injected with saline and a group in which the procedures were only simulated served as a comparison.

Following the interdigital pinch and during each castration step, cortical activity was recorded using a two-channel EEG. The change in wave activity compared to baseline values was evaluated over 90 seconds in the spectral range of >0–30 Hz and displayed as a spectrogram. After completion of the measurements, piglets were euthanized under anesthesia. Immediately thereafter, lumbar (L1, L2, L3) and sacral (S13) segments of the spinal cord were harvested. After histological processing of tissue samples and immunohistochemical staining reaction of tissue sections, FOS expression in the dorsal horn was evaluated by a semiquantitative scoring approach.

EEG evaluation of the interdigit pinch revealed a biphasic response pattern, which in the applied experimental setup represents the response pattern of piglets to a peripheral noxious stimulus over 90 s. Similar patterns occurred after skin incision and after dissection of the spermatic cord in animals

castrated without analgesia. In the local anesthesia groups and in the handling group, the EEG responses were absent or significantly smaller, respectively. After intratesticular and subscrotal injection of a substance, at least brief significant responses occurred in all groups. FOS expression was decreased, except in the bupivacaine group, in the local anesthetic groups and in the handling group compared with the NaCl group.

On the basis of the EEG and FOS data, it can be assumed that in the applied experimental setup, the use of local anesthetics for suckling piglet castration, most likely decreased the nociceptive transmission of peripheral noxious agents to the cerebral cortex. The decreased nociceptive activation was also found at the level of the spinal cord. These results are consistent with significantly reduced defensive movements and cardiovascular responses during castration with the use of a local anesthetic (SALLER et al., 2020).

Further studies on the awake animal are necessary to assess pain during suckling piglet castration and its reduction by local anesthetics in all its dimensions.

## VIII. TABELLENVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <i>Tabelle 1: Übersicht Versuchsgruppen, verwendete Präparate, Wirkstoffe, Injizierte Volumina, Kastration +/- .....</i> | <i>30</i> |
| <i>Tabelle 2: Entparaffinierung der Schnitte vor HE-Färbung mittels absteigender Alkoholreihe .....</i>                  | <i>40</i> |
| <i>Tabelle 3: Immunhistochemisches Protokoll.....</i>  | <i>41</i> |
| <i>Tabelle 4: Semiquantitativer FOS Bewertungsscore.....</i>   | <i>43</i> |
| <i>Tabelle 5: Übersicht der im EEG ausgewerteten Anzahl Tiere in den Versuchsgruppen.....</i>                            | <i>45</i> |
| <i>Tabelle 6: Übersicht der immunhistochemisch ausgewerteten Anzahl Tiere in den Versuchsgruppen .....</i>               | <i>59</i> |



## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Abbildung des Roh-EEGs eines Ferkels über 60 s, abgebildet sind beide Messkanäle (rechte und linke Hemisphäre), zur leichteren Unterscheidung sind die Spuren um 5  $\mu$ V versetzt. .... 15*
- Abbildung 2: Beispielhafte Powerspektrumanalyse eines Ferkels vor und nach einem Schmerzreiz, Abbildung der Baseline und der Zeitpunkte 30 s und 90 s post Stimulus..... 15*
- Abbildung 3: Spektrogramm eines Ferkels der Handling-Gruppe bei 1,6 % FI Iso, über eine Zeit von 6000 s. Abgebildet ist der Frequenzbereich von 0–30 Hz, die Power der Frequenzen ist farbcodiert in dB dargestellt. .... 15*
- Abbildung 4: Platzierung und Fixation der EEG-Nadelelektroden..... 32*
- Abbildung 5: Freigelegtes Rückenmark mit Lokalisation der Lendenwirbel (LW1–LW6) und der Spinalsegmente (L1–L6, S1–3) ..... 36*
- Abbildung 6: Ausgewertete Fläche für den FOS-Score. .... 42*
- Abbildung 7: Beispielbilder für Score 1–4 des FOS-Scores..... 43*
- Abbildung 8: Spektrogramm der Poweränderung im EEG nach dem ZZR über 90 s post Stimulus (n=44). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt..... 46*
- Abbildung 9: Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0,1–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der i.t. und s.sc. Injektion (NaCl: n=7, Lidocain: n=7, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=6, Handling: n=7). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt..... 48*
- Abbildung 10: Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der Inzision (NaCl: n=6, Lidocain: n=8, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=5, Handling: n=8). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt. .... 50*

- Abbildung 11: Spektrogramm der Poweränderung im EEG in den Frequenzen von 0–30 Hz über 90 s post Stimulus nach der Samenstrangdurchtrennung (NaCl: n=6, Lidocain: n=7, Bupivacain: n=9, Mepivacain: n=5, Procain: n=5, Handling: n=8). Änderung der Power farbcodiert als Vielfaches des Baseline-Wertes dargestellt. .... 52*
- Abbildung 12: Vergleich der Poweränderung im EEG während der Frühreaktion (A, C) und Spätreaktion (C, D) nach Hautinzision (A, B) und nach Samenstrangdurchtrennung (C, D) im Vergleich zur NaCl-Gruppe. 54*
- Abbildung 13: Verlauf der Alpha-Bandleistung (8–12 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve mit 95 % Konfidenzintervallen, • zeigen signifikante Änderungen an. .... 55*
- Abbildung 14: Verlauf der Beta-Bandleistung (12–30 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an..... 56*
- Abbildung 15: Verlauf der Theta-Bandleistung (4–8 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an..... 56*
- Abbildung 16: Verlauf der Delta-Bandleistung (0,1–4 Hz) über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an..... 57*
- Abbildung 17: Verlauf der Gesamt-Power über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an..... 57*
- Abbildung 18: Verlauf der SEF95 über 90 s nach ZZR1 im Vergleich zur Baseline, unten dazugehörige ROC-Kurve (AUC) mit 95 % Konfidenz-Intervallen, • zeigen signifikante Änderungen an..... 58*
- Abbildung 19: Streudiagramm des FOS-Scores, \*stat. signifikant. .... 59*

