

Evidenzbasierte Belastungseinschätzung und *Refinement*:
Haltungsformen von Labormäusen und
perioperative Analgesie für murine Kraniotomien

Von Anna Maria Munk

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

**Evidenzbasierte Belastungseinschätzung und *Refinement*:
Haltungsformen von Labormäusen und
perioperative Analgesie für murine Kraniotomien**

Von Anna Maria Munk
aus Weingarten

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

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Prof. Dr. Elisabeth G. Kemter

Prof. Dr. Andrea Fischer

Univ.-Prof. Dr. Susanne K. Lauer

Tag der Promotion: 06. Juli 2024

*„If having a soul means being able to feel love and loyalty and gratitude, then animals
are better off than a lot of humans.“*

All Creatures Great and Small, James Herriot (1972)

Meinen Eltern Carola und Jörg

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	11
II.	LITERATURÜBERSICHT	15
1.	Belastungseinschätzung in Tierversuchen.....	15
1.1.	Ethischer Rahmen von Tierversuchen.....	15
1.2.	Rechtlicher Rahmen von Tierversuchen	17
1.3.	Erfassen von Belastung und Wohlergehen.....	18
2.	Ausgewählte Parameter zur Belastungseinschätzung und Schmerzerkennung	21
2.1.	Aktivität im Heimkäfig und Laufrad.....	21
2.2.	Wühlverhalten	24
2.3.	Nestbauverhalten	26
2.4.	Mouse-Grimace-Scale	27
2.5.	Open-Field-Test	29
2.6.	Elevated-Zero-Maze-Test.....	31
2.7.	Forced-Swim-Test.....	31
2.8.	Neuro-Score	33
2.9.	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	33
2.10.	Multimodale Belastungseinschätzung.....	35
3.	Einzel- und Gruppenhaltung von Labormäusen	37
3.1.	Natürliches Sozialverhalten der Maus.....	37
3.2.	Aggressives Verhalten.....	38
3.2.1.	Einflussfaktoren auf aggressives Verhalten	39
3.2.2.	Parameter zur Quantifizierung aggressiven Verhaltens	40
3.3.	Abnormales Verhalten: <i>Barbering</i>	41
3.4.	Versuchstierhaltung.....	43
3.4.1.	Status quo und rechtlicher Rahmen.....	43
3.4.2.	Vor- und Nachteile der Einzelhaltung.....	45
3.4.3.	Vor- und Nachteile der Gruppenhaltung	46
3.4.4.	<i>Refinement</i> in der Versuchstierhaltung	47
4.	Postoperativer Schmerz und Analgesie	50
4.1.	Pathophysiologie des Schmerzes	50
4.1.1.	Schmerz bei neurochirurgischen Eingriffen.....	54

4.1.2.	Postoperative Schmerzerkennung	55
4.2.	Analgesie	58
4.2.1.	Analgesie in der Versuchstierkunde.....	59
4.2.2.	Nichtsteroidale Antiphlogistika	60
4.2.3.	Opioide	64
4.2.4.	Lokalanästhesie	67
4.2.5.	Multimodale Analgesie	68
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG.....	71
IV.	MATERIAL UND METHODEN	75
1.	Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung.....	75
1.1.	Studiendesign	75
1.2.	Versuchstiere	78
2.	<i>Refinement</i> der Analgesie für murine Kraniotomien	79
2.1.	Vorstudien	79
2.2.	Studiendesign	80
2.3.	Versuchstiere	83
2.4.	Analgesie	85
2.5.	Operativer Eingriff	86
3.	Erhobene Parameter.....	87
3.1.	(Patho-)physiologische Parameter.....	87
3.1.1.	Körpergewicht	87
3.1.2.	Wund-Score.....	87
3.1.3.	<i>Barbering</i>	88
3.2.	Heimkäfigassoziertes Verhalten.....	89
3.2.1.	Aggressionsverhalten	89
3.2.2.	Nestbauverhalten	89
3.2.3.	Wühlverhalten	90
3.2.4.	Aktivität.....	91
3.2.5.	Laufradaktivität	92
3.3.	Verhaltenstests	92
3.3.1.	Neuro-Score	92
3.3.2.	Mouse-Grimace-Scale	92
3.3.3.	Open-Field-Test	93

3.3.4.	Elevated-Zero-Maze-Test.....	94
3.3.5.	Forced-Swim-Test.....	94
3.4.	Probenverarbeitung und Analyse	95
3.4.1.	Kotproben für die FCM Analyse.....	95
3.4.2.	Blutplasma für die Carprofen Konzentrationsbestimmung.....	96
3.4.3.	Histopathologische Untersuchung	97
3.4.4.	Gehirnentnahme	97
4.	Auswertung und Statistik.....	97
V.	ERGEBNISSE.....	101
1.	Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung.....	101
1.1.	Körpergewicht.....	101
1.2.	Wund-Score.....	102
1.3.	<i>Barbering</i>	104
1.4.	Aggressionsverhalten	104
1.5.	Wühlverhalten	106
1.6.	Nestbauverhalten	107
1.7.	Open-Field-Test	109
1.8.	Elevated-Zero-Maze-Test.....	110
1.9.	Forced-Swim-Test.....	112
1.10.	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	113
1.11.	Korrelationsanalyse.....	114
2.	<i>Refinement der Analgesie für murine Kraniotomien</i>	117
2.1.	Pilotstudie.....	117
2.2.	Körpergewicht.....	117
2.3.	Neuro-Score	118
2.4.	Mouse-Grimace-Scale	120
2.5.	Wühlverhalten	122
2.6.	Nestbauverhalten	124
2.7.	Aktivität im Heimkäfig	126
2.8.	Laufradaktivität	128
2.9.	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	129
2.10.	Flüssigkeitsaufnahme und Carprofenkonzentration im Plasma	131
2.11.	Histopathologische Ergebnisse	133
2.12.	Zusammenfassung der Ergebnisse	135

2.13.	Design eines <i>Composite Measure Schemes</i>	136
VI.	DISKUSSION	143
1.	Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung	143
2.	<i>Refinement</i> der Analgesie für murine Kraniotomien	151
3.	Limitationen, Schlussfolgerung und Ausblick	165
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	173
VIII.	SUMMARY	177
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	181
X.	ANHANG	219
1.	Abbildungsverzeichnis.....	219
2.	Tabellenverzeichnis	220
3.	Geräte.....	221
4.	Software	222
5.	Lösungen, Medikamente und Substanzen	223
6.	Neuro-Score.....	226
7.	R Skripte.....	228
8.	Korrelationsanalyse der Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung.....	232
9.	Ergebnisse Pilotstudie.....	234
10.	Ergebnisse <i>Refinement</i> der Analgesie für murine Kraniotomien.....	236
11.	Ergebnisse Neuro-Score	237
12.	Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung	244
13.	Zwischenergebnisse zum Design eines <i>Composite Measure Schemes</i>	245
XI.	PUBLIKATIONSLISTE	253
XII.	DANKSAGUNG	255

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung	n	Stichprobenumfang
ACLAM	American College of Laboratory Animal Medicine	n.a.	nicht anwendbar
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	NAMs	<i>New approach methods</i>
AG	Arbeitsgruppe	NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>	OP	Operation
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>	p	p-Wert
AU	<i>action unit</i>	PALS	Pelt-Aggression-Lesion-Scale
cm	Zentimeter	PCA	Hauptkomponentenanalyse
CMS	<i>Composite Measure Scheme</i>	PCH	<i>post-craniotomy headaches</i>
COX	Cyclooxygenase	PFA	Paraformaldehyd
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon	PLGA	<i>Poly-lactic-co-glycolic acid</i>
DAWcon	<i>dynamic animal welfare concept</i>	RELSA	Relative-Severity-Assessment
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	r	Korrelationskoeffizient
FCM	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	RL	Richtlinie
FST	Forced-Swim-Test	rpm	<i>rounds per minute</i>
g	Gramm	s	Sekunde
g	Normalfallbeschleunigung	SAL	<i>short-attack-latency</i>
GG	Grundgesetz	s.c.	subkutan
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde	SD	<i>standard deviation</i>
h	Stunde	SE	Status-Epilepticus
IASP	<i>International Association for the study of pain</i>	SOP	<i>standard operation procedure</i>
IQR	<i>interquartile range</i>	TierSchG	Tierschutzgesetz
IVC	<i>individually ventilated cages</i>	TierSchVersV	Tierschutzversuchstierverordnung
kg	Kilogramm	VersTierMeldV	Versuchstiermeldeverordnung
LAL	<i>long-attack-latency</i>	VO	Verordnung
MESZ	mitteleuropäische Sommerzeit	vs.	versus
MEZ	mitteleuropäische Zeit	VWR	<i>Voluntary Wheel Running</i>

m	Meter	ZNS	Zentrales Nervensystem
M	Mittelwert	3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>
mg	Milligramm	µl	Mikroliter
MGS	Mouse-Grimace-Scale	°C	Grad Celsius
min	Minute		
MUPs	major urinary proteins		

