

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

**Evidenz-basierte Belastungseinschätzung des *Forced Swim Test*
in der Ratte**

von

Laura Becker

aus Koblenz

München 2024

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

Angefertigt am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit in Mannheim

Mentoren:

Prof. Dr. Peter Gass

Dr. Anne Stephanie Mallien

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.
Berichtersteller: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka
Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Dorothea Döring

Tag der Promotion:
06. Juli 2024

Meinen Liebsten

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	VII
II. Einleitung	1
III. Literaturübersicht.....	3
1. Tierversuche in der Depressionsforschung.....	3
1.1. Krankheitsbild und Diagnose depressiver Störungen	3
1.2. Theorien zur Krankheitsentstehung	5
1.2.1. Die Monoaminhypothese	5
1.2.2. Die Neurotrophinhypothese	5
1.2.3. Die Bedeutung von Stress und das Diathese-Stress-Modell	7
1.2.4. Die Beteiligung des Glutamatsystems bei der Entstehung depressiver Störungen	9
1.3. Tiermodelle für depressive Störungen	10
1.4. Validität und Übertragbarkeit	12
1.5. Der <i>Forced Swim Test</i>	14
2. Natürliche Lebensweise von Wanderratten (<i>Rattus norvegicus</i>).....	16
2.1. Lebensraum (Affinität zum Wasser).....	16
2.2. Soziale Strukturen	17
3. Belastungseinschätzung von Tierversuchen und Vorstellung ausgewählter Parameter	19
3.1. Rechtliche Grundlagen der Belastungseinschätzung	19
3.2. Fäkale Kortikosteronmetaboliten	20
3.3. Wühlverhalten	22
3.4. Open-Field-Test.....	23
3.5. Saccharin-Präferenz-Test	23
3.6. Nestbauverhalten.....	24
3.7. Soziale Interaktionen	25
3.8. Wasser- und Futteraufnahme	26
3.9. Körpergewicht.....	27

4. Auswirkungen von Hypothermie auf den Organismus.....	29
4.1. Ursachen und Einteilung mehrerer Hypothermieformen	29
4.2. Folgen der Hypothermie auf den Organismus	30
4.3. Behandlung von Hypothermie bei Heimtieren	31
IV. Arbeitshypothesen und Zielsetzung	32
V. Publikation	34
VI. Übergreifende Diskussion	56
VII. Zusammenfassung	64
VIII. Summary	66
IX. Literaturverzeichnis	68
X. Anhang.....	90
XI. Danksagung.....	97

I. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	= Adrenocorticotropes Hormon
ADH	= Antidiuretisches Hormon
AMPA	= eine Untergruppe der Glutamatrezeptoren, (<i>mα-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>)
BDNF	= <i>brain-derived neurotrophic factor</i>
CMS	= Chronisch milder Stress
CRH	= <i>Corticotropin-Releasing-Hormon</i>
CSD	= Chronisch sozialer Unterwerfungsstress (<i>chronic social defeat</i>)
DSM	= <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
eEF2	= eukaryotischer Elongationsfaktor 2
FST	= <i>Forced Swim Test</i>
GABA	= γ -Aminobuttersäure
GC	= Glukokortikoide
HPA-Achse	= Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (<i>hypothalamic pituitary adrenal axis</i>)
ICD	= Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
KO	= <i>Knockout</i>
LINT	= Latenz bis zur Interaktion mit dem Nestmaterial Test (<i>latency until interaction with nest material test</i>)
MAO	= Monoamin-Oxidase
MAP	= <i>mitogen activated protein</i>
MRT	= Magnetresonanztomographie
NAc	= <i>Nucleus accumbens</i>

NMDA	= N-Methyl-D-Aspartat
RDoC	= <i>Research Domain Criteria</i>
SNP	= Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSNRI	= Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	= Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TZA	= Trizyklische Antidepressiva
VTA	= <i>Area tegmentalis ventralis, (ventral tegmental area)</i>
ZNS	= Zentrales Nervensystem

II. Einleitung

Depressive Störungen, insbesondere die sogenannte Major Depression, gehören mit einer Prävalenz von etwa 10 % zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen (Nübel et al., 2017). Die Symptomatik, die durch wiederkehrende depressive Episoden mit gedrückter Stimmung, Interessensverlust, Antriebslosigkeit sowie weiteren variablen Symptomen gekennzeichnet ist, ist für die Patienten aber auch für ihr soziales Umfeld stark belastend (Willner et al., 2013). Trotz langjähriger Forschung ist es bis heute noch nicht gelungen die grundlegende Neurobiologie depressiver Störungen vollständig zu verstehen (Pitsillou et al., 2020; Willner et al., 2013). Die zu diesem Zeitpunkt zugelassenen Medikamente zur Behandlung von depressiven Störungen helfen nicht immer und viele der Patienten erreichen keine vollständige oder anhaltende Remission (Pigott et al., 2023).

Zum weiteren Verständnis der Ätiologie depressiver Störungen und zur Entwicklung neuer Therapieoptionen werden tierexperimentelle Verfahren eingesetzt, da die aktuell vorhandenen Alternativmethoden (*Replacement*) häufig in ihrer Komplexität nicht ausreichend sind (Homberg et al., 2021). Der *Forced Swim Test* (FST) ist ein bereits seit 1977 angewendeter Test bei Nagern zur Untersuchung des antidepressiven Potentials von Substanzen, der bis heute weltweit häufig angewendet wird (Brandwein et al., 2023; Molendijk & de Kloet, 2022; Porsolt et al., 1977).

Seit dem Inkrafttreten der europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (Richtlinie 2010/63/EU) und ihrer Umsetzung in nationales Recht (Tierschutzgesetz und Tierschutz-Versuchstier-Verordnung) muss die Belastung der Tiere in einem Tierversuchsvorhaben prospektiv festgelegt werden. Ein weiteres Kriterium ist, dass bei gleichem Erkenntnisgewinn stets dasjenige Verfahren zu bevorzugen ist, dass mit der geringsten Belastung der Tiere einhergeht. Eine evidenz-basierte Klassifikation der Belastung durch den FST ist jedoch bis heute nicht durchgeführt worden (The Animals in Science Committee, 2023).

Multimodale Ansätze durch Kombination verschiedener robuster Parameter bieten die Möglichkeit, Belastungen bei Versuchstieren möglichst objektiv darzustellen (Keubler et al., 2020). Die vorliegende Arbeit hat daher das Ziel die Belastung naiver Ratten mittels speziesspezifischer, verhaltensbiologischer, biochemischer und physiologischer Parameter in

einem häufig verwendeten Protokoll des *Forced Swim Test* zu erfassen und zu evaluieren. Außerdem sollen anhand der Ergebnisse Optionen zur Verbesserung des Tierwohls (*Refinement*) aufgezeigt werden.

III. Literaturübersicht

1. Tierversuche in der Depressionsforschung

Die Entstehung vieler psychiatrischer Störungen, unter anderem die von affektiven Störungen, ist noch nicht vollständig erklärt. Zum besseren Verständnis psychiatrischer Erkrankungen werden daher bis heute Tierversuche durchgeführt. Die Behandlung der Major Depression ist oft nicht zufriedenstellend, da bei vielen Patienten die pharmakologische Therapie nicht oder nur bedingt anschlägt, und es eine hohe Rate an Rezidiven oder chronifizierten depressiven Störungen gibt (Pigott et al., 2023; Rush et al., 2006). Dies unterstreicht, dass ein wissenschaftlicher Fortschritt absolut notwendig ist. Aufgrund der Komplexität des Gehirns sind die bislang verfügbaren Alternativmethoden nicht ausreichend, um zum aktuellen Zeitpunkt Tiermodelle in der psychiatrischen Forschung vollständig zu ersetzen (Homberg et al., 2021). In diesem Kapitel soll auf die existierenden Theorien zur Ätiologie/Pathogenese depressiver Erkrankungen sowie die Herausforderungen von tierexperimentellen Ansätzen in diesem Bereich eingegangen werden.

1.1. Krankheitsbild und Diagnose depressiver Störungen

Die Depression gehört zu den affektiven Störungen und kann je nach Verlauf und Schweregrad der Symptomatik in unterschiedliche depressive Störungen eingeteilt werden. Ihnen ist gemeinsam, dass sie mit einem Zustand der niedergeschlagenen Stimmung und einem Verlust der Lebensqualität über einen längeren Zeitraum einhergehen. Typisch ist zudem auch ein episodischer Verlauf, bei dem die depressiven Episoden sich zunehmend verlängern, während sich gleichzeitig die beschwerdefreie Zeit verkürzt (Willner et al., 2013). Zu den weiteren Kernsymptomen gehören der Verlust an Interessen und Aktivitäten, die dem Patienten eigentlich Freude bereiten sowie Müdigkeit und das Gefühl von fehlender Energie (Bear et al., 2007). Insgesamt kann das Krankheitsbild als sehr heterogen bezeichnet werden: Neben den Kernsymptomen gibt es weitere typische psychopathologische Symptome und vegetative Symptome, die auftreten können, die für die Diagnosestellung aber nicht notwendigerweise vorhanden sein müssen. Zu den psychopathologischen Symptomen gehören vor allem eine Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten, Gefühle, wie z.B. Hoffnungslosigkeit, Schuld und Wertlosigkeit, eine gesteigerte Ängstlichkeit sowie Reizbarkeit (Bear et al., 2007). Eine besondere

Last für die Patienten sind möglicherweise auftretende Suizidgedanken und auch Suizidversuche. Unspezifisch sind vor allem die vegetativen Symptome, die sich in entgegengesetzte Richtungen bewegen können. Einige Patienten beklagen Schlaflosigkeit, während andere ein deutlich gesteigertes Schlafbedürfnis haben. Auch der Appetit kann gesteigert oder aber vermindert sein, um nur einige mögliche Symptome aufzuzählen (Bear et al., 2007).

Bis heute ist die Entstehung von depressiven Störungen nicht vollständig erklärt; auf die verschiedenen Theorien wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen. Aufgrund fehlender Biomarker ist eine präzise Diagnosestellung mit Herausforderungen verbunden. Bis heute werden standardisierte Fragenkataloge eingesetzt, wie zum Beispiel der Gesundheitsbogen für Patienten zur Erfassung depressiver Störungen (PHQ-D), welche die Symptomatik der Patienten erfassen sollen, um dann anhand des Summenwertes eine Diagnose zu stellen (Kennedy, 2008). In der psychiatrischen Forschung wird die Klassifizierung und Diagnosestellung mittels der DSM- und ICD-Kriterien bereits seit mehreren Jahren kritisiert (Insel et al., 2010). Die Kritik bezieht sich vor allem darauf, dass nicht die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen in die Diagnosestellung mit einbezogen werden (Insel et al., 2010). Von dem Nationalen Institut für Mentale Gesundheit in Amerika (NIMH) wurde daher das *Research Domain Criteria* (RDoC) Rahmenwerk vorgeschlagen, um den Fokus auf objektiv messbare Parameter zu legen (Insel et al., 2010). Ein Beispiel dafür wären Störungen in hirnspezifischen neuronalen Verschaltungen, auf die durch funktionale Magnetresonanztomographie (MRT) Rückschlüsse gezogen werden können (Insel et al., 2010).

Durch die relativ hohe Prävalenz (10,1 % in Deutschland) und ihre hohe Belastung für die Patienten kommt depressiven Störungen eine hohe Bedeutung zu (Nübel et al., 2017). Eine weitere Herausforderung bleibt nach wie vor die Behandlung depressiver Störungen. Nicht jeder Patient reagiert auf jede Behandlung und eine Besserung der Symptome erfolgt bei vielen Medikamenten erst nach mehreren Wochen. Außerdem bleibt eine hohe Anzahl an Patienten, die auf keine Therapie hin Remission erreichen (Pigott et al., 2023).

1.2. Theorien zur Krankheitsentstehung

1.2.1. Die Monoaminhypothese

Die Monoaminhypothese basiert auf der Theorie, dass eine verringerte Konzentration von Monoaminen (v.a. Serotonin und Noradrenalin) im Gehirn mit Depressionen assoziiert ist (Bear et al., 2007). Bemerkenswerterweise liegt der Grundstein dieser Theorie in den 1950er Jahren bei der zufälligen Entdeckung einer antidepressiven Wirkung des Medikamentes Iproniazid, welches ursprünglich für die Behandlung von Tuberkulose entwickelt wurde (Lopez-Munoz & Alamo, 2009). Man vermutet, dass die antidepressive Wirkung von Iproniazid durch eine Hemmung der Monoamin-Oxidase (MAO) verursacht wird. Wenige Jahre später wurde das trizyklische Antidepressivum (TZA) Imipramin entwickelt. Nachdem es erfolglos für die Behandlung schizophrener Patienten getestet wurde, wurde ebenfalls durch einen Zufall eine deutliche Verbesserung der Symptome bei depressiven Patienten entdeckt (Lopez-Munoz & Alamo, 2009). Trizyklische Antidepressiva hemmen die präsynaptische Wiederaufnahme von Noradrenalin und Serotonin und erhöhen somit die Konzentration dieser Monoamine im synaptischen Spalt (Bear et al., 2007). Die Entwicklung von Fluoxetin, dem ersten selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI), wurde nach Bekanntwerden der Wirkweise der MAO-Hemmer und der TZA, gezielt durchgeführt (Lopez-Munoz & Alamo, 2009).

Zweifel an der Monoaminhypothese als (alleinige) Erklärung für Depressionen sind vor allem dadurch entstanden, dass der Wirkungseintritt von Monoamin-basierten Therapeutika mit ca. drei Wochen erst relativ spät passiert, obwohl die pharmakologische Wirkung im Gehirn innerhalb von Stunden stattfindet (Bear et al., 2007). Trotz der Kritik an der Monoaminhypothese stellen die SSRI, SSNRI, TZA und MAO-Hemmer bis heute die wichtigsten Medikamente in der pharmakologischen Behandlung dar (Kennedy et al., 2016).

1.2.2. Die Neurotrophinhypothese

Diese Hypothese versucht den direkten Zusammenhang zwischen Neurotrophinen und deren Rolle bei der Entstehung sowie der Behandlung von Depressionen zu erklären. Neurotrophine gehören zu den Nervenwachstumsfaktoren und sind maßgebliche Modulatoren in der Entwicklung und der Funktion von Nervenzellen. Die Entstehung neuer Nervenzellen

(Neurogenese) im Hippocampus im adulten Gehirn spielt eine wichtige Rolle für das Lernen und die Gedächtnisbildung, aber auch für die kognitive Leistung, welche bei depressiven Patienten häufig als vermindert beschrieben ist (Costa et al., 2015). Für die Gedächtnisbildung ist die synaptische Plastizität, d.h. Prozesse zur aktivitätsabhängigen Änderung der Effizienz bei der synaptischen Weiterleitung, ebenfalls von hoher Bedeutung (Citri & Malenka, 2008). Störungen in der synaptischen Plastizität werden als Ursache für psychiatrische Erkrankungen, u.a. depressiver Störungen, diskutiert (Citri & Malenka, 2008).

Im Fokus der Neurotrophinhypothese steht der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), dem eine zentrale Rolle in der Neuro- und Synaptogenese nachgewiesen wurde und auf den sich die meisten präklinischen Studien konzentriert haben (Krishnan & Nestler, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Stress und eine chronische Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse sowohl zu einer Verringerung der BDNF-Konzentrationen in limbischen Arealen und im präfrontalen Cortex als auch zu einer Atrophie im Hippocampus führen (Bland et al., 2005; McEwen, 1999; Nibuya et al., 1995). MRT-Studien konnten verkleinerte Volumina vom Hippocampus und in einem geringeren Ausmaß der Amygdala sowie teilweise vergrößerte laterale Ventrikel mit Depressionen in Zusammenhang bringen (Schmaal et al., 2016).

In *post mortem* Untersuchungen von Gehirnen depressiver Patienten konnte eine Herunterregulierung des „mitogen activated protein“ (MAP)-Kinase-Signalwegs im präfrontalen Cortex und im Hippocampus nachgewiesen werden (Dwivedi et al., 2001). Da der MAP-Kinase-Signalweg unter anderem durch BDNF aktiviert wird, spricht dies ebenfalls für eine verringerte Signalaktivität von BDNF in diesen Hirnarealen (Wang & Mao, 2019). Gleichzeitig zeigen Studien, dass eine chronische Therapie mit Antidepressiva und Elektrokonvulsionstherapie zu einer Erhöhung der BDNF-Konzentration im Hippocampus und im frontalen Cortex und einer gesteigerten Neurogenese im Hippocampus führt (Malberg et al., 2000; Nibuya et al., 1995). Versuche in Nagetieren haben gezeigt, dass eine direkte Infusion von BDNF in den Hippocampus einen antidepressiven Effekt zur Folge hat (Shirayama et al., 2002). Die fehlende Wirkung von Antidepressiva in konditionellen und induzierbaren BDNF-Knock-out Modellen sprechen ebenfalls für die zentrale Rolle von Neurotrophinen bei depressiven Störungen (Monteggia et al., 2004).

In Regionen des mesolimbischen Systems, der *Area tegmentalis ventralis* (VTA) und dem *Nucleus accumbens* (NAc), führt die Blockade der BDNF-Expression zu einem fehlenden Anpassungsverhalten nach einem „sozialen Unterwerfungs-Paradigma“ und damit zu einer eingeschränkten Funktion des mesolimbischen Systems (Berton et al., 2006). Studien an BDNF-defizienten Tieren zeigen, dass ein Mangel an BDNF in Vorderhirn-Strukturen nur in weiblichen Mäusen zu einer verlängerten Immobilität im *Forced Swim Test* und einer reduzierten Sucrose-Präferenz führt, während bei männlichen Tieren kein Unterschied zu der Wildtyp-Gruppe festgestellt wurde (Monteggia et al., 2007). Analog dazu treten bei Humanpatienten depressive Störungen bei Frauen deutlich häufiger als bei Männern auf. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) des BDNF-Gens, bei dem eine Aminosäure ausgetauscht ist, führt zu einer deutlich reduzierten Konzentration und Signalaktivität von BDNF. Eine Meta-Analyse ergab, dass diese genetische Variante vor allem bei der Entstehung depressiver Störungen bei männlichen Patienten eine große Rolle spielen könnte (Verhagen et al., 2010)

Da ein Mangel an Neurotrophinen nicht die einzige Ursache für die Major Depression sein kann, ist die Neurotrophinhypothese in Kombination mit anderen Hypothesen zu betrachten.

1.2.3. Die Bedeutung von Stress und das Diathese-Stress-Modell

Stress spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung depressiver Störungen (Bear et al., 2007). Der Körper reagiert bei Stress mit einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPA-Achse; *hypothalamic pituitary adrenal axis*). Dabei wird im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) ausgeschüttet (Willner et al., 2013). Dieses stimuliert die Hypophyse zur Sekretion des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH), welches wiederum die Nebennierenrinde zur Produktion und Ausschüttung von Glukokortikoiden (GC) (beim Menschen primär Kortisol) anregt (Willner et al., 2013). Im physiologischen Zustand wirkt eine erhöhte Glukokortikoid-Konzentration im Blut hemmend auf die Kaskade der HPA-Achse, um diese zu regulieren (de Kloet et al., 2005; Willner et al., 2013). Einen weiteren Einfluss auf das HPA-System haben die Amygdala, Teile des präfrontalen Cortex und der Hippocampus. Die Amygdala und absteigende Bahnen aus dem präfrontalen Cortex können exzitatorisch auf den Hypothalamus wirken (Willner et al., 2013). Hohe Kortisol-Level stimulieren durch positive Feedback-Mechanismen die Amygdala und haben

so auch einen aktivierenden Einfluss auf die HPA-Achse (Duvarci & Paré, 2007). Der Hippocampus wird auch durch Kortisol aktiviert und besitzt vor allem einen hemmenden Effekt auf die HPA-Achse ausübt (Willner et al., 2013). Dieser negative Feedback-Mechanismus ist wichtig, um die Aktivität der HPA-Achse in Balance zu halten (Swaab et al., 2005; Willner et al., 2013).

Bei dauerhaft erhöhten GC-Konzentrationen entstehen durch neurotoxische Effekte morphologische und funktionale Veränderungen im Hippocampus sowie im präfrontalen Cortex (Willner et al., 2013). Besonders die Körnerzellen des Hippocampus reagieren empfindlich auf hohe GC-Spiegel (Willner et al., 2013). In weiterer Folge kommt es zu einer Reduktion der GC-Rezeptoren auf den hippocampalen Körnerzellen und einer Disinhibition des HPA-Systems mit dauerhaft erhöhten Cortisol-Spiegeln (Raison & Miller, 2003; Willner et al., 2013). Mithilfe von Tierstudien konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der mütterlichen Fürsorge in Ratten zu einer erhöhten Ausschüttung der Hormone Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) und Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) führt (Suchecki et al., 1995). Weiterhin entstehen in Folge neurotoxische freie Radikale, der Glucose-Transport und die Produktion von BDNF ist reduziert (Willner et al., 2013). Auch im präfrontalen Cortex führen permanent erhöhte GC-Level zu Schäden. Diese Veränderungen umfassen die Aktivierung von Mikroglia, eine Atrophie der Pyramidenzellen, die Schrumpfung dendritischer Ausläufer und eine verminderte Produktion synaptischer Proteine (Hinwood et al., 2012; Liu & Aghajanian, 2008; Santini et al., 2004; Wellman, 2001; Willner et al., 2013). Kognitive Einbußen bei PFC-assoziierten Aufgaben konnten mit den genannten Veränderungen teilweise in Zusammenhang gebracht werden (Hinwood et al., 2012; Santini et al., 2004).

Interessanterweise reagieren Menschen sehr unterschiedlich auf belastende Ereignisse und nicht jede Person bildet nach der Erfahrung eines traumatischen Ereignisses eine psychische Störung aus. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet das Diathese-Stress-Modell. Es basiert nicht nur auf neurobiologischen Prozessen, sondern berücksichtigt auch psychosoziale Erklärungen, die langfristige Anfälligkeiten für Erkrankungen als Folge (kurzfristiger) Traumata begründen sollen (Willner et al., 2013). Eine genetische Prädisposition sowie traumatische Lebensereignisse, besonders im frühkindlichen Alter, können die Vulnerabilität gegenüber chronischem Stress zum Negativen erhöhen (Bear et al., 2007). Dieser Einfluss kann bis ins Erwachsenenalter anhalten

(Bear et al., 2007). Eine weitere Erhöhung der Vulnerabilität könnte durch vermehrte Kritik und Zurückweisung im jungen Alter (kognitive Diathese) (Beck & Alford, 2009; Willner et al., 2013). Diese genannten Faktoren (genetische Diathese, frühkindliche Traumata, kognitive Diathese) haben zur Folge, dass die benötigte Schwelle an Stress, die zur Ausprägung einer depressiven Symptomatik notwendig ist, sinkt (Willner et al., 2013). Zusätzlich scheint Stress als Auslöser eine zunehmend geringere Rolle zu spielen, je mehr depressive Episoden bereits durchgemacht wurden (Kendler et al., 2001). Die Berücksichtigung dieser Faktoren erklären einen Teil der hohen Variabilität der Diathese für psychiatrische Erkrankungen verschiedener Personen (Willner et al., 2013).

1.2.4. Die Beteiligung des Glutamatsystems bei der Entstehung depressiver Störungen

Ein großer Nachteil der Therapie mit klassischen Antidepressiva ist der stark verzögerte Wirkungseintritt (Cipriani et al., 2018). Bei anderen Therapieformen, wie z.B. nicht-pharmakologischen Interventionen, wie der Elektrokrampftherapie oder Schlafentzug sind hingegen bereits nach kurzer Zeit antidepressive Effekte zu beobachten (Boland et al., 2017; UK ECT Review Group, 2003). Bereits vor einigen Jahren wurde entdeckt, dass Ketamin, ein N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-Antagonist, bereits nach einmaliger Gabe in subanästhetischen Dosen ebenfalls zu einer mehrtätigen Besserung der Symptome führt (Berman et al., 2000). Substanzen mit einem schnellen antidepressiven Wirkungseintritt werden auch als „*rapid-acting antidepressants*“ bezeichnet (Gass et al., 2022).

Seit mehreren Jahren wird der Zusammenhang zwischen dem glutamatergen System und der Entstehung der Major Depression gezielt untersucht. So können zum Beispiel bei einer hohen Konzentration von Glutamat im synaptischen Spalt oder einer Störung der Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt, extrasynaptische NMDA-Rezeptoren aktiviert werden (Gass et al., 2022). Diese zeigen eine exzitotoxische Wirkung, die zu einer Abnahme der Dendriten und einem daraus folgenden Verlust an Synapsen in bestimmten Hirnregionen führt (Hardingham & Bading, 2010; Moda-Sava et al., 2019).

Für die antidepressive Wirkung von Ketamin werden verschiedene Wirkweisen diskutiert und es wurden zwei verschiedene Theorien aufgestellt: die Disinhibitionstheorie und die postsynaptische Hypothese (Gass et al., 2022). GABAerge Interneurone sind Teil von glutamatergen Synapsen und ihre Aufgabe ist es, die exzitatorische Wirkung bei der Aktivierung glutamaterger Neuronen zu hemmen (Gass et al., 2022). Sie werden präsynaptisch durch Glutamat-Rezeptoren (NMDAR) reguliert und sind tonisch aktiv (Gass et al., 2022). Sie reagieren besonders empfindlich auf Ketamin, welches die NMDAR hemmt und schließlich zu einer reduzierten Ausschüttung von γ -Aminobuttersäure (GABA), eines hemmenden Neurotransmitters, in den synaptischen Spalt, führt (Disinhibitionstheorie) (Gass et al., 2022). In weiterer Folge werden vorwiegend AMPA-Rezeptoren durch Glutamat aktiviert und führen zu einer erhöhten Ausschüttung von BDNF und einer gesteigerten Synaptogenese (Li et al., 2010; Zanos & Gould, 2018).

Die postsynaptische Theorie geht davon aus, dass durch eine Hemmung der NMDA-Rezeptoren eine anschließende Hemmung der BDNF-Synthese wegfällt: NMDA-Rezeptoren am postsynaptischen glutamatergen Neuron hemmen über die Aktivierung des eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) die Bildung von BDNF (Zanos & Gould, 2018). Wenn diese Rezeptoren durch Ketamin gehemmt werden, fällt die Aktivierung von eEF2 weg und es kommt wieder zu einer gesteigerten BDNF-Produktion (Gass et al., 2022; Zanos & Gould, 2018). Zusätzlich kann vermehrt extrazellulär vorhandenes Glutamat an den postsynaptisch gelegenen AMPA-Rezeptoren wirken. Diese führen wie oben beschrieben zu einer gesteigerten BDNF-Produktion.

Des Weiteren können durch Ketamin extrasynaptisch gelegene NMDAR am postsynaptischen Neuron gehemmt werden. Die NMDAR hemmen bei Aktivierung den *mechanistic target of rapamycin complex 1* (mTORC1)-Signalweg, der in weiterer Folge zur Proteinsynthese führen würde (Li et al., 2010; Zanos & Gould, 2018).

1.3. Tiermodelle für depressive Störungen

Seit den 1990er Jahren werden immer mehr Publikationen mit dem Schlagwort *Depressionsmodell* veröffentlicht, aber bis heute ist die wissenschaftliche Gemeinschaft beim Einsatz von Tiermodellen zur Depressionsforschung keiner einheitlichen Meinung (Harro, 2019).

Während in den frühen Jahren versucht wurde, möglichst viele depressive Symptome eins zu eins im Tier darzustellen, gilt heute die Meinung, dass es nur bei einigen der Symptome überhaupt möglich ist, diese im Tier zu modellieren (Harro, 2019). Beispielsweise kann eine Anhedonie, ein Kernsymptom depressiver Störungen, im Tier durch eine reduzierte Aufnahme von Futter oder Getränken erkannt und quantitativ erfasst werden, während anthropomorphe Symptome wie suizidale Gedanken oder Schuldgefühle nicht modellierbar sind (Nestler & Hyman, 2010). Weiterhin wird die Bezeichnung „Tiermodell“ nicht einheitlich verwendet. Es muss nämlich zwischen Modellen, durch die Verhaltensänderungen beim Tier induziert werden, und Tests zur Bestätigung der Verhaltensänderungen unterschieden werden (Hales et al., 2014). Zum Beispiel handelt es sich bei Chronisch mildem Stress (CMS) um ein gängiges Depressionsmodell (Willner, 2017). Chronisch milder Stress ruft in Nagetieren eine Anhedonie hervor, die durch eine chronische Anwendung von Antidepressiva rückgängig gemacht werden kann (Nestler & Hyman, 2010). Um die Anhedonie zu messen, muss neben dem CMS ein Test, wie zum Beispiel der Saccharin-Präferenz-Test durchgeführt werden, um zu überprüfen, dass das Tier keine appetitive Präferenz für eine süße Lösung oder ein leckeres Futter zeigt. Chronisch sozialer Unterwerfungsstress (CSD, *chronic social defeat*) gilt ebenfalls als etabliertes Verfahren zur Induktion einer Anhedonie und führt außerdem zur Vermeidung von Sozialpartnern, die nach Therapeutikagabe reversibel ist (Nestler & Hyman, 2010). Des Weiteren werden bei Mäusen durch CSD Veränderungen im Körpergewicht verursacht, was eine weitere Ähnlichkeit zu depressiven Störungen darstellt (Chuang et al., 2010).

Tests, wie zum Beispiel der *Forced Swim Test* oder der *Tail Suspension Test*, in denen das Tier durch Schwimmen in einem Zylinder oder Aufhängen am Schwanz in eine ausweglose Situation gebracht werden, stellen einen kurzfristigen Stressor für das Tier dar. Sie besitzen vor allem eine prädiktive Validität (siehe 1.4. Validität und Übertragbarkeit), da durch die antidepressiv wirkende Substanz eine Verhaltensänderung induziert wird (Gyles et al., 2023), können aber auch zur Detektion eines depressiven Phänotyps in genetischen Modellen verwendet werden (Chourbaji et al., 2011; Fitzgerald et al., 2010).

Auch das zuvor beschriebenen RDoC-Konzept lässt sich auf Tiermodelle übertragen und strebt eine Untersuchung von Endophänotypen an, also das Modellieren lediglich einzelner Aspekte

einer psychiatrischen Krankheit, um damit einen bestimmten pathophysiologischen Prozess zu untersuchen (Anderzhanova et al., 2017).

1.4. Validität und Übertragbarkeit

Um zu überprüfen, ob ein Tiermodell wirklich das misst, was man glaubt zu messen, muss die Validität des Modells überprüft werden. Für die Bewertung von Tiermodellen werden seit vielen Jahren die drei Validitäten, nämlich Augenscheinvalidität (*Face Validity*), Konstruktvalidität und die prädiktive Validität herangezogen (Willner, 1984). Des Weiteren lassen sich die interne (Robustheit und Reproduzierbarkeit) und die externe Validität (Generalisierbarkeit) untersuchen (van der Staay et al., 2009).