## X. LITERATURVERZEICHNIS

Abbadie C, Honoré P, Fournié-Zaluski MC, Roques BP, Besson JM. Effects of opioids and non-opioids on c-Fos-like immunoreactivity induced in rat lumbar spinal cord neurons by noxious heat stimulation. *Eur J Pharmacol* 1994; 258: 215-27.

Abendschön N, Senf S, Deffner P, Miller R, Grott A, Werner J, Saller AM, Reiser J, Weiß C, Zablotki Y, Fischer J, Bergmann S, Erhard MH, Baumgartner C, Ritzmann M, Zöls S. Local Anesthesia in Piglets Undergoing Castration-A Comparative Study to Investigate the Analgesic Effects of Four Local Anesthetics Based on Defensive Behavior and Side Effects. *Animals (Basel)* 2020; 10

Agrawal U, Berde CB, Cornelissen L. Electroencephalographic features of discontinuous activity in anesthetized infants and children. *PLoS One* 2019; 14: e0223324.

Ahmad AH, Ismail Z. c-fos and its Consequences in Pain. *Malays J Med Sci* 2002; 9: 3-8.

Akeju O, Pavone KJ, Westover MB, Vazquez R, Prerau MJ, Harrell PG, Hartnack KE, Rhee J, Sampson AL, Habeeb K, Gao L, Pierce ET, Walsh JL, Brown EN, Purdon PL. A comparison of propofol- and dexmedetomidine-induced electroencephalogram dynamics using spectral and coherence analysis. *Anesthesiology* 2014; 121: 978-89.

Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004; 1000: 40-56.

Antognini JF, Carstens E. In vivo characterization of clinical anaesthesia and its components. *Br J Anaesth* 2002; 89: 156-66.

Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK. Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 2005; 9: 463-84.

Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rüllicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 2001; 51: 443-56.

Baars JH, Rintisch U, Rehberg B, Lahrmann KH, von Dincklage F. Prediction of motor responses to surgical stimuli during bilateral orchietomy of pigs using nociceptive flexion reflexes and the bispectral index derived from the electroencephalogram. *Vet J* 2013; 195: 377-81.

Bell A. The neurobiology of acute pain. *Vet J* 2018; 237: 55-62.

Berger H. Über das Elektrenkephalogramm des Menschen. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 1929; 87: 527-70.

Bimar J, Bellville JW. Arousal reactions during anesthesia in man. *Anesthesiology* 1977; 47: 449-54.

Bischoff P. [Perioperative EEG monitoring: studies of the electrophysiological arousal mechanism]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1994; 29: 322-9.

Bishop JM. Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes. *Cell* 1981; 23: 5-6.

Bishop JM. Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 301-54.

Bojovic O, Panja D, Bittins M, Bramham CR, Tjølsen A. Time course of immediate early gene protein expression in the spinal cord following conditioning stimulation of the sciatic nerve in rats. *PLoS One* 2015; 10: e0123604.

Borsook D, Becerra L. CNS animal fMRI in pain and analgesia. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35: 1125-43.

Botti M, Minelli LB, Gazza F, Ragionieri L, Acone F, Panu R, Palmieri G. Sensory, motor somatic, and autonomic neurons projecting to the porcine cremaster muscle. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288: 1050-8.

Bourne S, Machado AG, Nagel SJ. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg Clin N Am* 2014; 25: 629-38.

Brown EN, Lydic R, Schiff ND. General anesthesia, sleep, and coma. *N Engl J Med* 2010; 363: 2638-50.

Bruford EA, Braschi B, Denny P, Jones TEM, Seal RL, Tweedie S. Guidelines for human gene nomenclature. *Nature genetics* 2020; 52: 754-8.

Bullitt E, Lee CL, Light AR, Willcockson H. The effect of stimulus duration on noxious-stimulus induced c-fos expression in the rodent spinal cord. *Brain Res* 1992; 580: 172-9.

Caton R. Electrical Currents of the Brain. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 1875; 2: 610.

Chini M, Gretenkord S, Kostka JK, Pöpplau JA, Cornelissen L, Berde CB, Hanganu-Opatz IL, Bitzenhofer SH. Neural Correlates of Anesthesia in Newborn Mice and Humans. *Front Neural Circuits* 2019; 13: 38.

Coggeshall RE. Fos, nociception and the dorsal horn. *Prog Neurobiol* 2005; 77: 299-352.

Connors BW, Regehr WG. Neuronal firing: does function follow form? *Curr Biol* 1996; 6: 1560-2.