I. EINLEITUNG

Durch die COVID-19-Pandemie wurde die Relevanz von Tierversuchen für die Erforschung und Behandlung humaner Erkrankungen erneut hervorgehoben (KIANI et al., 2022). Von den rund vier Millionen zu wissenschaftlichen Zwecken verwendeten oder im Dienste der Wissenschaft getöteten Versuchstieren im Jahr 2022 in Deutschland ist die Labormaus mit einem Anteil von 72 % mit Abstand die häufigste Versuchstierspezies (BFR, 2022). Der Einsatz von Tieren in experimentellen Versuchen, welche mit Schmerzen, Leiden und Schäden einhergehen können, ist in der Europäischen Union durch die Richtlinie (RL) 2010/63/EU streng reglementiert. Eine Belastungseinstufung in Schweregrade ist prospektiv, während des Versuches und retrospektiv vorgeschrieben (SMITH et al., 2018). Es mangelt jedoch an wissenschaftlich basierten Methoden, um die Belastung eines Versuchstieres objektiv quantifizieren zu können (BLEICH und TOLBA, 2017). Des Weiteren dürfen Tierversuche nur unter Berücksichtigung des 3R-Prinzips von Russell und Burch (RUSSELL und BURCH, 1959) durchgeführt werden. Das *Refinement*, die Verbesserung der Tierversuche, spielt neben *Replacement* und *Reduction* nicht nur im Hinblick auf die ethische Rechtfertigung von Tierversuchen, sondern auch im Hinblick auf eine höhere Studienqualität eine wichtige Rolle (BLEICH und TOLBA, 2017). Das deutsche Forschungskonsortium „*Severity Assessment in Animal Based-Research*“ (<https://severity-assessment.de/>) (DFG-FOR2591, 2024) hat es sich deshalb unter anderem zur Aufgabe gemacht, objektive und sensitive Parameter für die geforderte Belastungseinschätzung bei Versuchstieren zu identifizieren und zu validieren. Die zwei im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten In-vivo-Studien vereinte das übergeordnete Ziel *Refinement*-Ansätze für Labormäuse innerhalb der DFG-2591 Forschergruppe mit Hilfe präselektierter Parameter evidenzbasiert zu evaluieren. Während in der ersten Studie das *Refinement* in der Untersuchung einer adäquaten, sozialen Haltungsform bestand, wurde in der zweiten Studie das *Refinement*-Potential multimodaler Analgesieregime für das perioperative Schmerzmanagement muriner Kraniotomien untersucht.

Um das Wohlergehen der Labormaus als soziales Tier sicherzustellen, sieht die RL 2010/63/EU eine Haltung in stabilen Gruppen kompatibler Tiere vor. Weibliche Labormäuse können meist problemlos in Gruppen gehalten werden (DAMMANN et al., 2021), wohingegen es bei männlichen Mäusen in konventionellen

Tierhaltungen durch aggressives Verhalten häufig zu tierschutzrelevanten, manchmal tödlichen Verletzungen kommen kann (WEBER et al., 2017; LIDSTER et al., 2019). Nicht nur der Einfluss auf die körperliche Unversehrtheit, sondern auch auf den affektiven Status der Tiere ist hierbei zu berücksichtigen. Sowohl der soziale Stress durch Gruppenhierarchien als auch die soziale Isolation in Einzelhaltung, können mit Veränderungen von verhaltensbezogenen und physiologischen Parametern einhergehen (KAPPEL et al., 2017). Die Wahl einer adäquaten Haltungsform ist nicht nur für das Wohlergehen der Tiere, sondern auch für die Reduktion von Varianz und damit für die Reproduzierbarkeit, Validität und Translation tierexperimenteller Studien von Relevanz (LIDSTER et al., 2019; THEIL et al., 2020). Daher sollte in der ersten In-vivo-Studie dieser Dissertation die tatsächliche Belastung bei weiblichen und männlichen Mäusen in Einzel- und Gruppenhaltung in einem multizentrischen Ansatz untersucht werden.

In der neurobiologischen Forschung werden häufig intrakranielle, chirurgische Eingriffe an Labormäusen vorgenommen (CHO et al., 2019; KING et al., 2023). Allerdings scheint laut eines kürzlich von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten *Reviews* die Qualität des perioperativen Schmerzmanagements bei intrakraniellen Eingriffen in Labornagern besorgniserregend zu sein: 75 % der Studien berichteten im Jahr 2019 nicht über den Einsatz perioperativer Analgesie. Nur 5,7 % der Studien berichteten über die Anwendung von mehr als zwei Analgetika, was auf das unausgeschöpfte Potential multimodaler Analgesie hinweist (KING et al., 2023). Obwohl eine Analgesie bei schmerzhaften Eingriffen rechtlich vorgeschrieben ist, scheint die Unterversorgung mit Schmerzmitteln nach operativen Eingriffen an Versuchstieren ein Problem darzustellen (STOKES et al., 2009; HERRMANN und FLECKNELL, 2019). Der verbreiteten Befürchtung der Wissenschaftler, dass eine Verabreichung von Analgetika die Hauptzielgrößen ihrer Studie beeinflussen könnte, kann mit bedachter Studienplanung und Integration bestimmter Kontrollgruppen begegnet werden (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Es sollte vielmehr berücksichtigt werden, dass unbehandelter Schmerz nach chirurgischen Eingriffen, weitreichende Auswirkungen auf physiologische und verhaltensbezogene Parameter haben und somit zu einer erhöhten Varianz experimenteller Daten beitragen kann (ARRAS et al., 2007; TENNANT, 2013; DEMARCO und NUNAMAKER, 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021; AHMADI-NOORBAKHSI et al., 2022). Daher besteht nicht

nur eine ethische und rechtliche Verpflichtung, postoperative Schmerzen zu behandeln, sondern dies ist auch eine Voraussetzung für gute Studienqualität (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). In diesem Zusammenhang stellt jedoch die unzureichende Information zur Pharmakokinetik und -dynamik der Analgetika für die Anwendung in Labormäusen eine weitere Herausforderung dar (FLECKNELL, 2018; FOLEY et al., 2019). Deswegen sollte im Rahmen der zweiten In-vivo-Studie dieser Dissertation, die Verträglichkeit und Effektivität drei verschiedener multimodaler Analgesieregime im Vergleich zu einer Monotherapie für Kraniotomien in C57BL/6J Mäusen untersucht werden. Des Weiteren wurde evaluiert, inwiefern sich sensitive Parameter zur Belastungseinschätzung auch zur Quantifizierung postoperativer Schmerzen eignen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Belastungseinschätzung in Tierversuchen

1.1. Ethischer Rahmen von Tierversuchen

Ist die Verwendung von Tieren zu Versuchszwecken ethisch vertretbar? Dieser Frage kann mit verschiedenen ethischen Ansätzen nachgegangen werden. Voraussetzung für den ethischen Diskurs ist die Annahme, dass die Fähigkeit Schmerzen, Disstress und positive Emotionen wahrzunehmen, bei Tieren vorhanden ist (GROSS und TOLBA, 2015; KIANI et al., 2022). Obwohl Tieren mittlerweile ein moralischer Status zugesprochen wird (KIANI et al., 2022), werden sie häufig menschlichen Rechten untergeordnet (GROSS und TOLBA, 2015). Je nach Spezieszugehörigkeit wird eine Abstufung der Tierrechte basierend auf einer soziozoologischen Skala angenommen (GROSS und TOLBA, 2015). So wird beispielweisen Haustieren, wie Hunden und Katzen, in Europa ein größerer Wert als potentiellen Schädlingen wie Nagetieren zugesprochen (GROSS und TOLBA, 2015). Aus der Perspektive von Tierschutzrechtlern hingegen, haben Tiere ein dem Menschen gleichwertiges Recht auf Unversehrtheit, Leben und Schutz vor Instrumentalisierung, sodass der Einsatz von Tieren in Versuchen strikt abgelehnt wird (GROSS und TOLBA, 2015; KIANI et al., 2022). Der Utilitarismus besagt, dass Menschen ihr Handeln auf die Maximierung des Wohlergehens anderer auslegen sollen. Somit werden die Interessen aller empfindsamen Lebewesen moralisch gleichwertig betrachtet. Nichtsdestotrotz wird ein Tierversuch als notwendig angesehen, wenn der Nutzen für den Menschen oder die Tiere selbst größer ist als der ausgelöste Schaden (GROSS und TOLBA, 2015). Aus Sicht des Anthropozentrismus und Kontraktualismus, bei welchem der Mensch und zwischenmenschliche Vereinbarungen im Mittelpunkt stehen, ergibt sich eine indirekte Pflicht den Tieren gegenüber, um Erwartungen der Gesellschaft gerecht zu werden (GROSS und TOLBA, 2015). Allen ethischen Betrachtungen ist gemeinsam, dass sie von Menschen entworfen wurden, um das eigene Handeln reflektieren und begründen zu können (GROSS und TOLBA, 2015).