Die Konstruktvalidität prüft, ob das Modell durch die gleiche Ätiologie wie die Krankheit beim Patienten entstanden ist. Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, ist die Ursache depressiver Störungen noch nicht vollständig verstanden und meistens vermutlich multifaktoriell bedingt. Aus diesem Grund ist die Konstruktvalidität sehr schwierig in einem Tiermodell für die Major Depression zu erfüllen (Harro, 2019). Ein Beispiel für eine relativ gute Konstruktvalidität bieten die Modelle des „chronisch milden Stress“ oder der „chronischen sozialen Niederlage“ (*chronic social defeat*) in Nagetieren (Gyles et al., 2023). Beide Modelle basieren auf dem Ansatz, dass Stress eine Ursache in der Entstehung depressiver Störungen spielt.

Die Augenscheinvalidität beschreibt die Ähnlichkeit des Modells mit der Krankheit. Dabei kann die „sichtbare“ Symptomatik des Patienten aber auch indirekte Charakteristika wie Biomarker oder neuropathologische Auffälligkeiten berücksichtigt werden (Nestler & Hyman, 2010). Da das klinische Erscheinungsbild depressiver Störungen heterogen ist und viele Symptome auf der subjektiven Wahrnehmung basieren oder auch in gegensätzliche Richtungen ausgeprägt sein können, wie z.B. das Schlafverhalten, ist es für ein Tiermodell unmöglich, sämtliche Symptome einer Major Depression abzubilden (Nestler & Hyman, 2010). Eine weitere Schwäche der Augenscheinvalidität liegt in der anthropomorphischen Annahme, dass das Verhalten von Menschen und Nagetieren bei affektiven Störungen sich nicht ähneln, geschweige denn identisch sein muss, da es sich um unterschiedliche Spezies handelt (van der Staay et al., 2009). Aus diesen

Gründen wird der Augenscheinvalidität eine eher schwache Bedeutung zugeschrieben (van der Staay, 2006).

Mit der prädiktiven oder auch pharmakologischen Validität ist gemeint, dass der Test oder das Modell einen positiven Effekt nach der Anwendung von Antidepressiva aufweist (Willner, 1984). Dies soll den Therapieerfolg beim Patienten nach der pharmakologischen Behandlung imitieren und die Entwicklung neuer Medikamente fördern.

Das CMS-Modell hat eine verhältnismäßig hohe Konstruktvalidität, da es chronischen Stress zur Induktion nutzt, der beim Menschen einen Risikofaktor darstellt. Des Weiteren wird durch die Anhedonie die Augenscheinvalidität mindestens partiell erfüllt, da es ein Kernsymptom depressiver Störungen ist (Nestler & Hyman, 2010). Die pharmakologische oder prädiktive Validität ist schlussendlich durch die erfolgreiche Behandlung der Tiere mit Antidepressiva gegeben (Nestler & Hyman, 2010). Eine gute prädiktive Validität ist zum Beispiel auch beim *Forced Swim Test* in Kombination mit einem Open Field Test beschrieben, da dieser nur bis auf wenige Ausnahmen sehr sensitiv auf gängige Antidepressiva reagiert (Slattery & Cryan, 2012).

Eine gute interne Validität eines Modells setzt eine gute Robustheit sowie Reproduzierbarkeit voraus (van der Staay et al., 2009). Die Robustheit (*reliability*) bezeichnet die Möglichkeit das Modell wiederholt unter identischen experimentellen Bedingungen bei gleichzeitig unveränderten Ergebnissen durchzuführen (van der Staay et al., 2009). Mit einer guten Reproduzierbarkeit ist gemeint, dass man gleiche Ergebnisse auch bei einer unabhängigen Studiendurchführung, wie z.B. in einem anderen Labor, erhält (van der Staay et al., 2009). Die interne Validität adressiert vor allem qualitative Aspekte der experimentellen Durchführung. Darunter fällt unter anderem wie sorgsam die Studie umgesetzt wurde, wie gut experimentelle Störfaktoren kontrolliert werden und wie sicher man sich sein kann, dass ein gemessener Effekt tatsächlich von den vom Experimentator veränderten Faktoren abhängig ist (van der Staay et al., 2009).

Die externe Validität bzw. Generalisierbarkeit bezieht sich auf die Anwendungsmöglichkeit der Ergebnisse über das unter definierten Bedingungen gemessene Modell hinaus. Um zu testen, dass ein Tiermodell auch auf Tiere des anderen Geschlechts oder z.B. in einem anderen Alter oder

Haltungsbedingungen anwendbar ist, bieten sich systematische Wiederholungen mit definiert veränderten Faktoren an (van der Staay et al., 2009).

1.5. Der *Forced Swim Test*

Der FST wurde im Jahr 1977 von Roger Porsolt publiziert. Sein damaliges Ziel war die Etablierung eines Depressionsmodells, das auf klinische Antidepressiva reagiert (Porsolt et al., 1977). Bei der Ratte besteht der Test in der Regel aus zwei Schwimmbehandlungen, die in einem Abstand von 24 h durchgeführt werden (Slattery & Cryan, 2012). Dazu wird das Tier in ein mit Wasser gefülltes Becherglas gesetzt und soll am ersten Tag 15 und am zweiten Tag fünf Minuten in der Apparatur schwimmen (Slattery & Cryan, 2012). In der Zeit dazwischen finden üblicherweise Behandlungen mit den zu testenden Antidepressiva bzw. den Kontrollsubstanzen statt (Slattery & Cryan, 2012). Das Verhalten der Tiere wird am zweiten Tag des Tests analysiert, und es wird z.B. zwischen den Verhaltensweisen „klettern“, „schwimmen“ und „treiben“ unterschieden (Slattery & Cryan, 2012). Zu Beginn des Tests zeigt das Tier vor allem Flucht-assoziiertes Verhalten, d.h. es versucht aus dem Becher zu „klettern“ oder schwimmt im Kreis (Slattery & Cryan, 2012). Nach einer gewissen Zeit ändert sich das Verhalten und die Ratte treibt passiv und weitgehend bewegungslos an der Wasseroberfläche (Slattery & Cryan, 2012). Im Gegensatz zu Kontrollsubstanzen verlängern Antidepressiva das initiale Flucht-assoziierte Verhalten und verringern das ursprünglich als „Verzweiflungsverhalten“ interpretierte passive „Treiben“ (Castagné et al., 2006; Cryan et al., 2005). Es ist beschrieben, dass SSRI zu einer Steigerung des Schwimmverhaltens führen, während selektive Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer zu einer Steigerung des Kletterverhaltens führen (Detke & Lucki, 1995). Der FST kann damit als Screening-Test für die Entdeckung potentiell antidepressiv wirkender Substanzen eingesetzt werden (Cryan et al., 2005). Gleichzeitig führen Maßnahmen, die als Risikofaktoren für depressive Störungen gelten, wie z.B. chronischer Stress, zu einer Zunahme des passiven Verhaltens (Veenema et al., 2006). Die Interpretation und Bezeichnung des passiven Verhaltens als Verzweiflungsverhalten oder „Depressions-ähnliches“ Verhalten gilt heute jedoch als anthropomorphologischer Trugschluss (Nestler & Hyman, 2010). Da für die Diagnose depressiver Störungen bis heute Fragekataloge verwendet werden und noch keine objektiv messbaren Biomarker existieren, ist Kommunikation für das Erkennen depressiver Störungen notwendig.

Vorteile des FST sind die relativ einfache Durchführung und die Robustheit gegenüber laborspezifischer Einflussfaktoren (Slattery & Cryan, 2012). Bis 2018 konnte anhand der Anzahl der Publikationen eine zunehmende Popularität in der Nutzung des FST festgestellt werden und bis 2015 wurde von einem Großteil der Experimentatoren die Immobilität der Tiere als „depressionsähnliches Verhalten“ gewertet (Molendijk & de Kloet, 2015, 2022). Diese Auswertung stößt heute auf Kritik, da es dem FST an Konstrukt- und Augenscheinvalidität mangelt, um als Modell für eine Major Depression zu gelten (Commons et al., 2017; Nestler & Hyman, 2010). Vielmehr soll der FST ein Maß für die Bewältigung von akutem Stress sein (Commons et al., 2017). Eine mögliche Interpretation wäre, dass der Übergang vom aktiven Verhalten zum passiven Verhalten eine passive Bewältigungsstrategie darstellt, um beim Treiben auf dem Wasser Energie zu sparen (West, 1990).

Aufgrund fehlender Alternativmethoden zur Entdeckung neuer therapeutischer Möglichkeiten bei einer gleichzeitigen hohen Rate von Patienten, die an einer therapieresistenten depressiven Störung leiden, ist es von Bedeutung, dass nicht vorschnell auf Möglichkeiten zum Screening verzichtet wird, wie sie der FST bietet (Armario, 2021). Weiterhin spielt Stress nicht nur in der Entstehung der Major Depression eine Rolle, sondern auch in vielen anderen psychiatrischen Erkrankungen (Commons et al., 2017). Untersuchungen zur Stressbewältigung sind so ebenfalls für andere Erkrankungen von Relevanz (Commons et al., 2017). In den letzten Jahren konnten mehrere Arbeiten zur Erforschung des antidepressiven Wirkmechanismus von Ketamin die Bedeutung des FST in der Antidepressiva-Forschung aufzeigen (Autry et al., 2011; Li et al., 2010; Moda-Sava et al., 2019; Zanos et al., 2016).

2. Natürliche Lebensweise von Wanderratten (*Rattus norvegicus*)

Bei der Wahl des Tiermodells und der experimentellen Verfahren sollte auf die biologischen und ethologischen Eigenschaften des zu verwendenden Labortieres Rücksicht genommen werden, um einerseits das Tier in seiner Anpassungsfähigkeit nicht zu überfordern und andererseits wissenschaftlich verwertbare Ergebnisse zu erzielen (Olsson et al., 2003). Aus diesem Grund soll in diesem Abschnitt auf die wilde Form der Wanderratte eingegangen werden.

2.1. Lebensraum (Affinität zum Wasser)

Als Kulturfolger passen sich Ratten schon lange an den Lebensraum von Menschen an und sind daher weltweit fast überall in urbanen und ländlichen Räumen zu finden. Jeder künstliche Lebensraum sollte wie die natürliche Umgebung Futter, weitere Sozialpartner und Möglichkeiten für einen Unterschlupf bieten können (Barnett, 1963; Byers et al., 2019). Die Wanderratte legt umfangreiche Erdbauten an, in denen sie Schlafplätze anlegt, Vorräte lagert und sich verstecken kann (Steiniger, 1950). Wanderratten schlafen, vermutlich um sich gegenseitig zu wärmen, bevorzugt in Gruppen (Barnett, 1963). Weiterhin können die Tunnel auch zum Lagern von Futter verwendet werden, wenn eine größere Futterquelle entdeckt wurde (Recht, 1988). Wassernahe Gebiete, wie die Umgebung von Flüssen, Teichen und auch Kanalisationen werden von Ratten bevorzugt besiedelt (Lore & Flannelly, 1978; Traweger et al., 2006). Die Nähe zum Wasser muss aber nicht zwingend gegeben sein, da sich auch viele Populationen in trockeneren Gebieten, wie z. B. Mülldeponien, Ställen und ungepflegten Höfen, finden (Traweger et al., 2006). Eine Studie zur Untersuchung der Wildpopulation von Wanderratten in Salzburg, Österreich, ergab, dass die höchste Rattendichte in der Nähe von Wasser geschätzt wurde (Traweger et al., 2006). Es ist unbestritten, dass Ratten exzellente Schwimmer sind und einem Bericht von Wildratten zufolge, gehen diese auch bei sehr kalten Außentemperaturen ins Wasser (Cottam, 1948). Mit zunehmender Domestikation scheint das Interesse am Schwimmen jedoch abzunehmen, wie eine Publikation zeigen konnte (Stryjek et al., 2012).

2.2. Soziale Strukturen

Wilde Wanderratten leben natürlicherweise in Kolonien, deren Größe abhängig von dem Futterangebot ist und die aus mehreren Generationen besteht (Davis, 1953; Steiniger, 1950).

Das Sozialverhalten von Ratten ist komplex und lässt sich in soziopositive und sozinegative Aktivitäten unterteilen (Schweinfurth, 2020). Der direkte Kontakt mit den Koloniegefährten spielt eine große Rolle und es können mehrere häufige Verhaltensmuster unterschieden werden (Barnett, 1963). Zu den soziopositiven Aktivitäten zählen unter anderem das gegenseitige Putzen, das „Anstupsen“ mit der Nase, das Einnehmen einer unterwürfigen Position oder spielerisches Kampfverhalten unter jungen Ratten (Schweinfurth, 2020). Als sozinegative Aktivitäten werden zum Beispiel das Verfolgen des Gegenübers, Vermeidungsverhalten, Kämpfe und Drohgebärden verstanden (Schweinfurth, 2020). Auch das „Unterkriechen“ (*crawling under*), bei dem ein Tier unter das andere krabbelt, kann eher zu den sozinegativen Verhaltensweisen gezählt werden, da dieses Verhalten häufig in potentiellen Konfliktsituationen zwischen Männchen gezeigt wird (Barnett, 1963). Häufig laufen die Tiere auch übereinander (*walking over*), diesem Verhalten wurde jedoch keine soziale Wertung zugeschrieben (Barnett, 1963).

Aufgrund des Zusammenlebens in großen Kolonien, ist es für Ratten notwendig ihre Kolonieangehörigen von fremden Artgenossen zu unterscheiden (Schweinfurth, 2020). Territoriales und aggressives Verhalten wird vor allem dann gezeigt, wenn ein koloniefremdes Männchen in ein bestehendes Territorium von einem anderen Männchen eindringt (Barnett, 1963; Schweinfurth, 2020). Innerhalb der Kolonie kommt es nur selten zu aggressiven Auseinandersetzungen (Schweinfurth, 2020). Zwischen den Ratten einer Kolonie herrscht eine Rangordnung, die bei Weibchen tendenziell weniger starr ist als bei Männchen (Schweinfurth, 2020). Barnett unterscheidet in der Rangordnung in absteigender Reihenfolge die Positionen der Alpha-, Beta- und Omegamännchen (Barnett, 1963). In der Regel gibt es in einer Kolonie nur ein oder sehr wenige Alphamännchen, welche die anderen Männchen dominieren (Barnett, 1963). Während Betamännchen mit ihrer sozialen Niederlage trotzdem in der Lage sind genügend Futter zu sich zu nehmen, verlieren Omegamännchen mit der Zeit an Gewicht und haben eine deutlich geringere Lebenserwartung (Barnett, 1963). Bei dieser Beobachtung ist zu berücksichtigen, dass sie unter wilden Wanderratten in Gefangenschaft gemacht wurde (Barnett, 1963).

Interessanterweise bilden Ratten im Gegensatz zu vielen anderen Säugetieren keine engen Beziehungen zu anderen Ratten aus, obwohl sie ein umfangreiches Repertoire an sozialen Interaktionen zeigen (Barnett, 1963; Schweinfurth et al., 2017).

3. Belastungseinschätzung von Tierversuchen und Vorstellung ausgewählter Parameter

Das Erfassen des Ausmaßes an Leid, Disstress und Schmerz der Tiere in tierexperimentellen Versuchen ist neben der ethischen Verantwortung aus mehreren Gründen notwendig. Zum einen ist für die Genehmigung des Versuchsvorhabens eine prospektive und bei schwer belasteten Tierversuchen eine zusätzliche retrospektive Einschätzung notwendig. Weiterhin sind Verbesserungen im Sinne eines *Refinements* nur dann möglich, wenn der Belastungsgrad der Tiere im Versuch bekannt ist (Keubler et al., 2020). Um möglichst viele Dimensionen der Belastung abbilden zu können, bieten sich multimodale Ansätze mit der Kombination von verschiedenen Parametern an (Keubler et al., 2020). Im Folgenden werden die rechtlichen Grundlagen sowie ausgewählte Parameter zur Belastungseinschätzung vorgestellt.

3.1. Rechtliche Grundlagen der Belastungseinschätzung

Laut Definition kann ein Tierversuch mit Schmerzen, Leiden und/oder Schäden für das Tier verbunden sein (§7 Absatz 2 Satz 1 TierSchG). Der Grundsatz des Tierschutzgesetzes sieht vor, dass niemand letztere einem Tier ohne vernünftigen Grund zufügen darf (§1 TierSchG). Der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn kann die Belastung der Tiere legitimieren, daher soll auf Basis einer Schaden-Nutzen-Analyse eine Entscheidung für oder gegen das Versuchsprojekt getroffen werden. Das auf Russell and Burch zurückgehende 3R-Konzept ist ebenfalls fest im Tierschutzgesetz verankert. Es sieht neben der verpflichtenden Verwendung, sofern vorhanden, von Alternativmöglichkeiten (*Replacement*), auch eine Reduktion der Versuchstierzahlen (*Reduction*) sowie eine Verbesserung der Versuchs- und Haltungsbedingungen (*Refinement*) vor (Russell & Burch, 1959).

Die prospektive Belastungseinschätzung ist Teil eines jeden Verfahrens zur Genehmigung eines Versuchsvorhabens. Die Richtlinie 2010/63/EU legt in Artikel 15 fest, dass die Einteilung des Schweregrades in die Kategorien „gering“, „mittel“, „schwer“ oder „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ zu erfolgen hat (Richtlinie 2010/63/EU). Die Kategorien berücksichtigen jeweils die Schwere in Bezug auf die Dauer des Versuchs (Richtlinie 2010/63/EU). Verfahren, in denen die Tiere langanhaltenden schweren Schmerzen, Leiden oder Ängste ausgesetzt wären, sind nur in

Ausnahmefällen und aus wissenschaftlich berechtigten Gründen erlaubt (Richtlinie 2010/63/EU). In nationales Recht wurde dies in § 31 der Tierschutz-Versuchstier-Verordnung umgesetzt. Als Hilfestellung soll der Anhang VIII der EU-Richtlinie dienen. In diesem sind Zuordnungskriterien aufgelistet und Versuchsbeispiele den jeweiligen Schweregraden zugeordnet. Aufgrund der sehr vielfältigen Tiermodelle und Eingriffe an Versuchstieren, kann der Beispielkatalog jedoch nur eingeschränkt bei der Klassifizierung der Schweregrade helfen. Während des laufenden Tierversuchs muss die aktuelle Belastung der Tiere mittels versuchsspezifischer *Score Sheets* überprüft werden. Eine retrospektive Belastungseinschätzung nach Abschluss des Experiments ist zusätzlich bei schweren Tierversuchen erforderlich. Bislang sind viele der tierexperimentellen Verfahren noch nicht objektiv auf die Belastung der Tiere untersucht worden, was eine präzise Schweregradklassifizierung erschwert. Ratten, zum Beispiel, sind nachtaktive Tiere, die ganz andere sensorische Grundvoraussetzungen als der Mensch mitbringen und dementsprechend experimentelle Verfahren gegebenenfalls anders wahrnehmen als wir es uns vorstellen können (Olsson et al., 2003). Ein weiterer Aspekt der Schweregradbeurteilung ist der kumulative Ansatz. Wenn in komplexen Versuchsvorhaben, die z.B. über einen längeren Zeitraum andauern, verschiedene Verfahren an Tieren angewandt und kombiniert werden, kann dies für die Tiere mit einer höheren Belastung einhergehen und muss in der prospektiven Belastungseinschätzung berücksichtigt werden.

Eine objektive und evidenzbasierte Belastungseinschätzung, die idealerweise mehrere Dimensionen von Leiden, Schmerzen und Schäden abdeckt, ist also in Bereichen, die der Anhang VIII nicht vollständig abdeckt, anzustreben (Keubler et al., 2020).

3.2. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Glukokortikoide werden vor allem bei Stress und körperlicher Aktivität von der Nebennierenrinde ausgeschüttet. Sie vermitteln viele Funktionen im Körper, wie z.B. die Bereitstellung von Energie, um auf ungewohnte Situationen reagieren zu können (Palme, 2019). Kortikosteron ist das primäre Glukokortikoid von Ratten, dessen Messung Rückschlüsse auf die Aktivität der Nebennierenrinde und der gesamten HPA-Achse erlaubt (Palme, 2019; Rowland & Toth, 2019).

In Ratten kann die Kortikosteron-Konzentration entweder direkt oder indirekt durch Stoffwechselprodukte in vielen Matrices, wie z.B. Blut, Speichel, Urin, Kot oder Haaren nachgewiesen werden (Palme, 2019). Während eine Blutentnahme bei Ratten stets mit Stress verbunden ist, bietet die Analyse der Kortikosteronmetaboliten im Kot (Fäkale Kortikosteronmetaboliten, FCM) eine nicht-invasive Methode zur Analyse von Kortikosteron integriert über die Zeit (Rowland & Toth, 2019). Aus Tierwohlgründen, aber auch aus methodischen Gründen, z.B. bei wiederholten Messungen, kann die Bestimmung der FCM der direkten Messung im Blut überlegen sein.

Viele verschiedene Einflüsse beeinflussen die Konzentration der FCM und müssen im Studiendesign sowie in der nachfolgenden Auswertung berücksichtigt werden. Die Verzögerung von der Ausschüttung des Kortikosterons in der Nebennierenrinde bis zum Vorliegen als Kortikosteronmetabolite im Darm bzw. in den Faeces, muss zwingend in der zeitlichen Planung berücksichtigt werden (Lepschy et al., 2007). Zudem sollten die Faeces möglichst schnell eingefroren werden, um einem bakteriellen Abbau der FCM vorzubeugen (Palme, 2019). Des Weiteren unterliegt die Kortikosteron-Ausschüttung einem circadianen Rhythmus, der eng mit der circadianen Aktivität zusammenhängt (Palme, 2019). Um diese im Experiment zu berücksichtigen, bietet es sich an, eine zusätzliche Kontrollgruppe zu verwenden. Die Konzentration der FCM ist geschlechtsabhängig und die Auswertung sollte daher getrennt für die Geschlechter erfolgen (Lepschy et al., 2007; Palme, 2019). Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Metabolisierung des Kortikosterons sind u.a. applizierte Pharmaka, die Darmtätigkeit, die Stoffwechsellage der Leber, die Diät der Tiere sowie die Faecesmenge pro Zeit (Kalliokoski et al., 2015; Palme, 2019).

Aus einer Erhöhung der Konzentration von Glukokortikoiden lässt sich nicht direkt eine negative Belastung der Tiere ableiten, sondern lediglich, dass das Tier einer Form von Stress ausgesetzt war. Studien zeigen, dass Tiere auch bereits nach Bewegung erhöhte Kortikosteron-Spiegel zeigen (Chen et al., 2017). Zur Unterscheidung zwischen positivem (Eustress) und negativem Stress (Distress), sollten FCM nicht als alleiniger Parameter in der Belastungseinschätzung herangezogen werden, sondern vielmehr in Kombination mit anderen Parametern, wie z.B. dem

Verhalten und physiologischen Werten, interpretiert werden (Mormede et al., 2007; Tiemann et al., 2022).

3.3. Wühlverhalten

Wühlen ist ein natürliches Verhalten von Ratten und vielen anderen Nagetieren. Viele Studien konnten bereits zeigen, dass die Beurteilung des Wühlverhaltens ein sensitiver Parameter zur Belastungseinschätzung ist und in vielen Bereichen, wie z. B. in Toxizitätsstudien, neurologischen und chirurgischen Modellen, eingesetzt werden kann (Begni et al., 2020; Deacon, 2006; Mallien, Becker, et al., 2022; Riedesel et al., 2022). Das Wühlverhalten wird häufig als sehr positiv für die Ratten beschrieben, da es sich dabei um ein natürliches Verhalten dieser Spezies handelt. In Wildpopulationen von Wanderratten wurde beschrieben, dass diese Tunnel bauen, um sich vor der Witterung und Fressfeinden zu schützen (Steiniger, 1950). Eine Studie, die häufig genutzte Laborrattenstämme mit Wildstämmen verglich, konnte zeigen, dass die Länge sowie die Komplexität der Tunnel in den Laborstämmen deutlich verringert war (Stryjek et al., 2012). Eine ältere Arbeit hingegen hat keine Unterschiede im Bau von Tunneln in verschiedenen Experimentalansätzen zwischen wilden Wanderratten und Sprague-Dawley Albino Ratten festgestellt (Boice, 1977). Deutliche Stamm-abhängige Unterschiede wurden auch in einer weiteren Studie zur Untersuchung mehrerer Rattenstämme festgestellt (Riedesel et al., 2022). Ein weiteres Phänomen dieses Tests ist die hohe individuelle Varianz. So ist mehrfach beschrieben, dass die Ratten über mehrere Tage hinweg eine sehr unterschiedliche Wühlleistung aufzeigen (Riedesel et al., 2022; Whittaker et al., 2015). Neben einer belohnenden Komponente, könnte die Motivation der Ratten darin liegen, sich einen Versteckplatz durch das Entfernen des Substrats aus einer Röhre zu erschaffen (Deacon, 2006). Während Mäuse mit verschiedenen Substraten interagieren, bevorzugen Ratten Kies (Deacon, 2006). Ein für die Belastungseinschätzung großer Vorteil der Analyse des Wühlverhaltens ist der quantitative Charakter der Messdaten, der im Gegensatz zu Scoring-Systemen eine sehr objektive Beurteilung erlaubt. Bei diesem Parameter ist außerdem zu beachten, dass er sehr Handling-intensiv ist und eine mehrtägige Trainingsphase das Wühlverhalten positiv beeinflussen kann (Whittaker et al., 2015).

3.4. Open-Field-Test

Der Open-Field-Test ist ein sehr häufig genutzter Test zur Beurteilung des Explorations- und Lokomotionsverhaltens (Gould et al., 2009). Bei dem Test werden die Tiere in eine leere Testarena, die typischerweise rund, rechteckig oder quadratisch ist, gesetzt und ihr Verhalten wird über eine bestimmte Zeit hinweg aufgezeichnet (Prut & Belzung, 2003). Nach Beenden des Tests werden die Tiere wieder in ihren Heimkäfig zurückgesetzt. In der Regel findet heute eine Video-basierte, automatisierte Auswertung des Tests statt und es können viele verschiedene Parameter untersucht werden: die horizontale Aktivität der Tiere (zurückgelegte Distanz, Zeit in Bewegung, Geschwindigkeit), die Anzahl des Aufrichtens (*rearing*) sowie die Position der Tiere in der Arena (Zeit im Zentrum) (Prut & Belzung, 2003).

Initial untersucht man mit dem Test in den ersten Minuten die Reaktion auf eine neue Umgebung (Blizard et al., 2007). Offene Flächen sind für Ratten aversiv und zunächst versuchen viele Tiere Schutz in der Nähe einer Seitenwand zu suchen. Der Aufenthalt am Rand der Arena wird auch als Thigmotaxis bezeichnet (Prut & Belzung, 2003). Erst mit fortschreitender Zeit in der Open-Field Arena wird vor allem das Lokomotionsverhalten untersucht (Gould et al., 2009).

Bei der Behandlung mit anxiolytischen Substanzen erhöht sich die Dauer des Aufenthalts innerhalb des Zentrums (Gould et al., 2009). Stimulierende Substanzen, wie zum Beispiel Kokain oder Amphetamine, erhöhen hingegen die lokomotorische Aktivität der Tiere (Prut & Belzung, 2003). Über Mäuse ist beschrieben, dass sie sich eine längere Zeit im Zentrum aufhalten, wenn sie keine Vibrissen besitzen, mit denen sie sich an der Wand orientieren können (Prut & Belzung, 2003). Dies veranschaulicht, dass auch sensorische Eigenschaften der Tiere die Ergebnisse beeinflussen können und dass stets eine vorsichtige Interpretation der Daten stattfinden sollte (Prut & Belzung, 2003). Weitere mögliche Einflussfaktoren auf die Bewegung im Open Field sind die Größe der Arena, motorische Funktionen, das Geschlecht, der Erkundungsdrang, der Gesundheitszustand des Tieres und die relative Zeit im circadianen Rhythmus (Gould et al., 2009).

3.5. Saccharin-Präferenz-Test

Bei dem Saccharin-Präferenz-Test handelt es sich um einen Wahltest, bei dem das Tier in einem definierten Zeitraum zwei Trinkflaschen zur Auswahl zur freien Verfügung gestellt bekommt. Eine

der Flaschen ist mit einer Saccharin-Lösung gefüllt, die andere mit Wasser. Um eine Seitenpräferenz auszuschließen, findet der Test über zwei Tage statt, sodass die Position der Wasser- und Saccharinflasche getauscht werden kann (Mallien, Becker, et al., 2022). Der Test basiert auf der angeborenen Präferenz für Süßes, d.h. eine gesunde Ratte würde sich stets für die süße Lösung entscheiden, während eine Ratte mit anhedonischem Verhalten einen verringerten Konsum der Saccharin-Lösung aufweisen würde (Klein et al., 2015). Der Test wird vor allem als verhaltensbasierter Auswertungsparameter für Depressionsmodelle verwendet (Nestler & Hyman, 2010). Da die Anhedonie ein Kernsymptom der Major Depression darstellt, kann bei einer verminderten Saccharinpräferenz von einer erhöhten Belastung für das Tier ausgegangen werden (Mallien, Pfeiffer, et al., 2022). Der Saccharin-Präferenz-Test ist eine modifizierte Form des Sucrose-Präferenz-Tests, bei dem mögliche Einflüsseffekte der Sucrose ausgeschlossen werden sollen (Harkin et al., 2002). Der Test ist sehr leicht durchzuführen, da er im Heimkäfig stattfindet und die Tiere dafür nicht gehandelt werden müssen. Allerdings ist zu beachten, dass die Auswertung für diesen Test bei einer Gruppenhaltung nicht auf Einzeltierebene durchgeführt werden kann.

3.6. Nestbauverhalten

Die Beurteilung des Nestbauverhaltens ist ein schon lange etablierter Parameter in Mäusen. Bei Ratten ist im Gegensatz zu Mäusen das Nestbauverhalten mit einer hohen Varianz beschrieben (Schwabe et al., 2020). Eine Arbeit hat untersucht, ob das Nestbauverhalten von den Ratten erst erlernt werden muss und konnte dies in einem experimentellen Ansatz bestätigen (Van Loo & Baumans, 2004). Eine weitere Studie konnten keinen Einfluss des Alters zum Zeitpunkt des ersten Kontakts mit dem Nestmaterial auf das Nestbauverhalten bestätigen (Schwabe et al., 2020). Innerhalb des DFG-Konsortiums FOR2591 wurde versucht die Eignung des Nestbauverhaltens in der Ratte als Belastungsparameter zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde ein detaillierterer Score zur Beurteilung der Nestkomplexität publiziert (Schwabe et al., 2020). In einem kürzlich durchgeführten systematischen Review konnte lediglich eine Studie identifiziert werden, in dem die Nestbauaktivität genutzt wurde, um postoperative Schmerzen zu beurteilen (Aulehner et al., 2022). In dieser Studie wurden Ratten nach einer Kraniotomie in einem

Epilepsiemodell sowie während der epileptischen Anfälle untersucht und es konnte eine Reduktion des Nestbauverhaltens festgestellt werden (Möller et al., 2018). Eine weitere Studie zur Belastungseinschätzung von männlichen Dopamin-Transporter Knockout (DAT-KO) Ratten, konnte keinen Effekt auf das Nestbauverhalten zeigen, obwohl andere Parameter eindeutig eine Belastung indizierten (Mallien, Becker, et al., 2022). Bei der Verwendung des Nest-Scores sollte immer berücksichtigt werden, dass es sich um einen qualitativen Score handelt, der unweigerlich mit einer intra- und interrater-Variabilität einhergeht und daher nur von trainierten Beurteilern angewendet werden sollte. Weiterhin wurde vorgeschlagen die Robustheit des Tests zu stärken, indem man den Median des Nest-Scores mehrerer Experimentatoren ermittelt (Schwabe et al., 2020).