Constant I, Sabourdin N. The EEG signal: a window on the cortical brain activity. *Paediatr Anaesth* 2012; 22: 539-52.

Cornelissen L, Kim SE, Purdon PL, Brown EN, Berde CB. Age-dependent electroencephalogram (EEG) patterns during sevoflurane general anesthesia in infants. *Elife* 2015; 4: e06513.

Cornelissen L, Bergin AM, Lobo K, Donado C, Soul JS, Berde CB. Electroencephalographic discontinuity during sevoflurane anesthesia in infants and children. *Paediatr Anaesth* 2017; 27: 251-62.

Curran T, Peters G, Van Beveren C, Teich NM, Verma IM. FBJ murine osteosarcoma virus: identification and molecular cloning of biologically active proviral DNA. *J Virol* 1982; 44: 674-82.

Curran T, MacConnell WP, van Straaten F, Verma IM. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome: molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol Cell Biol* 1983; 3: 914-21.

Curran T, Miller AD, Zokas L, Verma IM. Viral and cellular fos proteins: a comparative analysis. *Cell* 1984; 36: 259-68.

Da Silva JT, Seminowicz DA. Neuroimaging of pain in animal models: a review of recent literature. *Pain Rep* 2019; 4: e732.

Derbyshire AJ, Rempel B, Forbes A, Lambert EF. The effects of anesthetics in action potentials in the cerebral cortex of the cat. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1936; 116: 577-96.

Diesch T, Mellor D, Johnson C, Lentle R. Responsiveness to painful stimuli in anaesthetised newborn and young animals of varying neurological maturity (wallaby joeys, rat pups and lambs). *AATEX* 2008; 14

Diesch TJ, Mellor DJ, Johnson CB, Lentle RG. Electroencephalographic responses to tail clamping in anaesthetized rat pups. *Lab Anim* 2009; 43: 224-31.

Dullenkopf A, Borgeat A. [Local anesthetics. Differences and similarities in the "-cains"]. *Anaesthesist* 2003; 52: 329-40.

Egekvist H, Bjerring P, Arendt-Nielsen L. Pain and mechanical injury of human skin following needle insertions. *Eur J Pain* 1999; 3: 41-9.

Eger EI, 2nd, Johnson BH, Weiskopf RB, Holmes MA, Yasuda N, Targ A, Rampil IJ. Minimum alveolar concentration of I-653 and isoflurane in pigs: definition of a supramaximal stimulus. *Anesth Analg* 1988; 67: 1174-6.

Finkel MP, Biskis BO, Jinkins PB. Virus induction of osteosarcomas in mice. *Science* 1966; 151: 698-701.

García PS, Kreuzer M, Hight D, Sleigh JW. Effects of noxious stimulation on the electroencephalogram during general anaesthesia: a narrative review and approach to analgesic titration. *Br J Anaesth* 2021; 126: 445-57.

Haga HA, Tevik A, Moerch H. Electroencephalographic and cardiovascular indicators of nociception during isoflurane anaesthesia in pigs. *Vet Anaesth Analg* 2001; 28: 126-31.

Haga HA, Tevik A, Moerch H. Motor responses to stimulation during isoflurane anaesthesia in pigs. *Vet Anaesth Analg* 2002; 29: 69-75.

Haga HA, Ranheim B. Castration of piglets: the analgesic effects of intratesticular and intrafunicular lidocaine injection. *Vet Anaesth Analg* 2005; 32: 1-9.

Haga HA, Dolvik NI. Electroencephalographic and cardiovascular variables as nociceptive indicators in isoflurane-anaesthetized horses. *Vet Anaesth Analg* 2005; 32: 128-35.

Haga HA, Ranheim B, Spadavecchia C. Effects of isoflurane upon minimum alveolar concentration and cerebral cortex depression in pigs and goats: an interspecies comparison. *Vet J* 2011; 187: 217-20.

Hagihira S. Changes in the electroencephalogram during anaesthesia and their physiological basis. *Br J Anaesth* 2015; 115 Suppl 1: i27-i31.

Hanna MN, Elhassan A, Veloso PM, Lesley M, Lissauer J, Richman JM, Wu CL. Efficacy of bicarbonate in decreasing pain on intradermal injection of local anesthetics: a meta-analysis. *Reg Anesth Pain Med* 2009; 34: 122-5.

Harris JA. Using c-fos as a neural marker of pain. *Brain Res Bull* 1998; 45: 1-8.

Hayashi K, Shigemi K, Sawa T. Neonatal electroencephalography shows low sensitivity to anesthesia. *Neurosci Lett* 2012; 517: 87-91.

Henke J, Tacke S, Erhardt W. Mechanismen der Anästhesie. In: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*, 2. Auflage. Erhardt W, Henke J, Haberstroh J, Baumgartner C, Tacke S, Hrsg. Stuttgart: Schattauer GmbH 2012: 317-348. 2012;

Hentschke H, Stüttgen MC. Computation of measures of effect size for neuroscience data sets. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 1887-94.

Herff C, Krusienski DJ. Extracting Features from Time Series. In: *Fundamentals of Clinical Data Science*. Kubben P, Dumontier M, Dekker A, eds. Cham (CH): Springer

Copyright 2019, The Author(s). 2019: 85-100.

Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 1996; 50: 83-107.