Praktische Bedeutung für die Versuchstiere, erlangte das Prinzip der 3R, *Replace*, *Reduce*, *Refine*, welches von Russell und Burch 1959 für einen humanen Umgang mit Versuchstieren in der Forschung vorgeschlagen wurde (RUSSELL und BURCH, 1959). Mit *Replacement* ist gemeint, dass eine wissenschaftliche Methode

eingesetzt wird, welche mit empfindungslosem Material arbeitet (TANNENBAUM und BENNETT, 2015). Dies umfasst nach der ursprünglichen Definition von Russel und Burch auch Experimente an Versuchstieren, welche beispielweise in finaler Narkose stattfinden (TANNENBAUM und BENNETT, 2015). Heutzutage wird unter dem Begriff *Replacement* das Ersetzen von Tierversuchen durch alternative Methoden, wie beispielsweise Zellkulturen, Organoiden oder künstliche Intelligenz, verstanden (GROSS und TOLBA, 2015; LEE et al., 2020). *Reduction* zielt auf die Reduktion von Tierzahlen bei gleichbleibender Aussagekraft von Studien ab (TANNENBAUM und BENNETT, 2015). *Refinement* bedeutet, dass der Disstress, welchen Versuchstiere erleiden, auf ein Minimum begrenzt wird (TANNENBAUM und BENNETT, 2015). Dies kann erreicht werden, indem beispielsweise die Haltungsbedingungen mit *Enrichment* verbessert werden, das Schmerzmanagement für operative Eingriffe angepasst oder die bestmögliche Euthanasiemethode gewählt wird. Auch die Auswahl eines Tiermodells mit geringerer Belastung ist eine *Refinement*-Methode (GROSS und TOLBA, 2015). Es wurden mehrere Vorschläge für das Hinzufügen eines vierten Rs diskutiert: *Rehabilitation*, die Erholung nach experimentellen Eingriffen (GROSS und TOLBA, 2015), *Refusal*, dem Zurückweisen von Forschungsvorhaben ohne erkennbaren Mehrwert (LEE et al., 2020) oder *Responsibility*, die Verantwortung gegenüber dem Versuchstier und dem Stand von Tierversuchen in der Öffentlichkeit und Wissenschaft (LEE et al., 2020). Brill und Kollegen¹ (2021) betonten die symbiotische Beziehung von Ethik in der Versuchstierkunde und wissenschaftlicher Qualität. Wie schon Russel und Burch (1959) postulierten sie, dass eine gute wissenschaftliche Praxis von Nöten ist, um den Schaden an den Versuchstieren so gering wie möglich zu halten. Ein unpassendes Studiendesign, inadäquate Messmethoden oder geringe Fallzahlen können dazu führen, dass Studien wiederholt werden und letztendlich die Zahl der verwendeten Versuchstiere und das Gesamtleiden steigt (BRILL et al., 2021). Um die Studienqualität zu verbessern wurde gefordert, die 3R um *Robustness*, *Registration* und *Reporting* auf 6R zu erweitern (STRECH und DIRNAGL, 2019). Indem robuste Methoden angewandt, Studien vor Beginn registriert sowie Negativergebnisse publiziert werden und somit auch vollständig über Studien berichtet wird, könnte die

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertationsschrift bei Personenbezeichnungen das generische Maskulinum verwendet. Diese umfassen im Folgenden, falls nicht näher spezifiziert, alle Geschlechter.

Problematik der Reproduzierbarkeit von Tierversuchen ins Visier genommen werden (STRECH und DIRNAGL, 2019).

Aufgrund des wachsenden, öffentlichen Diskurses zur Verwendung von Versuchstieren und der je nach Fragestellung limitierten Übertragbarkeit von Ergebnissen in Tiermodellen auf die klinische Anwendung beim Menschen, wird zunehmend an alternativen Methoden, sog. NAMs (*new approach methods*), geforscht (KIANI et al., 2022; SCHMEISSER et al., 2023). Zu diesem Zweck wurden Institutionen wie die ZEBET (Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch) gegründet (LIEBSCH et al., 2011). Immer mehr NAMs werden insbesondere für die Toxizität- und Risikobewertung von Chemikalien, beispielsweise für die Hautsensibilisierung, in regulatorische Auflagen implementiert (SCHMEISSER et al., 2023). Trotzdem können NAMs In-vivo-Modelle zur Abbildung komplexer, pathologischer Prozesse, welche zum Beispiel in der präklinischen Forschung neurodegenerativer Erkrankungen vorliegen, bislang noch nicht ersetzen. Vielmehr sollten beide Ansätze kombiniert werden, um die biomedizinische Forschung voranzutreiben (AERTS et al., 2022). Die Relevanz von Tierversuchen wurde zudem während der COVID-19-Pandemie, bei welcher Tierversuche eine entscheidende Rolle zum Verständnis des Pathomechanismus von SARS-CoV-2 und zur Entwicklung von Impfstoffen gespielt haben, deutlich (KIANI et al., 2022). Die Anzahl von 4,16 Millionen verwendeten Versuchstieren allein im Jahr 2022 in Deutschland (BFR, 2022) sollte zudem bei dieser Debatte auch in Relation zur Anzahl der in Deutschland gehaltenen Nutztiere, welche 2022 elf Millionen Rinder, 21 Millionen Schweine, 1,5 Millionen Schafe und 173 Millionen Geflügel umfassten (BMEL, 2022), betrachtet werden.

1.2. Rechtlicher Rahmen von Tierversuchen

Mit der Verankerung im Grundgesetz (Art. 20a, GG)², erklärte Deutschland den Schutz der Tiere im Jahr 2002 zum Staatsziel. Der rechtliche Rahmen, in welchem Tierversuche stattfinden, ist zum einen im deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) und zum anderen detailliert in der europäischen Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, RL 2010/63/EU, vorgegeben. Die

² Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 19. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2478) geändert worden ist.

RL 2010/63/EU wurde in Deutschland national mit der Verabschiedung der Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVersV) umgesetzt. Im §1 des TierSchG ist aufgeführt, dass „niemand [...] einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“ darf³. Der vernünftige Grund, der es erlaubt, einem Versuchstier Schmerzen, Leiden oder Schäden zuzufügen, kann in der Unerlässlichkeit des Tierversuches begründet sein. Die Unerlässlichkeit eines Tierversuches ist im Kontext des aktuellen wissenschaftlichen Standes und unter Berücksichtigung von alternativen Methoden zu beurteilen (§ 7a Abs. 2 S. 1 und 2 TierSchG)². Ein Tierversuch wird dann als unerlässlich und ethisch vertretbar angesehen, wenn zu erwarten ist, dass der Nutzen aus der wissenschaftlichen Erkenntnis die Schmerzen, Leiden und Schäden des Versuchstieres aller Voraussicht nach übersteigen wird (§ 7a Abs. 2 S. 3 TierSchG)². Somit bedient sich der Gesetzgeber der Ansicht des Utilitarismus. Bei jeder Antragsstellung für einen Tierversuch ist eine Schaden-Nutzen-Analyse durchzuführen (Art. 38 Abs. 2d RL 2010/63/EU)⁴ (BRILL et al., 2021). Der Tierversuchsantrag muss außerdem auf die Wahrscheinlichkeit eines Erkenntnisgewinns im Hinblick auf die Qualität des Studiendesigns geprüft werden (Art. 38 Abs. 1d und 3b RL 2010/63/EU)³ (BRILL et al., 2021). Zudem ist das Einhalten des 3R-Prinzips rechtlich im TschG §7 Abs. 1 S. 2 TschG² und in Art. 4 der RL 2010/63/EU³ vorgeschrieben. Die Versuchstiermeldeverordnung (VersTierMeldV) schreibt vor, dass die Anzahl der für wissenschaftliche Zwecke getöteten Tiere und seit 2021 auch die Anzahl getöteter Tiere, die für den wissenschaftlichen Zweck gezüchtet aber nicht verwendet wurden, jährlich an die zuständige Behörde gemeldet werden muss. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) veröffentlicht daraufhin jährlich eine Statistik über die Gesamtanzahl verwendeter Versuchstiere in Deutschland (BfR, 2022).

1.3. Erfassen von Belastung und Wohlergehen

Der Begriff „Belastung“ wird von der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde) als „Summe aller Faktoren, die [...] auf anatomische, physiologische, kognitive oder emotionale Zustände wirken und [...] zu Schmerzen

³ Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 20 des Gesetzes vom 20. Dezember 2022 (BGBl. I S. 2752) geändert worden ist.

⁴ Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ABI. EU L 276, 20.10.2010, S 33 -79.

oder Leiden führen“ definiert (DÜLSNER et al.). Damit umfasst der Begriff „Belastung“ Schmerzen, Leiden, Stress, Angst, anhaltende Schäden und den affektiven Status der Tiere (KEUBLER et al., 2020). Eine Einstufung der Belastung von Versuchstieren ist in Art. 15 Abs. 1 RL 2010/63/EU³ vorgeschrieben. Dabei wird die Belastung in vier Schweregrade kategorisiert: „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“, „mittel“ und „schwer“. Im Anhang VII Abschn. III der RL 2010/63/EU³ werden Beispiele für die Zuordnung zu bestimmten Schweregraden genannt: eine Allgemeinanästhesie oder die subkutane Applikation von Substanzen werden dem Schweregrad „gering“ zugeschrieben; chirurgische Eingriffe unter Analgesie und Allgemeinanästhesie wie beispielsweise die Kraniotomie werden dem „mittleren“ Schweregrad zugeordnet. Die Belastungseinschätzung muss prospektiv für die Antragsstellung eines geplanten Tierversuches, während eines laufenden Tierversuches und retrospektiv nach Versuchsabschluss erfolgen (SMITH et al., 2018). Zur Abwägung einer etwaigen Wiederverwendung eines Versuchstieres und zur retrospektiven Belastungseinschätzung muss die kumulative Belastung, welche sich aus einzelnen Belastungen und allen Erfahrungen innerhalb eines Versuchstierlebens zusammensetzt, beachtet werden (Anhang VIII Abschn. II RL 2010/63/EU)⁵ (SMITH et al., 2018). Von Verfahren, die starke Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste, welche lang anhalten und nicht gelindert werden können, verursachen, ist in der europäischen Union abzusehen (Art. 15 Abs. 2 RL 2010/63/EU)⁴. Abgesehen von der gesetzlichen Verpflichtung ist die Belastungseinschätzung auch Voraussetzung für die Intervention während eines laufenden Versuches, inklusive der Anwendung humaner Endpunkte, und für die Bewertung von *Refinement*-Ansätzen (TAPPE-THEODOR et al., 2022). Die Belastungsbeurteilung erfolgt anhand von Bewertungsbögen, sog. Score-Sheets, welche für jedes Versuchsvorhaben spezifisch angepasst sind und bei Veränderungen klinischer Parameter direkte Handlungsanweisungen enthalten (DÜLSNER et al., 2020). Innerhalb der Forschergruppe DFG-2591 wurden darüber hinaus eine Reihe von (patho-)physiologischen, biochemischen oder verhaltensbezogenen Parametern identifiziert, mit welchen die Belastung der Versuchstiere quantifiziert werden kann (JIRKOF et al., 2020b; KAHNAU et al., 2020; KEUBLER et al., 2020; DFG-

⁵ Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ABI. EU L 276, 20.10.2010, S 33 -79.