Die Ermittlung der Latenz bis zur Interaktion mit dem Nestmaterial (LINT) ist ein mit dem Nestbau assoziierter Parameter. Bei dem LINT wird eine definierte Menge Nestmaterial in einen frisch eingestreuten Käfig gegeben und die Zeit gemessen, bis die Ratte über mehrere Sekunden mit dem Nestmaterial interagiert (Möller et al., 2018). Als Interaktionen können dabei das Herumtragen, Beschnüffeln, Annagen gewertet werden (Möller et al., 2018).

3.7. Soziale Interaktionen

Ratten sind sehr soziale Tiere, die natürlicherweise in Kolonien leben (s. Kapitel 2.2. „Soziale Strukturen“). Der erste Test zur Messung der sozialen Interaktion („*social interaction test*“) in Ratten wurde bereits 1978 beschrieben. Dieser sollte vorrangig die Ängstlichkeit der Tiere messen (File & Hyde, 1978). Eine für das Tier unbekanntere Testumgebung und eine helle Beleuchtung der Testarena führen zu einer anxiogenen Wirkung der Testsituation (File & Seth, 2003). Je anxiogener der Test wirkt, desto weniger soziales Verhalten wird von den Tieren gezeigt (File & Seth, 2003). Es kann zwischen aggressiven (treten, boxen und unterwerfen) und nicht-aggressiven Verhaltensweisen (schnüffeln, folgen, gegenseitiges putzen), aber auch passiven Verhaltensweisen unterschieden werden (File et al., 2004). Es wird empfohlen, Tiere mit einem ähnlichen Körpergewicht zu testen und die Tiere für mehrere Tage vor dem Test einzeln zu halten, um die sozialen Aktionen zu verstärken (File et al., 2004). Jedes getestete Paar stellt eine experimentelle Einheit dar, damit sich keine fälschlicherweise erhöhten Stichprobenanzahl ergibt (File & Seth, 2003).

Die Untersuchung des Sozialverhaltens hat eine hohe Relevanz für die psychiatrische Forschung, da Veränderungen in der sozialen Aktivität auch bei vielen psychiatrischen Erkrankungen eine Rolle spielen (Si et al., 2023; Wilson & Koenig, 2014). Reduziertes soziales Verhalten im *social interaction test* kann somit den sozialen Rückzug beim Menschen modellieren (Wilson & Koenig, 2014). Eine Studie konnte zeigen, dass sich der *social interaction test* gut zur Einschätzung der Belastung in Epilepsiemodellen eignet (van Dijk et al., 2020). Um den Tieren den Stress durch die kurzfristige Isolation vom Sozialpartner vor dem *social interaction test* und während des Tests zu ersparen, bieten sich Beobachtungen der sozialen Aktivität im Heimkäfig an (Babineau et al., 2013; Kahnau et al., 2023). Zudem bietet diese Option, im Gegensatz zu dem klassischen *social interaction test*, die Möglichkeit das Verhalten auch kontinuierlich zu erfassen und über einen längeren Zeitraum zu charakterisieren (Babineau et al., 2013; Puścian & Knapska, 2022).

3.8. Wasser- und Futteraufnahme

Der Wasser- und der Futterkonsum zählen zu den einfach zu erhebenden und objektiven Parametern zur Einschätzung des Tierwohls (Hawkins et al., 2011). Eine ausreichende Wasser- und Futteraufnahme über einen längeren Zeitraum ist wichtig für das Überleben eines Tieres. Eine Störung der Aufnahme kann dementsprechend auf wesentliche Beeinträchtigungen des Gesundheitszustandes und auf eine Belastung des Tieres hindeuten. Die Wasseraufnahme kann bei Labortieren sehr einfach durch ein in bestimmten Zeitabständen durchgeführtes Wiegen der Wasserflaschen analysiert werden. Bei der Gruppenhaltung muss berücksichtigt werden, dass nur Werte auf einer Käfigbasis und nicht für das Individualtier ermittelt werden können.

Ähnlich wie bei der Beurteilung der Wasseraufnahme muss bei der Futteraufnahme die Haltungform der Tiere berücksichtigt werden. Zusätzlich bleibt zu beachten, dass es in einem Standard-Käfigmodell und bei *ad libitum*-Fütterung nicht möglich ist, den exakten Futtermittelverbrauch festzustellen, da kleine Futterpellets leicht durch das Futtergitter fallen können und das Messergebnis dadurch ungenau werden kann. Bei der komplexen Regulation des Appetits spielen pathophysiologische Faktoren, wie z.B. Krankheiten, Angst und Schmerz eine Rolle, da diese Inappetenz hervorrufen können (Andermann & Lowell, 2017). In zwei Studien konnte am Beispiel von chronischem, aber auch akutem Immobilisationsstress gezeigt werden, dass Stress die Futteraufnahme in Ratten verringern kann (Marti et al., 1994; Valles et al., 2000).

Pharmakologische Interventionen können ebenfalls Einflüsse auf das Fressverhalten haben. Das Opioid-Analgetikum Buprenorphin kann in Ratten eine Allotriophagie oder Pica-Verhalten verursachen. Dabei wird nicht-verdauliches Material, wie zum Beispiel Käfigeinstreu, gefressen (Clark et al., 1997). Gegenteilige Effekte, wie die Verringerung des Futterkonsums, sind ebenfalls als Nebenwirkungen von antipsychotischen Substanzen beschrieben (von Wilmsdorff et al., 2010).

3.9. Körpergewicht

Die Beurteilung des Körpergewichts und dessen Verlauf über die Zeit wird schon sehr lange zur Belastungseinschätzung von Labortieren vorgeschlagen und angewandt (Morton & Griffiths, 1985). Ein Verlust des Körpergewichts ist vor allem auf die verminderte Futter- bzw. Wasseraufnahme zurückzuführen, aber er kann auch durch metabolische Veränderungen, Malabsorption oder einen erhöhten Energieverbrauch bedingt sein (Talbot et al., 2020). Nach der Veröffentlichung einer weiteren Studie haben sich *Score Sheets* mit dem Ziel etabliert, Belastungen von Tieren objektiv zu erfassen und an Maßnahmen zu knüpfen, um das Tierwohl nicht zu gefährden (Morton, 2000). In der behördlichen Überwachung gibt es häufig die Forderung, eine Euthanasie des Experimentaltieres bei einem Verlust von mehr als 20 % des Körpergewichts durchzuführen, da dieser Wert mit einer hohen Belastung für die Tiere interpretiert wird (Talbot et al., 2020). Eine Studie konnte anhand verschiedener Tiermodelle zeigen, dass ein Verlust des Körpergewichts nicht zwingend mit einem Auftreten anderer klinischer Symptome zusammenhängen muss und dass der Körpergewichtsverlust idealerweise modellspezifisch und in Kombination mit anderen Parametern zur Erfassen der Belastung interpretiert werden sollte (Talbot et al., 2020). Des Weiteren kann ein humaner Endpunkt bereits anhand anderer klinischer Parameter indiziert sein, ohne dass die 20 %-Grenze beim Körpergewichtsverlust erreicht wird (Helgers et al., 2020). Anhand modellspezifischer Körpergewichtsschwankungen lassen sich Algorithmen entwickeln, die bereits vor Eintreten eines humanen Endpunktes, auf ein bestimmtes Tier zur genaueren Untersuchung hinweisen können (Helgers et al., 2020). Ebenfalls kann auch eine Körpergewichtszunahme eine Belastung darstellen. Diese kann sich durch pharmakologische Interventionen (z.B. chronische Cortison-Gaben), bei pathologischen Ansammlungen von Flüssigkeit, in Tumormodellen oder bei Modellen

für Adipositas entwickeln, um einige Beispiele zu nennen (Hickman & Swan, 2010; Mallien, Pfeiffer, et al., 2022). Um dieser Problematik zu begegnen, kann zusätzlich die Verwendung von Scoring-Systemen zur Bewertung des Körperkonditionsindex (*body condition score*) in Betracht gezogen werden (Hickman & Swan, 2010).

Eine weitere Schwierigkeit stellt sich in der Bewertung des Körpergewichts von jungen, noch wachsenden und eventuell genetisch modifizierten Tieren dar. Junge Mäuse eines genetischen Epilepsiemodells haben zum Zeitpunkt des Absetzens ein geringeres Körpergewicht als Kontrolltiere, kompensieren dies jedoch innerhalb kurzer Zeit nach dem Absetzen (Talbot et al., 2020). In Fällen von einem transienten Körpergewichtsverlust während der Entwicklung sollten weitere klinische Parameter berücksichtigt werden, um das Tierwohl sicherzustellen (Talbot et al., 2020).

4. Auswirkungen von Hypothermie auf den Organismus

Säugetiere gehören zu den gleichwarmen Tieren und ihre Körpertemperatur bleibt aufgrund von Regulationsmechanismen trotz einer schwankenden Außentemperatur konstant. Dazu unterliegt die Körpertemperatur einer strikten Regulation durch den Hypothalamus, der als „Thermostat“ des Körpers agiert (Steinlechner, 2005). Weitere thermische Detektoren befinden sich in der Haut, dem Rückenmark, den Bauchorganen und den großen Venen (Todd & Powell, 2009). Wenn der Wärmeverlust die Wärmeproduktion übersteigt, gerät das System aus dem Gleichgewicht und es kommt zu einem Absinken der Körpertemperatur und einer Hypothermie (Steinlechner, 2005).

4.1. Ursachen und Einteilung mehrerer Hypothermieformen

Eine Unterkühlung kann verschiedene Ursachen haben und es wird zunächst zwischen der primären bzw. akzidentiellen Hypothermie und der sekundären Hypothermie unterschieden (Todd & Powell, 2009).

Bei der primären Hypothermie liegt der Grund für das Absinken der Körpertemperatur in der Exposition in einer kalten Umgebung (Todd & Powell, 2009). Eine leichte Hypothermie bedeutet eine innere Körpertemperatur zwischen 32-37 °C (Ruys, 2017). Sie ist gekennzeichnet durch zittern, Vasokonstriktion, einen erhöhten Metabolismus, Erhöhung der Herzfrequenz, Piloerektion sowie Wärme suchendem Verhalten (Ruys, 2017). Von einer mäßigen Hypothermie spricht man bei einer Körpertemperatur zwischen 28-32 °C (Ruys, 2017). Die klinische Symptomatik kann nun aus einer verminderten Herz- sowie Atemfrequenz, einem schwachen Puls, Muskelsteifheit, Hypotonie und einer Depression des zentralen Nervensystems (ZNS) bestehen (Ruys, 2017). Bei einer Körpertemperatur zwischen 20-28 °C liegt eine schwere Hypothermie vor, die durch eine Dekompensation gekennzeichnet ist: Es kommt zu einer peripheren Vasodilatation, Arrhythmien, Koagulopathien, vermindertem Allgemeinverhalten bis zum Koma, abwesendem Pupillarreflex und ggf. fehlendem Kornealreflex (Ruys, 2017). Eine Asystolie tritt bei kritischen Hypothermien und Körpertemperaturen von unter 20 °C auf (Ruys, 2017).

Bei der sekundären Hypothermie liegen bereits andere Erkrankungen oder Konditionen vor, die entweder zu einer gestörten Thermoregulation, einer verminderten Wärmeproduktion oder einem erhöhten Wärmeverlust führen und zeigen stärkere klinische Symptome bei höheren Temperaturen (Paal et al., 2022; Todd & Powell, 2009). Die Einteilung in eine leichte (36,7 – 37,7 °C), mäßige (35,5 – 36,7 °C), schwere (33 – 35,5 °C) und kritische Hypothermie (< 33 °C) hat daher höhere Grenzwerte für die innere Körpertemperatur als die primäre Hypothermie (Ruys, 2017; Todd & Powell, 2009). Diese Grenzwerte beziehen sich auf Hunde und Katzen, da eine Einteilung der verschiedenen Hypothermiegrade speziell für Ratten noch nicht publiziert wurde.

Die Induktion einer Hypothermie kann jedoch bei Humanpatienten auch bei Schlaganfall- oder Herzinfarktpatienten medizinisch indiziert sein, um Ischämie- und Reperfusionsschäden vorzubeugen (Lampe & Becker, 2011).

4.2. Folgen der Hypothermie auf den Organismus

Eine Unterkühlung des Körpers beeinflusst die Hämodynamik, den Säure-Basen-Haushalt, das Immunsystem sowie den Leberstoffwechsel und damit den Abbau von Medikamenten (Ruys, 2017). Die Effekte auf die Hämodynamik sind abhängig vom Volumenhaushalt und Sedationszustand. Generell wird die kardiale Kontraktilität herabgesetzt und es kommt durch eine Sinusbradykardie zu einer Herabsetzung der Herzrate (Vardon et al., 2016). Des Weiteren erfolgt ein Flüssigkeitsverlust durch eine verminderte Produktion des antidiuretischen Hormons (ADH), eine Verringerung der Anzahl für ADH-Rezeptoren in der Niere, die Synthese von atrialem natriuretischem Peptid und durch eine tubuläre Dysfunktion (Vardon et al., 2016). Bei einer schweren Hypothermie steigt zudem die Gefahr für das Auftreten von Arrhythmien, die bereits bei einer Manipulation des Thorax auftreten können (Vardon et al., 2016). Während anfänglich in der Regel atriale Fibrillationen auftreten, können sich diese auch später zu ventrikulären Fibrillationen entwickeln (Vardon et al., 2016).

Die Immunsuppression bei einer Hypothermie entsteht vor allem durch eine Hemmung der Migration von Leukozyten, einer Hemmung der Phagozytose sowie durch eine verringerte Synthese von Cytokinen (Vardon et al., 2016). Bei einer perioperativ auftretenden Hypothermie

steigt das Risiko für respiratorische Infektionen und chirurgische Wundinfektionen (Vardon et al., 2016).

Zusätzlich erhöht eine Hypothermie die Gefahr von auftretenden Blutungen vor allem durch eine Veränderung der enzymatischen Aktivität von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten und eine Veränderung in der Fibrinogensynthese (Vardon et al., 2016). Des Weiteren entsteht durch eine Umverteilung von Blutplättchen in Milz und Leber eine vorübergehende Thrombozytopenie (Vardon et al., 2016). Ein weiterer Effekt der Unterkühlung liegt in dem veränderten Cytochrom P450-Stoffwechsel in der Leber (Tortorici et al., 2007). Durch eine Hypothermie wird die Aktivität der P450 Enzyme reduziert, was sich in einem deutlich verlangsamten systemischen Abbau vieler Pharmaka äußert (Tortorici et al., 2007).

In Ratten sind zudem höhere Scores des *Rat Grimace Scales*, einem Scoring-System, das Schmerzen bei Ratten detektieren soll, nach einer perioperativen Hypothermie im Vergleich zu den Kontrollgruppen beschrieben (Klune et al., 2020)

4.3. Behandlung von Hypothermie bei Heimtieren

Bei hypothermen Patienten sollten möglichst schnell aufwärmende Maßnahmen eingeleitet werden, sodass die Hypothermie nicht weiter fortschreitet. Bei einer leichten Hypothermie können passive Maßnahmen, wie z.B. das Einschlagen in eine isolierende Decke, bereits ausreichen (Todd & Powell, 2009). Bei einer stärkeren Hypothermie werden weitere aktive Maßnahmen über eine exogene Wärmezufuhr empfohlen. Dies kann über Wärmelampen, mit warmen Wasser gefüllten Einmalhandschuhen, Wärmematten oder am effektivsten mittels Warmluftgebläsen erfolgen (Eberspächer-Schweda, 2016). Bei einem direkten Kontakt zwischen Wärmematten und der Haut darf die Wärmequelle nicht zu warm eingestellt sein, da durch die periphere Vasokonstriktion die Hitze nicht weggeleitet werden kann und Verbrennungen leicht entstehen können (Todd & Powell, 2009). Dabei sollte eine Aufwärmungsrate von 0,5 bis 2 °C pro Stunde nicht überschritten werden (Ruys, 2017). Bei Rotlichtlampen ist zu beachten, dass diese leicht einen Wärmestau erzeugen und eine Erwärmung tiefergehender Hautschichten häufig nicht erreicht wird (Henke & Erhardt, 2011).

IV. Arbeitshypothesen und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine evidenz-basierte Belastungseinschätzung für den *Forced Swim Test* in der Ratte durchgeführt werden.

Der *Forced Swim Test* wird sehr häufig in der psychiatrischen Forschung eingesetzt. Weitere Forschung zum Verständnis der Entstehung depressiver Störungen ist dringend notwendig, da Ätiologie und Pathogenese bis heute noch nicht vollständig erklärt werden konnten. Auch auf der Patientenseite ist die aktuelle Situation nicht zufriedenstellend, da immer noch viele der Depressionspatienten auf die pharmakologische Therapie hin keine Remission erreichen und neue therapeutische Ansätze benötigt werden (Pigott et al., 2023). Einem systematischen Review zufolge wurden seit der ersten Erwähnung des FST 1977 fast 4.000 Publikationen mit dem *Forced Swim Test* in der Ratte veröffentlicht (Brandwein et al., 2023). Es ist daher davon auszugehen, dass er auch weiterhin verbreitet angewendet wird. Der FST besitzt eine prädiktive Validität zur Untersuchung des antidepressiven Potentials von Substanzen und bietet auch die Möglichkeit die akute Stressantwort in Ratten zu analysieren (Commons et al., 2017; Slattery & Cryan, 2012). Das Tierwohl ist in tierexperimentellen Verfahren zu berücksichtigen und für die Genehmigung von Tierversuchsvorhaben ist eine prospektive Schweregradklassifizierung notwendig (Richtlinie 2010/63/EU). Bislang wurde für eine zeitlich definierte Schwimmprozedur noch keine objektive Belastungseinschätzung verfasst. Eine Studie konnte belegen, dass im Genehmigungsprozess psychiatrische Tiermodelle als schwerer belastend für die Tiere eingeschätzt wurden, als umfassende Untersuchungen zur Belastung der Tiere es gezeigt haben (Mallien et al., 2020). Da jedes einzelne Verfahren innerhalb eines Tierversuchs zu der Belastung der Tiere beitragen kann, sollten diese in einem kumulativen Ansatz erfasst werden (Richtlinie 2010/63/EU). Es liegt in der Funktion des FST, dass er in den meisten Fällen mit der Applikation von Substanzen einhergeht und dass diese in der Belastung mit zu berücksichtigen ist. Als Beutetiere versuchen Nagetiere Schwäche stets zu verbergen (Turner et al., 2019). In der Praxis wird dies dadurch sichtbar, dass leichte Belastungen der Tiere häufig nur schwer erkannt werden (Krueger et al., 2023). Um möglichst viele Dimensionen der Belastung abbilden zu können, bietet es sich an mehrere Parameter in einem multimodalen Ansatz zu überprüfen (Keubler et al., 2020).

Im Rahmen der vorliegenden Studie werden folgende Fragestellungen untersucht:

- i. Welche Auswirkung hat ein Standardprotokoll des FST auf die Konzentration fäkaler Kortikosteronmetaboliten naiver Wistar-Han-Ratten?
- ii. Ruft der FST bei naiven Wistar-Han-Ratten anhedonisches Verhalten hervor?
- iii. Welche Auswirkungen hat der FST auf das Nestbauverhalten in Wistar-Han-Ratten?
- iv. Ist das Lokomotionsverhalten nach dem FST in Wistar-Han-Ratten verändert?
- v. Welche unmittelbare Auswirkung hat der FST auf die rektale Körpertemperatur der Ratten?
- vi. Welche Auswirkung hat der FST auf das Wühlverhalten von Wistar-Han-Ratten?
- vii. Hat das Antidepressivum Imipramin Auswirkungen auf die Gesamtbelastung der Wistar-Han-Ratten?
- viii. Können anhand dieser Arbeit *Refinement*-Vorschläge für den FST gemacht werden?

V. Publikation

Der Artikel „Evidence-based severity assessment of the forced swim test in the rat“ wurde am 7. Juli 2023 bei der Fachzeitschrift „PLOS ONE“ eingereicht und am 12. Oktober 2023 veröffentlicht (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816>).

Teile des Manuskripts wurden auf folgendem Kongress vorgestellt:

Becker, L., Mallien, A., Pfeiffer, N., Brandwein, C., Talbot, S., Bleich, A., Palme, R., Potschka, H., Gass, P. (2023, September 6-8). Evidence-based severity assessment of the forced swim test in the rat [Conference presentation]. 60th Annual Meeting of the Society for Laboratory Animal Science GV-SOLAS and 21st Advanced Training Course of the IGTP, Mainz, Germany.

RESEARCH ARTICLE

Evidence-based severity assessment of the forced swim test in the rat

Laura Becker¹, Anne S. Mallien^{1*}, Natascha Pfeiffer¹, Christiane Brandwein¹, Steven R. Talbot², André Bleich², Rupert Palme³, Heidrun Potschka⁴, Peter Gass¹

1 Department of Psychiatry and Psychotherapy, RG Animal Models in Psychiatry, Central Institute of Mental Health, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany, **2** Hannover Medical School, Institute for Laboratory Animal Science, Hannover, Germany, **3** Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria, **4** Institute of Pharmacology, Toxicology, and Pharmacy, Ludwig-Maximilians-University, Munich, Germany

* anne.mallien@zi-mannheim.de



Abstract

The forced swim test (FST) is a traditional assay, which has been used for more than 40 years to assess antidepressant effects of novel drug candidates. In recent years, a debate about the test has focused on the assumption that the FST is highly aversive and burdening for the animals because of the earlier anthropomorphic interpretation and designation as a "behavioral despair test". The Directive 2010/63/EU and the German Animal Welfare law require a prospective severity classification of the planned experimental procedures. Still, an objective examination of the animals' burden in this test has not been performed yet. To fill this gap, we conducted an evidence-based severity assessment of the forced swim test in rats according to a 'standard protocol' with a water temperature of 25°C. We examined parameters representing the physiological and the affective state, and natural as well as locomotion-associated behaviors in three separate experiments to reflect as many dimensions as possible of the animal's condition in the test. Hypothermia was the only effect observed in all animals exposed to the FST when using this standard protocol. Additional adverse effects on body weight, food consumption, and fecal corticosterone metabolite concentrations occurred in response to administration of the antidepressant imipramine, which is frequently used as positive control when testing for antidepressant effects of new substances. We conclude that this version of the FST itself is less severe for the animals than assumed, and we suggest a severity classification of 'moderate' because of the acute and short-lasting effects of hypothermia. To refine the FST according to the 3Rs, we encourage confirming the predictive validity in warmer water temperatures to allow the rats to maintain physiological body temperature.

OPEN ACCESS

Citation: Becker L, Mallien AS, Pfeiffer N, Brandwein C, Talbot SR, Bleich A, et al. (2023) Evidence-based severity assessment of the forced swim test in the rat. *PLoS ONE* 18(10): e0292816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816>

Editor: Giuseppe Biagini, University of Modena and Reggio Emilia, ITALY

Received: July 7, 2023

Accepted: September 28, 2023

Published: October 12, 2023

Copyright: © 2023 Becker et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data are held in a public repository (<https://for.severity-assessment.de/fst-severity-assessment/>).

Funding: This work was funded by the DFG FOR2591 in the projects GA-427/12-2 to PG, BL953/11-2 to AB, and PO681/9-2 to HP. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The forced swim test (FST), also known as the Porsolt test, has been used for over 40 years to detect novel antidepressant agents [1]. It is a widely known and discussed behavioral test for

different reasons: the model's validity, its terminologies and use, and as an example for harm-benefit analyses of ethical problems in laboratory animal science.

A short time after the development of the FST, a debate on the terminology of the immobility readout as 'behavioral despair' emerged [2]. Further criticism points to the increased use of the FST as a model for depression, although the test's validity, especially construct validity, has been highly questioned [3–6].

Instead of interpreting it as despair, these authors argue that the immobility in the forced swim test is a passive coping mechanism of rodents confronted with an inescapable stressor and a learned response to conserve energy [2, 4–6]. The discussion on immobility readouts reflects that the regulation of FST behavior is still not understood [6, 7].

Nevertheless, as summarized in several reviews, the predictive validity of the FST has been proven in various studies reporting an impact of licensed antidepressants on the immobility response in mice and rats [8–11]. However, such reviews and the underlying original publications should be considered with caution in light of the negative publication bias [12, 13]. Nonetheless, existing evidence for a predictive validity and the apparent lack of validated alternative testing methods, the scientific field should not hastily give up on the FST.

Another debate focuses on the harm caused by the test. Following the anthropomorphic interpretation of floating as behavioral despair, the FST has ever since ensured media attention. Animal rights organizations criticize the FST for inducing 'fear, anxiety, terror, and depression in small animals' [14, 15]. Only until a few years ago, the global number of publications using the forced swim test was increasing, but to the best of the authors' knowledge, no study has yet focused on the assessment of severity to the animals in the FST [6], apart from measuring corticosterone and other stress hormones related to the swim exposure [16].

In Europe, the Directive 2010/63/EU regulates animal experimentation and requires a prospective severity classification for all planned experimental procedures in the categories 'mild', 'moderate', 'severe', and 'non-recovery'. An exemplary catalog is provided in appendix 8 but only classifies 'forced swim tests [...] with exhaustion as the end-point' as a severe experiment and lacks an estimation for tests limited in time (Directive 2010/63/EU). The laboratory animal science association, the British Association for Psychopharmacology, the Physiological Society, and Understanding Animal Research have published a fact sheet on the forced swim test proposing a severity classification of 'moderate' [17]. However, an evidence-based assessment of severity is lacking.

To close this gap, we set up an experimental design to objectively measure the impacts of the FST on different kinds of behavior in rats, following a suggestion of the UK National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research (NC3Rs) [18]. We decided to analyse the severity of the procedure in rats. Of course, the severity can species-specific: rats are heavier than mice and might have more difficulties to float effortlessly on the water surface, but are also less prone to hypothermia and have a higher preference to swimming than mice. We used parameters that explore the physiological and affective state, natural and homecage behaviors, and locomotion to investigate many dimensions of the animal's experience. To reflect the severity in as many laboratories as possible, we decided to conduct a 'standard' version of the FST as described by Slattery and Cryan [19].

Material & methods

Experimental plan

For assessing the severity of the Forced Swim Test (FST) in the rat, we conducted three experiments, each examining separate parameters indicating welfare impairments to reduce the risk of interference between parameter measurements. Parameters were studied at three different

time points to allow for within-subject comparisons additional to between-subject comparisons: at a baseline level, in the week of the FST, and one week following the FST, to assess potential recovery effects. The timelines are shown in Fig 1A–1D. In experiment 1, we investigated the impact of the FST on fecal corticosterone metabolite levels (FCM) (Fig 1B). Effects of the FST on burrowing behavior and inner body temperature (IBT) were tested in experiment 2 (Fig 1C). Non-invasive parameters (nest score, latency until interaction with nest material test (LINT), saccharin preference test) in the homecage and locomotion tested in the open field (OF) were analyzed in experiment 3 (Fig 1D). All experiments were performed according to the regulations for animal experimentation in the European Union (European Communities Council Directive 2010/63/EU) and in the German Animal Welfare Act and were approved by the German animal welfare authorities (Regierungspräsidium Karlsruhe, 35-9185-81-G-15-21). Reporting of this project follows the ARRIVE 2.0 guidelines [20].

Animals

We investigated the impact of the forced swim test on female and male Wistar-Han rats. We used male rats purchased from Charles River (Sulzfeld, Germany) in the FCM experiments and in the burrowing experiment. In all other experiments, rats bred by the Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) were used. At arrival, the animals were eight weeks old and were handled for five minutes five times a week. We randomized the assignment to the treatment groups. We comparatively analyzed four treatment groups: 1) rats that swam in the FST and were intraperitoneally (i.p.) treated with imipramine (FST-Imi), 2) rats that swam in the FST and were injected with saline (FST-Sal), 3) rats that were exposed to the FST without any injection (FST) and 4) a mere handling control group (Ctrl). 5) An additional group of animals was used to consider the circadian variations of corticosterone levels (DV) in experiment 1. The rats were housed pairwise in type IV cages (Tecniplast, Hohenpeißenberg, Germany), equipped with bedding (Abedd Espen MIDI, ABEDD, Vienna, Austria), sizzle nest, gnawing sticks (both Zoonlab, Castrop-Rauxel, Germany) and unbleached cellulose tissue paper at a 12 h light-dark cycle (7 am– 7 pm, unless stated otherwise). Cages were changed weekly unless otherwise indicated. Food (LASQCdiet Rod16, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Germany) and tap water were provided *ad libitum*, and their intakes were measured weekly or daily, depending on the experiment. The body weight of the rats was measured five times a week in all cohorts between 8 and 9 o'clock in the morning. We performed additional measurements in female rats (17 weeks old, n = 5) to assess the time until the animals regain their physiological body temperature after the 15 min swim procedure. Experiments with male and female animals were performed at separate time points to avoid pheromonal effects on animal behavior. In general, the experimenters remained blinded to the treatment. However, it was not possible in some instances as the same experimenters performed the FST and the well-being tests.

Forced swim test

The beakers for the FST consisted of transparent acrylic glass cylinders (height: 50 cm, inner diameter: 19 cm). They were filled to the height of 30 cm with 25°C warm water. The beakers were filled with fresh water for each animal. The testing took place 2–3.5 h after the onset of light. The experimental room was dimly lit with 15 lux. Up to four animals were tested simultaneously after acclimatizing to the room for approximately 20 min. They could not see each other during swimming as dark grey dividers were placed between the beakers. The forced swim test was conducted over two consecutive days. On day 1, the swimming duration was 15 min, and on day 2 they swam for 5 min, as published by Slattery and Cryan [19]. After

the next day, i.e., 13.5–24 h after the FST. ‘Recovery response’ samples were timed 28–34 h after an FST session, therefore between 1 pm and 7 pm (C) Timeline of the Burrowing experiment. The group size was $n = 12$ for both sexes. Because of poor burrowing behavior in male animals, only data for female rats are available. BURROW = burrowing, IBT = inner body temperature. (D) Experimental timeline of the homecage parameters and the open field. We used $n = 12$ /group in both sexes. LINT = latency until interaction with nest material test, SPT = saccharin preference test, NEST = nest score.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.g001>

swimming, the rats were towel-dried and placed back in their homecages. The cages were warmed with red light for approximately 30 min after the FST.