Hinrichs. Technik. In: *EEG, 2. Auflage*. Ebner, A., Deuschl, G, Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2002: 73-77. 2002;

Hogan ME, vanderVaart S, Perampaladas K, Machado M, Einarson TR, Taddio A. Systematic review and meta-analysis of the effect of warming local anesthetics on injection pain. *Ann Emerg Med* 2011; 58: 86-98.e1.

Hoppe. Befundung von EEG-Kurven. In: *EEG, 2. Auflage*. Ebner, A., Deuschl, G., Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2002: 177-181.: 2002:

Howe NR, Williams JM. Pain of injection and duration of anesthesia for intradermal infiltration of lidocaine, bupivacaine, and etidocaine. *J Dermatol Surg Oncol* 1994; 20: 459-64.

Hunt SP, Pini A, Evan G. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 1987; 328: 632-4.

Ison SH, Clutton RE, Di Giminiani P, Rutherford KM. A Review of Pain Assessment in Pigs. *Front Vet Sci* 2016; 3: 108.

Jaber SM, Sullivan S, Hankenson FC, Kilbaugh TJ, Margulies SS. Comparison of Heart Rate and Blood Pressure with Toe Pinch and Bispectral Index for Monitoring the Depth of Anesthesia in Piglets. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015; 54: 536-44.

John ER, Prichep LS. The anesthetic cascade: a theory of how anesthesia suppresses consciousness. *Anesthesiology* 2005; 102: 447-71.

Johnson C, Sutherland M, Beausoleil N, Kells N (2015) Validation of EEG measures for pain assessment in piglets aged 0 to 10 days, [pork.org](http://pork.org)

Johnson C. Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception. *Animals (Basel)* 2016; 6

Johnson CB, Taylor PM. Comparison of the effects of halothane, isoflurane and methoxyflurane on the electroencephalogram of the horse. *Br J Anaesth* 1998; 81: 748-53.

Johnson CB, Wilson PR, Woodbury MR, Caulkett NA. Comparison of analgesic techniques for antler removal in halothane-anaesthetized red deer (*Cervus elaphus*): electroencephalographic responses. *Vet Anaesth Analg* 2005; 32: 61-71.

Johnson CB, Gibson T, Flint P, Wilson PW, Mellor DJ. New techniques for pain recognition: What are the applications, where are the limits? *Proceedings of the AAWS International Animal Welfare Conference* 2008;

Johnson CB, Sylvester SP, Stafford KJ, Mitchinson SL, Ward RN, Mellor DJ. Effects of age on the electroencephalographic response to castration in lambs anaesthetized with halothane in oxygen from birth to 6 weeks old. *Vet Anaesth Analg* 2009; 36: 273-9.

Kaiser HA, Knapp J, Sleight J, Avidan MS, Stüber F, Hight D. [The quantitative EEG in electroencephalogram-based brain monitoring during general anesthesia]. *Anaesthesist* 2021; 70: 531-47.

Kaleczyc J, Scheuermann DW, Pidsudko Z, Majewski M, Lakomy M, Timmermans JP. Distribution, immunohistochemical characteristics and nerve pathways of primary sensory neurons supplying the porcine vas deferens. *Cell Tissue Res* 2002; 310: 9-17.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 240-6.

Kells N, Beausoleil N, Johnson C, Sutherland M. Evaluation of Different Gases and Gas Combinations for On-Farm Euthanasia of Pre-Weaned Pigs. *Animals (Basel)* 2018; 8

Kells NJ, Beausoleil NJ, Sutherland MA, Morrison RM, Johnson CB. Electroencephalographic assessment of oral meloxicam, topical anaesthetic cream and cautery iron for mitigating acute pain in pigs (*Sus scrofa*) undergoing tail docking. *Vet Anaesth Analg* 2017a; 44: 1166-74.

Kells NJ, Beausoleil NJ, Chambers JP, Sutherland MA, Morrison RS, Johnson CB. Electroencephalographic responses of anaesthetized pigs (*Sus scrofa*) to tail docking using clippers or cautery iron performed at 2 or 20 days of age. *Vet Anaesth Analg* 2017b; 44: 1156-65.

Khera T, Rangasamy V. Cognition and Pain: A Review. *Front Psychol* 2021; 12: 673962.

Kratzer S, Schneider M, Obert DP, Schneider G, García PS, Kreuzer M. Age-Related EEG Features of Bursting Activity During Anesthetic-Induced Burst Suppression. *Front Syst Neurosci* 2020; 14: 599962.

Kreuzer M, Stern MA, Hight D, Berger S, Schneider G, Sleight JW, García PS. Spectral and Entropic Features Are Altered by Age in the Electroencephalogram in Patients under Sevoflurane Anesthesia. *Anesthesiology* 2020; 132: 1003-16.

Lackner A (2003) Untersuchungen zur Schmerzhaftigkeit und der Wundheilung bei der Kastration männlicher Ferkel zu unterschiedlichen Kastrationszeitpunkten

Lakomy M, Kaleczyc J, Majewski M. Noradrenergic and peptidergic innervation of the testis and epididymis in the male pig. *Folia Histochem Cytobiol* 1997; 35: 19-27.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 597-652.

Lee MC, Tracey I. Imaging pain: a potent means for investigating pain mechanisms in patients. *Br J Anaesth* 2013; 111: 64-72.

Lemke KA, Dawson SD. Local and regional anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 839-57.