FOR2591, 2024). Um die Erfassung des affektiven Status vermehrt zu fokussieren, schlagen Kahnau und Kollegen (2020) vor, mit Hilfe von Präferenztests, die Perspektive aus Sicht der Versuchstiere zu berücksichtigen. Ausgewählte Parameter zur Belastungseinschätzung und Schmerzerkennung sind in Kapitel 2 und besondere Herausforderungen zur postoperativen Schmerzerkennung in Kapitel 4.1.2. dieser Dissertation aufgeführt. Mehrere Autoren der Forschergruppe DFG-2591 postulieren des Weiteren, dass nur mit einer Kombination verschiedener Parameter die Multidimensionalität der Belastung erfasst werden kann (KEUBLER et al., 2020; VAN DIJK et al., 2020; ZECHNER et al., 2022; REIBER et al., 2023). Auf die multimodale Belastungseinschätzung wird genauer in Kapitel 2.10. eingegangen.

Da im Kontext des *Refinements* oft die Förderung des Wohlergehens (*well-being*) von Versuchstieren thematisiert wird, muss dieser Begriff genauer erläutert werden. Unter dem Begriff „Wohlergehen“ kann von der Abwesenheit von Belastung bis hin zum Empfinden von Freude und Glück alles verstanden werden (TANNENBAUM und BENNETT, 2015). Deswegen wurden mehrere Konzepte entwickelt, um das Tierwohl (*animal welfare*) in seiner Gesamtheit besser beschreiben zu können. Das Konzept der fünf Freiheiten (*concept of five freedoms*) wurde für die Tierwohlbewertung von Nutztieren angewandt und bezieht sich hauptsächlich auf Haltungsansprüche (BRAMBELL, 1965). Hierbei wird von Tierwohl ausgegangen, wenn das Tier frei ist von Hunger und Durst, von Unbehagen, von Schmerz, Verletzung und Krankheit, von Angst und Disstress und die Freiheit besitzt sein natürliches Verhalten auszuüben (BRAMBELL, 1965). Dieses Konzept wurde jedoch kritisiert, da es sich hauptsächlich auf das Entfernen negativer Faktoren konzentriert (ARNDT et al., 2022). In der Versuchstierkunde wurde daraufhin das Konzept der fünf Domänen (*five domains concept*) zur Einschätzung des Tierwohls, bestehend aus a) Durst/ Hunger/ Mangelernährung, b) Umweltherausforderungen, c) Krankheit/ Verletzung/ funktionelle Beeinträchtigung, d) verhaltensbezogene/ interaktive Restriktion und e) Angst/ Schmerz/ Disstress, formuliert (MELLOR und REID, 1994). Dabei wurde die Relevanz positiver Erfahrungen betont und die Mensch-Tier-Beziehung berücksichtigt (MELLOR und REID, 1994; ARNDT et al., 2022). Das Konzept der Lebensqualität (*quality of life concept*) basiert auf der individuellen Selbstwahrnehmung der Lebensqualität im Kontext der gesammelten positiven und

negativen Erfahrungen während des gesamten Lebens (GREEN und MELLOR, 2011). Arndt und Kollegen (2022) entwickelten ein dynamisches Tierwohlkonzept (*dynamic animal welfare concept*, DAWcon), welches der Anpassungsfähigkeit der Tiere und positiven, emotionalen Zuständen Rechnung trägt, weiter. Dabei wird postuliert, dass ein Tier sich wahrscheinlich in einem Zustand positiven Wohlergehens befindet, wenn es mental und physisch dazu in der Lage ist, angemessen auf angenehme oder aversive, interne oder externe Stimuli zu reagieren (ARNDT et al., 2022). Angemessene Reaktionen zur Bewältigung von Umweltbedingungen stellen ein natürliches Verhalten dar und erlauben dem Individuum einen Zustand herbeizuführen, welchen es selbst als positiv wahrnimmt (ARNDT et al., 2022). Das Tierwohl ist dann gefährdet, wenn die Fähigkeit des Individuums zur Bewältigung aversiver Stimuli überschritten wird (ARNDT et al., 2022). Für das Erfassen des Tierwohls unter Berücksichtigung des DAWcons ist zum einen die Evaluierung des speziesspezifischen Verhaltens mit Hilfe von Ethogrammen, zum anderen die wiederholte Evaluierung von Parametern zur Abbildung dynamischer Veränderungen, relevant (ARNDT et al., 2022).

2. Ausgewählte Parameter zur Belastungseinschätzung und Schmerzerkennung

2.1. Aktivität im Heimkäfig und Laufrad

Über die Ausprägung der lokomotorischen Aktivität im Heimkäfig können einerseits Rückschlüsse auf das Wohlergehen der Labormäuse gezogen werden und kann andererseits das Verhalten genetisch veränderten Mauslinien phänotypisiert werden (GENESKY et al., 2017). Die lokomotorische Aktivität war bei Mäusen nach einer experimentellen Infektion mit dem Influenza-Virus im Vergleich zu den Kontrollgruppen reduziert (VAGIMA et al., 2020). Die Charakterisierung von *Scn1a*-A1783V haploinsuffizienten Mäusen, ein Mausmodell für das Dravet-Syndrom, in unserer Arbeitsgruppe ergab, dass geschlechtsreife, adulte Tiere eine geringere Distanz in ihrem Heimkäfig im Vergleich zu Wildtyp Mäusen zurücklegten (REIBER et al., 2022c). Der Vorteil von heimkäfig-basierter Datenerhebung besteht darin, dass spontanes Mausverhalten ohne Einfluss einer neuen Umgebung, wie beispielsweise gegeben bei der Analyse lokomotorischer Aktivität im Open-Field, ohne handlingassoziierten Disstress gemessen werden kann. Zusätzlich können durch einen langen Beobachtungszeitraum Einflüsse des

Tag-Nacht-Rhythmus, des Östruszyklus oder des wöchentlichen Käfigwechsels in der Tierhaltung, berücksichtigt werden (TECOTT und NESTLER, 2004). Die Aktivität im Heimkäfig kann durch verschiedene Methoden erfasst werden (GENEWSKY et al., 2017): diese reichen von der chirurgischen Implantation von Telemetrie-Sendern (MÖLLER et al., 2019) über die Messung der Käfigneigung bei Bewegung (GANEVA et al., 2007) und mikrowellenbasierten Systemen (GENEWSKY et al., 2017) bis hin zu Videoaufnahmen im sichtbaren Lichtbereich (GRIECO et al., 2021) und im Infrarotlichtspektrum (PEREIRA et al., 2018). Um einen chirurgischen Eingriff und nachfolgende Schmerzen sowie implantatbedingten Disstress und Unwohlsein zu verhindern, sollten vorzugsweise nicht-invasive Messmethoden eingesetzt werden (BRAGA und BURMEISTER, 2011; PEREIRA et al., 2019). Bei der Interpretation von Daten zur Heimkäfigaktivität müssen natürliche Schwankungen berücksichtigt werden. Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, spiegelt sich die zirkadiane Rhythmik auch in ihrem Aktivitätsprofil wider. Zudem wurde eine zirkannuale Oszillation der Aktivität alle zwei bis vier Monate bei C57BL/6J Mäusen beobachtet (PERNOLD et al., 2021).