Drugs

The Imipramine was injected intraperitoneally (i.p.) 1 h and 23.5 h after the first swim at a dose of 10 mg/kg imipramine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland). Imipramine was dissolved in a volume of 10 mg/ml in sterile saline the day before usage. The vehicle control group (FST-Sal) was injected with an equal volume of sterile saline at the same time points as FST-Imi rats.

Handling control

Rats assigned to the control group were acclimatized to an experimental room, different from the room where the FST was conducted, for approximately 20 min. The dry rats were then towel-dried for one minute to control for handling influences. Afterward, they were transferred back to their homecages. We omitted red-light exposure for these control animals, as this may have overheated the animals because they did not experience the hypothermia due to the water exposure.

Experiment 1: FCM measurement. Rat feces were collected on multiple days at three pre-defined time points, referred to as ‘acute response’, ‘delayed response’, and ‘recovery response’. According to Lepschy et al. [21], the fecal corticosterone metabolites peak after 10–12 h following an ACTH stimulation. The exact times of the collection intervals are based on the FST times: ‘Acute response’ samples were obtained 10–13.5 h after the FST and were followed by collecting the ‘delayed response’ samples 13.5–24 h. Finally, the ‘recovery response’ was collected 28–34 h after the FST (Fig 1A and 1B). The three different FCM intervals were collected at a basal time point and on the first FST day, the second FST day, and the day after. Additionally, 2 and 6 days after the FST protocol, another ‘acute response’ sample was collected to rule out a persistent elevation of corticosterone. Two cohorts for each sex were used to examine FCM concentrations (total group size in both sexes was $n = 18$). Each cohort was divided into two batches, housed in separate rooms with time-shifted light cycles (batch 1: lights on at 7 am, batch 2: lights on at 8:30 am) to maintain the same time intervals and therefore take the diurnal variation of the corticosterone metabolism into account during experimentation.

For the exact timing of the intervals, the rats were transferred to a different set of ‘collection cages’ (equally sized and enriched as the housing cages but with reduced bedding). Two collection cages were assigned to each pair of animals, in addition to the regular homecage, to keep their environment familiar. All fecal pellets were collected before each new use of the respective cages. To avoid stress induction by frequent cage changes, the animals were already trained in the habituation phase to frequent handling and cage changes at the sample times (Fig 1B).

The collected feces were kept at -20°C until further processing. The feces were then dried for 5 h in an incubator at 65°C and subsequently homogenized. The samples were further processed as described in Mallien et al. [22]. Briefly, 50 mg of homogenized, powdered feces were

mixed with 1 ml of 80% of methanol and shaken for 30 min. Finally, the methanolic extract was centrifuged for 10 min before taking the supernatant for further analysis, as described Lepschy and colleagues [21].

Experiment 2: Burrowing and inner body temperature measurement. The burrowing assay was conducted as previously described [22–25]. Shortly, the rats were trained to burrow in a separate experimental room for five days. On day one, the animals were only acclimatized to a type IV cage laid out with unbleached cellulose paper tissues and an empty burrowing tube (32 cm long x 10 cm in diameter, open end 6 cm elevated from the floor) for 30 min. On days 2–5, the burrowing tube was exchanged for another burrowing tube filled with gravel (2000 g) after acclimatization. After 60 min, the rats were transferred back to their homecages, and the remaining gravel in the tubes was measured. On day 5, the latency to start burrowing was additionally analyzed. Rats that did not begin burrowing in the first 10 min were assigned a latency of 600 s for the statistical analysis. Between trials, the gravel was washed with 0.1% acetic acid. The tubes and cages were cleaned with 70% ethanol. Seventeen out of 48 rats burrowed less than 500 g on day 5 and were excluded from the analysis as described elsewhere [26].

After training, the burrowing behavior of the rats was tested one day before the FST, on both FST days, the day after the FST, and 5 and 6 days after the FST for severity assessment (Fig 1C). Directly after the FST or the respective handling procedure, the inner body temperature of the animals was measured rectally (Rodent thermometer BIO-TK8851, Bioseb Lab Instruments, France).

Experiment 3: Homecage-based parameters and open field. In the third experiment, non-invasive homecage parameters, like the nest score, the latency until interaction with the nest material test (LINT), the saccharin preference test, and locomotion, were examined (Fig 1D).

Nest-building behavior was assessed five times a week for three consecutive weeks. The nests were scored 2 h after the end of the dark phase and according to the method previously published by Schwabe et al. [27] and Mallien and colleagues [22]. In summary, '0' was assigned in case the nest material was almost untouched, '1' was given when the nest material was touched and distributed over 50% of the floor area without a visible nest area; a score of '3' was rated for nests that showed a marked nest area which could either be flat with an indentation or present an appreciable height; the highest score of '4' was assigned for perfect nests: both a noticeable height as well as a prominent indentation needed to be visible [27]. The fresh nesting material was placed in the same position in each cage change.

The LINT was measured during the weekly cage change. In the male cohort, the rats were placed in the new cage, already equipped with sizzle nest material (formed into two balls, each weighing 14 g), paper, and the gnawing stick. Then, the time was measured until the animals interacted with the nest material for more than 3 s, as described in Möller et al. [26]. We counted carrying, digging, and gnawing the material as interactions. Animals that did not display an interaction after 600 s were assigned 600 s as latency as a cut-off point. For the female animals, we changed the protocol slightly because we observed that in the previous examined males, many rats did not show interest in the nest material immediately after cage change but were instead occupied with playing with the cage mate and/or playing with the fresh bedding or the gnawing stick. Therefore, the female animals were transferred to a new cage only filled with bedding for one hour to acclimatize. Then, 28±1 g of sizzle material, formed into two balls, was added to the cage, and the latency was measured as previously described. After the LINT, paper, and gnawing sticks were placed in the cages.

Locomotion of the animals in an open field (OF) was analyzed for 30 min twice at the interval of one week. Before the conduction of the OF, the rats were transferred to an experimental room and acclimatized for 30 min. Four animals were tested in 4 adjacent boxes (50 cm in length × 50 cm in width × 50 cm in height), dimly lit with 25 lux simultaneously. After each

trial, the apparatus was cleaned with 70% ethanol to prevent odor cues. We analyzed the total distance moved (TDM), center time (CT), velocity, and movement in 5 min time bins after automatic tracking (Ethovision XT 15, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands) [22, 24, 28].

The saccharin preference test SPT was repeatedly conducted for three consecutive weeks according to the protocol by Klein et al. [29]. On days 1 and 3, the animals were presented with two water bottles to compare the regular consumption, check for a side preference, and prevent habituation to the sweet taste. On days 2 and 4, one bottle was filled with 0.1% saccharin solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), while the other bottle contained plain water. The position of the saccharin bottle was switched with the water bottle on both days to control for side preference. 24 h values were measured for both cohorts. An additional 2 h measurement was evaluated in the female cohort because we did not observe any treatment effects in male animals tested before the female animals. A dripping control, i.e., an additional cage equipped with two bottles, was used to correct the fluid loss due to cage handling. This cage was removed from the rack and opened like all other animal cages. Animals consuming the same or less fluid in 2 h than lost by the dripping control (mean of all 2 h measurements) were excluded from this analysis. This affected 2 from 24 cages in the 2 h measurement.

Statistical data analysis. Statistical analysis was performed using R [30] using the packages lme4 [31] and lmerTest [32]. Data were tested against the hypothesis of normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Data from male and female animals and cohorts were analyzed separately whenever sex interactions or cohort interactions were present. Body weight, water and food consumption, amount of burrowed gravel, inner body temperature, and open field outcomes were analyzed using linear models (resp. parameter ~ treatment + time + treatment:time). To assess the time until the animals regained their physiological body temperature after swimming we used the following linear model (temperature ~ time). For the analysis of FCM, body weight change, and saccharin preference, linear mixed-effects models were used because of single missing data points and/or improved residual distribution. We chose animal ID, cage (in cage-based parameters) and if appropriate cohort as random effects. Non-parametrical testing was performed using the Kruskal-Wallis Test. We compared two time points with the Wilcoxon-Test to analyze the nest scores. Multiple group comparisons were corrected with the Tukey post hoc test. The experimental unit was the single animal, except for SPT, FCM, water consumption, food consumption, and nest score, where the cage was used as the experimental unit. We used G*power *a priori* analysis to calculate the sample size based on estimated effect sizes for one-way ANOVA [33]. For data visualization, the R package ggplot2 was utilized [34].

Results

Our multimodal approach for severity assessment combined parameters from physiological, affective, locomotion-associated, and intrinsic natural behaviors.

Impact of the FST on physiological parameters

Body weight change. Analysis of the body weight change (BWC) did not reveal general treatment effects (male animals: $F(3, 530) = 0, p = 1$, female animals: $F(3, 721.02) = 0, p = 1$) but time:treatment interactions (male animals: $F(12, 530) = 13.45, p < 0.001$; female animals: $F(12, 721.02) = 5.77, p < 0.001$) in both sexes (Fig 2A–2D). A cohort effect was present in both sexes, but because of similar effects, the datasets of the cohorts were combined. In male animals, the control group gained weight after the pretest of the FST (day 20) compared to all

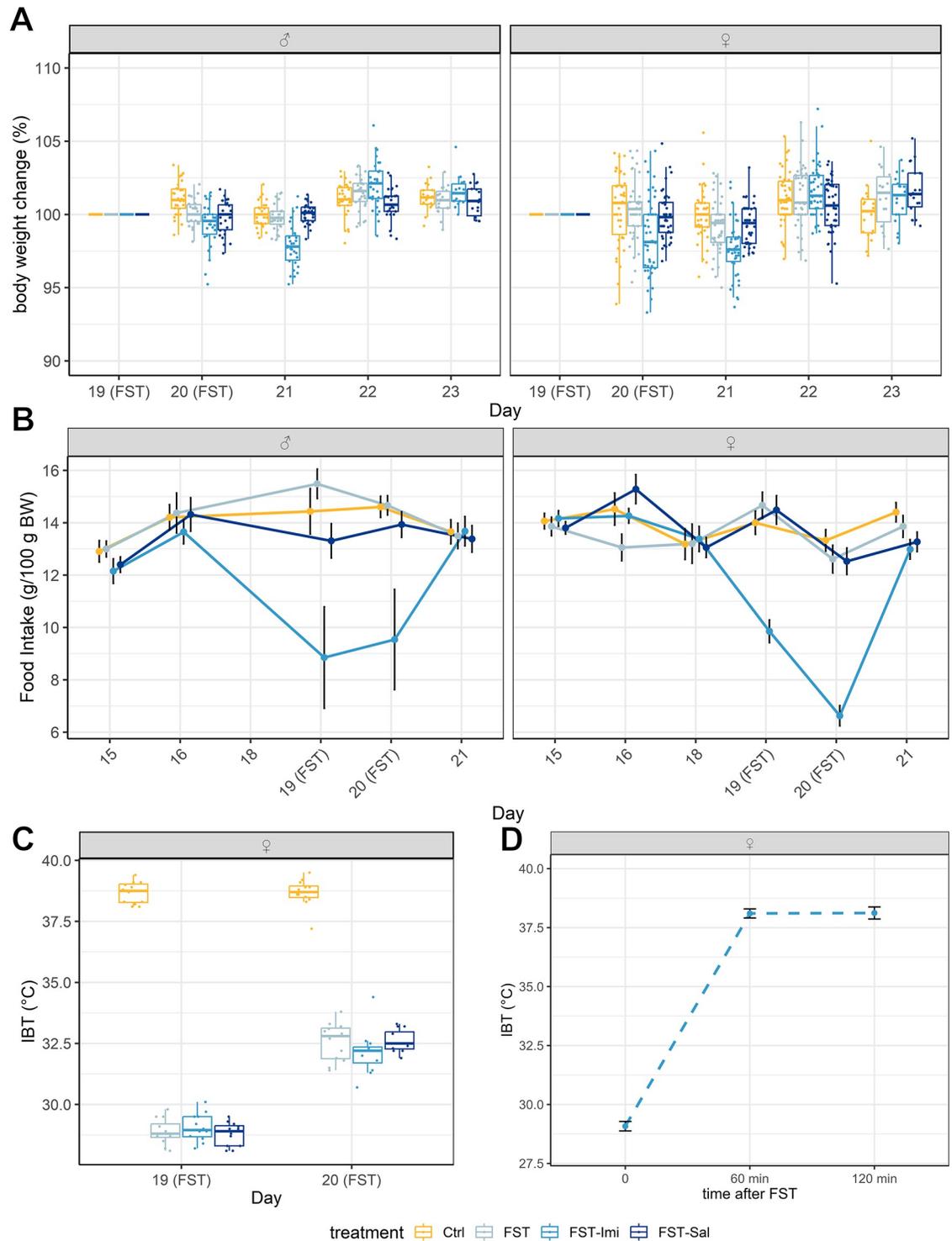


Fig 2. (A–D) Physiological parameters. (A) Body weight change. The percentage change in body weight from the previous day during the week of the FST is shown as a boxplot, separated by sex. Animals of the FST-Imipramine group show a mild but significant loss of body weight after the FST and Imipramine injections. Data from all cohorts were considered. Sample size of male animals $n = 30$ for all treatment groups. Sample size of female animals was $n = 42$ for each treatment group. (B) Food intake. The mean and standard error of the daily food consumption per 100 g body weight is displayed separately for male and female rats. Rats treated with Imipramine showed a significantly reduced food consumption on the days of the injections. The intake of the FST and FST-Sal groups did not change. Sample size of male animals: $n = 5$ cages per treatment group. Sample size of female animals:

n = 8–20 cages per treatment group. (C) Inner body temperature. Boxplots showing the internal body temperature measured directly after the forced swim test/the handling procedure on both FST days. The forced swim test led to a significant drop in temperature. Only data for female animals are available. Sample size: n = 12 per treatment group. (D) Recovery to physiological body temperature. Already after 60 min the female rats could regain their normal body temperature. Sample size: n = 5.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.g002>

other treatment groups, and the FST-Imipramine group showed a lower body weight gain compared to the FST group (P_{adj} : Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, Ctrl vs. FST $p = 0.003$, Ctrl vs. FST-Sal $p < 0.001$, FST vs. FST-Imi $p = 0.005$). After the second FST (day 21), the FST-Imi group showed a loss of body weight (mean \pm SE, 97.9 ± 0.19), unlike all other treatment groups (P_{adj} : Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST-Sal vs. FST-Imi $p < 0.001$). On day 22, the FST-Imi compensated the small body weight loss again and showed a higher BWC compared to the control group and the FST-Sal group as well as the FST-group compared to the FST-Sal animals (P_{adj} : Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST vs. FST-Sal $p = 0.03$, FST-Imi vs. FST-Sal $p < 0.001$). In female animals, the FST-Imi group lost weight on day 20 (mean \pm SE, 98.4 ± 0.26) and on day 21 (mean \pm SE, 97.6 ± 0.26) (P_{adj} , day 20: Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST-Sal vs. FST-Imi $p < 0.001$, day 21: Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST vs. FST-Imi $p < 0.001$, FST-Sal vs. FST-Imi $p < 0.001$). On day 22, the rats in the FST-Imi group compensated the weight loss and showed a positive BWC that was higher than of the FST-Sal animals (P_{adj} : $p = 0.04$). The FST-Sal animals gained more weight on day 23 than the control group (P_{adj} : $p = 0.03$).

We did not observe significant treatment effects or time:treatment interactions of the forced swim test on the absolute body weight in the week of the FST in male and female animals (data shown in [S1 File](#)). Although not statistically significant, a kink in the growth curve could be seen in all cohorts and sexes in the FST-Imi group.

Inner body temperature. Measurement of the inner body temperature showed that all female animals swimming in the FST suffered a pronounced drop in temperature on both days (FST 1: $F(3, 44) = 1122$, $p < 0.001$; FST 2: $F(3, 44) = 238.4$, $p < 0.001$; P_{adj} : Ctrl vs. FST $p < 0.001$, Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, Ctrl vs. FST-Sal $p < 0.001$; [Fig 2C](#)). The estimated mean \pm SE for the FST group was $28.9 \pm 0.15^\circ\text{C}$, for the FST-Imi group $29.1 \pm 0.15^\circ\text{C}$ and the FST-Sal animals $28.8 \pm 0.15^\circ\text{C}$ after the 15 min FST pretest. After the 5 min swim on the next day, the drop of the inner body temperature was lower but still pronounced: FST group $32.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$, for the FST-Imi group $32.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ and the FST-Sal animals $32.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$. The experiment performed to assess the recovery after the 15 min swim, revealed that the female rats regained their physiological body temperature already after 60 min ([Fig 2D](#)). The estimated mean \pm SE directly after the swimming was $29.1 \pm 0.22^\circ\text{C}$, and $38.1 \pm 0.22^\circ\text{C}$ after 60 min as well as after 120 min ($F(2, 12) = 571$, $p < 0.001$, P_{adj} : 0 min vs. 60 min $p < 0.001$, 0 min vs. 120 min $p < 0.001$). No data for male animals are available.

Food consumption. Analysis of the daily food intake revealed a time:treatment interaction. Male and female animal in the FST-Imi group ate less on both FST days compared to all other treatment groups (male animals: $F(12, 79) = 03.11$, $p = 0.001$; female animals: $F(15, 387) = 13.1$, $p < 0.001$), indicating a pharmacological effect of Imipramine ([Fig 2B](#)). Two measurements (day 15 and day 16) of female animals were excluded from the analysis using the 3σ -rule; one measurement was higher and the other lower compared to the mean of the other animals. The intercept for male animals was 12.91 g (SE 0.79 g), and for female animals, 14.15 g (SE 0.56 g). When we measured the food consumption weekly (male FCM1 and HC+OF cohort), we could not detect any effects, probably because the imipramine effect only lasted for two days (data shown in [S1 File](#)).

Water intake. Measuring the water intake once a week did not show any effects in male or female animals (data shown in [S1 File](#)). As for food consumption, the lack of effect may be related to the long interval. Analysis of the water consumption in 24 h on the ‘control days’ of the saccharin preference test only showed a non-significant reduction of water intake in the FST-Imipramine animals (male: $F(3, 39) = 2.2, p = 0.1$; female: $F(3, 40) = 1.5, p = 0.23$).

Fecal corticosterone metabolites (FCMs). In male animals, we observed time:treatment interactions for the ‘acute response’ ($F(20, 200) = 1.7, p = 0.03$) and ‘recovery response’ ($F(12, 119.1) = 2, p = 0.02$) but no general treatment effects ([Fig 3A](#)). The acute response of the FST-Imi group was characterized by elevated FCM concentrations after the 15 min FST pretest (P_{adj} : Ctrl vs. Imi $p = 0.06$, DV vs. FST-Imi $p = 0.04$). One day later, after the 5 min FST test, the FST-Imi group continued to show elevated FCM concentrations compared to the handling and diurnal variation control (P_{adj} : Ctrl vs. FST-Imi $p < 0.001$, DV vs. FST-Imi $p = 0.003$). On P1, the imipramine-treated animals still had significantly higher FCM concentrations than almost all other groups (P_{adj} : FST-Imi vs. Ctrl. $p < 0.001$, FST-Imi vs. DV $p < 0.001$, FST-Imi vs. FST $p = 0.07$, FST-Imi vs. FST-Sal $p = 0.02$). In the ‘recovery response’ interval, the FST-Imipramine group also presented elevated FCM concentrations after both FST days compared to handling and DV control (P_{adj} : FST-Imi vs. Ctrl $p = 0.008$, FST-Imi vs. DV $p = 0.03$ on FST1; FST-Imi vs. Ctrl $p = 0.003$, FST-Imi vs. DV $p = 0.01$ on FST2).

The FCM analysis in female animals demonstrated a strong cohort effect, so both cohorts were analyzed separately ([Fig 3B](#)). Generally, the measured FCM concentrations in cohort FCM2 were exceptionally high. In the first cohort (FCM 1), we did not observe general treatment effects, but a time effect in the ‘acute response’ interval ($F(5, 100) = 3.9, p = 0.003$) and a time:treatment interaction in the first interval ($F(20, 100) = 1.7, p = 0.046$) as well as in the ‘recovery response’ interval ($F(12, 60) = 3.1, p = 0.002$). The handling group showed higher FCM concentrations than the FST-Imi group two days after the FST (P_{adj} : FST-Imi vs. Ctrl $p = 0.03$) in the ‘acute response’ interval. During the ‘recovery response’ on the day of the second FST (FST2), the Imipramine group displayed increased levels of FCM in contrast to the handling and FST-Saline animals (FST-Imi vs. Ctrl $p = 0.005$, FST-Imi vs. FST-Sal $p = 0.009$). Analysis in the second FCM cohort (FCM 2) did not reveal a treatment effect or time:treatment interactions during all sample intervals but a time effect in the ‘acute response’ interval ($F(5, 75) = 3.02, p = 0.01$), showing that FCM concentrations were higher in basal samples compared to all other sampling time points (P_{adj} : Basal vs. FST1 $p = 0.01$, Basal vs. FST2 $p = 0.02$, Basal vs. P1 $p < 0.0001$, Basal vs. P2 $p < 0.0001$, Basal vs. P6 $p < 0.0001$), indicating stress during the baseline measurement. Additionally, the levels of FCM samples were lower on P6 compared to FST1 and FST2 (P_{adj} : FST1 vs. P6 $p = 0.01$, FST2 vs. P6 $p = 0.008$).

Impact of the FST on the affective state

SPT. The 24 h test of the saccharine preference did not show a sex effect. Therefore the datasets of females and males were combined ([Fig 4A](#)). All treatment groups demonstrated a high preference for saccharin. The intercept was 98.34% (SE 1.22%). Neither a treatment effect ($F(3, 204.9) = 0.48, p = 0.69$) or a time:treatment interaction ($F(12, 176) = 1.5, p = 0.13$) were found but a higher variation in the preference of the FST-Imi animals one day after the FST was visible. To increase the sensitivity of the saccharin preference test, we added a measurement in the female cohort two hours after the FST. In a shorter interval (two hours after FST) no group showed a decreased saccharin preference (treatment effect: $F(3, 98) = 0.12, p = 0.95$, time:treatment interaction: $F(12, 78.6) = 1.2, p = 0.29$; figure shown in [S1 File](#)). Intake values that lay below the mean of the drip control were excluded from the 2 h analysis, as we did not assume a representative preference for these (2 cages out of 24).

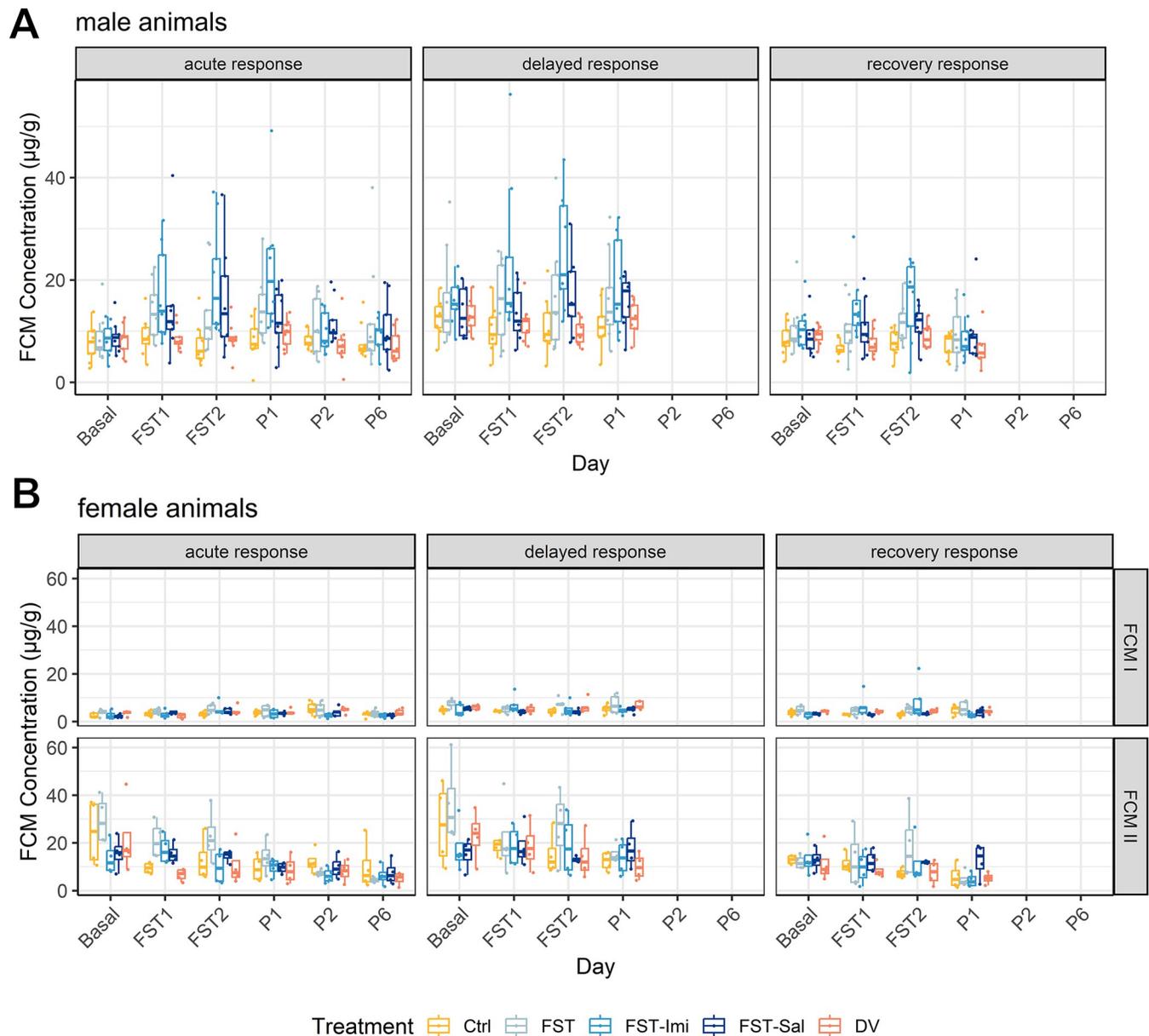


Fig 3. (A-B) Fecal corticosterone metabolite concentrations are shown as boxplots. (A) FCM response in male animals. The panels show the FCM concentrations of all tested days separated by the collection intervals ‘acute response’, ‘delayed response’, and ‘recovery response’. Animals of the FST-Imi group displayed higher concentrations at the time points FST1, FST2, and P1 in the ‘acute response’ interval and at FST1 and FST2 during the ‘recovery response’. No other treatment group showed significantly elevated stress hormone metabolite levels. The sample size was $n = 17-18/\text{group}$. (B) FCM response in female animals. The FCM concentration in female animals showed substantial cohort differences. Therefore, the panels are separated by cohort and collection interval. In the first cohort (FCM I), we could detect elevated FCM levels after the second FST in the FST-Imi group during the ‘recovery response’. In cohort two (FCM II), animals displayed much higher FCM concentrations, especially during the baseline measurement. In the ‘acute response’ interval, the Control-group showed higher FCM values than the FST-Imi group at P2, two days after the FST. No significant time:treatment interactions could be detected in this cohort. The sample size in the first cohort was $n = 10/\text{group}$, and in the second, $n = 8/\text{group}$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.g003>

Impact of the FST on natural behaviors

Burrowing. No treatment effect ($F(3, 189) = 0.29, p = 0.84$) or time:treatment interaction ($F(18, 189) = 0.74, p = 0.76$) could be detected in the analysis of the relative amount burrowed

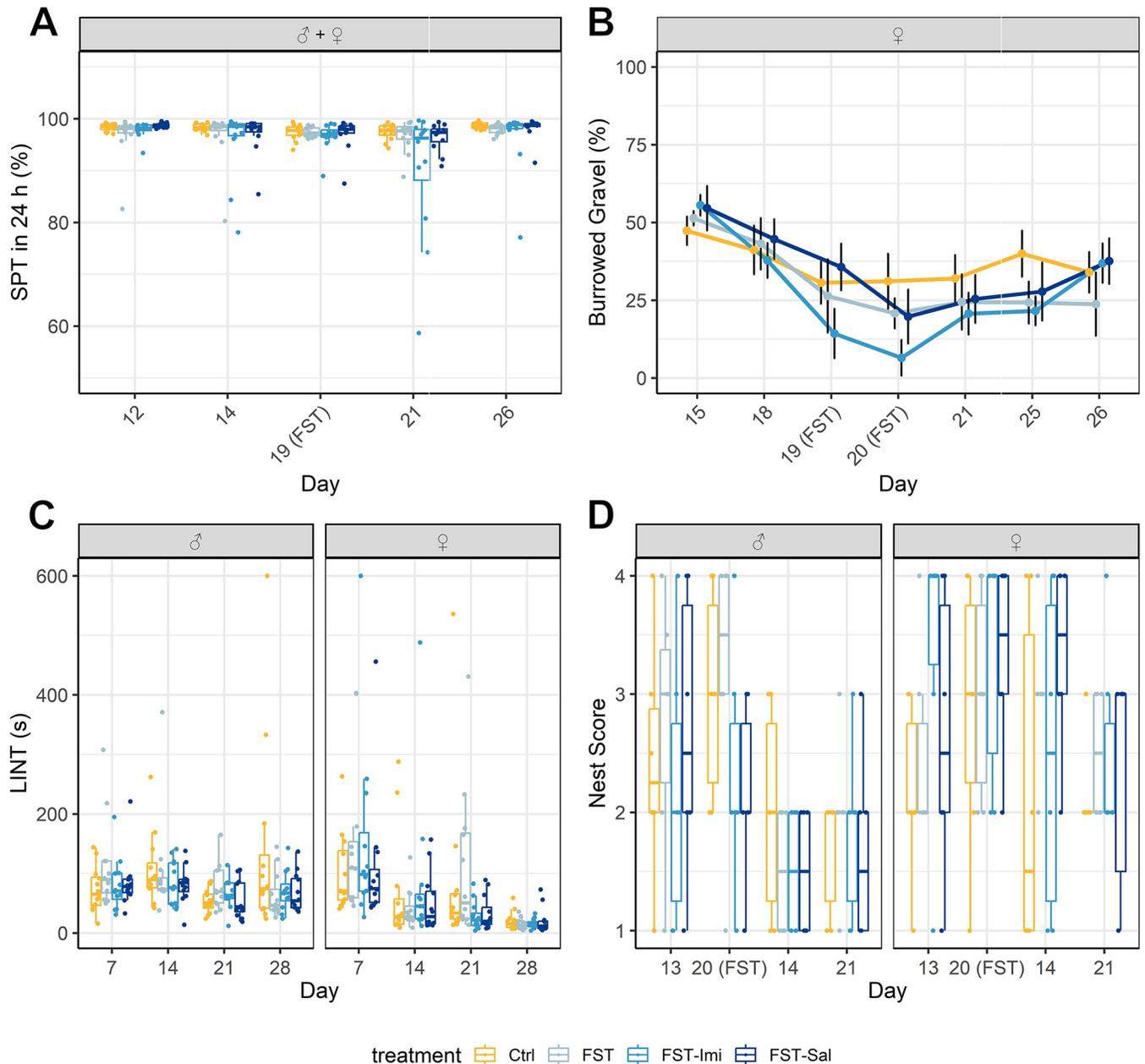


Fig 4. (A-D) Species-specific behaviors. (A) Saccharine preference test results over 24 h are shown as a boxplot. No significant time:treatment interaction was observed in the 24 h saccharin preference test. N = 6 cages per treatment group. (B) Burrowed gravel in the burrowing assay. The mean amount of burrowed gravel (\pm SEM) is depicted from the last training day (D15). We did not find significant treatment effects or time:treatment interactions. Sample sizes were: Control n = 8, FST n = 6, FST-Imi n = 9, FST-Sal n = 8. (C) Latency until interaction with nest material test displayed as a boxplot. No effects of the FST were observed. The sample size for all groups was n = 12. (D) Nest Score. Baseline nest scores on days 13 and 14 are shown together with the scores on the mornings after the two FST days (day 20 and day 21) as boxplots. The sample size for all groups was n = 6 (cage-based parameter) for each sex.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.g004>

by female rats (Fig 4B). The latency until the start of the burrowing behavior was at no point significantly different for the respective treatment groups (data in S1 File).