Levy WJ, Shapiro HM, Maruchak G, Meathe E. Automated EEG processing for intraoperative monitoring: a comparison of techniques. *Anesthesiology* 1980; 53: 223-36.

Lima D, Avelino A, Coimbra A. Differential activation of c-fos in spinal neurones by distinct classes of noxious stimuli. *Neuroreport* 1993; 4: 747-50.

Livingston A. Pain and analgesia in domestic animals. *Handb Exp Pharmacol* 2010: 159-89.

Llonch P, Rodríguez P, Jospin M, Dalmau A, Manteca X, Velarde A. Assessment of unconsciousness in pigs during exposure to nitrogen and carbon dioxide mixtures. *Animal* 2013; 7: 492-8.

Lopes da Silva FH, Smith NT, Zwart A, Nichols WW. Spectral analysis of the EEG during halothane anaesthesia: input-output relations. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 33: 311-9.

Lundeen G, Manohar M, Parks C. Systemic distribution of blood flow in swine while awake and during 1.0 and 1.5 MAC isoflurane anesthesia with or without 50% nitrous oxide. *Anesth Analg* 1983; 62: 499-512.

Lykkegaard K, Lauritzen B, Tessem L, Weikop P, Svendsen O. Local anaesthetics attenuates spinal nociception and HPA-axis activation during experimental laparotomy in pigs. *Res Vet Sci* 2005; 79: 245-51.

Lykkegaard K, Lykkesfeldt J, Lauritzen B, Svendsen O. Morphine reduces spinal c-fos expression dose-dependently during experimental laparotomy in pigs: a combined pharmacokinetic and surgical study. *Res Vet Sci* 2008; 84: 457-64.

Malver LP, Brokjaer A, Staahl C, Graversen C, Andresen T, Drewes AM. Electroencephalography and analgesics. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 77: 72-95.

Mathews K, Kronen PW, Lascelles D, Nolan A, Robertson S, Steagall PV, Wright B, Yamashita K. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain: WSAVA Global Pain Council members and co-authors of this document. *J Small Anim Pract* 2014; 55: E10-68.

McKay W, Morris R, Mushlin P. Sodium bicarbonate attenuates pain on skin infiltration with lidocaine, with or without epinephrine. *Anesth Analg* 1987; 66: 572-4.

Mellor DJ, Gregory NG. Responsiveness, behavioural arousal and awareness in fetal and newborn lambs: experimental, practical and therapeutic implications. *N Z Vet J* 2003; 51: 2-13.

Meyerholz DK, Beck AP. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. *Lab Invest* 2018; 98: 844-55.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999; 57: 1-164.

Morgan JI, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 421-51.

Morris R, McKay W, Mushlin P. Comparison of pain associated with intradermal and subcutaneous infiltration with various local anesthetic solutions. *Anesth Analg* 1987; 66: 1180-2.

Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1949; 1: 455-73.

Müller R. Cellular and viral fos genes: structure, regulation of expression and biological properties of their encoded products. *Biochim Biophys Acta* 1986; 823: 207-25.

Munzlani R, Hunt SP. Molecular biology of pain. *Br J Anaesth* 1995; 75: 186-92.

Murrell JC, Johnson CB, White KL, Taylor PM, Haberham ZL, Waterman-Pearson AE. Changes in the EEG during castration in horses and ponies anaesthetized with halothane. *Vet Anaesth Analg* 2003; 30: 138-46.

Murrell JC, Johnson CB. Neurophysiological techniques to assess pain in animals. *J Vet Pharmacol Ther* 2006; 29: 325-35.

Murrell JC, Mitchinson SL, Waters D, Johnson CB. Comparative effect of thermal, mechanical, and electrical noxious stimuli on the electroencephalogram of the rat. *Br J Anaesth* 2007; 98: 366-71.

Murrell JC, Waters D, Johnson CB. Comparative effects of halothane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on the electroencephalogram of the rat. *Lab Anim* 2008; 42: 161-70.

Neundörfer. Entstehungsmechanismen. In: EEG-Fibel, 5. Auflage. Neundörfer B Hrsg. München: Urban & Fischer 2002: 2-3. 2002;

Newson JJ, Thiagarajan TC. EEG Frequency Bands in Psychiatric Disorders: A Review of Resting State Studies. *Front Hum Neurosci* 2018; 12: 521.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Nervensystem, Sinnesorgane, endokrine Drüsen. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere* Stuttgart, Germany: parey Verlag 1991: p 273.

Niedermeyer E, Sherman DL, Geocadin RJ, Hansen HC, Hanley DF. The burst-suppression electroencephalogram. *Clin Electroencephalogr* 1999; 30: 99-105.

Nyborg P, Soerig A, Lykkegaard K, Svendsen O (2000) Nociception after castration of juvenile pigs determined by quantitative estimation of c-Fos expressing neurons in the spinal cord dorsal horn

Nyborg PYS, A. ; Lykkegaard, K. ; Svendsen, O. Nociception after castration of juvenile pigs determined by quantitative estimation of c-Fos expressing neurons in the spinal cord dorsal horn. Dansk Veterinærtidsskrift 2000; Vol.83: 16-7.