Mit dem *Voluntary Wheel Running* (VWR, Freiwilliges Rennen im Laufrad) können Mäuse in ihrer gewohnten Heimkäfigumgebung, ohne Einfluss des Experimentators und auf freiwilliger Basis, ihrer lokomotorischen Aktivität nachkommen und sowohl Spiel- als auch Fluchttrieb befriedigen (MANZANARES et al., 2018). Dabei zeigen Labormäuse eine spontane Nutzung des Laufrads (MANZANARES et al., 2018). Dies wurde auch in wildlebenden Mauspopulationen nachgewiesen (MEIJER und ROBBERS, 2014). Das VWR kann genutzt werden, um Verhaltensveränderungen in verschiedenen Mausmodellen oder genetisch veränderten Mauslinien zu beurteilen (GOH und LADIGES, 2015; REIBER et al., 2022c). Darüber hinaus eignet es sich, um wissenschaftlichen Fragestellungen zur körperlichen Betätigung und deren Folgen auf beispielsweise Muskelzuwachs, auf das kardiovaskuläre System (ALLEN et al., 2001) oder hinsichtlich Alterungsprozessen (MCMULLAN et al., 2016), nachzugehen (MANZANARES et al., 2018). Grundsätzlich kann zwischen zwei Arten von Laufrädern unterschieden werden: das erstere ist vertikal ausgerichtet, an der Käfigseitenwand befestigt und meist aus Metallstreben. Zweites ist ein geneigtes Laufrad, meist aus Plastik und wird auf dem Käfigboden befestigt. Mäuse scheinen geneigte den vertikalen Laufrädern vorzuziehen (WALKER und

MASON, 2018). Die Art des Laufrades, der Durchmesser sowie der Drehwiderstand beeinflussen maßgeblich die Laufleistung der Mäuse (MANZANARES et al., 2018). So legen C57BL/6J Mäuse auf geneigten Laufrädern mehr Strecke (ca. 10 km (DE BONO et al., 2006) bis 20 km (CREER et al., 2010)) täglich zurück als auf vertikalen Laufrädern (ca. 8 km (ALLEN et al., 2001) bis 10 km (BARTLING et al., 2017)). Das Laufrad wird von den Mäusen hauptsächlich in der Dunkelphase insbesondere in den ersten drei Stunden benutzt. Dabei ist die Laufradaktivität der Mäuse in 150 Sekunden lange Einheiten unterteilt, denen eine kurze Pause von 30 Sekunden folgt (DE BONO et al., 2006; BARTLING et al., 2017; MANZANARES et al., 2018). In längeren Studien zeigte sich eine Steigerung der Laufleistung, welche nach zwei bis fünf Wochen ein Plateau erreichte (DE BONO et al., 2006). Erst mit einem gewissen Alter der Tiere nahm diese aufgrund von verlangsamter Geschwindigkeit, nicht aber aufgrund einer geringeren Aufenthaltsdauer im Laufrad, ab (BARTLING et al., 2017). In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Weibchen aufgrund einer erhöhten Laufgeschwindigkeit, eine größere Distanz zurücklegten als männliche Mäuse (DE BONO et al., 2006; MCMULLAN et al., 2016; BARTLING et al., 2017; REIBER et al., 2022b). Zudem wies die Laufstrecke von weiblichen Tieren eine höhere Varianz auf, welche auf den Östruszyklus zurückgeführt werden kann (BASTERFIELD et al., 2009; BARTLING et al., 2017). Reiber und Kollegen (2022c) aus unserer Arbeitsgruppe demonstrierten, wie sich die Laufradaktivität von C57BL/6J Mäusen in unterschiedlichem Alter entwickelte. Am meisten Distanz legten Mäuse unabhängig vom Geschlecht im Alter von 50 Tagen zurück (REIBER et al., 2022b). Innerhalb der Forschergruppe DFG-2591 (DFG-FOR2591, 2024) konnten Häger und Kollegen (2018) anhand von Daten der VWR-Aktivität und des Körpergewichts erfolgreich eine Belastungseinstufung bei Mäusen eines akuten Restraint-Stress-Modells vornehmen. Diese Belastungskategorisierung wurde mittels einer Clusteranalyse basierend auf einem *k-means*-Algorithmus ermöglicht (HÄGER et al., 2018). Ein beeinträchtigtes Wohlbefinden spiegelte sich ebenfalls in einer reduzierten Laufradaktivität bei einem Pankreas-Tumor-Modell direkt nach dem operativen Eingriff sowie im Verlauf der Behandlungsphase (WEEGH et al., 2021) als auch bei einem kognitiven Depressionsmodell wider (MALLIEN et al., 2020). Bei Letzterem scheint die VWR-Aktivität sensitiver als andere Parameter, wie Wühl- und Nestbauverhalten oder Körpergewichtsveränderungen, zu sein (MALLIEN et al., 2020). Ebenso ist die

Ausprägung der Laufradaktivität bei einer chronischen Entzündung am Hinterbein sowie neuropathischen Schmerzen reduziert (CONTRERAS et al., 2021).

2.2. Wühlverhalten

Das Wühlen ist ein evolutionär konserviertes Verhalten von Nagetieren und dient dem Ziel, einen unterirdischen Bau zu errichten. Letzterer schützt vor Raubtieren und kalten Temperaturen, kann als Lagerstätte für Futtermittel verwendet werden und ist ein geeigneter Ort, um Jungtiere aufzuziehen (DEACON, 2006b). Der unterirdische Bau weist je nach Mauspezies eine unterschiedliche Form auf. Die speziesspezifische Ausgestaltung des Baus ist genetisch verankert und auch in Mäusen in Labortierhaltungen über mehrere Generationen konserviert (DAWSON et al., 1988). Die Küstenmaus (*Peromyscus Polionotus*) kreiert einen komplexen Bau mit langem Eingangstunnel, einer Nestkammer und einem Fluchtgang, wohingegen die Hirschmaus (*Peromyscus maniculatus*) und die Weißfußmaus (*Peromyscus leucopus*) kurze Gänge bauen, welche in eine Nestkammer münden (DAWSON et al., 1988; WEBER et al., 2013; BEDFORD et al., 2022). Deacon und Kollegen (2006c) nutzten das Wühlen von Nagetieren, welches zuvor ausschließlich in der Ethologie und Evolutionsbiologie erforscht wurde, um daraus einen Verhaltenstest zu entwickeln. Wühlverhalten ist demnach das Entfernen eines Substrates mit koordinierten Bewegungen der Vorder- und Hinterpfoten aus einer Röhre, welche den natürlichen unterirdischen Gang nachahmen soll und dient der Konstruktion und dem Aufrechterhalten des Ganges (DEACON, 2006b). Das Wühlverhalten (*burrowing*) ist jedoch abzugrenzen vom sog. *hoarding*, bei dem Futter gezielt mit dem Maul zu ausgewählten Orten getragen wird, um Vorräte anzusammeln (DEACON, 2006b, 2006c). Ebenso abzugrenzen ist es vom Graben (*digging*), bei welchem in der Einstreu gewühlt wird (DEACON, 2006d, 2006b). Ratten, Mäuse, Hamster und Gerbils zeigen Wühlverhalten mit erdähnlichen Substraten (DEACON, 2009). Jedoch zeigte nur die Hausmaus Wühlverhalten auch mit Futterpellets als Substrat (DEACON, 2009). Die meisten Mausstämme, außer CBA- und 129S2/SV-Stämme, zeigen ein ausgeprägtes Wühlverhalten (DEACON, 2006b).

Deacon und Kollegen (2006c) entwarfen einen einfachen und kostengünstigen Testaufbau für die Beurteilung des Wühlverhaltens: drei Stunden vor der Dunkelphase wird eine mit 200 g Substrat gefüllte Wühlröhre in den Heimkäfig einer Maus gelegt. Nach zwei Stunden sowie nach der Dunkelphase am nächsten

Morgen wird die Wühlröhre gewogen und die entfernte Menge an Substrat berechnet (DEACON, 2006b). Dieser Versuchsaufbau kann durch Videoaufnahmen erweitert werden, sodass zusätzliche Parameter beurteilt werden können. Jirkof (2010) definierte die Zeit bis eine Maus Wühlverhalten zeigt (Latenzzeit) so, dass innerhalb von 10 Sekunden drei Futterpellets aus der Röhre gewühlt werden müssen. Die Gesamtdauer des Wühlens ist erreicht, wenn die Wühlröhre komplett entleert wurde (JIRKOF et al., 2010). Labormäuse besitzen eine hohe intrinsische Motivation Wühlverhalten auszuüben. Dieses in der Laborumgebung nicht-essentielle, sprich nicht überlebenswichtige Verhalten, wird auch als „Luxusverhalten“ bezeichnet und kann zur Beurteilung des Wohlbefindens („Wohlfühlparameter“) eingesetzt werden (LATHAM und MASON, 2004; JIRKOF, 2014). Das Wühlverhalten erwies sich als sensitiver Parameter unter anderem bei einem Modell für bakterielle Infektion (TEELING et al., 2007), bei Scrapie-infizierten Mäusen (DEACON et al., 2001) oder bei einem genetisch veränderten Mausmodell für das Dravet-Syndrom (REIBER et al., 2022c). Des Weiteren kann das Wühlverhalten für die postoperative Schmerzbeurteilung eingesetzt werden (JIRKOF et al., 2010; TURNER et al., 2019; AULEHNER et al., 2022). Ein systematisches *Review* aus unserer Arbeitsgruppe identifizierte zehn Studien im Zeitraum 2009 bis 2019, bei welchen Wühlverhalten eingesetzt wurde, um postoperative Schmerzen zu untersuchen (AULEHNER et al., 2022). Hierbei stellten alle Studien einen Einfluss der Operation auf das Wühlverhalten fest (AULEHNER et al., 2022). Jirkof und Kollegen (2010) konnten zeigen, dass der Beginn des Wühlverhaltens der Mäuse, welche keine analgetische Versorgung bei einer Laparotomie erhielten, signifikant verzögert war im Vergleich zu Mäusen, die mittels einer *non-steroidal anti-inflammatory drug* (NSAID) analgetisch versorgt wurden. Dabei wiesen letztere ähnliche Latenzzeiten bis zum Beginn des Wühlverhaltens auf, wie Versuchsgruppen mit ausschließlicher Anästhesie oder Anästhesie und Analgesie. Über alle Gruppen hinweg war der Beginn des Wühlverhaltens jedoch im Vergleich zu den Baselinewerten verzögert (JIRKOF et al., 2010). In einer weiteren Studie konnte nach einem Sham-Embryotransfer kein Unterschied bezüglich des Beginns des Wühlverhaltens zwischen operierten Mäusen ohne analgetische Versorgung und operierten Mäusen, die Tramadol über das Trinkwasser erhielten, festgestellt werden (EVANGELISTA-VAZ et al., 2018). Das Wühlverhalten war bei einer weiteren Studie, welche das Analgesiemanagement für Sham-Embryotransfers oder Vasektomien bei Mäusen

des Stammes C57BL/6J untersuchte, zwischen den multimodalen und monotherapeutischen Analgesiegruppen nicht unterschiedlich beeinträchtigt (DURST et al., 2021).