The male rats used in our experiment did not burrow well enough to establish a stable baseline. Twenty-one animals, resp. 44% of the cohort did not burrow more than 500 g on training day 5. Of the remaining 27 rats, some animals showed high intra-individual variances, i.e.,

they burrowed one day and not the following day. This phenomenon was also observed in a study by Whittaker and colleagues [35] and Riedesel et al. [25]. We have also tried to let the rats burrow in pairs, consisting of one animal that did not perform well and one that burrowed reasonable amounts, as recommended in one study [36], but this did not improve the performance. In addition, a prolongation of the training for additional 4 days did not lead to improved burrowing performance, so we decided to stop the experiment.

Nest score. Analysis of nest-building behavior in male and female rats revealed that the forced swim test did not lead to altered nest scores. The Wilcoxon test did not show significant differences in the mornings after the FST (data in [S1 File](#)). Since the nest scores depend on the day of the week [27], the nests of the respective weekdays of the baseline week were compared with the FST week. Nest scores of male and female animals were analyzed separately. The nest scores of the two days after the FST compared to the baseline (day 13 vs. day 20; day 14 vs. day 21) are shown in [Fig 4D](#).

LINT. In female and male animals, the latency until interaction with the nest material test did not differ among the treatment groups during the entire study (data in [S1 File](#), [Fig 4C](#)).

Impact of the FST on locomotion

Open field. None of the parameters analyzed in the open field demonstrated time:treatment interactions in both sexes ([Fig 5A–5D](#)). The total distance moved during the 30 min was not influenced by the FST, as we did not observe significant time:treatment interactions in male ($F(3, 88) = 0.26, p = 0.86$) and female ($F(3, 88) = 1.3, p = 0.27$) animals ([Fig 5A](#)). Also, no treatment effects were observed in both sexes (male: $F(3, 88) = 0.37, p = 0.78$, female: $F(3, 88) = 0.27, p = 0.85$). The time the animals spent in the center of the open field did not show time:treatment interactions as well (male: $F(3, 88) = 1.3, p = 0.27$, female: $F(3, 88) = 0.19, p = 0.9$, [Fig 5B](#)). The female animals showed a general treatment effect ($F(3, 88) = 3.7, p = 0.01$), which occurred because of an unstable baseline. We did not find time:treatment interactions in the velocity in both cohorts (male: $F(3, 88) = 0.2, p = 0.9$, female: $F(3, 88) = 1.32, p = 0.27$, [Fig 5D](#)). The relative proportion in the movement has also not changed as a result of the FST (time:treatment interaction—male: $F(3, 88) = 0.1, p = 0.96$, female: $F(3, 88) = 1.67, p = 0.18$, [Fig 5C](#)). We did not observe time effects in any parameter, indicating that no habituation effects resulted from repeating the open field after one week.

A brief summary of the outcomes of all analyzed parameters can be found in [Table 1](#).

Discussion

This study investigated the burden of the forced swim test, a traditional assay for assessment of antidepressant effects. The impact on the general condition and the affective state was assessed in male and female rats. Therefore, we chose parameters examining physiological aspects and affective state as well as species-specific, and locomotion behavior. Following evidence-based assessment of the severity of the FST, we planned to determine suitable refinement measures according to the 3R principle [37]. Interestingly, the only effect observed in all FST groups was hypothermia after the FST. Animals swimming in the FST and additionally treated with Imipramine (FST-Imi) showed additional effects on body weight, FCM, and food intake.

Cooling due to the 25°C tempered water seems to be the most relevant effect of the forced swim test on animal welfare due to the small body volume. We measured the temperature in female rats, but several studies performed in male rats did confirm hypothermia after the FST [16, 38–40]. Water temperatures of 15°C and 19°C decreased homecage or exploratory behavior directly after swimming, whereas 25°C cold water or warmer water temperatures did not have this effect [38, 41]. Rewarming in a warm water bath diminished the effect of reduced

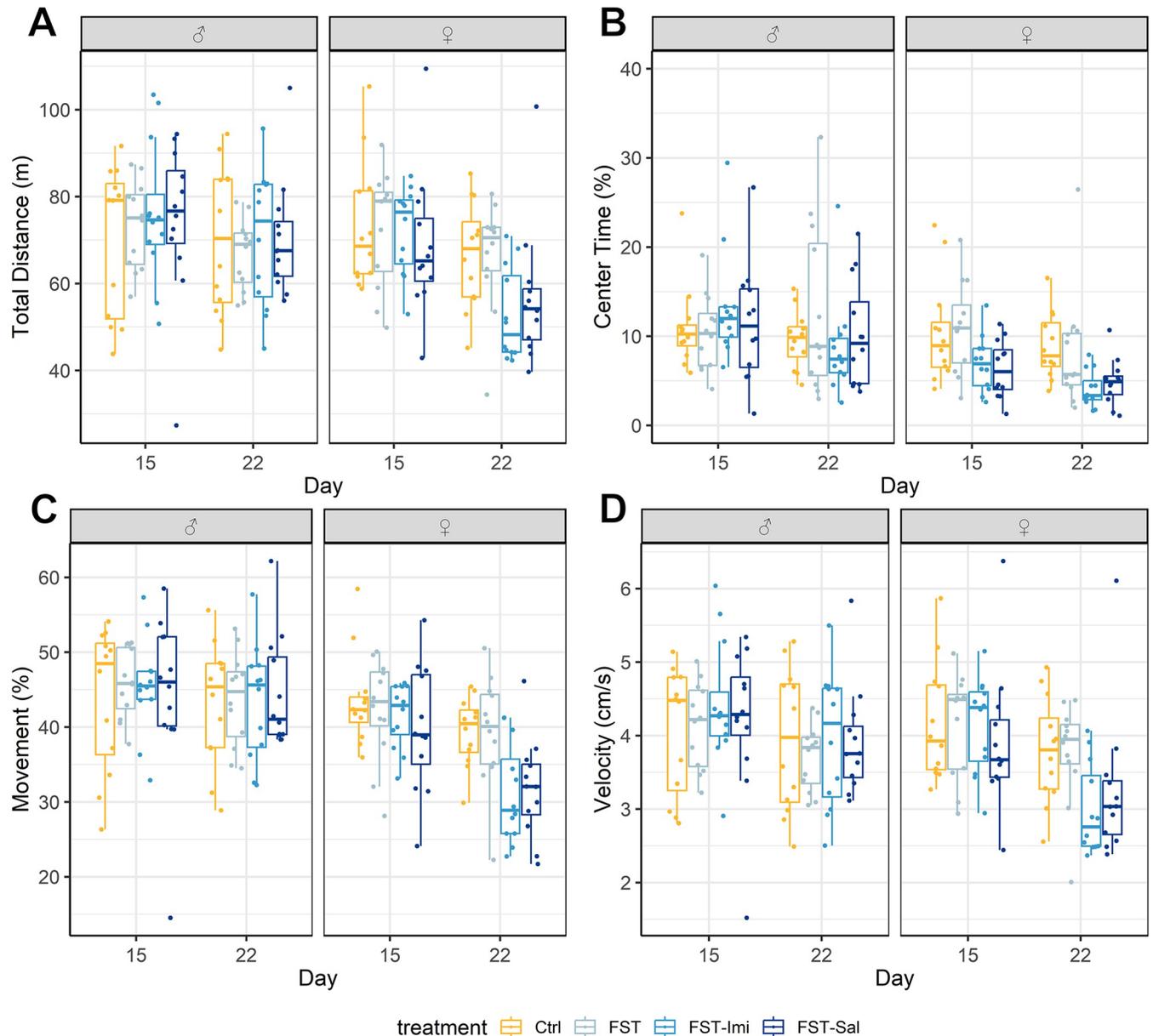


Fig 5. (A-D) Open field. All parameters are shown as boxplots and separately for female and male animals. Results from the baseline week (day 15) and after the FST (day 22) are displayed next to each other. We did not see effects in any of the open field parameters. The group size was $n = 12$ per sex. (A) Total distance moved over the time course of 30 min. (B) Center time. (C) Relative movement. (D) Velocity.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.g005>

activity after a swim procedure [41]. In two publications, the application of imipramine at a dosage of 15 and 30 mg/kg led to an additive temperature loss [16, 39], a finding we could not confirm using a dosage of 10 mg/kg. All these findings highlight the importance of drying and warming the animals after the forced swim test to quickly regain body temperature homeostasis. In our opinion, the drying and rewarming should be an inherent part of any forced swim procedure. We could show that the animals have recovered from hypothermia already 60 min after the 15 min forced swimming and after being dried with towels and rewarmed for approximately 30 min with red light. In the previously mentioned study, animals regained a normal core body temperature after 90 min after the 15 min forced swim in $24 \pm 1^\circ\text{C}$ cold water [16].

Table 1. Summary of results.

Parameter	Sex	Outcome*
Body weight	♂	n.s.
	♀	n.s.
Body weight change	♂	FST-Imi: Lower body weight gain after the FST pretest, short-lasting loss of body weight after FST (5 min)
	♀	FST-Imi: short-lasting weight loss after both FST days for two days
Water consumption (1x weekly)	♂	n.s.
	♀	n.s.
Water consumption (1 h after FST)	♂	n.s.
	♀	n.s.
Food consumption (1x weekly)	♂	n.s.
	♀	No data
Food consumption (1x daily)	♂	FST-Imi: Less food consumption on both FST (+ Imipramine inj.) days
	♀	FST-Imi: Less food consumption on both FST (+ Imipramine inj.) days
FCM	♂	FST-Imi: higher FCM concentrations in the 'acute response' interval, and in the 'recovery response' interval after the FST
	♀	Strong cohort effect. Cohort 1: Ctrl group showed higher FCM concentration than the FST-Imi group two days after the FST in the 'acute interval'. The FST-Imi group had higher FCM concentrations than the Ctrl and FST-Sal groups on the day of FST2 in the 'recovery response'. Cohort 2: time effect—baseline values higher
Burrowing	♂	No data
	♀	n.s.
Inner body temperature	♂	No data
	♀	FST, FST-Sal, FST-Imi: Pronounced loss of temperature on both FST days
Nest Score	♂	n.s.
	♀	n.s.
LINT	♂	n.s.
	♀	n.s.
Open field	♂	n.s.
	♀	n.s.
Saccharin preference	♂+♀	n.s.

*More details can be found in the results section under the respective parameter.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292816.t001>

The physical consequences of hypothermia should not be overlooked: Several studies showed detrimental effects of hypothermia on spatial working memory and damage in the hippocampus [42, 43]. A possible refinement of the forced swim test might therefore be using warmer water to prevent hypothermia, which is only rarely done so far [44, 45]. However, several studies report higher floating times when the water temperature is near thermoneutrality [16, 38, 46]. Therefore, the pharmacological validity of the FST must be confirmed at higher temperatures.

Regarding the body weight, we observed a short growth stagnation in male rats after the first day of the FST compared to the handling control, but no significant weight loss due to the FST on its own. On the contrary, female and male rats additionally treated with imipramine were found to lose body weight (<5%) on the two days after imipramine application but recovered quickly. We assume that the weight loss resulted from reduced food intake, which occurred in the FST-Imipramine groups only. This has already been demonstrated in one study [47] during chronic imipramine administration and displays a pharmacological effect.

In humans several side effects of imipramine such as e.g. dizziness, constipation, loss of appetite, xerostomia (dry mouth), nausea and weight gain frequently occur. Whether imipramine primarily influences central regulation of appetite or induces unpleasant side effects such as nausea and a dry mouth leading to an indirect reduced food intake in rats remains unclear at the moment. So far, it could already be shown, that imipramine leads to a reduction of salivary flow in rats but in a test to predict the emetic potential of drugs, imipramine did not seem to induce this [48, 49].

Many publications have previously shown that conducting the FST in rats leads to an elevation of plasma corticosterone, the primary stress hormone in rats [16, 50–52]. Only a few studies examined how long the stress response lasted after the FST [53, 54]. One group could show a recovery after 135 min in male animals [54]. Furthermore, in some studies, corticosterone levels were measured by repeated blood analyses or did not employ a baseline measurement, which might have also confounded the results [55, 56]. In our study, we conducted a non-invasive approach to examine the duration of elevated corticosterone levels by measuring fecal corticosterone metabolites (FCMs) over the whole time course of the FST and afterwards [57]. By choosing different sample intervals, we tried to represent the time of the acute stress response and the time of recovery.

Interestingly, we only observed significantly higher FCM concentrations in the FST-Imi group in both sexes after the forced swim test, but not in the other groups. This finding contrasts with Pintér and colleagues [16], who did not find an altered corticosterone response after imipramine administration. The same study also showed that water temperature does not seem to influence the amplitude of corticosterone release [16]. Additionally, early life experiences affect corticosterone levels after stress [58]. This aspect seems particularly important for the later cumulative evaluation of distress associated with the experiment. Finally, another study demonstrated that rats housed in an enriched environment had a lower corticosterone response after the FST than those in a non-enriched climate [59].

We detected much higher FCM levels in the second female cohort leading to strong cohort effects, which we cannot explain entirely. Circannual variations of the serum corticosterone concentrations might have partially influenced the results because the female cohorts were tested during different times of the year [60].

The forced swim test and forced swimming procedures are psychological stressors because the animals are experiencing an unescapable situation. We were surprised to see no effect in the saccharin preference test as a measure for anhedonia [61]. From this we conclude, that the stress induced by the standard FST protocol is probably too mild and too brief to cause anhedonia, a core symptom of major depressive disorder. This interpretation is reinforced by an earlier study subjecting rats to repeated forced swim stress in cold water, which induced a significantly lower preference for a sucrose solution [62].

The analysis of species-specific behaviors such as burrowing, nest score, and LINT did not reveal any effects of the FST on the wellbeing of the animals. The burrowing results in the female rats indicate that animals are not exhausted after the FST, as often criticized by animal rights organizations after the FST, and still burrow voluntarily shortly after the swimming procedure. However, we found that burrowing is not always a reliable parameter. Forty-four percent of the rats in the male cohort did not reach the threshold of the inclusion criteria (500 g in 60 min), so the experiment had to be discontinued. Several studies report that approximately 10–20% of rats do not show good burrowing behavior at baseline measurements [36, 63]. A recent study demonstrated profound strain differences in burrowing behavior [25]. Based on these findings, one should carefully consider the choice of the rat strain in future burrowing studies. Also, testing the rats during their active phase (i.e., at night), as usually done in mice, might increase burrowing behavior [23].

The fact that nest complexity was not affected by exposure to the FST is an additional indicator for the severity of the FST not being as high as discussed. But we cannot exclude the possibility of the nest score parameter not being sensitive enough to detect potential negative effects of the FST.

Regarding locomotion and exploratory behavior, we would have expected a reduction of the total distance moved in the open field resulting from the physical dimension of the FST. Instead, we found that the FST and/or treatment with imipramine does not alter open field parameters after two days. We assume that the latency until interaction with the nest material test (LINT) was not changed because it is also dependent on locomotion and exploration. One reason might be that the time between forced swim testing and the welfare parameters was too long to detect acute effects. Yet this shows that any possible burden does not last longer than two days.

A limitation of our study is that we only tested one rat strain. One study could show different endocrine responses after the FST in rat strains [44, 64]. Therefore, a strain-dependent severity of the FST might be possible and should be examined in future studies.

Further factors influencing the experimental outcome might be the animals' age, experimenters, handling procedures and the intensity of habituation to handling since this has already been demonstrated in the mouse [65–67]. Consequently, a study across labs could be very interesting due to the many influencing factors. Furthermore, an investigation of the severity of the FST in mice might be helpful to also give recommendations on the animal species on an animal welfare basis.

Additionally, the usage of potentially more sensitive parameters, e.g., telemetric recordings of heart rate and especially heart rate variability, focusing on the recovery of physiological variables of the animals might be an additional informative future approach.

The current treatment options for major depressive disorder are limited, and approximately one-third of the patients do not reach remission, highlighting the need for more research [68]. Until today, alternative testing methods, especially in the field of neurobiology, unfortunately, cannot replace animal experimentation to a full extent [69].

Conclusion

So far, our experiments demonstrate that hypothermia is the only burden induced by the FST. Animals additionally treated with imipramine also showed mild body weight loss, reduced food intake, and elevated fecal corticosterone metabolite concentrations for three days after the FST. From our results, we conclude that the standard FST procedure itself only produces short-term moderate suffering and distress because of the profound but only short-lasting hypothermia and suggest a classification as 'moderate' according to the Directive 2010/63/EU. The ideal classification would be via a systematic approach comparing the relative severity of different models as previously performed in mice [70].

Applying pharmacological substances usually adds some discomfort to the animal and is always a part of severity classification in the process of the approval. In this case, the effect of the i.p. injection of imipramine was detected to have a stronger influence on the severity-associated measures than the swimming procedure. A promising refinement factor is using warmer water to allow the rats to maintain their physiological body temperature and prevent hypothermia. It might result in a procedure causing only mild stress in the animals.

Supporting information

S1 File.
(DOCX)

Acknowledgments

We thank Edith Klobetz-Rassam for her excellent technical support with the EIA analysis. Furthermore, we thank Gaia Vairani, Diego Capelli, and Alessandro Mannarino for their support in acquiring data during behavioral experiments.

Author Contributions

Conceptualization: Laura Becker, Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Data curation: Laura Becker, Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Christiane Brandwein.

Formal analysis: Laura Becker, Steven R. Talbot.

Funding acquisition: André Bleich, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Investigation: Laura Becker, Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Christiane Brandwein, Rupert Palme, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Methodology: Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Christiane Brandwein, Steven R. Talbot, Rupert Palme, Peter Gass.

Project administration: Anne S. Mallien, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Resources: André Bleich, Rupert Palme, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Software: Steven R. Talbot.

Supervision: Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Christiane Brandwein, Steven R. Talbot, Heidrun Potschka, Peter Gass.

Visualization: Laura Becker.

Writing – original draft: Laura Becker.

Writing – review & editing: Anne S. Mallien, Natascha Pfeiffer, Christiane Brandwein, Steven R. Talbot, André Bleich, Rupert Palme, Heidrun Potschka, Peter Gass.

References

1. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977; 266(5604):730–2. <https://doi.org/10.1038/266730a0> PMID: 559941
2. Hawkins J, Hicks RA, Phillips N, Moore JD. Swimming rats and human depression. *Nature*. 1978; 274(5670):512–3. <https://doi.org/10.1038/274512a0> PMID: 672980
3. Willner P, Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol*. 2002; 13(3):169–88. <https://doi.org/10.1097/00008877-200205000-00001> PMID: 12122308
4. Molendijk ML, de Kloet ER. Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*. 2015; 62:389–91. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028> PMID: 26386543
5. Molendijk ML, de Kloet ER. Coping with the forced swim stressor: Current state-of-the-art. *Behav Brain Res*. 2019; 364:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.02.005> PMID: 30738104
6. Molendijk ML, de Kloet ER. Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration. *Eur J Neurosci*. 2022; 55(9–10):2813–31. <https://doi.org/10.1111/ejn.15139> PMID: 33548153
7. Harro J. Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res*. 2019; 377(1):5–20. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2973-0> PMID: 30560458
8. Kara NZ, Stukalin Y, Einat H. Revisiting the validity of the mouse forced swim test: Systematic review and meta-analysis of the effects of prototypic antidepressants. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018; 84:1–11. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.11.003> PMID: 29128579

9. Castagné V, Porsolt RD, Moser P. Early behavioral screening for antidepressants and anxiolytics. *Drug Development Research*. 2006; 67(9):729–42.
10. Borsini F, Lecci A, Stasi MA, Pessia M, Meli A. Seasonal and circadian variations of behavioural response to antidepressants in the forced swimming test in rats. *Behav Pharmacol*. 1990; 1(5):395–401. PMID: 11175424
11. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology (Berl)*. 1988; 94(2):147–60. <https://doi.org/10.1007/BF00176837> PMID: 3127840
12. Turner EH. Publication bias, with a focus on psychiatry: causes and solutions. *CNS Drugs*. 2013; 27(6):457–68. <https://doi.org/10.1007/s40263-013-0067-9> PMID: 23696308
13. Bruckner T, Wieschowski S, Heider M, Deutsch S, Drude N, Tolch U, et al. Measurement challenges and causes of incomplete results reporting of biomedical animal studies: Results from an interview study. *PLoS One*. 2022; 17(8):e0271976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271976> PMID: 35960759
14. Reardon S. Depression researchers rethink popular mouse swim tests. *Nature*. 2019; 571(7766):456–7. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-02133-2> PMID: 31337906
15. PETA. Experimenters Trap Small Animals in Beakers of Water Until They Stop Swimming, Retrieved April 4, 2023, from: <https://www.peta.org.uk/features/experimenters-trap-small-animals-in-beakers-of-water-until-they-stop-swimming/> 2023 [Available from: <https://www.peta.org.uk/features/experimenters-trap-small-animals-in-beakers-of-water-until-they-stop-swimming/>].
16. Pinter O, Domokos A, Mergl Z, Mikics E, Zelena D. Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test? *Endocr J*. 2011; 58(5):395–407. <https://doi.org/10.1507/endocrj.k10e-375> PMID: 21505269
17. LASA, Research UA, Psychopharmacology Bf. Factsheet on the forced swim test 2020 [Available from: <https://www.lasa.co.uk/the-forced-swim-test/>].
18. Sewell F, Waterson I, Jones D, Tricklebank MD, Ragan I. Preclinical screening for antidepressant activity—shifting focus away from the Forced Swim Test to the use of translational biomarkers. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2021; 125:105002. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105002> PMID: 34245825
19. Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*. 2012; 7(6):1009–14. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044> PMID: 22555240
20. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol*. 2020; 177(16):3617–24. <https://doi.org/10.1111/bph.15193> PMID: 32662519
21. Lepschy M, Touma C, Hruby R, Palme R. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. *Lab Anim*. 2007; 41(3):372–87. <https://doi.org/10.1258/002367707781282730> PMID: 17640465
22. Mallien AS, Becker L, Pfeiffer N, Terraneo F, Hahn M, Middelman A, et al. Dopamine Transporter Knockout Rats Show Impaired Wellbeing in a Multimodal Severity Assessment Approach. *Front Behav Neurosci*. 2022;16.
23. Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc*. 2006; 1(1):118–21. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19> PMID: 17406222
24. Begni V, Sanson A, Pfeiffer N, Brandwein C, Inta D, Talbot SR, et al. Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. *PLoS One*. 2020; 15(10):e0240439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240439> PMID: 33108362
25. Riedesel AK, Bach-Hagemann A, Abdulkaki A, Talbot SR, Tolba R, Schwabe K, et al. Burrowing behaviour of rats: Strain differences and applicability as well-being parameter after intracranial surgery. *Lab Anim*. 2022; 56(4):356–69. <https://doi.org/10.1177/00236772211072977> PMID: 35144494
26. Moller C, Wolf F, van Dijk RM, Di Liberto V, Russmann V, Keck M, et al. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia*. 2018; 59(4):765–77. <https://doi.org/10.1111/epi.14028> PMID: 29479675
27. Schwabe K, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Hager C, et al. Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Lab Anim*. 2020; 54(1):17–25. <https://doi.org/10.1177/0023677219862004> PMID: 31333052
28. Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Spanagel R, Gass P. Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice. *Behav Brain Res*. 2005; 164(1):100–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.003> PMID: 16046006
29. Klein S, Bankstahl JP, Loscher W, Bankstahl M. Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2015; 263:263–71. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.004> PMID: 25220610

30. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2022.
31. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*. 2015; 67(1):1–48.
32. Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB. lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models. *Journal of Statistical Software*. 2017; 82(13):1–26.
33. Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods*. 2009; 41(4):1149–60. <https://doi.org/10.3758/BRM.41.4.1149> PMID: 19897823
34. Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. 2016.
35. Whittaker AL, Lymn KA, Nicholson A, Howarth GS. The assessment of general well-being using spontaneous burrowing behaviour in a short-term model of chemotherapy-induced mucositis in the rat. *Lab Anim*. 2015; 49(1):30–9. <https://doi.org/10.1177/0023677214546913> PMID: 25112495
36. Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, et al. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain*. 2012; 16(4):485–95. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2011.07.012> PMID: 22396078
37. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique: Methuen; 1959.
38. Linthorst AC, Flachskamm C, Reul JM. Water temperature determines neurochemical and behavioural responses to forced swim stress: an in vivo microdialysis and biotelemetry study in rats. *Stress*. 2008; 11(2):88–100. <https://doi.org/10.1080/10253890701533231> PMID: 17853068
39. Porsolt RD, Deniel M, Jalfre M. Forced swimming in rats: hypothermia, immobility and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1979; 57(4):431–6. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90507-7](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90507-7) PMID: 258612
40. Dal-Zotto S, Marti O, Armario A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res*. 2000; 114(1–2):175–81. [https://doi.org/10.1016/s0166-4328\(00\)00220-5](https://doi.org/10.1016/s0166-4328(00)00220-5) PMID: 10996058
41. Stone EA. Behavioral and neurochemical effects of acute swim stress are due to hypothermia. *Life Sci*. 1970; 9(15):877–88. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(70\)90050-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(70)90050-0) PMID: 5478395
42. Xu G, Li T, Huang Y. The Effects of Intraoperative Hypothermia on Postoperative Cognitive Function in the Rat Hippocampus and Its Possible Mechanisms. *Brain Sci*. 2022; 12(1). <https://doi.org/10.3390/brainsci12010096> PMID: 35053838
43. Rauch TM, Welch DI, Gallego L. Hypothermia impairs performance in the Morris water maze. *Physiol Behav*. 1989; 46(2):315–20. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90273-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90273-4) PMID: 2602474
44. Sanchis-Olle M, Sanchez-Benito L, Fuentes S, Gagliano H, Belda X, Molina P, et al. Male long-Evans rats: An outbred model of marked hypothalamic-pituitary-adrenal hyperactivity. *Neurobiol Stress*. 2021; 15:100355. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100355> PMID: 34307794
45. Walf AA, Rhodes ME, Frye CA. Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004; 78(3):523–9. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.03.023> PMID: 15251261
46. Nadeau BG, Marchant EG, Amir S, Mistlberger RE. Thermoregulatory significance of immobility in the forced swim test. *Physiol Behav*. 2022; 247:113709. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113709> PMID: 35065081
47. Mogensen J, Pedersen TK, Holm S. Effects of chronic imipramine on exploration, locomotion, and food/water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1994; 47(3):427–35. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90139-2) PMID: 8208760
48. Kopittke L, Gomez R, Barros HM. Opposite effects of antidepressants on unstimulated and stimulated salivary flow. *Arch Oral Biol*. 2005; 50(1):17–21. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.08.006> PMID: 15598413
49. Nelissen E, van Goethem NP, Bonassoli VT, Heckman PRA, van Hagen BTJ, Suay D, et al. Validation of the xylazine/ketamine anesthesia test as a predictor of the emetic potential of pharmacological compounds in rats. *Neurosci Lett*. 2019; 699:41–6. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.026> PMID: 30659913
50. Verma P, Hellemans KG, Choi FY, Yu W, Weinberg J. Circadian phase and sex effects on depressive/anxiety-like behaviors and HPA axis responses to acute stress. *Physiol Behav*. 2010; 99(3):276–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.11.002> PMID: 19932127
51. Kelliher P, Kelly JP, Leonard BE, Sanchez C. Effects of acute and chronic administration of selective monoamine re-uptake inhibitors in the rat forced swim test. *Psychoneuroendocrinology*. 2003; 28(3):332–47. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(02\)00026-4](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(02)00026-4) PMID: 12573300

52. Drossopoulou G, Antoniou K, Kitraki E, Papathanasiou G, Papalexi E, Dalla C, et al. Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience*. 2004; 126(4):849–57. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.04.044> PMID: 15207320
53. Nguyen ET, Caldwell JL, Streicher J, Ghisays V, Balmer NJ, Estrada CM, et al. Differential effects of imipramine and CORT118335 (Glucocorticoid receptor modulator/mineralocorticoid receptor antagonist) on brain-endocrine stress responses and depression-like behavior in female rats. *Behav Brain Res*. 2018; 336:99–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.08.045> PMID: 28866130
54. Rittenhouse PA, Lopez-Rubalcava C, Stanwood GD, Lucki I. Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology*. 2002; 27(3):303–18. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(01\)00052-x](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00052-x) PMID: 11818168
55. Victoria NC, Murphy AZ. The long-term impact of early life pain on adult responses to anxiety and stress: Historical perspectives and empirical evidence. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 2(Pt 2):261–73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.017> PMID: 26210872
56. Cotella EM, Morano RL, Wulsing AC, Martelle SM, Lemen P, Fitzgerald M, et al. Lasting Impact of Chronic Adolescent Stress and Glucocorticoid Receptor Selective Modulation in Male and Female Rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2020; 112:104490. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.104490> PMID: 31786480
57. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav*. 2019; 199:229–43. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021> PMID: 30468744
58. Oosterhof CA, El Mansari M, Merali Z, Blier P. Altered monoamine system activities after prenatal and adult stress: A role for stress resilience? *Brain Res*. 2016; 1642:409–18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.032> PMID: 27086968
59. Scarola SJ, Perdomo Trejo JR, Granger ME, Gerecke KM, Bardi M. Immunomodulatory Effects of Stress and Environmental Enrichment in Long-Evans Rats (*Rattus norvegicus*). *Comp Med*. 2019; 69(1):35–47. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000025> PMID: 30728094
60. Ahlersova E, Ahlers I, Smajda B. Influence of light regimen and time of year on circadian oscillations of insulin and corticosterone in rats. *Physiol Res*. 1992; 41(4):307–14. PMID: 1286098
61. Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev*. 1992; 16(4):525–34. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80194-0](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80194-0) PMID: 1480349
62. Pan Y, Lin W, Wang W, Qi X, Wang D, Tang M. The effects of central pro-and anti-inflammatory immune challenges on depressive-like behavior induced by chronic forced swim stress in rats. *Behav Brain Res*. 2013; 247:232–40. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.031> PMID: 23542087
63. Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, Morland R, Andrews N, Baastrup C, et al. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain*. 2016; 157(10):2350–65.
64. Armario A, Gavalda A, Marti J. Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*. 1995; 20(8):879–90. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00018-6](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00018-6) PMID: 8834094
65. Reiber M, Koska I, Pace C, Schonhoff K, von Schumann L, Palme R, et al. Development of behavioral patterns in young C57BL/6J mice: a home cage-based study. *Sci Rep*. 2022; 12(1):2550. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06395-1> PMID: 35169182
66. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci*. 2002; 5(11):1101–2. <https://doi.org/10.1038/nn1102-1101> PMID: 12403996
67. Jirkof P, Abdelrahman A, Bleich A, Durst M, Keubler L, Potschka H, et al. A safe bet? Inter-laboratory variability in behaviour-based severity assessment. *Lab Anim*. 2020; 54(1):73–82. <https://doi.org/10.1177/0023677219881481> PMID: 31696771
68. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, et al. Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*. 2006; 163(11):1905–17. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.1905> PMID: 17074942
69. Homborg JR, Adan RAH, Alenina N, Asiminas A, Bader M, Beckers T, et al. The continued need for animals to advance brain research. *Neuron*. 2021; 109(15):2374–9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.015> PMID: 34352213
70. Talbot SR, Struve B, Wassermann L, Heider M, Weegh N, Knape T, et al. RELSA-A multidimensional procedure for the comparative assessment of well-being and the quantitative determination of severity in experimental procedures. *Front Vet Sci*. 2022; 9:937711. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.937711> PMID: 36439346

VI. Übergreifende Diskussion

Weitere Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Psychiatrie ist notwendig, da viele Zusammenhänge in der Entstehung der Major Depression bislang nicht verstanden werden (Homberg et al., 2021). Zudem erreichen sehr viele Patienten bis heute keine Remission nach der Therapie mit Antidepressiva (Pigott et al., 2023). Der *Forced Swim Test* ist ein tierexperimentelles Verfahren, das bereits seit über 40 Jahren verwendet wird, um Substanzen auf ihre antidepressive Wirkung zu untersuchen (Slattery & Cryan, 2012).