Obert DP, Schweizer C, Zinn S, Kratzer S, Hight D, Sleight J, Schneider G, García PS, Kreuzer M. The influence of age on EEG-based anaesthesia indices. J Clin Anesth 2021; 73: 110325.

Omerhodzic I, Avdakovic S, Nuhanovic A, Dizdarevic K, Rotim K (2012) Energy distribution of EEG signal components by wavelet transform. chapter

Otte A (2010) Die Fourier-Transformation und ihre Bedeutung für die biomedizinische Systemtechnik. In: Schriften der Wissenschaftlichen Hochschule Lahr, Lahr

Otto K, Short CE. Electroencephalographic power spectrum analysis as a monitor of anesthetic depth in horses. Vet Surg 1991; 20: 362-71.

Otto KA, Mally P. Noxious stimulation during orthopaedic surgery results in EEG 'arousal' or 'paradoxical arousal' reaction in isoflurane-anaesthetised sheep. Res Vet Sci 2003; 75: 103-12.

Otto KA. Effects of averaging data series on the electroencephalographic response to noxious visceral stimulation in isoflurane-anaesthetized dogs. Res Vet Sci 2007; 83: 385-93.

Pampiglione G. Electroencephalography in Animals [Abridged]. Proc R Soc Med 1965; 58: 547-8.

Pampiglione G. Some aspects of development of cerebral function in mammals. Proc R Soc Med 1971; 64: 429-35.

Paul-Murphy J, Ludders JW, Robertson SA, Gaynor JS, Hellyer PW, Wong PL. The need for a cross-species approach to the study of pain in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2004; 224: 692-7.

Piechaczyk M, Blanchard JM. c-fos proto-oncogene regulation and function. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17: 93-131.

Ploner M, Sorg C, Gross J. Brain Rhythms of Pain. *Trends Cogn Sci* 2017; 21: 100-10.

Purdon PL, Sampson A, Pavone KJ, Brown EN. Clinical Electroencephalography for Anesthesiologists: Part I: Background and Basic Signatures. *Anesthesiology* 2015; 123: 937-60.

Raja SN, Carr DB, Cohen M, Finnerup NB, Flor H, Gibson S, Keefe FJ, Mogil JS, Ringkamp M, Sluka KA, Song XJ, Stevens B, Sullivan MD, Tutelman PR, Ushida T, Vader K. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain* 2020; 161: 1976-82.

Rampil IJ, Weiskopf RB, Brown JG, Eger EI, 2nd, Johnson BH, Holmes MA, Donegan JH. I653 and isoflurane produce similar dose-related changes in the electroencephalogram of pigs. *Anesthesiology* 1988; 69: 298-302.

Rampil IJ, Laster MJ. No correlation between quantitative electroencephalographic measurements and movement response to noxious stimuli during isoflurane anesthesia in rats. *Anesthesiology* 1992; 77: 920-5.

Rampil IJ, Mason P, Singh H. Anesthetic potency (MAC) is independent of forebrain structures in the rat. *Anesthesiology* 1993; 78: 707-12.

Rampil IJ. Anesthetic potency is not altered after hypothermic spinal cord transection in rats. *Anesthesiology* 1994; 80: 606-10.

Rampil IJ. A primer for EEG signal processing in anesthesia. *Anesthesiology* 1998; 89: 980-1002.

Ranheim B, Haga HA, Ingebrigtsen K. Distribution of radioactive lidocaine injected into the testes in piglets. *J Vet Pharmacol Ther* 2005; 28: 481-3.

Rault J-L, Lay DC, Marchant-Forde JN. Castration induced pain in pigs and other livestock. *Applied Animal Behaviour Science* 2011; 135: 214-25.

Rault JL, Truong S, Hemsworth L, Le Chevoir M, Bauquier S, Lai A. Gentle abdominal stroking ('belly rubbing') of pigs by a human reduces EEG total power and increases EEG frequencies. *Behav Brain Res* 2019; 374: 111892.

Reiner G, Heinrich L, Brenig B, Geldermann H, Dzapo V. Cloning, structural organization, and chromosomal assignment of the porcine c-fos proto-oncogene, FOS. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 89: 59-61.

Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol* 1952; 96: 414-95.

Rintisch U, Baars J, Lahrmann KH. [Evaluation of perioperative analgesia by nociceptive flexor reflex in pigs under ketamine-azaperone-general anaesthesia]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2012; 125: 96-102.

Saller AM, Werner J, Reiser J, Senf S, Deffner P, Abendschön N, Weiß C, Fischer J, Schörwerth A, Miller R, Zablotzki Y, Bergmann S, Erhard MH, Ritzmann M, Zöls S, Baumgartner C. Local anesthesia in piglets undergoing castration-A comparative study to investigate the analgesic effects of four local anesthetics on the basis of acute physiological responses and limb movements. *PLoS One* 2020; 15: e0236742.

Sassenhagen J, Draschkow D. Cluster-based permutation tests of MEG/EEG data do not establish significance of effect latency or location. *Psychophysiology* 2019; 56: e13335.

Satas S, Haaland K, Thoresen M, Steen PA. MAC for halothane and isoflurane during normothermia and hypothermia in the newborn piglet. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996; 40: 452-6.

Schiavenato M, Craig KD. Pain assessment as a social transaction: beyond the "gold standard". *Clin J Pain* 2010; 26: 667-76.