2.3. Nestbauverhalten

Nester dienen der freilebenden Hausmaus als Unterschlupf, zum Schutz vor Fressfeinden und Konkurrenten, zur Thermoregulation und zur Jungtieraufzucht (DEACON, 2006a; JIRKOF, 2014). Das Nestbauverhalten ist trotz der Domestikation in Labormäusen erhalten geblieben (ESTEP et al., 1975). Dabei bauen nicht nur weibliche Mäuse Nester für die Jungtieraufzucht, sondern auch Männchen. Auch Weibchen ohne Nachwuchs bauen Nester vergleichbarer Größe und Qualität. Diese werden hauptsächlich zum Schlafen, zur Thermoregulation sowie zum Schutz vor künstlichem Licht und menschlicher Manipulation genutzt (LISK et al., 1969; SHERWIN, 1997; JIRKOF, 2014). Das Nestbauverhalten unterliegt dem zirkadianen Rhythmus der Hausmaus. Deswegen wird das Verhalten mit einigen Höhepunkten während der Dunkelphase, vor allem aber zum Ende der Dunkelphase ausgeübt, sodass während der Hellphase ein intaktes Nest zum Ruhen zur Verfügung steht. So nimmt die Nestkomplexität während der Dunkelphase ab und nimmt gegen deren Ende und während der Hellphase wiederum zu (JIRKOF et al., 2013). Deswegen wird häufig zu Beginn der Hellphase nach einer kompletten Dunkelphase die Nestkomplexität evaluiert (JIRKOF, 2014). Alternativ wurde auch eine Evaluation neun Stunden nach Gabe des Nestmaterials innerhalb der Hellphase zum Beispiel zur Beurteilung des Nestbauverhaltens nach einem experimentellen Eingriff vorgeschlagen (JIRKOF et al., 2013). Verschiedene Nestbaumaterialien stehen zu Verfügung, wobei Mäuse Papiertaschentücher, Holzwolle und Baumwollstreifen einem Käfig ohne Nestbaumaterial oder zerkleinerten Materialien wie Papierstreifen oder Holzspänen vorziehen (VAN DE WEERD et al., 1997). Am häufigsten wird Nestmaterial aus Baumwolle eingesetzt (AULEHNER et al., 2022). Ein geeigneter Score mit fünf Abstufungen, um die Qualität des Nestbaus zu analysieren, wurde bereits veröffentlicht (DEACON, 2006a). Ebenfalls kann das Nestbauverhalten mittels der Parameter Latenzzeit bis zum Nestbau, Zeit zur Integration des Nestmaterials in ein bestehendes Nest oder der Dauer des Nestbaus sowie durch Wiegen des Nests beurteilt werden (JIRKOF, 2014). Mäuse sind normalerweise hochmotiviert nicht-essenzielle Verhaltensaspekte, welche für das Überleben in der Labortierhaltung nicht mehr

zwingend notwendig sind, sog. „Luxusverhalten“, wie das Nestbauverhalten, auszuüben (JIRKOF, 2014). Bei reduziertem Wohlbefinden wird dieses „Luxusverhalten“ jedoch zuerst eingestellt. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ausgeübte Luxusverhaltensmuster als ein Zeichen für Wohlbefinden bei der Maus interpretiert und auch als „Wohlfühlparameter“ bezeichnet werden können (JIRKOF, 2014). Beispielsweise war das Nestbauverhalten bei Mausmodellen neurodegenerativer oder psychischer Erkrankungen und insbesondere bei hippocampaler Beeinträchtigung, reduziert (CUNNINGHAM et al., 2005; FILALI und LALONDE, 2009; JIRKOF, 2014). Außerdem wird das Nestbauverhalten auch durch operative Eingriffe beeinflusst: dies konnte bei einer Laparotomie (ARRAS et al., 2007) und in unserer Arbeitsgruppe bei einer hippocampalen Elektroden- und Transmitterimplantation für die Erzeugung eines chronischen Epilepsiemodells (BUHECKER et al., 2022) sowie bei einer Elektrodenimplantation in den Hippocampus oder die Amygdala in einem Kindling-Modell (BOLDT et al., 2021) gezeigt werden. Ob die postoperative Beeinträchtigung durch Schmerzen allein verursacht wird, ist umstritten, da gezeigt wurde, dass der Einsatz von hochdosiertem Schmerzmittel die Nestkomplexität postoperativ nicht verbesserte (JIRKOF et al., 2013).

2.4. Mouse-Grimace-Scale

Bereits 1873 postulierte Charles Darwin, dass sowohl Menschen als auch Tiere verschiedene Emotionen mit ihrer Gesichtsmimik ausdrücken können (DARWIN, 1873). Der menschliche Gesichtsausdruck wurde von Ekman und Friesen 1978 mit dem *Facial Action Coding System* („Gesichtsbewegungs-Kodierungssystem“) auf Basis einer Vielzahl an anatomisch begründeten *action units* (AU, „Bewegungseinheiten“) und für verschiedene Emotionen klassifiziert (EKMAN und FRIESEN, 1978). Dieses Kodierungssystem wurde abgewandelt und zur Detektion von Schmerzen bei Neugeborenen, Kindern und Menschen mit Behinderung verwendet (GILBERT et al., 1999; LACHAPPELLE et al., 1999; WILLIAMS, 2002). Basierend darauf entwickelten Langford und Kollegen (2010) ebenfalls ein Scoring-System, um Schmerzen bei Mäusen klassifizieren zu können. Dabei identifizierten sie fünf AUs:

- ***orbital tightening* (Schließen der Augenlider):** Diese AU ist verändert, wenn sich die Augenfläche durch Schließen oder Zusammenknäufen der Augenlider verkleinert.

- ***nose bulge (Wölbung im Bereich des Nasenrückens)***: Diese AU ist verändert, wenn sich der Nasenspiegel nach ventral krümmt und somit eine Wölbung des Nasenrückens, welche zum Teil mit in Falten geworfener Haut einhergeht, entsteht.
- ***cheek bulge (Wölbung des Oberkieferbereiches)***: Diese AU ist verändert, wenn sich eine konvexe Wölbung im Oberkieferbereich zwischen Augen und Tasthaaren aufgrund von Anspannen der Kaumuskulatur ergibt.
- ***ear position (Ohrposition)***: Diese AU ist verändert, wenn die Ohren zur Seite und/oder nach hinten gedreht sind.
- ***whisker change (Veränderung der Vibrissen)***: Die Vibrissenposition ist verändert, wenn diese entweder flach an das Gesicht angelegt werden, nach kranial abstehen oder zusammenkleben.

Diese AUs werden einzeln mit Score 0 (keine Veränderung), Score 1 (moderate Veränderung) und Score 2 (starke Veränderung) versehen. Der Mouse-Grimace-Scale (MGS) wurde daraufhin in 14 präklinischen Schmerzmodellen, beispielsweise im Tail-Flick-Test, einer magnesiumsulfatinduzierten abdominalen Konstriktion oder nach einer Laparotomie validiert (LANGFORD et al., 2010). Daraufhin wurden Grimace-Scales für weitere Spezies wie unter anderem für Ratten (SOTOCINAL et al., 2011), Pferde (DALLA COSTA et al., 2014), Schweine (VISCARDI et al., 2017), Schafe (HÄGER et al., 2017) und Kaninchen (HAMPSHIRE und ROBERTSON, 2015) entwickelt. Ein *Systematic Review*, welches den Evidenzgrad der Grimace-Scales für mehrere Spezies anhand verschiedener Kriterien untersuchte, kam zu der Schlussfolgerung, dass der Grimace-Scale bei Mäusen, Ratten, Pferden sowie Katzen einen hohen Evidenzgrad aufwies (EVANGELISTA et al., 2022). Aufgrund der bisher geringen Anzahl an Studien ist eine Einstufung des Evidenzgrades der Grimace-Scales für Schafe und Esel limitiert (EVANGELISTA et al., 2022). Der MGS kann in Echtzeit durch den Experimentator erhoben werden, sodass während des Versuches interveniert werden kann, sollte ein Versuchstier Schmerzen zeigen. Diese Methodik ist jedoch fragwürdig, da Verblindung, Randomisierung und Standardisierung schwierig umzusetzen sind (ERNST et al., 2020a; WHITTAKER et al., 2021). Hinzu kommt, dass die physische Präsenz des Experimentators die Wachsamkeit der Maus erhöht, welche als Beutetier versucht, Schmerzen zu verbergen (TURNER et al., 2019;