Für die ethische Rechtfertigung von Tierversuchen muss im Rahmen einer Schaden-Nutzen-Analyse der wissenschaftliche Erkenntnisgewinn den entstehenden Schaden an den Tieren überwiegen. Dies impliziert, dass Tierexperimente stets von hoher wissenschaftlicher Qualität sein sollten, um einen maximalen Erkenntnisgewinn anzustreben. Auf die Depressionsforschung lässt sich dies übertragen, indem man die Möglichkeiten und Limitationen von Tiermodellen berücksichtigt. So wird beispielsweise zwischen Modellen und Tests unterschieden. Während die Ersteren zum Beispiel durch chronischen Stress beim Tier einzelne Symptome affektiver Störungen induzieren sollen, sind Tests mit einer pharmakologischen Validierung nur für das Screening neuer möglicher Antidepressiva geeignet, aber nicht um depressives Verhalten in Tieren hervorzurufen (Hales et al., 2014). Der FST ist ein Beispiel für einen pharmakologischen Test, bei dem eine Verhaltensänderung (kürzere Immobilität) durch die Gabe von Antidepressiva induziert wird (Slattery & Cryan, 2012). Auch die pharmakologische Validität wird von manchen Autoren kritisch betrachtet, da vor allem die Wirkstoffklasse der monoaminergen Antidepressiva in diesem Test historisch intensiv untersucht und positive Ergebnisse aufzeigt, während der Test bislang zu keinen neuen klinischen Ansätzen geführt hat (Gyles et al., 2023).

Auf der Schadenseite der Güterabwägung wird bei vielen psychiatrischen Modellen oder Tests von einer hohen Belastung für das Tier ausgegangen, obwohl die meisten der Modelle diesbezüglich bislang nicht systematisch untersucht wurden (Mallien et al., 2020). In Anhang VIII der europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ist lediglich festgelegt, dass erzwungenes Schwimmen bis zur Erschöpfung des Tieres als schwer belastender Tierversuch einzuschätzen ist (Directive 2010/63/EU). In der Schweiz zum Beispiel

wird der FST mit dem höchsten Schweregrad 3 als hochgradig belastender Verhaltensversuch eingestuft, während ein kürzlich erschienener Bericht über den FST vom „*Animals in Science Committee*“ im Vereinigten Königreich anhand von Tierversuchsanträgen den Schweregrad des FST nicht abschließend klassifizieren konnte (Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen, 2018; The Animals in Science Committee, 2023). Die Gründe für die hohe Belastungseinschätzung sind oftmals nicht bekannt, aber eine mögliche Ursache könnte in der anthropomorphen Interpretation des gezeigten Verhalten liegen. Beim FST wurde die gezeigte Immobilität des Tieres lange als Verzweiflungsverhalten („*behavioral despair*“) interpretiert (Porsolt et al., 1977). Diese Deutung führt bis heute zu einer medialen Brisanz und Kampagnen von Tierrechtsorganisationen gegen den FST (Munro, 2023). In der neurowissenschaftlichen Forschung hat sich die Nutzung des FST lange einer wachsenden Beliebtheit erfreut, und auch in den letzten Jahren wurden weltweit jährlich ca. 600 Publikationen, in denen der FST als Methode verwendet wurde, veröffentlicht (Molendijk & de Kloet, 2022). Aufgrund der sehr häufigen Verwendung war das Ziel dieser Studie, eine umfassende und objektive Belastungseinschätzung des FST zu erstellen, da eine solche bislang nicht vorlag (Sewell et al., 2021).

Spezies-spezifische Besonderheiten sollten bei der Wahl der Versuche stets berücksichtigt werden: So geht man bei Ratten prinzipiell von einer Affinität gegenüber Wasser und Schwimmen aus, während dies bei Mäusen nicht zutrifft (Olsson et al., 2003). Eine Untersuchung konnte allerdings zeigen, dass die häufig verwendeten Laborrattenstämme Wistar, Sprague-Dawley und Brown Norway ein weniger ausgeprägtes spontanes Schwimmverhalten aufweisen als wilde Ratten (Stryjek et al., 2012). Eine weitere Studie deutete ebenfalls auf die Aversität des FST hin. Nachdem Ratten über vier Tage täglich 20 min in einer dem FST-ähnlichen Apparatur in einer Saccharin-Lösung schwammen, entwickelten sie im Vergleich zu den Kontrollgruppen keine Präferenz bei der Präsentation einer Saccharin-Lösung (Nakajima, 2015).

Bei der Planung des Versuchsdesigns sollte darauf geachtet werden, dass sich die Parameter zur Belastungseinschätzung nicht gegenseitig beeinflussen (Hawkins et al., 2011; Keubler et al., 2020). Im Rahmen der DFG-Forschergruppe 2591 werden mehrere Parameter auf ihre Eignung zur Belastungseinschätzung in verschiedenen Modellen untersucht (Keubler et al., 2020). Bei vielen der Parameter kann man davon ausgehen, dass sie für die Tiere keine zusätzliche Belastung

darstellen, da sie in den Heimkäfig integriert sind. Dazu gehören zum Beispiel der Saccharin-Präferenz-Test und die Messung der Wasser- sowie Futteraufnahme. Auch Kotproben zur späteren Analyse der fäkalen Kortikosteronmetaboliten können im Rahmen eines Käfigwechsels entnommen werden, ohne das Tier dabei zu stören. Für die Ermittlung des Lokomotionsverhalten im Open-Field oder des Wühlverhaltens hingegen, ist es notwendig die Tiere aus dem Heimkäfig zu entnehmen und in eine Versuchsanordnung zu setzen. Dies verändert das Tierverhalten über mehrere Stunden danach und kann parallel laufende Kortikosteronmessungen beeinflussen (Wassermann et al., 2020). Um eine Beeinflussung der Parameter untereinander möglichst zu verhindern, wurden die untersuchten Parameter in der Belastungsbeurteilung des FST auf drei separate Experimente aufgeteilt. Die Parameter sollten gleichzeitig ein möglichst breites Spektrum an Belastungen anzeigen können und so wurde das spezies-spezifische Verhalten, physiologische Werte sowie das Verhalten in klassischen Tests wie dem Open-Field Test und der Saccharinpräferenz zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Überraschenderweise haben nur sehr wenige der untersuchten Parameter einen Effekt des in dieser Studie verwendeten FST-Protokolls aufgezeigt. In allen Behandlungsgruppen, in denen der FST durchgeführt wurde, trat während des Schwimmens eine signifikante Hypothermie der Ratten auf. In der Gruppe, die zusätzlich zum FST mit Imipramin behandelt wurde, ist eine signifikante kurzzeitige Abnahme des Körpergewichts, eine Reduktion der Futteraufnahme sowie in den männlichen Ratten eine transiente Erhöhung der fäkalen Kortikosteronmetaboliten aufgefallen.

Die durch den FST verursachte Hypothermie scheint den stärksten Effekt auf das Rattenwohl zu haben. Bei einer Unterkühlung auf ca. 29 °C handelt es sich um eine mäßige Hypothermie (Ruys, 2017). Durch wiederholte Messungen der rektalen Temperatur konnten wir feststellen, dass sich die Ratten bereits innerhalb von 60 min wieder erholt hatten und eine physiologische Körpertemperatur aufwiesen. Überraschenderweise war die Erholungszeit deutlich kürzer als die in der Literatur empfohlene Aufwärmrate von 0,5 bis 2 °C pro Stunde (Ruys, 2017). Dies liegt vermutlich daran, dass in der veterinärmedizinischen Literatur meist die Behandlung von akuten Notfallpatienten oder das Anästhesiemanagement thematisiert wird. Dabei weisen die Patienten in der Regel entweder ein stark vermindertes Allgemeinverhalten auf oder sind anästhesiert und besitzen so eine gestörte Thermoregulation. Bei Nagetieren gibt es zudem die Besonderheit, dass sie im Gegensatz zum Menschen auch im adulten Stadium noch über braunes Fettgewebe

verfügen, dass zur Thermogenese beitragen kann (DuBose et al., 2007). Dadurch, dass die Ratten während des gesamten Ablaufs des FST bei vollem Bewusstsein waren, konnten auch noch andere thermoregulatorische Maßnahmen wirken, wie zum Beispiel das Kältezittern und Vasokonstriktion, die bei einer Anästhesie oftmals nicht stattfinden (DuBose et al., 2007).

Eine Hypothermie hat viele Auswirkungen auf grundlegende Funktionen des Körpers und führt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit zu einem Unwohlsein der Tiere. Ein besonders wichtiger Aspekt scheint die Veränderung des pharmakokinetischen Profils vieler Medikamente zu sein, da der FST in der Regel mit der Gabe von Pharmaka assoziiert ist und die Plasmahalbwertszeit durch die Unterkühlung deutlich verlängert sein kann (Tortorici et al., 2007).

Eine Studie konnte zeigen, dass eine perioperative Hypothermie im Vergleich zur normothermen Operationsgruppe zu erhöhten Scores bei der Bewertung des Schmerzgesichts führt (Klune et al., 2020). In der neurowissenschaftlichen und psychiatrischen Forschung ist es auch wichtig zu beachten, dass ab einem gewissen Grad der Unterkühlung auch kognitive Funktionen beeinträchtigt sein können. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Performance von Ratten im Morris Water Maze, einem Test zur Ermittlung des räumlichen Lernens, bei einer vorliegenden Hypothermie schlechter als in einem normothermen Zustand war (Rauch et al., 1989). Eine andere Studie konnte anhaltende Effekte nach einer perioperativen Hypothermie auf das räumliche Lernvermögen im Vergleich zu einer während der Operation normotherm gehaltenen Gruppe aufzeigen (Xu et al., 2022).

In der Behandlungsgruppe, die zusätzlich zum FST zweimal intraperitoneal mit Imipramin behandelt wurde, ist eine reduzierte Futteraufnahme an den Tagen der Behandlung sowie eine geringgradige und kurzfristige Reduktion des Körpergewichts aufgefallen. Aus einer früheren Studie geht hervor, dass Ratten nach der Behandlung von Imipramin weniger Futter aufnehmen und weniger an Gewicht zunehmen als die Tiere der Kontrollgruppe (Mogensen et al., 1994). Auch beim Menschen sind Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Appetitlosigkeit und das Gefühl von einem trockenen Mund, bei der Behandlung mit Imipramin beschrieben. Weiterhin ist bei den mit Imipramin behandelten männlichen Ratten aufgefallen, dass sie signifikant erhöhte Konzentrationen an fäkalen Kortikosteronmetaboliten aufwiesen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass durch die geringere Futteraufnahme und durch die Ausscheidung von weniger Kot, die FCM

sich in dem vorhandenen Kot konzentrieren könnten. Dies setzt jedoch voraus, dass der Gallenfluss in allen Versuchsgruppen und bei einer unterschiedlichen Futtermenge konstant sein müsste, da die Kortikosteronmetaboliten über die Galle in den Darm gelangen (Vogt et al., 2023). Eine weitere mögliche Begründung für eine Erhöhung der FCM liegt in den vielen bereits erwähnten Einflüssen auf den Stoffwechsel: So werden sowohl Imipramin als auch Kortikosteroide über das Cytochrom-P450-Enzymsystem verstoffwechselt. Da eine Hypothermie die Aktivität genau dieses Enzymsystems reduziert, könnte es somit möglicherweise zu Interaktionen gekommen sein, die schließlich zu einer länger anhaltenden Erhöhung der FCM-Konzentration geführt haben. Imipramin könnte auch durch zentrale Effekte einen Einfluss auf die HPA-Achse und somit auf die FCM-Konzentration haben. Eine Humanstudie konnte jedoch einen gegenteiligen Effekt zeigen. In dieser Studie führte eine CRH-Stimulation nach einer langfristigen (sechs Wochen) Einnahme von Imipramin zu verringerten ACTH- und Kortisol-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Michelson et al., 1997).

Die weiteren Parameter zur Belastungseinschätzung haben keine Abweichungen in den FST-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gezeigt. Dies bedeutet entweder, dass der FST neben der Hypothermie keine Belastung verursacht oder dass die verwendeten Parameter nicht sensitiv genug waren. Eine kürzlich durchgeführte Umfrage unter wissenschaftlichem Personal konnte zeigen, dass die Zustände „keine Belastung“ und „schwere Belastung“ sehr gut unterschieden werden können und dass es dagegen sehr schwierig ist, „geringe“ oder „mittlere“ Belastungszustände am Tier einzuschätzen (Krueger et al., 2023). Folglich sind für das Belastungsspektrum dazwischen sensitivere Methoden notwendig. Ratten sind Beutetiere und versuchen Anzeichen von Schwäche, wie z.B. Schmerzverhalten, vor allem in Anwesenheit von potentiellen Bedrohungen versteckt zu halten (Turner et al., 2019). Im Folgenden soll auf die einzelnen Parameter und ihre Limitationen, besonders in Hinblick dieser Belastungseinschätzung, eingegangen werden.

Das Wühlverhalten scheint zwischen den Tieren, aber auch tierindividuell an verschiedenen Tagen, stark zu variieren. In unserer Belastungseinschätzung ist aufgefallen, dass die Weibchen das beste Wühlverhalten am ersten Tag der Baseline aufgezeigt haben und dass die Wühlleistung im Anschluss starken Schwankungen, vor allem auch an den Tagen des FST, unterlegen war.

Bereits während der Baseline-Messungen haben die Tiere weniger als 60 % des Kiesel aus den Röhren entfernt. Eine Studie konnte inzwischen belegen, dass Wistar-Ratten kein besonders ausgeprägtes Wühlverhalten zeigen (Riedesel et al., 2022). Ein möglicher Ansatz zur Verbesserung des Tests könnte darin liegen die Tiere während ihrer aktiven Phase, d.h. in der Nacht, zu testen (Lau et al., 2013). Ein weiterer Aspekt, der bislang in Ratten noch nicht untersucht wurde, ist, ob sich das Wühlverhalten der Ratten während ihrer Entwicklung verändert und ob es besonders geeignete sowie ungeeignete Zeitpunkte gibt, dieses Verhalten zu testen. Eine Studie in Mäusen konnte zeigen, dass das Wühlverhalten der Tiere in einem jungen Stadium weniger stark ausgeprägt ist, als im adulten Stadium (Reiber et al., 2022).

Die Futteraufnahme war lediglich bei den Tieren, die mit Imipramin behandelt wurden, verringert und nicht bei den anderen FST-Gruppen. Der FST und die Behandlung von Imipramin hatte in unserem Versuch keinen Effekt auf den Open-Field-Test, der zwei Tage später durchgeführt wurde. Daraus lässt sich schließen, dass der FST keine langfristige Auswirkung auf das Lokomotionsverhalten hat, aber eine unmittelbar nach dem FST oder der Imipramin-Applikation auftretende Veränderung des Lokomotionsverhaltens kann mit unserem Versuchsdesign nicht ausgeschlossen werden. Einer Studie zufolge wird das Bewegungsverhalten durch Imipramin nicht verändert (Mogensen et al., 1994). Umfangreiche Analysen der Basislokomotion über einen längeren Zeitraum wären über dauerhafte Heimkäfig-Beobachtungen möglich und hätten zusätzlich den Vorteil, dass die Tiere nicht in eine separate Apparatur gesetzt werden müssen und könnten somit auch zum Refinement beitragen (Kahnau et al., 2023).

Bei der Durchführung des LINT ist die Haltungsform der Tiere zu beachten. Da der Test mit einem Käfigwechsel einhergeht und die Tiere in unserer Studie paarweise gehalten wurden, zeigten die Tiere nach dem Umsetzen zunächst Rangordnungsverhalten und kein initiales Interesse an dem hinzugefügten Nestmaterial. Die Auswertung des Tests hat keine Belastung der Tiere durch das verwendete FST-Protokoll aufgezeigt.

Gemäß der nationalen Tierschutzgesetzgebung sollen Tierversuche im Einklang mit den 3R stetig verbessert werden. Dies ist oftmals erst dann möglich, wenn vorher die Belastung der Tiere objektiv festgestellt wurde und man abschätzen kann welche Aspekte des Tierversuchs eine Verbesserung benötigen. Für eine zuverlässige Belastungseinschätzung werden sensitive

Parameter benötigt, da besonders leichte Belastungen der Tiere schwierig zu erfassen sind (Erhard, 2005; Krueger et al., 2023). Eine multimodale Herangehensweise ist stets zu empfehlen, da davon auszugehen ist, dass verschiedene Modelle unterschiedliche Dimensionen der Belastung aufweisen und es nicht den einen Parameter gibt, der die Belastung eines Versuchs sicher abbilden kann (Keubler et al., 2020). Vielmehr scheint auch die Art des Modells einen großen Effekt auf die Belastungsparameter zu haben, so dass die Belastungseinschätzungen individuell vorgenommen werden sollten. Bei der Kombination von mehreren Parametern sollte in dem Versuchsdesign eine potentielle Beeinflussung der Parameter untereinander bedacht werden (Keubler et al., 2020).

Eine Limitation dieser Studie liegt darin, dass nur bei weiblichen Ratten die Temperatur gemessen wurde. Mögliche Refinement-Optionen zur Reduktion der Hypothermie könnten auf Testseite eine Verkürzung der Testdauer sein sowie die Nutzung von wärmerem Wasser. Dies setzt jedoch voraus, dass die prädiktive Validität erhalten bleibt und sich das Verhalten der Tiere im FST auch unter diesen Bedingungen nach der Gabe von Antidepressiva verändert. Zu den Maßnahmen, die auf jeden Fall ergriffen werden sollten, gehören das sorgfältige Abtrocknen der Tiere und das Aufwärmen mithilfe von Rotlicht, um der Hypothermie auf schnellstem Wege entgegenzuwirken. Auf der Haltungsseite bietet sich die Verwendung von Nistmaterial an, da dies die Wärmeleitung und Wärmestrahlung reduzieren kann. Die Haltung der Ratten in Pärchen und Gruppen ermöglicht den Körperkontakt zu Artgenossen und kann ebenfalls positiv zum schnelleren Aufwärmen der Tiere beitragen. Eine weitere Limitation liegt darin, dass aufgrund der Personalstärke nicht zu allen Testzeitpunkten eine Verblindung stattfinden konnte. Beispielsweise wurde der FST von den gleichen Mitarbeitern durchgeführt wie die Tests zur Erfassung des Belastungszustandes. Dies könnte zu einer ungewollten Voreingenommenheit (*risk of bias*) während der Versuchsdurchführung geführt haben (Bello et al., 2014).

Das hier untersuchte Schwimmprotokoll wird sehr häufig verwendet (Brandwein et al., 2023). Eine Untersuchung sämtlicher FST-Protokolle in der Ratte konnte zeigen, dass sehr viele verschiedene Pharmaka getestet werden, die wiederum einen großen Einfluss auf das Wohlbefinden der Tiere haben könnten (Brandwein et al., 2023). Medikamente, die dämpfend auf das ZNS wirken, können je nach Dosierung die Schwimmfähigkeit der Tiere beeinträchtigen

und können gegebenenfalls die Hypothermie verstärken und sollten daher vorsichtig dosiert und verwendet werden. Eine weitere Voraussetzung, die vielleicht selbstverständlich klingen mag, ist stets die Verwendung gesunder Tiere.

Die Daten könnten darauf hindeuten, dass beim FST die Belastung durch die Hypothermie im Vordergrund steht, da sonst keiner der getesteten Parameter durch den FST verändert war. Es konnte gezeigt werden, dass die zusätzliche Applikation von Pharmaka ebenfalls vor allem physiologische Effekte (bzw. Nebenwirkungen) auslösen kann, die durch die Belastungsparameter auch erfasst wurden. Eine sorgfältige Mitberücksichtigung der Effekte durch die verwendeten Substanzen in der Gesamtklassifikation des Versuchs ist daher absolut anzustreben.

Um auszuschließen, dass die Tiere doch stärkere Belastungen erleiden, die anhand der bisher verwendeten Parameter nicht detektiert werden konnten, sollen in zukünftigen Studien gegebenenfalls sensitivere Parameter mittels telemetrischer Untersuchungen (Herzratenvariabilität, circadiane Rhythmik und Aktivität) untersucht werden. Dies würde auch den Vergleich mehrerer Modelle verschiedener Disziplinen in einem quantitativen Ansatz zur Einschätzung der relativen Belastung ermöglichen (Talbot et al., 2022). Auch die Untersuchung der sozialen Interaktionen nach dem FST-Stress könnte weitere Hinweise auf eine Belastung geben. Idealerweise könnte diese in einem automatisierten Heimkäfig durchgeführt werden. Eine vergleichende Untersuchung der Belastung in Mäusen wäre ebenfalls aufschlussreich, da der FST auch in Mäusen sehr häufig verwendet wird. Die Hypothermie könnte in Mäusen aufgrund der größeren Körperoberfläche deutlich ausgeprägter als in Ratten sein. Auf diese Weise könnte eine evidenz-basierte Empfehlung zur Nutzung des FST bei gleichzeitiger Berücksichtigung des Tierwohls entwickelt werden.

VII. Zusammenfassung

Der *Forced Swim Test* ist ein seit über 40 Jahren eingesetzter Test zur Bestimmung der antidepressiven Wirkung von Substanzen. Weltweit konnte bis vor einigen Jahren ein zunehmender Anstieg veröffentlichter Studien, die den FST verwendet haben, verzeichnet werden. Der FST basiert auf der Analyse des Schwimmverhaltens in einer unausweichbaren Situation. Durch Gabe von Antidepressiva kommt es während des Testverlaufs zu einer Verhaltensänderung. Aufgrund der limitierten Therapieoptionen für Patienten mit einer depressiven Störung und der häufigen Rückfallraten sind Verfahren, die zur Entwicklung neuer Therapeutika führen können, von hoher Relevanz. In den vergangenen Jahren sind Diskussionen aufgekommen, die eine starke Belastung und Gefährdung der Tiere in dem Test vermuten. Dies könnte eine mögliche Folge auf die frühere Bezeichnung des passiven Verhaltens als „Verzweiflungsverhalten“ sein.

Im europäischen Raum erfordert die Richtlinie 2010/63/EU eine Klassifikation der Belastung der Tiere im Versuch bereits bei der Antragstellung. Für den *Forced Swim Test* lag bis zum aktuellen Zeitpunkt keine evidenz-basierte Belastungseinschätzung vor. Um diese Lücke zu schließen, wurde für die Belastungseinschätzung von Ratten ein multimodaler Ansatz bestehend aus speziesspezifischen (Wühlverhalten, Nest Score, Nestbauverhalten), verhaltensbiologischen (Explorationsverhalten, Saccharinpräferenz), biochemischen (fäkale Kortikosteronmetaboliten) und physiologischen Parametern (innere Körpertemperatur, Körpergewicht, Körpergewichtsveränderung, Futter- und Wasseraufnahme) gewählt, um so viele Dimensionen einer potentiellen Belastung wie möglich aufzeigen zu können.

Die Belastungsparameter wurden in drei separaten Versuchsansätzen untersucht. Die vier bzw. fünf Vergleichsgruppen bestanden aus einer FST-Gruppe, einer FST + Imipramin-Gruppe, einer FST + Kochsalzlösung-Gruppe, einer Handling-Gruppe sowie bei der Bestimmung der FCM zusätzlich einer Gruppe zur Kontrolle der circadianen Variation. Bei dem untersuchten Schwimmprotokoll handelt es sich um ein sehr gängiges, zweitägiges Protokoll für die Spezies Ratte. Die Tiere wurden am ersten Tag 15 min und am zweiten Tag fünf Minuten in 25 °C temperierten Wasser getestet.

Im ersten Versuch wurden die fäkalen Kortikosteronkonzentrationen ermittelt (n=18 pro Gruppe und Geschlecht). Im zweiten Versuchsansatz wurde das Wühlverhalten der Ratten sowie die rektale Körpertemperatur unmittelbar nach der Testung untersucht (n=12 pro Gruppe und Geschlecht). Der letzte Versuchsansatz umfasste die Parameter Saccharinpräferenz, Latenz bis zur Interaktion mit dem Nestmaterial-Test, den Nest Score sowie die Analyse des Verhaltens im Open Field (n=12 pro Gruppe und Geschlecht). Die Zeit zum Wiedererlangen einer physiologischen Körpertemperatur wurde in einem zusätzlichen Experiment in weiblichen Ratten untersucht (n=5).

Der einzig messbare Effekt des FST auf die Tiere in dieser Studie war eine moderate, aber nur sehr kurz anhaltende Hypothermie. Die Ratten, die zusätzlich zweifach mit Imipramin, einem trizyklischen Antidepressivum, behandelt wurden, wiesen transiente nachteilige Effekte auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme sowie eine Erhöhung von Kortikosteron-Derivaten im Kot auf. Langanhaltende Effekte des FST auf die Belastung der Tiere konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. Die weiteren Parameter zur Belastungseinschätzung haben keine signifikanten Abweichungen in den FST-Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gezeigt. Dies bedeutet entweder, dass der FST neben der Hypothermie keine Belastung verursacht oder dass die verwendeten Parameter nicht sensitiv genug waren. Die Analyse des Wühlverhaltens sowie des Nestbauverhalten erwiesen sich in dieser Studie aufgrund einer starken beobachteten Variabilität als nicht aussagekräftige Parameter.

Eine Verwendung wärmeren Wassers oder eine Verkürzung der Testzeit können mögliche *Refinement*-Optionen für den FST darstellen, müssen aber weiter untersucht werden. Zukünftige detailliertere Untersuchungen zu der akuten Belastung während des und unmittelbar nach dem FST könnten zudem weitere Schlussfolgerungen zu dem Schweregrad des Tests ermöglichen.

VIII. Summary

The Forced Swim Test has been used for over 40 years to determine the antidepressant effect of substances. Until a few years ago, an increasing number of published studies using the FST were recorded worldwide. The FST is based on the analysis of swimming behavior in an inescapable situation. The administration of antidepressants leads to a behavioral change during the course of the test. Due to the limited treatment options for patients suffering from a depressive disorder and the frequent relapse rates, procedures that can lead to the development of new therapeutic agents are highly relevant. In recent years, discussions have arisen that assume that the test is highly stressful and dangerous for the animals. This could be a possible consequence of the earlier designation of passive behavior as "despair behavior".

In Europe, Directive 2010/63/EU requires a severity classification of the experiment already at the time of application. For the Forced Swim Test, no evidence-based stress assessment has been available to date. In order to close this gap, a multimodal approach comprising species-specific (burrowing, nest score, nest building behavior), behavioral (exploratory behavior, saccharin preference), biochemical (fecal corticosterone metabolites) and physiological parameters (inner body temperature, body weight, body weight change, food and water intake) was chosen for the severity assessment of rats in order to be able to identify as many dimensions of possible suffering as possible.

The severity parameters were examined in three separate test approaches. The four resp. five comparison groups consisted of an FST group, an FST + imipramine group, an FST + saline solution group, a handling group and, for analysis of the FCM, an additional group to control for circadian variation. The swimming protocol investigated is a very common, two-day protocol for the rat species. The animals were tested in water at 25 °C for 15 minutes on the first day and five minutes on the second day. In the first experiment, the fecal corticosterone concentrations were determined (n=18 per group and sex). In the second experiment, burrowing behavior and rectal body temperature immediately after testing were examined (n=12 per group and sex). The last experimental approach comprised the parameters saccharin preference, latency until interaction with nest material test, nest score and the analysis of behavior in the open field (n=12 per group

and sex). The time to regain a physiological inner body temperature was investigated in an additional experiment in female rats (n=5).

The only measurable effect of FST on the animals in this study was a moderate but very short-lasting hypothermia. The rats that were additionally treated twice with imipramine, a tricyclic antidepressant, showed transient adverse effects on body weight and food intake as well as an increase in corticosterone derivatives in the feces. Long-lasting effects of the FST on the burden of the animals could not be demonstrated in this study. The other parameters for severity assessment showed no significant differences in the FST groups compared to the control groups. This means either that the FST does not cause stress in addition to hypothermia or that the parameters used were not sensitive enough. The analysis of burrowing behavior and nest-building behavior did not prove to be reliable parameters in this study due to the high variability observed.

Using warmer water or shortening the test time may represent possible refinement options for the FST, but need to be further investigated. In the future, more detailed studies on acute stress during and immediately after the FST could also allow further conclusions to be drawn about the severity classification of the test.