Schieber RA, Namnoum A, Sugden A, Shiu GK, Orr RA, Cook DR. Hemodynamic effects of isoflurane in the newborn piglet: comparison with halothane. *Anesth Analg* 1986; 65: 633-8.

Schmid RG, Tirsch WS. Neurophysiologische Grundlagen des EEG. In: *Klinische Elektroenzephalographie des Kindes- und Jugendalters: Ein Atlas der EEG-Aktivität: Altersbezogene Normkurven und Pathologie* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 1995: 5-12.

Scholz S, Schneider SL, Rose M. Differential effects of ongoing EEG beta and theta power on memory formation. *PLoS One* 2017; 12: e0171913.

Schulz. Artefakte. In: *EEG, 2. Auflage*. Ebner, A., Deuschl, G, Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2002: 73-77. 2002;

Schwender D, Daunderer M, Klasing S, Finsterer U, Peter K. Power spectral analysis of the electroencephalogram during increasing end-expiratory concentrations of isoflurane, desflurane and sevoflurane. *Anaesthesia* 1998; 53: 335-42.

Schwilden H, Stoeckel H. Quantitative EEG analysis during anaesthesia with isoflurane in nitrous oxide at 1.3 and 1.5 MAC. *Br J Anaesth* 1987; 59: 738-45.

Sheil M, Polkinghorne A. Optimal Methods of Documenting Analgesic Efficacy in Neonatal Piglets Undergoing Castration. *Animals (Basel)* 2020; 10

Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG. The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev* 1989; 3: 60-72.

Sienkiewicz W. Sources of the porcine testis innervation. *Andrologia* 2010; 42: 395-403.

Silva A, Antunes L. Electroencephalogram-based anaesthetic depth monitoring in laboratory animals. *Lab Anim* 2012; 46: 85-94.

Sitdikova G, Zakharov A, Janackova S, Gerasimova E, Lebedeva J, Inacio AR, Zaynutdinova D, Minlebaev M, Holmes GL, Khazipov R. Isoflurane suppresses early cortical activity. *Ann Clin Transl Neurol* 2014; 1: 15-26.

Sneddon L, Elwood R, Adamo S, Leach M. Defining and assessing animal pain. *Animal Behaviour* 2014; 97: 201-12.

Sneddon LU. Comparative Physiology of Nociception and Pain. *Physiology (Bethesda)* 2018; 33: 63-73.

Srinivasan R, Winter WR, Nunez PL. Source analysis of EEG oscillations using high-resolution EEG and MEG. *Prog Brain Res* 2006; 159: 29-42.

Staudt F (2014) Hans Berger und andere EEG-Pioniere. In: *Kinder-EEG*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Steagall PV, Bustamante H, Johnson CB, Turner PV. Pain Management in Farm Animals: Focus on Cattle, Sheep and Pigs. *Animals (Basel)* 2021; 11

Steigmann M (2013) Evaluierung der Schmerzausschaltung bei der Kastration männlicher Ferkel unter automatisierter Isoflurannarkose. Inaugural dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität.

Steriade M, Gloor P, Llinás RR, Lopes de Silva FH, Mesulam MM. Report of IFCN Committee on Basic Mechanisms. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990; 76: 481-508.

Stoffel MH. Rückenmark. In: *Funktionelle Neuroanatomie für die Tiermedizin, 2., aktualisierte Auflage* edn. Stoffel MH, ed.: Georg Thieme Verlag KG 2021:

Strazar AR, Leynes PG, Lalonde DH. Minimizing the pain of local anesthesia injection. *Plast Reconstr Surg* 2013; 132: 675-84.

Stromberg MW, Kitchell RL, Usenik EA, Lagerwerff JM. Electroencephalographic patterns in normal pigs and burros. *Am J Vet Res* 1962; 23: 737-43.

Subasi A, Alkan A, Koklukaya E, Kiyimik MK. Wavelet neural network classification of EEG signals by using AR model with MLE preprocessing. *Neural Netw* 2005; 18: 985-97.

Sun X, Yokoyama M, Mizobuchi S, Kaku R, Nakatsuka H, Takahashi T, Morita K. The effects of pretreatment with lidocaine or bupivacaine on the spatial and temporal expression of c-Fos protein in the spinal cord caused by plantar incision in the rat. *Anesth Analg* 2004; 98: 1093-8, table of contents.

Svendson O, Edwards CN, Lauritzen B, Rasmussen AD. Intramuscular injection of hypertonic saline: in vitro and in vivo muscle tissue toxicity and spinal neurone c-fos expression. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97: 52-7.

Svendson O, Andersen CB, Mørkhøj CB, Lauritzen B. Spinal nociception induced by intramuscular injection of oxytetracycline preparations in rats and pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 99: 58-61.

Svendson O. Castration of piglets under carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) anaesthesia. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 2006; 29: 54-5.

Tierschutzgesetz (2021) Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist

Todd AJ. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 823-36.

Tong S, Thakor NV (2009) Quantitative EEG analysis methods and clinical applications. Artech House

Tonner PH, Bein B. Classic electroencephalographic parameters: median frequency, spectral edge frequency etc. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2006; 20: 147-59.

van Straaten F, Müller R, Curran T, Van Beveren C, Verma IM. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 3183-7.