WHITTAKER et al., 2021; AULEHNER et al., 2022). 88 % der veröffentlichten Studien im Zeitraum 2010 bis 2020 wandten ein retrospektives Scoring des MGS auf Basis von Foto- oder Videoaufnahmen an, aus welchen Standfotos gewonnen wurden (WHITTAKER et al., 2021). Obwohl Verblindung und Randomisierung vor der Bewertung des MGS hierdurch möglich sind, muss der Zeitaufwand für die Foto- und Videobearbeitungen bedacht werden (ERNST et al., 2020a; WHITTAKER et al., 2021). Ernst und Kollegen (2020a) entwickelten deswegen einen Algorithmus, welcher aus Videoaufnahmen qualitativ hochwertige, bewertbare Standbilder selektiert, um den Prozess der Videobearbeitung zu automatisieren und zu optimieren. Die Robustheit des Algorithmus wurde in weiteren Arbeitsgruppen (AG) getestet und erwies sich bis auf die Anwendung bei elektrodenimplantierten Mäusen als zuverlässig (ERNST et al., 2020b). Darüber hinaus existiert bereits ein Deep-Learning basiertes Model, welches den MGS in einem Maus-Migräne-Modell mit hoher Übereinstimmung zur Bewertung durch einen Beobachter automatisiert erhebt (CHIANG et al., 2022). Mit dem MGS können nicht nur akute Schmerzen, wie vorerst angenommen (LANGFORD et al., 2010), sondern unter Umständen auch Schmerzen bis zu einem Monat nach dem Insult detektiert werden (WHITTAKER et al., 2021). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in einem *Systematic Review* den Einsatz des MGS zur postoperativen Schmerzdetektion (AULEHNER et al., 2022). Dabei zeigte sich bei allen Studien ein signifikanter Effekt des operativen Eingriffes auf den MGS im Vergleich zu den Baselinewerten. Des Weiteren zeigten sieben von acht Studien, dass durch den Einsatz von Analgetika der postoperative MGS im Vergleich zu operierten Kontrollgruppen ohne analgetische Versorgung reduziert werden konnte (AULEHNER et al., 2022). Bei der Interpretation des postoperativen MGS müssen jedoch Effekte der Inhalations- (HOHLBAUM et al., 2017) und Injektionsnarkose (HOHLBAUM et al., 2018), welche ebenfalls zu einer Erhöhung des MGS führen können, berücksichtigt werden (WHITTAKER et al., 2021). Nicht nur Schmerz, sondern auch Disstress kann zu einer Erhöhung des MGS führen, was durch die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Handling-Methoden ersichtlich wird (ROUGHAN und SEVENOAKS, 2019; SWAN et al., 2023).

2.5. Open-Field-Test

Der Open-Field-Test ermöglicht das Erfassen von angstassoziiertem Verhalten und der Lokomotion von Mäusen. Als ursprünglich für die Untersuchung zur

Emotionalität bei Ratten entwickelter Test (HALL und BALLACHEY, 1932), stellt der Open-Field-Test in seiner heutigen Form ein standardisiertes und breit eingesetztes Verhaltensexperiment dar (PRUT und BELZUNG, 2003). Dabei wird eine Maus in eine unbekannte Arena mit hohen Seitenwänden gesetzt und mittels Videokamera aufgezeichnet. Durch Tracking-Softwares wird sowohl die zurückgelegte Distanz als auch die Dauer des Aufenthalts in verschiedenen Zonen berechnet. Zusätzlich können Verhaltensmuster wie *Rearing* (Aufrichten auf den Hinterpfoten), Putzverhalten oder das Absetzen von Kot manuell erfasst werden (BOURIN et al., 2007). Das angstassoziierte Verhalten wird zum einen durch individuelles Testen von Mäusen aus Gruppenhaltungen, zum anderen durch die Agoraphobie, der Angst vor freien, offenen Plätzen, ausgelöst (BOURIN et al., 2007). Um sich vor Raubtieren zu schützen, hält sich die Maus vorzugsweise in einer geschützten Umgebung, in diesem Fall im Wandbereich der Open-Field-Arena auf. Dieses Verhalten wird als Thigmotaxis bezeichnet (PRUT und BELZUNG, 2003). Somit wird der Konflikt evaluiert, ob die Maus dem Stressor mit angstassoziiertem Verhalten (Thigmotaxis) oder Explorationsverhalten (Erkunden der inneren Zone des Open-Fields) begegnet (PRUT und BELZUNG, 2003; BOURIN et al., 2007). Die anxiolytische Wirkung von Benzodiazepinrezeptoragonisten und 5 HT_{1A}-Rezeptoragonisten und partiellen Agonisten wird im Open-Field Test mit der Maus bestätigt. Da Substanzen, welche eine klinische Wirksamkeit in der Behandlung von Angststörungen beim Menschen aufweisen, keine entsprechende Wirkung im Tierversuch im Open-Field zeigten, scheint das Open-Field-Paradigma nicht das geeignete Modell für die Untersuchung von mit Angst verbundenen psychischen Störungen zu sein (PRUT und BELZUNG, 2003; BOURIN et al., 2007). Des Weiteren müssen Einflussfaktoren bei der Interpretation von Ergebnissen kritisch hinterfragt werden, da sich die Methodik beispielsweise hinsichtlich der Form des Open-Fields (rund, quadratisch, rechteckig), der Beleuchtung und der Aufnahmedauer (zwei bis 20 Minuten) zwischen den Studien erheblich unterscheidet (WALSH und CUMMINS, 1976) (BOURIN et al., 2007). Bodden und Kollegen (2018) untersuchten die Belastung, welche den Mäusen bei einmaligen und wiederholten Open-Field-Experimenten widerfährt. Sie konnten anhand mehrerer Parameter zeigen, dass das Wohlergehen der Mäuse durch die Durchführung dieses Tests nicht beeinträchtigt war (BODDEN et al., 2018).

2.6. Elevated-Zero-Maze-Test

Das Elevated-Zero-Maze ist ein Verhaltenstest, mit dem man unkonditioniertes, angstassoziiertes Verhalten messen kann. Es besteht aus einer erhobenen, runden Plattform, welche zwei offene und zwei mit seitlichen Wänden geschlossene Bereiche aufweist (SHEPHERD et al., 1994). Nager haben eine natürliche Aversion gegenüber offenen Flächen und Höhen (BOURIN et al., 2007). Somit entsteht ein Konflikt zwischen explorativem und angstassoziiertem Verhalten (BOURIN et al., 2007). Gemessen wird üblicherweise die Aufenthaltsdauer in dem offenen und geschlossenen Bereich. Des Weiteren kann das Verlassen des geschlossenen Bereiches (Eintritt) und die Anzahl der Kreuzungen von einem geschlossenen in den anderen geschlossenen Bereich (Übertritt) gezählt werden (BOURIN et al., 2007). Dorsoventrale Kopfbewegungen am Rand der Plattform (*head dips*) und das Nach-vorne-Strecken (*stretch attend posture*) können ebenfalls gezählt werden (SHEPHERD et al., 1994). Das Elevated-Zero-Maze hat sich aus dem Vorgängermodell, dem Elevated-Plus-Maze entwickelt. Letzteres besteht aus zwei offenen und zwei geschlossenen Bereichen, welche sich jeweils gegenüber liegen und eine zentrale Kreuzungsfläche bilden. Die Interpretation des Aufenthalts auf dieser zentralen Fläche ist umstritten (SHEPHERD et al., 1994). Mit der runden Form des Elevated-Zero-Maze fällt diese Fläche weg und subtile Veränderungen des Verhaltens können präziser detektiert werden (SHEPHERD et al., 1994). Das Elevated-Zero- sowie Elevated-Plus-Maze werden für die Erforschung anxiolytischer und anxiogener Substanzen und zur phänotypischen Charakterisierung von genetisch veränderten Mauslinien eingesetzt (SHEPHERD et al., 1994; BOURIN et al., 2007). Für die Erforschung von anxiolytischen Substanzen wird, nach einem Vergleich des Elevated-Zero-Maze mit dem Elevated-Plus-Maze sowie dem Mirror-Chamber-Paradigma, empfohlen, das Elevated-Zero-Maze einzusetzen (KULKARNI et al., 2007).

2.7. Forced-Swim-Test

Der Forced-Swim-Test (FST) wurde zuerst für Ratten und sodann für Mäuse als Verhaltenstest zur Detektion depressionsassoziierter Züge im Tiermodell entwickelt (PORSOLT et al., 1977b; PORSOLT et al., 1977a). Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit Hilfe des FST jedoch die Bewältigung von einer akuten Stress-Situation untersucht. Beim FST wird die Maus einer aversiven, unausweichlichen Situation ausgesetzt, indem sie in einen mit Wasser gefüllten