IX. Literaturverzeichnis

- Andermann, M. L., & Lowell, B. B. (2017). Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control. *Neuron*, 95(4), 757-778. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.014>
- Anderzhanova, E., Kirmeier, T., & Wotjak, C. T. (2017). Animal models in psychiatric research: The RDoC system as a new framework for endophenotype-oriented translational neuroscience. *Neurobiol Stress*, 7, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.03.003>
- Armario, A. (2021). The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. *Neurosci Biobehav Rev*, 128, 74-86. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.06.014>
- Aulehner, K., Leenaars, C., Buchecker, V., Stirling, H., Schonhoff, K., King, H., Hager, C., Koska, I., Jirkof, P., Bleich, A., Bankstahl, M., & Potschka, H. (2022). Grimace scale, burrowing, and nest building for the assessment of post-surgical pain in mice and rats-A systematic review. *Front Vet Sci*, 9, 930005. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.930005>
- Autry, A. E., Adachi, M., Nosyreva, E., Na, E. S., Los, M. F., Cheng, P. F., Kavalali, E. T., & Monteggia, L. M. (2011). NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses. *Nature*, 475(7354), 91-95. <https://doi.org/10.1038/nature10130>
- Babineau, B. A., Yang, M., Berman, R. F., & Crawley, J. N. (2013). Low home cage social behaviors in BTBR T+tf/J mice during juvenile development. *Physiology & Behavior*, 114-115, 49-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.03.006>
- Barnett, S. A. (1963). *The rat: A study in behaviour*. Aldine.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). Mental Illness. In M. F. Bear, B. W. Connors, & M. A. Paradiso (Eds.), *Neuroscience Exploring the Brain* (3rd ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

- Beck, A. T., & Alford, B. A. (2009). *Depression: Causes and treatment, 2nd ed.* University of Pennsylvania Press.
- Begni, V., Sanson, A., Pfeiffer, N., Brandwein, C., Inta, D., Talbot, S. R., Riva, M. A., Gass, P., & Mallien, A. S. (2020). Social isolation in rats: Effects on animal welfare and molecular markers for neuroplasticity. *PLOS ONE*, *15*(10), e0240439.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240439>
- Bello, S., Krogsbøll, L. T., Gruber, J., Zhao, Z. J., Fischer, D., & Hróbjartsson, A. (2014). Lack of blinding of outcome assessors in animal model experiments implies risk of observer bias. *J Clin Epidemiol*, *67*(9), 973-983. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2014.04.008>
- Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., Charney, D. S., & Krystal, J. H. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, *47*(4), 351-354. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00230-9](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00230-9)
- Berton, O., McClung, C. A., Dileone, R. J., Krishnan, V., Renthal, W., Russo, S. J., Graham, D., Tsankova, N. M., Bolanos, C. A., Rios, M., Monteggia, L. M., Self, D. W., & Nestler, E. J. (2006). Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, *311*(5762), 864-868. <https://doi.org/10.1126/science.1120972>
- Bland, S. T., Schmid, M. J., Der-Avakian, A., Watkins, L. R., Spencer, R. L., & Maier, S. F. (2005). Expression of c-fos and BDNF mRNA in subregions of the prefrontal cortex of male and female rats after acute uncontrollable stress. *Brain Res*, *1051*(1-2), 90-99.
<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.065>
- Blizard, D. A., Takahashi, A., Galsworthy, M. J., Martin, B., & Koide, T. (2007). Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *J Psychopharmacol*, *21*(2), 136-139. <https://doi.org/10.1177/0269881107074513>
- Boice, R. (1977). Burrows of wild and albino rats: effects of domestication, outdoor raising, age, experience, and maternal state. *J Comp Physiol Psychol*, *91*(3), 649-661.
<https://doi.org/10.1037/h0077338>

- Boland, E. M., Rao, H., Dinges, D. F., Smith, R. V., Goel, N., Detre, J. A., Basner, M., Sheline, Y. I., Thase, M. E., & Gehrman, P. R. (2017). Meta-Analysis of the Antidepressant Effects of Acute Sleep Deprivation. *J Clin Psychiatry, 78*(8), e1020-e1034.
<https://doi.org/10.4088/JCP.16r11332>
- Brandwein, C., Leenaars, C. H. C., Becker, L., Pfeiffer, N., Iorgu, A. M., Hahn, M., Vairani, G. A., Lewejohann, L., Bleich, A., Mallien, A. S., & Gass, P. (2023). A systematic mapping review of the evolution of the rat Forced Swim Test: Protocols and outcome parameters. *Pharmacol Res, 196*, 106917. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106917>
- Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen. (2018). *Fachinformation Tierversuche*. Retrieved 12.11.2023 from
https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/tiere/publikationen-und-forschung/tierversuche/klassifikation-schweregrad-tv.pdf.download.pdf/116104_DE.pdf
- Byers, K. A., Lee, M. J., Patrick, D. M., & Himsworth, C. G. (2019). Rats About Town: A Systematic Review of Rat Movement in Urban Ecosystems [Systematic Review]. *Frontiers in Ecology and Evolution, 7*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00013>
- Castagné, V., Porsolt, R. D., & Moser, P. (2006). Early behavioral screening for antidepressants and anxiolytics. *Drug Dev. Res., 67*, 729-742.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ddr.20145>
- Chen, C., Nakagawa, S., An, Y., Ito, K., Kitaichi, Y., & Kusumi, I. (2017). The exercise-glucocorticoid paradox: How exercise is beneficial to cognition, mood, and the brain while increasing glucocorticoid levels. *Front Neuroendocrinol, 44*, 83-102.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2016.12.001>
- Chourbaji, S., Brandwein, C., & Gass, P. (2011). Altering BDNF expression by genetics and/or environment: Impact for emotional and depression-like behaviour in laboratory mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 35*(3), 599-611.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.003>

- Chuang, J. C., Krishnan, V., Yu, H. G., Mason, B., Cui, H., Wilkinson, M. B., Zigman, J. M., Elmquist, J. K., Nestler, E. J., & Lutter, M. (2010). A beta3-adrenergic-leptin-melanocortin circuit regulates behavioral and metabolic changes induced by chronic stress. *Biol Psychiatry*, *67*(11), 1075-1082. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.003>
- Cipriani, A., Furukawa, T. A., Salanti, G., Chaimani, A., Atkinson, L. Z., Ogawa, Y., Leucht, S., Ruhe, H. G., Turner, E. H., Higgins, J. P. T., Egger, M., Takeshima, N., Hayasaka, Y., Imai, H., Shinohara, K., Tajika, A., Ioannidis, J. P. A., & Geddes, J. R. (2018). Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*, *391*(10128), 1357-1366. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32802-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32802-7)
- Citri, A., & Malenka, R. C. (2008). Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 18-41. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301559>
- Clark, J. A., Jr., Myers, P. H., Goelz, M. F., Thigpen, J. E., & Forsythe, D. B. (1997). Pica behavior associated with buprenorphine administration in the rat. *Lab Anim Sci*, *47*(3), 300-303. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241634>
- Commons, K. G., Cholanians, A. B., Babb, J. A., & Ehlinger, D. G. (2017). The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci*, *8*(5), 955-960. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.7b00042>
- Costa, V., Lugert, S., & Jagasia, R. (2015). Role of adult hippocampal neurogenesis in cognition in physiology and disease: pharmacological targets and biomarkers. *Handb Exp Pharmacol*, *228*, 99-155. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16522-6_4
- Cottam, C. (1948). Aquatic Habits of the Norway Rat. *Journal of Mammalogy*, *29*(3), 299-299. <https://doi.org/10.1093/jmammal/29.3.299>

- Cryan, J. F., Valentino, R. J., & Lucki, I. (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev*, 29(4-5), 547-569. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.008>
- Davis, D. E. (1953). The characteristics of rat populations. *Q Rev Biol*, 28(4), 373-401. <https://doi.org/10.1086/399860>
- de Kloet, E. R., Joels, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6(6), 463-475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
- Deacon, R. M. (2006). Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc*, 1(1), 118-121. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.19>
- Detke, M. J., & Lucki, I. (1995). Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behavioural Brain Research*, 73(1), 43-46. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-4328\(96\)00067-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-4328(96)00067-8)
- DuBose, D. A., Leon, L. R., Morehouse, D. H., Rufolo, D. M., Blaha, M. D., & Gordon, C. J. (2007). Hypothermia induction and recovery in free-ranging rats. *Journal of Thermal Biology*, 32(2), 87-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.10.005>
- Duvarci, S., & Paré, D. (2007). Glucocorticoids enhance the excitability of principal basolateral amygdala neurons. *J Neurosci*, 27(16), 4482-4491. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0680-07.2007>
- Dwivedi, Y., Rizavi, H. S., Roberts, R. C., Conley, R. C., Tamminga, C. A., & Pandey, G. N. (2001). Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem*, 77(3), 916-928. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00300.x>
- Eberspächer-Schweda, E. (2016). Anästhesiezwischenfälle und Komplikationen. In E.-S. E. (Ed.), *AnästhesieSkills* (1st ed.). Schattauer GmbH.

- Erhard, M. (2005). Physiologie und Tierschutz. In W. von Engelhardt (Ed.), *Physiologie der Haustiere* (4th ed., pp. 685-691). Enke Verlag.
- File, S. E., & Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*, *62*(1), 19-24. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1978.tb07001.x>
- File, S. E., Lippa, A. S., Beer, B., & Lippa, M. T. (2004). Animal tests of anxiety. *Curr Protoc Neurosci*, *Chapter 8*, Unit 8 3. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0803s26>
- File, S. E., & Seth, P. (2003). A review of 25 years of the social interaction test. *Eur J Pharmacol*, *463*(1-3), 35-53. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01273-1](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01273-1)
- Fitzgerald, P. J., Barkus, C., Feyder, M., Wiedholz, L. M., Chen, Y.-C., Karlsson, R.-M., Machado-Vieira, R., Graybeal, C., Sharp, T., Zarate, C., Harvey-White, J., Du, J., Sprengel, R., Gass, P., Bannerman, D., & Holmes, A. (2010). Does gene deletion of AMPA GluA1 phenocopy features of schizoaffective disorder? *Neurobiology of Disease*, *40*(3), 608-621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.08.005>
- Gass, P., Vasilescu, A. N., & Inta, D. (2022). [Rapid-acting antidepressants-neurobiological mechanisms of action]. *Nervenarzt*, *93*(3), 223-233. <https://doi.org/10.1007/s00115-021-01225-7> (Schnell wirksame Antidepressiva - neurobiologische Wirkprinzipien.)
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. In *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests*. (pp. 1-20). Humana Press/Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Gyles, T. M., Nestler, E. J., & Parise, E. M. (2023). Advancing preclinical chronic stress models to promote therapeutic discovery for human stress disorders. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-023-01625-0>
- Hales, C. A., Stuart, S. A., Anderson, M. H., & Robinson, E. S. (2014). Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents. *Br J Pharmacol*, *171*(20), 4524-4538. <https://doi.org/10.1111/bph.12603>

- Hardingham, G. E., & Bading, H. (2010). Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci*, *11*(10), 682-696. <https://doi.org/10.1038/nrn2911>
- Harkin, A., Houlihan, D. D., & Kelly, J. P. (2002). Reduction in preference for saccharin by repeated unpredictable stress in mice and its prevention by imipramine. *Journal of Psychopharmacology*, *16*(2), 115-123. <https://doi.org/10.1177/026988110201600201>
- Harro, J. (2019). Animal models of depression: pros and cons. *Cell Tissue Res*, *377*(1), 5-20. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2973-0>
- Hawkins, P., Morton, D. B., Burman, O., Dennison, N., Honess, P., Jennings, M., Lane, S., Middleton, V., Roughan, J. V., Wells, S., Westwood, K., & BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW, U. K. J. W. G. o. R. (2011). A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim*, *45*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1258/la.2010.010031>
- Helgers, S. O. A., Talbot, S. R., Riedesel, A. K., Wassermann, L., Wu, Z., Krauss, J. K., Hager, C., Bleich, A., & Schwabe, K. (2020). Body weight algorithm predicts humane endpoint in an intracranial rat glioma model. *Sci Rep*, *10*(1), 9020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65783-7>
- Henke, J., & Erhardt, W. (2011). Nager. In W. Erhardt, J. Henke, & J. Haberstroh (Eds.), *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier* (2nd ed.). Schattauer GmbH.
- Hickman, D. L., & Swan, M. (2010). Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, *49*(2), 155-159. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353688>
- Hinwood, M., Morandini, J., Day, T. A., & Walker, F. R. (2012). Evidence that microglia mediate the neurobiological effects of chronic psychological stress on the medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, *22*(6), 1442-1454. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr229>

Homberg, J. R., Adan, R. A. H., Alenina, N., Asiminas, A., Bader, M., Beckers, T., Begg, D. P., Blokland, A., Burger, M. E., van Dijk, G., Eisel, U. L. M., Elgersma, Y., Englitz, B., Fernandez-Ruiz, A., Fitzsimons, C. P., van Dam, A. M., Gass, P., Grandjean, J., Havekes, R., Henckens, M., Herden, C., Hut, R. A., Jarrett, W., Jeffrey, K., Jezova, D., Kalsbeek, A., Kamermans, M., Kas, M. J., Kasri, N. N., Kiliaan, A. J., Kolk, S. M., Korosi, A., Korte, S. M., Kozicz, T., Kushner, S. A., Leech, K., Lesch, K. P., Lesscher, H., Lucassen, P. J., Luthi, A., Ma, L., Mallien, A. S., Meerlo, P., Mejias, J. F., Meye, F. J., Mitchell, A. S., Mul, J. D., Olcese, U., Gonzalez, A. O., Olivier, J. D. A., Pasqualetti, M., Pennartz, C. M. A., Popik, P., Prickaerts, J., de la Prida, L. M., Ribeiro, S., Roozendaal, B., Rossato, J. I., Salari, A. A., Schoemaker, R. G., Smit, A. B., Vanderschuren, L., Takeuchi, T., van der Veen, R., Smidt, M. P., Vyazovskiy, V. V., Wiesmann, M., Wierenga, C. J., Williams, B., Willuhn, I., Wöhr, M., Wolvekamp, M., van der Zee, E. A., & Genzel, L. (2021). The continued need for animals to advance brain research. *Neuron*, *109*(15), 2374-2379.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.015>

Insel, T., Cuthbert, B., Garvey, M., Heinssen, R., Pine, D. S., Quinn, K., Sanislow, C., & Wang, P. (2010). Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. *Am J Psychiatry*, *167*(7), 748-751.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09091379>

Kahnau, P., Mieske, P., Wilzopolski, J., Kalliokoski, O., Mandillo, S., Hölter, S. M., Voikar, V., Amfim, A., Badurek, S., Bartelik, A., Caruso, A., Čater, M., Ey, E., Golini, E., Jaap, A., Hrnčić, D., Kiryk, A., Lang, B., Loncarevic-Vasiljkovic, N., Meziane, H., Radzevičienė, A., Rivalan, M., Scattoni, M. L., Torquet, N., Trifkovic, J., Ulfhake, B., Thöne-Reineke, C., Diederich, K., Lewejohann, L., & Hohlbaum, K. (2023). A systematic review of the development and application of home cage monitoring in laboratory mice and rats. *BMC Biology*, *21*(1), 256. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01751-7>

Kalliokoski, O., Teilmann, A. C., Abelson, K. S., & Hau, J. (2015). The distorting effect of varying diets on fecal glucocorticoid measurements as indicators of stress: a cautionary

- demonstration using laboratory mice. *Gen Comp Endocrinol*, 211, 147-153.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.12.008>
- Kendler, K. S., Thornton, L. M., & Gardner, C. O. (2001). Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am J Psychiatry*, 158(4), 582-586. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.4.582>
- Kennedy, S. H. (2008). Core symptoms of major depressive disorder: relevance to diagnosis and treatment. *Dialogues Clin Neurosci*, 10(3), 271-277.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2008.10.3/shkennedy>
- Kennedy, S. H., Lam, R. W., McIntyre, R. S., Tourjman, S. V., Bhat, V., Blier, P., Hasnain, M., Jollant, F., Levitt, A. J., MacQueen, G. M., McLnerney, S. J., McIntosh, D., Milev, R. V., Muller, D. J., Parikh, S. V., Pearson, N. L., Ravindran, A. V., Uher, R., & Group, C. D. W. (2016). Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) 2016 Clinical Guidelines for the Management of Adults with Major Depressive Disorder: Section 3. Pharmacological Treatments. *Can J Psychiatry*, 61(9), 540-560.
<https://doi.org/10.1177/0706743716659417>
- Keubler, L. M., Hoppe, N., Potschka, H., Talbot, S. R., Vollmar, B., Zechner, D., Hager, C., & Bleich, A. (2020). Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment. *Lab Anim*, 54(1), 50-62. <https://doi.org/10.1177/0023677219877216>
- Klein, S., Bankstahl, J. P., Loscher, W., & Bankstahl, M. (2015). Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*, 263, 263-271.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.09.004>
- Klune, C. B., Robbins, H. N., Leung, V. S., & Pang, D. S. (2020). Hypothermia During General Anesthesia Interferes with Pain Assessment in Laboratory Rats (*Rattus norvegicus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 59(6), 719-725. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-20-000018>

- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, 455(7215), 894-902. <https://doi.org/10.1038/nature07455>
- Krueger, J. C., Boecker, M., Gauggel, S., Bleich, A., & Tolba, R. H. (2023). Using photographs for rating severity degrees of clinical appearance in research mice enables valid discrimination of extreme but not mild and moderate conditions: A pilot study. *PLOS ONE*, 18(11), e0287965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287965>
- Lampe, J. W., & Becker, L. B. (2011). State of the art in therapeutic hypothermia. *Annu Rev Med*, 62, 79-93. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-052009-150512>
- Lau, W., Dykstra, C., Thevarkunnel, S., Silenieks, L. B., de Lannoy, I. A., Lee, D. K., & Higgins, G. A. (2013). A back translation of pregabalin and carbamazepine against evoked and non-evoked endpoints in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 73, 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.023>
- Lepschy, M., Touma, C., Hruby, R., & Palme, R. (2007). Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. *Lab Anim*, 41(3), 372-387. <https://doi.org/10.1258/002367707781282730>
- Li, N., Lee, B., Liu, R. J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., Li, X. Y., Aghajanian, G., & Duman, R. S. (2010). mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science*, 329(5994), 959-964. <https://doi.org/10.1126/science.1190287>
- Liu, R. J., & Aghajanian, G. K. (2008). Stress blunts serotonin- and hypocretin-evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1), 359-364. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706679105>
- Lopez-Munoz, F., & Alamo, C. (2009). Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Curr Pharm Des*, 15(14), 1563-1586. <https://doi.org/10.2174/138161209788168001>

- Lore, R., & Flannelly, K. J. (1978). Habitat selection and burrow construction by wild *Rattus norvegicus* in a landfill. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *92*(5), 888-896. <https://doi.org/10.1037/h0077535>
- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*, *20*(24), 9104-9110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09104.2000>
- Mallien, A. S., Becker, L., Pfeiffer, N., Terraneo, F., Hahn, M., Middelman, A., Palme, R., Creutzberg, K. C., Begni, V., Riva, M. A., Leo, D., Potschka, H., Fumagalli, F., Homberg, J. R., & Gass, P. (2022). Dopamine Transporter Knockout Rats Show Impaired Wellbeing in a Multimodal Severity Assessment Approach. *Front Behav Neurosci*, *16*, 924603. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.924603>
- Mallien, A. S., Hager, C., Palme, R., Talbot, S. R., Vogt, M. A., Pfeiffer, N., Brandwein, C., Struve, B., Inta, D., Chourbaji, S., Hellweg, R., Vollmayr, B., Bleich, A., & Gass, P. (2020). Systematic analysis of severity in a widely used cognitive depression model for mice. *Lab Anim*, *54*(1), 40-49. <https://doi.org/10.1177/0023677219874831>
- Mallien, A. S., Pfeiffer, N., Brandwein, C., Inta, D., Sprengel, R., Palme, R., Talbot, S. R., & Gass, P. (2022). Comparative Severity Assessment of Genetic, Stress-Based, and Pharmacological Mouse Models of Depression. *Front Behav Neurosci*, *16*, 908366. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.908366>
- Marti, O., Marti, J., & Armario, A. (1994). Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*, *55*(4), 747-753. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90055-8)
- McEwen, B. S. (1999). Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci*, *22*, 105-122. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105>
- Michelson, D., Galliven, E., Hill, L., Demitrack, M., Chrousos, G., & Gold, P. (1997). Chronic Imipramine Is Associated with Diminished Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis

- Responsivity in Healthy Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(8), 2601-2606. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.8.4172>
- Moda-Sava, R. N., Murdock, M. H., Parekh, P. K., Fetcho, R. N., Huang, B. S., Huynh, T. N., Witztum, J., Shaver, D. C., Rosenthal, D. L., Alway, E. J., Lopez, K., Meng, Y., Nellissen, L., Grosenick, L., Milner, T. A., Deisseroth, K., Bitto, H., Kasai, H., & Liston, C. (2019). Sustained rescue of prefrontal circuit dysfunction by antidepressant-induced spine formation. *Science*, 364(6436). <https://doi.org/10.1126/science.aat8078>
- Mogensen, J., Pedersen, T. K., & Holm, S. (1994). Effects of chronic imipramine on exploration, locomotion, and food/water intake in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 47(3), 427-435. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90139-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90139-2)
- Molendijk, M. L., & de Kloet, E. R. (2015). Immobility in the forced swim test is adaptive and does not reflect depression. *Psychoneuroendocrinology*, 62, 389-391. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.08.028>
- Molendijk, M. L., & de Kloet, E. R. (2022). Forced swim stressor: Trends in usage and mechanistic consideration. *Eur J Neurosci*, 55(9-10), 2813-2831. <https://doi.org/10.1111/ejn.15139>
- Möller, C., Wolf, F., van Dijk, R. M., Di Liberto, V., Russmann, V., Keck, M., Palme, R., Hellweg, R., Gass, P., Otzdorff, C., & Potschka, H. (2018). Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia*, 59(4), 765-777. <https://doi.org/10.1111/epi.14028>
- Monteggia, L. M., Barrot, M., Powell, C. M., Berton, O., Galanis, V., Gemelli, T., Meuth, S., Nagy, A., Greene, R. W., & Nestler, E. J. (2004). Essential role of brain-derived neurotrophic factor in adult hippocampal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29), 10827-10832. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402141101>
- Monteggia, L. M., Luikart, B., Barrot, M., Theobald, D., Malkovska, I., Nef, S., Parada, L. F., & Nestler, E. J. (2007). Brain-derived neurotrophic factor conditional knockouts show

- gender differences in depression-related behaviors. *Biol Psychiatry*, 61(2), 187-197.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.03.021>
- Mormede, P., Andanson, S., Auperin, B., Beerda, B., Guemene, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C. G., Richard, S., & Veissier, I. (2007). Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav*, 92(3), 317-339. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.12.003>
- Morton, D. B. (2000). A systematic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J*, 41(2), 80-86. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.80>
- Morton, D. B., & Griffiths, P. H. (1985). Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116(16), 431-436. <https://doi.org/10.1136/vr.116.16.431>
- Munro, C. (2023). *PETA Calls On Home Office to End the Forced Swim Test With 40,000 Strong Petition*. Retrieved 12.11.2023 from <https://www.peta.org.uk/blog/forced-swim-test-home-office-petition/>
- Nakajima, S. (2015). Swimming in Flavored Water Leads to Avoidance of that Flavor in Laboratory Rats (*Rattus Norvegicus*). *International Journal of Comparative Psychology*, 28. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.46867/ijcp.2015.28.00.02>
- Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 13(10), 1161-1169. <https://doi.org/10.1038/nn.2647>
- Nibuya, M., Morinobu, S., & Duman, R. S. (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, 15(11), 7539-7547. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07539.1995>
- Nübel, J., Kuhnert, R., & Hapke, U. (2017). Depressive symptoms among adults in Germany. *Journal of Health Monitoring*, 2, 77-83. <https://doi.org/10.17886/RKI-GBE-2017-070>

- Olsson, I. A. S., Nevison, C. M., Patterson-Kane, E. G., Sherwin, C. M., Van de Weerd, H. A., & Würbel, H. (2003). Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. *Applied Animal Behaviour Science*, *81*(3), 245-264.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00285-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00285-X)
- Paal, P., Pasquier, M., Darocha, T., Lechner, R., Kosinski, S., Wallner, B., Zafren, K., & Brugger, H. (2022). Accidental Hypothermia: 2021 Update. *Int J Environ Res Public Health*, *19*(1).
<https://doi.org/10.3390/ijerph19010501>
- Palme, R. (2019). Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol Behav*, *199*, 229-243. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.11.021>
- Pigott, H. E., Kim, T., Xu, C., Kirsch, I., & Amsterdam, J. (2023). What are the treatment remission, response and extent of improvement rates after up to four trials of antidepressant therapies in real-world depressed patients? A reanalysis of the STAR*D study's patient-level data with fidelity to the original research protocol. *BMJ Open*, *13*(7), e063095. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2022-063095>
- Pitsillou, E., Bresnehan, S. M., Kagarakis, E. A., Wijoyo, S. J., Liang, J., Hung, A., & Karagiannis, T. C. (2020). The cellular and molecular basis of major depressive disorder: towards a unified model for understanding clinical depression. *Molecular Biology Reports*, *47*(1), 753-770. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05129-3>
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, *266*(5604), 730-732.
<https://doi.org/10.1038/266730a0>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, *463*(1), 3-33.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Puścian, A., & Knapska, E. (2022). Blueprints for measuring natural behavior. *iScience*, *25*(7), 104635. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104635>

- Raison, C. L., & Miller, A. H. (2003). When Not Enough Is Too Much: The Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders. *American Journal of Psychiatry*, *160*(9), 1554-1565. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.160.9.1554>
- Rauch, T. M., Welch, D. I., & Gallego, L. (1989). Hypothermia impairs performance in the Morris water maze. *Physiol Behav*, *46*(2), 315-320. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(89\)90273-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(89)90273-4)
- Recht, M. A. (1988). *THE BIOLOGY OF DOMESTIC RATS: TELEMETRY YIELDS INSIGHTS FOR PEST CONTROL* Proceedings of the Thirteenth Vertebrate Pest Conference (1988), Monterey, California.
- Reiber, M., Koska, I., Pace, C., Schonhoff, K., von Schumann, L., Palme, R., & Potschka, H. (2022). Development of behavioral patterns in young C57BL/6J mice: a home cage-based study. *Sci Rep*, *12*(1), 2550. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06395-1>
- Riedesel, A. K., Bach-Hagemann, A., Abdulbaki, A., Talbot, S. R., Tolba, R., Schwabe, K., & Lindauer, U. (2022). Burrowing behaviour of rats: Strain differences and applicability as well-being parameter after intracranial surgery. *Lab Anim*, *56*(4), 356-369. <https://doi.org/10.1177/00236772211072977>
- Rowland, N. E., & Toth, L. A. (2019). Analytic and Interpretational Pitfalls to Measuring Fecal Corticosterone Metabolites in Laboratory Rats and Mice. *Comp Med*, *69*(5), 337-349. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-18-000119>
- Rush, A. J., Trivedi, M. H., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Stewart, J. W., Warden, D., Niederehe, G., Thase, M. E., Lavori, P. W., Lebowitz, B. D., McGrath, P. J., Rosenbaum, J. F., Sackeim, H. A., Kupfer, D. J., Luther, J., & Fava, M. (2006). Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry*, *163*(11), 1905-1917. <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.11.1905>

- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Ruys, L. (2017). Umweltbedingte Notfälle. In N. Sigrist (Ed.), *Notfallmedizin für Hund und Katze* (pp. 457-469). Enke Verlag.
- Santini, E., Ge, H., Ren, K., Peña de Ortiz, S., & Quirk, G. J. (2004). Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*, *24*(25), 5704-5710. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0786-04.2004>
- Schmaal, L., Veltman, D. J., van Erp, T. G., Sämann, P. G., Frodl, T., Jahanshad, N., Loehrer, E., Tiemeier, H., Hofman, A., Niessen, W. J., Vernooij, M. W., Ikram, M. A., Wittfeld, K., Grabe, H. J., Block, A., Hegenscheid, K., Völzke, H., Hoehn, D., Czisch, M., Lagopoulos, J., Hatton, S. N., Hickie, I. B., Goya-Maldonado, R., Krämer, B., Gruber, O., Couvy-Duchesne, B., Rentería, M. E., Strike, L. T., Mills, N. T., de Zubicaray, G. I., McMahon, K. L., Medland, S. E., Martin, N. G., Gillespie, N. A., Wright, M. J., Hall, G. B., MacQueen, G. M., Frey, E. M., Carballo, A., van Velzen, L. S., van Tol, M. J., van der Wee, N. J., Veer, I. M., Walter, H., Schnell, K., Schramm, E., Normann, C., Schoepf, D., Konrad, C., Zurowski, B., Nickson, T., McIntosh, A. M., Pappmeyer, M., Whalley, H. C., Sussmann, J. E., Godlewska, B. R., Cowen, P. J., Fischer, F. H., Rose, M., Penninx, B. W., Thompson, P. M., & Hibar, D. P. (2016). Subcortical brain alterations in major depressive disorder: findings from the ENIGMA Major Depressive Disorder working group. *Mol Psychiatry*, *21*(6), 806-812. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.69>
- Schwabe, K., Boldt, L., Bleich, A., van Dijk, R. M., Helgers, S. O. A., Hager, C., Nowakowska, M., Riedesel, A. K., Schonhoff, K., Struve, B., Wittek, J., & Potschka, H. (2020). Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Lab Anim*, *54*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1177/0023677219862004>
- Schweinfurth, M. K. (2020). The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *eLife*, *9*, e54020. <https://doi.org/10.7554/eLife.54020>

- Schweinfurth, M. K., Neuenschwander, J., Engqvist, L., Schneeberger, K., Rentsch, A. K., Gyga, M., & Taborsky, M. (2017). Do female Norway rats form social bonds? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *71*(6), 98. <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2324-2>
- Sewell, F., Waterson, I., Jones, D., Tricklebank, M. D., & Ragan, I. (2021). Preclinical screening for antidepressant activity – shifting focus away from the Forced Swim Test to the use of translational biomarkers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *125*, 105002. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2021.105002>
- Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*, *22*(8), 3251-3261. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03251.2002>
- Si, L., Xiao, L., Xie, Y., Xu, H., Yuan, G., Xu, W., & Wang, G. (2023). Social isolation after chronic unpredictable mild stress perpetuates depressive-like behaviors, memory deficits and social withdrawal via inhibiting ERK/KEAP1/NRF2 signaling. *Journal of Affective Disorders*, *324*, 576-588. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jad.2022.12.092>
- Slattery, D. A., & Cryan, J. F. (2012). Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat Protoc*, *7*(6), 1009-1014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.044>
- Steiniger, F. (1950). Beiträge zur Soziologie und sonstigen Biologie der Wanderratte. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, *7*(3), 356-379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1950.tb01630.x>
- Steinlechner, S. (2005). Wärmebilanz und Temperaturregulation. In W. von Engelhardt (Ed.), *Physiologie der Haustiere* (4th ed., pp. 476-493). Enke Verlag.
- Stryjek, R., Modlińska, K., & Pisula, W. (2012). Species Specific Behavioural Patterns (Digging and Swimming) and Reaction to Novel Objects in Wild Type, Wistar, Sprague-Dawley and Brown Norway Rats. *PLOS ONE*, *7*(7), e40642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040642>