Verhoeven M, Gerritzen M, Velarde A, Hellebrekers L, Kemp B. Time to Loss of Consciousness and Its Relation to Behavior in Slaughter Pigs during Stunning with 80 or 95% Carbon Dioxide. *Front Vet Sci* 2016; 3: 38.

Voss L, Sleigh J. Monitoring consciousness: the current status of EEG-based depth of anaesthesia monitors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2007; 21: 313-25.

Waldmann V, Otto KH, Bollwahn W. [Piglet castration--pain sensation and pain elimination]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 1994; 101: 105-9.

Walter WG, Dovey VJ. Electro-encephalography in cases of sub-cortical tumor. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1944; 7: 57-65.

Wang JM, Zhang GF, Zhou WH, Jiang ZD, Shao XM. Changes in amplitude-integrated electroencephalograms in piglets during selective mild head cooling after hypoxia-ischemia. *Pediatr Neonatol* 2014; 55: 282-90.

Williams DC, Brosnan RJ, Fletcher DJ, Aleman M, Holliday TA, Tharp B, Kass PH, LeCouteur RA, Steffey EP. Qualitative and Quantitative Characteristics of the Electroencephalogram in Normal Horses during Administration of Inhaled Anesthesia. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 289-303.

Witte. Hagemann G., Haueisen J. Physiologische Grundlagen des EEG. In: EEG, 2. Auflage. Ebner, A., Deuschl, G, Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 2002: 1-9. 2002;

Yi DK, Barr GA. The induction of Fos-like immunoreactivity by noxious thermal, mechanical and chemical stimuli in the lumbar spinal cord of infant rats. *Pain* 1995; 60: 257-65.

Zhang D, Ding H, Hou X, Liu Y, Ye D. Cerebral hypoxic ischemia at different cerebral oxygen saturations in piglets: amplitude-integrated EEG study. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* 2008; 2008: 4712-5.

Zhang D, Hou X, Liu Y, Zhou C, Luo Y, Ding H. The utility of amplitude-integrated EEG and NIRS measurements as indices of hypoxic ischaemia in the newborn pig. *Clin Neurophysiol* 2012; 123: 1668-75.

Zschocke S. Entstehungsmechanismen des EEG. In: *Klinische Elektroenzephalographie*. Hansen HC, ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2002: 1-46.

Zschocke S, Hansen H-C. Auswertung und Beschreibung des EEG. In: *Klinische Elektroenzephalographie*. Zschocke S, Hansen H-C, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2012: 69-80.

## **XI. DANKSAGUNG**

Mein größter Dank gilt meiner Mentorin Frau Professor Dr. Christine Baumgartner. Danke für die Überlassung dieses tollen, herausfordernden Themas und für die Chance und den Ansporn meine Dissertation im Rahmen dieses Forschungsprojektes anzufertigen. Danke für Deine in jeder Hinsicht umfangreiche Unterstützung, die konstruktiven, hilfreichen Vorschläge zur Verbesserung der Arbeit und den unumstößlichen Glauben an die erfolgreiche Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Professor Dr. Mathias Ritzmann bedanke ich mich besonders herzlich für die vertrauensvolle Übernahme dieser Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät der LMU und die tolle Kooperation in diesem Projekt.

Mein Dank geht im Besonderen auch an Frau Dr. Susanne Zöls, die den ersten Anstoß für diese Arbeit gegeben hat. Danke, dass Du den Stein ins Rollen gebracht hast. Danke für Deine Unterstützung, Deine hilfreichen Korrekturen und Dein gesamtes Engagement in diesem Projekt.

Einen riesigen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat Dr. Matthias Kreuzer, der mir mit seiner Expertise und Inspiration immer zur Seite stand und ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danke für Deine unermüdliche, geduldige Hilfe bei Fragen und Problemen jeglicher Art und bei der Erstellung und Auswertung der EEGs, es war mir eine Freude!

Für die Hilfe bei der Bearbeitung und Auswertung der Gewebeproben sage ich ganz herzlich Danke an PD Dr. Katja Steiger, Tanja Groll und das Team des Institutes für Vergleichende experimentelle Pathologie, die ihre Expertise beigetragen haben und mir hilfreich zur Seite standen.

Ein gigantisches Dankeschön geht an meine Kollegen vom Zentrum für Präklinische Forschung Dr. Johannes Fischer, Dr. Julia Werner, Dr. Anna Saller und Silke Baer, das OP-Team, die Tierpfleger und viele weitere Mitarbeiter. Danke euch für die mannigfaltige Hilfe bei der Anfertigung dieser Arbeit, für eure Ermutigungen und die schöne Zusammenarbeit in diesem tollen Team.

Auch durch die schöne, freundliche Zusammenarbeit mit den Kollegen der Klinik für Schweine Dr. Steffanie Senf, Dr. Pauline Deffner, Dr. Nora

Abendschön und mit vielen weiteren Helfern, die an der Durchführung der Studie beteiligt waren, wurde diese Arbeit möglich, Danke dafür. Danke ebenso an die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der LMU unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Michael Erhard für die gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel für die Durchführung des Projektes bedanke ich mich beim Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft und bei der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung.

Danke Hanno für Deine Unterstützung, Dein Verständnis und Deine unglaubliche Geduld. Dafür sei auch all meinen Freunden gedankt. Danke an meine Eltern und meine Geschwister für eure Unterstützung und eure Liebe.