- Suchecki, D., Nelson, D. Y., Van Oers, H., & Levine, S. (1995). Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(2), 169-182. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(94\)00051-b](https://doi.org/10.1016/0306-4530(94)00051-b)
- Swaab, D. F., Bao, A.-M., & Lucassen, P. J. (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, *4*(2), 141-194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.003>
- Talbot, S. R., Biernot, S., Bleich, A., van Dijk, R. M., Ernst, L., Hager, C., Helgers, S. O. A., Koegel, B., Koska, I., Kuhla, A., Miljanovic, N., Muller-Graff, F. T., Schwabe, K., Tolba, R., Vollmar, B., Weegh, N., Wolk, T., Wolf, F., Wree, A., Zieglowski, L., Potschka, H., & Zechner, D. (2020). Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim*, *54*(1), 99-110. <https://doi.org/10.1177/0023677219883319>
- Talbot, S. R., Struve, B., Wassermann, L., Heider, M., Weegh, N., Knape, T., Hofmann, M. C. J., von Knethen, A., Jirkof, P., Häger, C., & Bleich, A. (2022). RELSA-A multidimensional procedure for the comparative assessment of well-being and the quantitative determination of severity in experimental procedures. *Front Vet Sci*, *9*, 937711. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.937711>
- The Animals in Science Committee. (2023). *FORCED SWIM TEST REPORT*. Retrieved 12.11.2023 from https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/1166674/FST_Report_June_2023_Final.pdf
- Tiemann, I., Fijn, L. B., Bagaria, M., Langen, E. M. A., van der Staay, F. J., Arndt, S. S., Leenaars, C., & Goerlich, V. C. (2022). Glucocorticoids in relation to behavior, morphology, and physiology as proxy indicators for the assessment of animal welfare. A systematic mapping review. *Front Vet Sci*, *9*, 954607. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.954607>

- Todd, J., & Powell, L. L. (2009). Chapter 166 - Hypothermia. In D. C. Silverstein & K. Hopper (Eds.), *Small Animal Critical Care Medicine* (pp. 720-722). W.B. Saunders.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-2591-7.10166-3>
- Tortorici, M. A., Kochanek, P. M., & Poloyac, S. M. (2007). Effects of hypothermia on drug disposition, metabolism, and response: A focus of hypothermia-mediated alterations on the cytochrome P450 enzyme system. *Crit Care Med*, *35*(9), 2196-2204.
<https://doi.org/10.1097/01.ccm.0000281517.97507.6e>
- Traweger, D., Travnitzky, R., Moser, C., Walzer, C., & Bernatzky, G. (2006). Habitat preferences and distribution of the brown rat (*Rattus norvegicus* Berk.) in the city of Salzburg (Austria): implications for an urban rat management. *Journal of Pest Science*, *79*(3), 113-125. <https://doi.org/10.1007/s10340-006-0123-z>
- Turner, P. V., Pang, D. S., & Lofgren, J. L. (2019). A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. *Comp Med*, *69*(6), 451-467. <https://doi.org/10.30802/AALAS-CM-19-000042>
- UK ECT Review Group. (2003). Efficacy and safety of electroconvulsive therapy in depressive disorders: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, *361*(9360), 799-808.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12705-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12705-5)
- Valles, A., Marti, O., Garcia, A., & Armario, A. (2000). Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *279*(3), R1138-1144. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1138>
- van der Staay, F. J. (2006). Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, *52*(1), 131-159.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.01.006>
- van der Staay, F. J., Arndt, S. S., & Nordquist, R. E. (2009). Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders. *Behavioral and Brain Functions*, *5*(1), 11.
<https://doi.org/10.1186/1744-9081-5-11>

- van Dijk, R. M., Koska, I., Bleich, A., Tolba, R., Seiffert, I., Moller, C., Di Liberto, V., Talbot, S. R., & Potschka, H. (2020). Design of composite measure schemes for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research: A case study focussed on rat epilepsy models. *PLOS ONE*, *15*(5), e0230141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230141>
- Van Loo, P. L., & Baumans, V. (2004). The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Lab Anim*, *38*(1), 17-24. <https://doi.org/10.1258/00236770460734353>
- Vardon, F., Mrozek, S., Geeraerts, T., & Fourcade, O. (2016). Accidental hypothermia in severe trauma. *Anaesth Crit Care Pain Med*, *35*(5), 355-361. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2016.05.001>
- Veenema, A. H., Blume, A., Niederle, D., Buwalda, B., & Neumann, I. D. (2006). Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur J Neurosci*, *24*(6), 1711-1720. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05045.x>
- Verhagen, M., van der Meij, A., van Deurzen, P. A. M., Janzing, J. G. E., Arias-Vásquez, A., Buitelaar, J. K., & Franke, B. (2010). Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity. *Molecular Psychiatry*, *15*(3), 260-271. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.109>
- Vogt, A., König von Borstel, U., Waiblinger, S., Palme, R., & Barth, K. (2023). Fecal cortisol metabolites reflect transport stress in 3-month-old dairy calves pre- and postweaning: A pilot study. *J Dairy Sci*, *106*(3), 2124-2136. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22341>
- von Wilmsdorff, M., Bouvier, M. L., Henning, U., Schmitt, A., & Gaebel, W. (2010). The impact of antipsychotic drugs on food intake and body weight and on leptin levels in blood and hypothalamic ob-r leptin receptor expression in wistar rats. *Clinics (Sao Paulo)*, *65*(9), 885-894. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322010000900012>

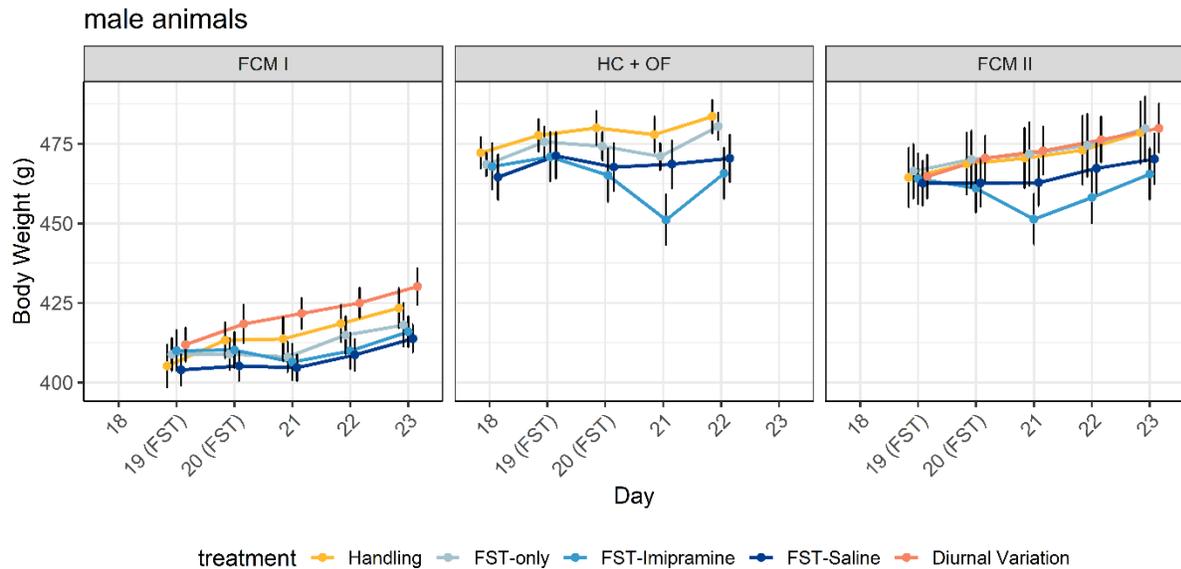
- Wang, J. Q., & Mao, L. (2019). The ERK Pathway: Molecular Mechanisms and Treatment of Depression. *Mol Neurobiol*, 56(9), 6197-6205. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1524-3>
- Wassermann, L., Helgers, S. O. A., Riedesel, A. K., Talbot, S. R., Bleich, A., Schwabe, K., & Hager, C. (2020). Monitoring of Heart Rate and Activity Using Telemetry Allows Grading of Experimental Procedures Used in Neuroscientific Rat Models. *Front Neurosci*, 14, 587760. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.587760>
- Wellman, C. L. (2001). Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*, 49(3), 245-253. <https://doi.org/10.1002/neu.1079>
- West, A. P. (1990). Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 14(6), 863-877. [https://doi.org/10.1016/0278-5846\(90\)90073-p](https://doi.org/10.1016/0278-5846(90)90073-p)
- Whittaker, A. L., Lymn, K. A., Nicholson, A., & Howarth, G. S. (2015). The assessment of general well-being using spontaneous burrowing behaviour in a short-term model of chemotherapy-induced mucositis in the rat. *Lab Anim*, 49(1), 30-39. <https://doi.org/10.1177/0023677214546913>
- Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)*, 83(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/BF00427414>
- Willner, P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*, 6, 78-93. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.08.002>
- Willner, P., Scheel-Krüger, J., & Belzung, C. (2013). The neurobiology of depression and antidepressant action. *Neurosci Biobehav Rev*, 37(10 Pt 1), 2331-2371. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.12.007>

- Wilson, C. A., & Koenig, J. I. (2014). Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(5), 759-773. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.11.008>
- Xu, G., Li, T., & Huang, Y. (2022). The Effects of Intraoperative Hypothermia on Postoperative Cognitive Function in the Rat Hippocampus and Its Possible Mechanisms. *Brain Sci*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/brainsci12010096>
- Zanos, P., & Gould, T. D. (2018). Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*, 23(4), 801-811. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.255>
- Zanos, P., Moaddel, R., Morris, P. J., Georgiou, P., Fischell, J., Elmer, G. I., Alkondon, M., Yuan, P., Pribut, H. J., Singh, N. S., Dossou, K. S., Fang, Y., Huang, X. P., Mayo, C. L., Wainer, I. W., Albuquerque, E. X., Thompson, S. M., Thomas, C. J., Zarate, C. A., Jr., & Gould, T. D. (2016). NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature*, 533(7604), 481-486. <https://doi.org/10.1038/nature17998>

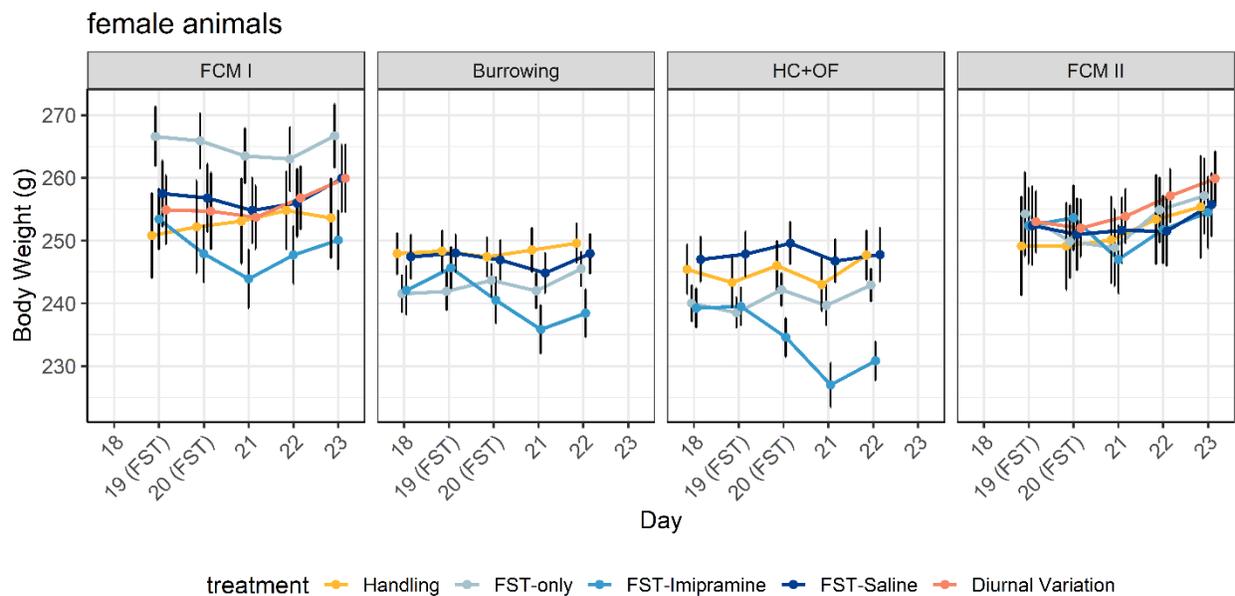
X. Anhang

Supplementary Material

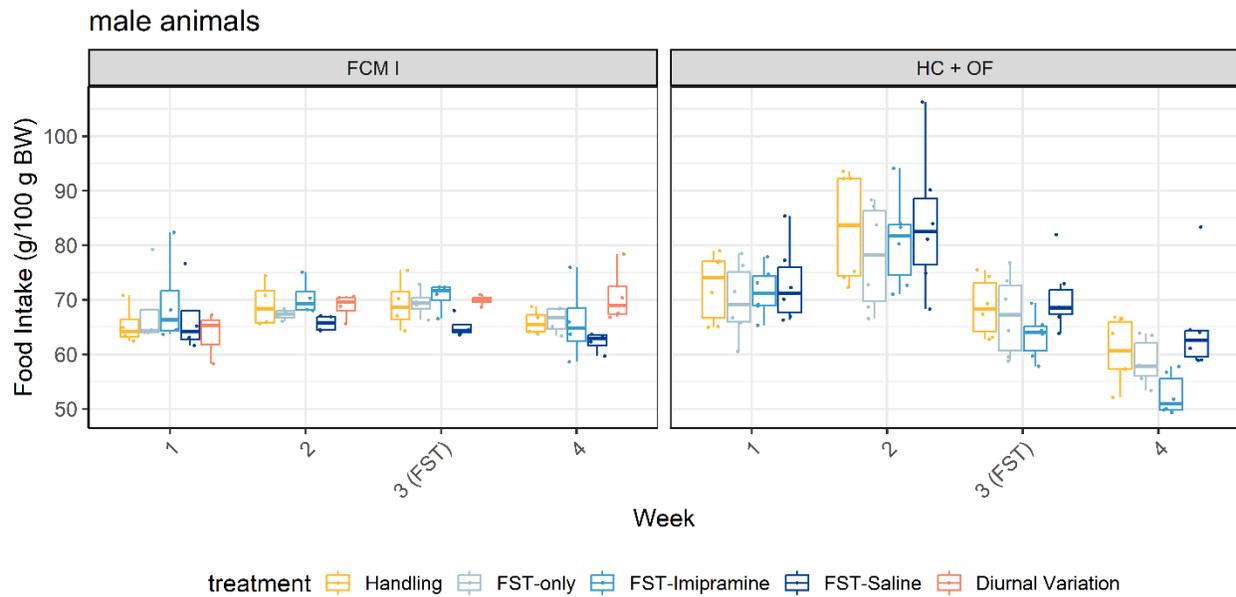
Supplementary Figures



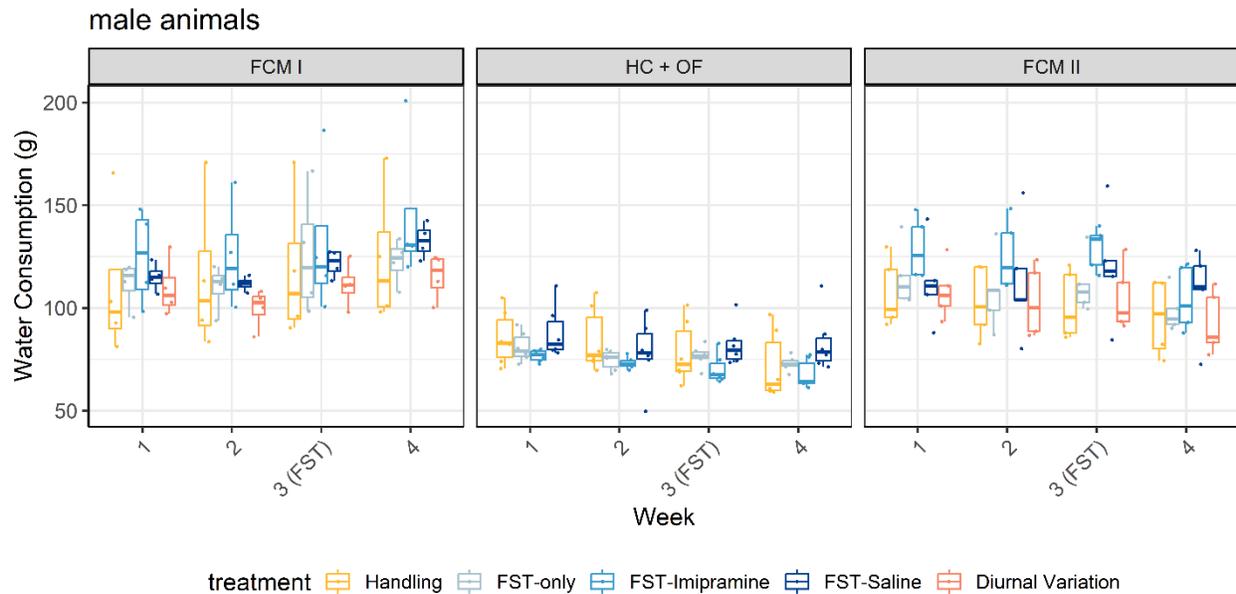
S1 Figure: Time course of the body weight in male animals of the respective cohorts. Data presented as mean \pm SEM. Group sizes were n=8-12 animals.



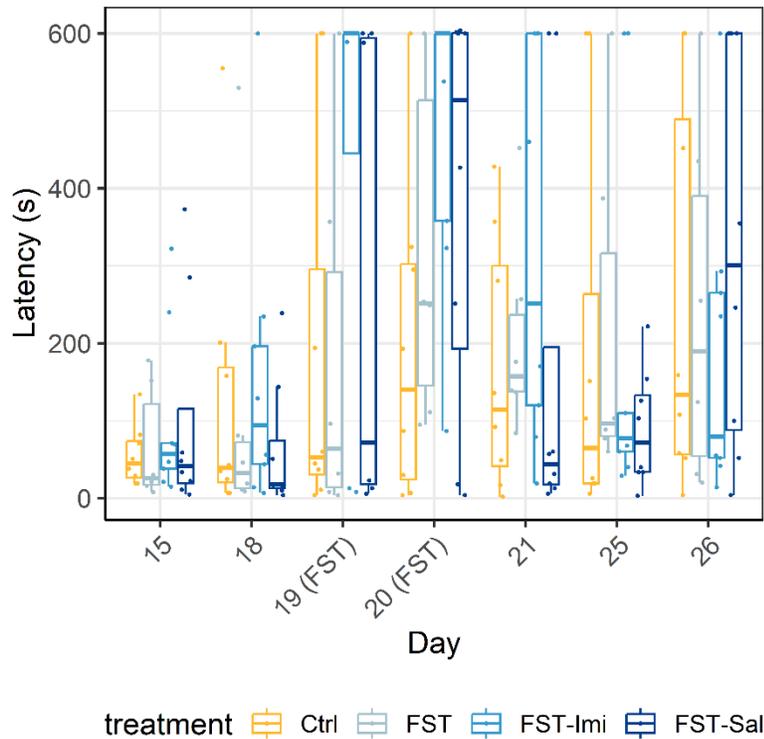
S2 Figure: Time course of the body weight in female animals of the respective cohorts. Data presented as mean \pm SEM. Group sizes were n=8-12 animals.



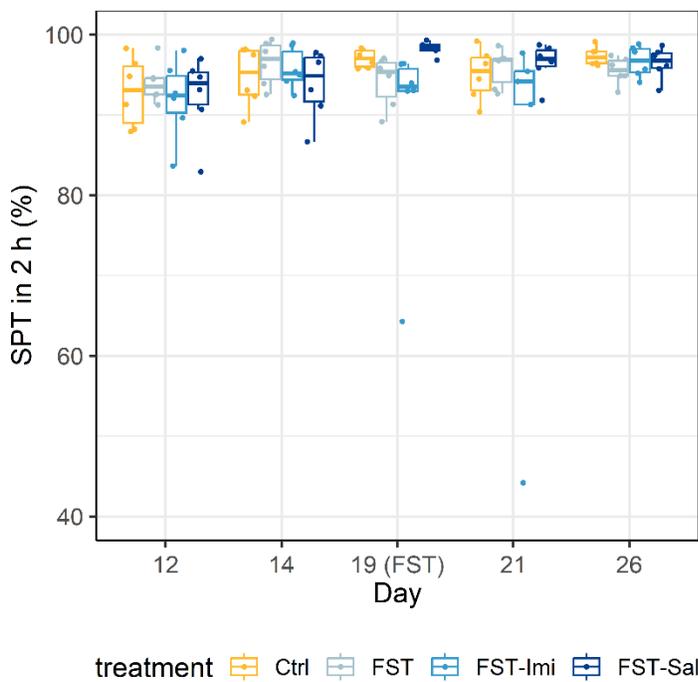
S3 Figure: Food consumption measured once a week in male animals of the first FCM cohort and the homecage cohort. Data is presented as boxplots. Group sizes were n=4-6 cages.



S4 Figure: Water intake measured once a week in male animals of both FCM cohorts and the homecage cohort. Data is presented as boxplots. Group sizes were n=4-6 cages.



S5 Figure: Latency until start of burrowing in female rats. Data is presented as boxplots. Twelve animals were allocated to each treatment group.



S6 Figure: Preference of saccharin over water measured during 2 h. Data is presented as boxplots. Group sizes were n=5-6 cages. SPT = Saccharin Preference Test.

Supplementary results

S1 Table: Body Weight

Sex	Cohort	Time effect	Treatment effect	Time*treatment interaction
♂	FCM I	F(4, 175)=1.5, p=0.2	F(4, 175)=0.37, p=0.83	F(16, 175)=0.22, p=1
	HC + OF	F(4, 220)=0.43, p=0.79	F(3, 220)=0.24, p=0.87	F(12, 220)=0.46, p=0.93
	FCM II	F(4, 225)=0.39, p=0.82	F(4, 225)=0.03, p=1	F(16, 225)=0.15, p=1
♀	FCM I	F(4, 225)=0.08, p=0.99	F(4, 225)=1.25, p=0.29	F(16, 225)=0.13, p=1
	Burrowing	F(4, 220)=0.06, p=0.99	F(3, 220)=1.1, p=0.35	F(12, 220)=0.42, p=0.96
	HC + OF	F(4, 220)=0.32, p=0.86	F(3, 220)=1.28, p=0.28	F(12, 220)=0.77, p=0.68
	FCM II	F(4, 175)=0.23, p=0.92	F(4, 175)=0.1, p=0.98	F(16, 175)=0.09, p=1

S2 Table: Weekly food intake

Sex	Cohort	Time effect	Treatment effect	Time*treatment interaction
♂	FCM I	F(3, 59)=0.89, p=0.45	F(4, 59)=0.98, p=0.43	F(12, 59)=0.78, p=0.67
	HC + OF	F(3, 80)=9.38, p<0.001	F(3, 80)=0.2, p=0.9	F(9, 80)=0.55, p=0.83

S3 Table: Weekly water consumption

Sex	Cohort	Time effect	Treatment effect	Time*treatment interaction
♂	FCM I	F(3, 60)= 0.23, p=0.88	F(4, 60)=0.26, p=0.9	F(12, 60)=0.1, p=1
	HC + OF	F(3, 80)=1.97, p=0.13	F(3, 80)=1.22, p=0.3	F(9, 80)=0.46, p=0.89

	FCM II	F(3, 79)=0.35, p=0.79	F(4, 79)=1.28, p=0.28	F(12, 79)=0.25, p=1
♀	FCM I	F(3, 80)=0.95, p=0.42	F(4, 80)=1.41, p=0.24	F(12, 80)=0.12, p=1
	Burrowing	F(3, 79)=0.39, p=0.76	F(3, 79)=0.03, p=0.99	F(9, 79)=0.12, p=1
	HC + OF	F(3, 80)=1.84, p=0.15	F(3, 80)=1.26, p=0.29	F(9, 80)=0.38, p=0.94

S4 Table: Latency to start burrowing

Sex	Cohort	Time	Kruskal-Wallis-Test
♀	Burrowing	D15	$\chi^2=1.02$, p=0.8
		D18	$\chi^2=1.9$, p=0.59
		D19	$\chi^2=3$, p=0.39
		D20	$\chi^2=5.8$, p=0.12
		D21	$\chi^2=4.5$, p=0.21
		D25	$\chi^2=1.5$, p=0.69
		D26	$\chi^2=1.01$, p=0.79

S5 Table: Nest Score (Wilcoxon-Test)

Sex	Cohort	Treatment Group	Time Points: D13 vs. D20	Time Points: D14 vs. D21
♂	HC+OF	Ctrl	p=0.4142	p=0.5716
		FST	p=0.4962	p=0.3447
		FST-Imi	P=0.8241	p=0.5862
		FST-Sal	p=0.5807	p=0.7656
♀	HC+OF	Ctrl	p=0.3304	p=1

		FST	p=0.3447	p=0.233
		FST-lmi	p=1	p=1
		FST-Sal	p=0.2652	p=0.08897

S6 Table: Latency until interaction with nest material test (LINT)

Sex	Cohort	Time Point	Kruskal-Wallis-Test
♂	HC + OF	D7	$X^2=2.76$, p=0.43
		D14	$X^2=1.602$, p=0.66
		D21	$X^2=5.28$, p=0.153
		D28	$X^2=2.11$, p=0.55
♀	HC + OF	D7	$X^2=1.51$, p=0.68
		D14	$X^2=1.69$, p=0.64
		D21	$X^2=7.78$, p=0.051
		D28	$X^2=0.63$, p=0.89

S7 Table: Detailed Statistics of Body Weight Change

Sex	Cohort	time*treatment interaction	Post-hoc (Tukey)
♂	FCM 1	$F(20, 210)=2.9$, p<0.001	Day 20: Ctrl. vs. FST p=0.0003 Ctrl. vs. FST-lmi p=0.0003 Ctrl. vs. FST-Sal = p=0.0026 FST-only vs. DV p=0.0098 FST-lmi vs. DV p=0.01 Day 21: FST-lmi vs. DV p=0.0026
	FCM 2	$F(24, 315)=3.8$, p<0.001	Day 20: Ctrl. vs. FST-lmi p=0.0031 FST vs. FST-lmi p=0.0098 FST-lmi vs. DV p=0.0002

			FST-Sal vs. DV p=0.02 Day 21: Ctrl. vs. FST-Imi p<0.0001 FST vs. FST-Imi p<0.0001 FST-Imi vs. DV p<0.0001
	HC + OF	F(18, 308)=9.8, p<0.001	Day 20: Ctrl. vs. FST-Imi p<0.001 Ctrl. vs. FST-Sal p=0.0047 FST vs. FST-Imi p=0.04 FST vs. FST-Sal p<0.001 Day 21: Ctrl. vs. FST-Imi p<0.001 FST vs. FST-Imi p<0.001 FST-Imi vs. FST-Sal p<0.001 Day 22: Ctrl. vs. FST-Imi p<0.001 FST vs. FST-Imi p=0.006 FST-Imi vs. FST-Sal p<0.001
♀	FCM 1	F(16, 225)=2.1, p=0.008	Day 20: Ctrl. vs. FST-Imi p=0.0049 DV vs. FST-Imi p=0.066 Day 21: Ctrl. vs. FST-Imi p=0.056
	FCM 2	F(9, 176)=3.2, p=0.001	Day 20: FST vs. FST-Imi p=0.047 Day 21: Ctrl. vs. FST-Imi p=0.0019 FST vs. FST-Imi p=0.047 FST-Imi vs. FST-Sal p=0.0035 FST-Imi vs. DV p=0.0004
	Burrowing	F(9, 176)=3.1, p=0.001	Day 20: Ctrl. vs. FST-Imi p=0.01 Day 21: Ctrl. vs. FST-Imi p=0.0004 FST vs. FST-Imi p<0.001
	HC + OF	F(16, 175)=2.7, p<0.001	Hand vs. Imi: 20 p=0.0002, 21 p=0.03 FST-only vs. Imi: 20 p<0.001, 21 p=0.02 Sal vs. Imi: 20 p=0.001, 21 p=0.02

XI. Danksagung

Die mehrjährige intensive Auseinandersetzung mit dem Forced Swim Test war – wie vermutlich jede Hochschulschrift – nicht ohne Hindernisse und so möchte ich mich zum Abschluss noch bei allen für die Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem externen Betreuer Herrn Prof. Dr. Peter Gass für die Bereitstellung des spannenden und vor allem wichtigen Themas und die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit zu promovieren. Ohne Dich hätte ich vermutlich niemals so tiefe Einblicke in das Feld der Psychiatrie erlangen können. Vielen Dank für Deine exzellente Betreuung und Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit. Ich möchte mich auch für das großzügig entgegengebrachte Vertrauen und die stetige Förderung meiner Ausbildung als Tierärztin bedanken.

Einen ebenso großen Dank möchte ich meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka widmen. Trotz der großen Distanz nach München standest Du mir von Anfang an zur Seite und hast mir immer das Gefühl vermittelt sehr gut betreut zu sein. Vielen Dank für die konstruktiven Vorschläge und anregenden Diskussionen, wenn ich mal nicht weiterwusste.

Ein besonderer Dank geht an die Arbeitsgruppe *Animal Models in Psychiatry*: Vielen Dank, dass Ihr mich so schnell in Euer Team aufgenommen und integriert habt. Ein besonderer Dank gilt hier meiner Postdoc Frau Dr. Anne Mallien. Ich möchte mich für die ausgesprochen hervorragende fachliche, aber auch persönliche Unterstützung und Betreuung bedanken. Vielen Dank für deine schier unendliche Geduld, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte sowie für deine besondere Gabe, Tierärzten neurobiologisches Wissen näherzubringen. Vielen Dank auch an Frau Natascha Pfeiffer und Frau Christiane Brandwein – die besten TAs, die man sich nur wünschen kann! Danke Natascha, für all das praktische Wissen, für die gute enge Zusammenarbeit und, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte. Danke für die regelmäßigen Erinnerungen mit Euch frische Luft zu schnuppern (und dabei die kulinarischen Angebote Mannheims kennenzulernen)!

Ein großes Dankeschön gilt außerdem sämtlichen Beteiligten der DFG Forschergruppe FOR2591 für den konstruktiven Austausch und das unfassbar wertvolle Netzwerk an engagierten Versuchstierkundlern mit gleicher Vision. In diesem Zuge möchte ich auch der DFG für die finanzielle Unterstützung und dem Ermöglichen solcher großartigen Forschungsprojekte danken. Besonders möchte ich mich außerdem bei Dr. Steven Talbot für die großartige Unterstützung bei sämtlichen statistischen Fragestellungen bedanken

und wenn R mich wieder auf die Probe gestellt hat. Deine Erklärungen haben mich stets weitergebracht und mir das Programmieren schmackhaft gemacht.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich Herrn Prof. Rupert Palme und seinem Team an der Veterinärmedizinischen Universität Wien für die große Unterstützung bei der Probenanalyse aussprechen.

Auch das großartige Team des Tierlabors am ZI hat mich immer unterstützt. Vielen Dank Euch allen für den regelmäßigen Austausch und Eure Unterstützung, auf die ich mich immer verlassen konnte.

Ein weiteres riesengroßes Dankeschön gilt meinem Partner, Dominik, der immer für mich da ist und mich motiviert hat.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem Bruder und meiner Familie bedanken. Vielen Dank, dass Ihr mich immer bei meinen Plänen unterstützt und an mich glaubt.