Zylinder platziert wird (PORSOLT et al., 1977b). Diesem Stressor kann die Maus mit aktiven Bewältigungsstrategien (Schwimmen oder Klettern) oder passiven Bewältigungsstrategien (*floating*, sich treiben lassen) begegnen (COMMONS et al., 2017). Das passive *floating*, bei der sich die Maus nur so viel bewegt, dass sie den Kopf über Wasser halten kann, wird als Zustand der Verzweiflung oder der Resignation interpretiert (PORSOLT et al., 1977a). Die Unfähigkeit, Stress zu bewältigen wird beim Menschen als ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer depressiven Erkrankung gesehen (ALFONSO et al., 2005). Der FST kann in diesem Zusammenhang depressionsassoziierte Verhaltenszüge im Tiermodell abbilden (COMMONS et al., 2017). Die Dauer der Immobilität konnte mit pharmakologisch unterschiedlichen Klassen an klinisch wirksamen Antidepressiva verkürzt werden und Mäuse zeigten vermehrt aktive Bewältigungsstrategien (PORSOLT et al., 1977b; LUCKI, 1997). Dadurch wurde dem FST eine prädiktive Validität zugeschrieben. Dies machte ihn einerseits zu einem beliebten präklinischen Screening-Test für potentielle Antidepressiva, andererseits wurde er genutzt, um depressionsassoziiertes Verhalten von genetisch veränderten Mäusen zu phänotypisieren (CRYAN und HOLMES, 2005). In den letzten Jahren wurde vermehrt Kritik an der Validität des FST geäußert. Ein retrospektives *Review* verfolgte die Forschung an Substanzen für die Behandlung von Depression, die mit Hilfe des FST in großen pharmakologischen Unternehmen selektiert wurden: von 109 Substanzen, wurden 28 % auf antidepressive Wirksamkeit am Menschen untersucht, drei Substanzen davon zeigten eine Wirkung, aber keine der Substanzen ist bisher auf dem freien Markt verfügbar (TRUNNELL und CARVALHO, 2021). Des Weiteren weist der FST keine gute Konstruktvalidität bezüglich der Messung eines depressionsassoziierten Verhaltens auf. Es wird diskutiert, dass der Übergang von initial aktiver Bewältigung durch Schwimmen zu passiver Bewältigung mittels *floating*, eher eine erfolgreiche, adaptive Bewältigungsstrategie darstellen könnte. Anstatt dies als Zustand der Verzweiflung und Misserfolg in der Bewältigung der stressigen Situation zu interpretieren, könnte das *floating* durch das Einsparen von Energiereserven auch das Überleben der Labormaus sichern (COMMONS et al., 2017). Zudem kann keine Aussage über den inneren, emotionalen Zustand einer Maus im FST getroffen werden, sodass der FST nicht als generell anwendbarer Verhaltenstest zur Detektion von depressionsassoziierten Verhaltenszüge gesehen werden darf (COMMONS et al., 2017). Nichtsdestotrotz eignet er sich, um Bewältigungsstrategien von akuten Stress-Situationen, welche durchaus relevant

für andere Verhaltensstörungen sind, zu erforschen. Ergebnisse müssen dabei umsichtig interpretiert und Limitationen berücksichtigt werden (COMMONS et al., 2017).

2.8. Neuro-Score

Der Irwin-Score, welcher eine systematische Testbatterie verschiedener Verhaltensparameter umfasst, wurde 1968 von Samuel Irwin entwickelt, um Nebenwirkungen von pharmakologischen Substanzen auf das autonome, zentrale und periphere Nervensystem zu detektieren (IRWIN, 1968). Seither wird er als Screening-Methode in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt (MOSCARDO et al., 2007; FONCK et al., 2015). Limitiert ist die Aussagekraft des Irwin-Scores durch die Subjektivität des Scorers sowie die Erhebung durch reines Beobachten des Tieres (MOSCARDO et al., 2007; FONCK et al., 2015). In unserer Arbeitsgruppe erwies sich ein modifizierter Irwin-Score, auch Neuro-Score genannt, als nützlicher Parameter zur Belastungseinschätzung: so war der modifizierte Irwin-Score der einzige veränderte Parameter in der chronischen Phase des intrahippocampalen Kainat-Epilepsiemodells (BUCHECKER et al., 2022). Erhöhte Irwin Scores wiesen auf eine Belastung in jungen *Scn1a*-A1783V haploinsuffizienten Mäusen hin (REIBER et al., 2022c).

2.9. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse reguliert hormonell die Reaktion von Säugetieren auf verschiedene Stressoren inklusive Schmerz. Als Reaktion auf Stressoren wird zum einen der Sympathikus des vegetativen Nervensystems aktiviert und zum anderen setzt der Hypothalamus das Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) frei. Dieses führt in der Adenohypophyse zur Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), welches wiederum in der Nebennierenrinde für die Freisetzung von Glukokortikoiden verantwortlich ist. Glukokortikoide zusammen mit Adrenalin und Noradrenalin, die durch die Aktivierung des Sympathikus von der Nebennierenrinde freigesetzt werden, befähigen den Körper zur Bewältigung des Stressors. Hierfür wird der Stoffwechsel zur schnellen Energiebereitstellung aktiviert, das Herzkreislaufsystem stimuliert, die Atmung vertieft und das Verhalten entsprechend angepasst. Die Aktivierung der Stressachse sorgt für eine zeitgleiche Ausschüttung von β -Endorphin, einem endogenen Opioid, aus der Adenohypophyse. Somit kommt es unter akutem Stress

zu vermindertem Schmerzempfinden. Der Mechanismus unterliegt einer negativen Rückkopplung, sodass bei chronischem Stress die Aktivität der Stressachse reduziert wird (VON ENGELHARDT et al., 2015).

Das murine Glukokortikoid, das Kortikosteron, oder dessen Abbauprodukt, (SPACKMAN und RILEY, 1978), kann in unterschiedlichem Probenmaterial wie Serum, Haaren oder Sekreten und Exkreten nachgewiesen und quantifiziert werden. Die Invasivität der Blutentnahme und deren direkter Einfluss auf den Kortikosteronspiegel, die Einschränkung über die Anzahl an wiederholten Blutentnahmen und die limitierte Aussagekraft über den Kortikosteronspiegel zu einem kurzen Zeitpunkt, sprechen gegen das Serum als Probenmaterial bei Mäusen (TOUMA et al., 2004). Touma und Kollegen (2003) entwickelten einen speziesspezifischen Enzym-Immunoassay für den Nachweis der Kortikosteronmetaboliten in murinen Fäzes und validierten diese Technik mit einem ACTH-Stimulations- und einem Dexamethason-Suppressionstest in vivo (TOUMA et al., 2004). Die Aktivierung der Stressachse führt zu einer Erhöhung der fäkalen Kortikosteronmetaboliten (FCM) nach acht bis zehn Stunden (TOUMA et al., 2004). Diese Verzögerung ist durch die Darmpassagezeit verursacht (PALME et al., 1996), welche bei der Maus zwischen vier und zehn Stunden beträgt (TOUMA et al., 2003; PADMANABHAN et al., 2013). Sie wird maßgeblich von der Aktivität der Maus im diurnalen Rhythmus beeinflusst (TOUMA et al., 2003). Zusätzlich zur Darmpassagezeit muss bei der Interpretation der FCM die zirkadiane Rhythmik (TOUMA und PALME, 2005; SOLLARS et al., 2014) und die zirkannuale Oszillation des Kortikosteronspiegels bedacht werden (KOLBE et al., 2015). Aufgrund der zirkadianen Freisetzung erreicht die Kortikosteronkonzentration einen Tiefpunkt zu Beginn der Lichtphase und einen Höhepunkt im ersten Drittel der Nachtphase (TOUMA et al., 2004). Mit zunehmendem Alter der Mäuse flacht die zirkadiane Oszillation ab und stammesabhängig kann es zu Veränderungen des Baselinekortikosteronspiegels kommen (KOLBE et al., 2015). Des Weiteren bestehen geschlechtsspezifische Unterschiede in der Metabolisierung und Exkretion der Kortikosteronmetaboliten (TOUMA et al., 2003), wobei für weibliche Mäuse deutlich höhere FCM Werte beschrieben wurden (TOUMA et al., 2004; REIBER et al., 2022b). Die Analyse der FCM informiert über den Stresslevel eines Tieres und eignet sich unter anderem für die Belastungseinschätzung in experimentellen Studien (KAHNAU et al., 2020).

2.10. Multimodale Belastungseinschätzung

Um die Multidimensionalität von Belastung (KEUBLER et al., 2020; ZECHNER et al., 2022) und die Komplexität von Schmerzen (TAPPE-THEODOR et al., 2019; TURNER et al., 2019) annäherungsweise zu quantifizieren, sollte eine Kombination mehrerer evidenzbasierter Parameter angewandt werden. Zechner und Kollegen (2022) stellten fest, dass eine Generalisierbarkeit von verschiedenen Parametern zur Belastungseinschätzung in der postoperativen Anwendung oder für gastrointestinale Modelle nicht gegeben war. So war es nicht möglich, anhand bestimmter, erhobener Parameter zwischen gesunden und erkrankten Tieren bei allen Tiermodellen zu unterscheiden; vielmehr waren die Parameter tiermodell-spezifisch verändert und ein direkter Vergleich der Belastung zwischen den Tiermodellen basierend auf den erhobenen Parametern daher nicht möglich (ZECHNER et al., 2022). Eine tiermodell-spezifische Veränderung von Parametern konnte auch in unserer Arbeitsgruppe anhand verschiedener Epilepsiemodelle festgestellt werden (VAN DIJK et al., 2020; REIBER et al., 2023). Darüber hinaus muss beachtet werden, dass insbesondere bei verhaltensbezogenen Parametern eine quantitative Varianz zwischen Ergebnissen verschiedener Laboratorien festgestellt wurde (JIRKOF et al., 2020b). Wenn mehrere Parameter zur Belastungseinschätzung analysiert werden, kann mit Hilfe von umfassenden statistischen und bioinformatischen Analysen ein zusammenfassender, informativer Mehrwert generiert werden (KEUBLER et al., 2020). Innerhalb der Forschergruppe DFG-2591 (DFG-FOR2591, 2024) wurde beispielsweise ein Algorithmus (*endpoint R*), welcher anhand der Entwicklung des Körpergewichts humane Endpunkte prognostizieren kann, für ein intrakranielles Gliom-Modell bei der Ratte entworfen (HELGERS et al., 2020). Mit Hilfe des Relative-Severity-Assessment-Scores (RELSA-Score) kann die Belastung von Versuchstieren anhand mehrerer quantitativer Parameter in Bezug auf einen Referenzdatensatz bestimmt werden. Somit lässt sich die Belastung experimenteller Gruppen sowie verschiedener Tiermodelle objektiv und evidenzbasiert vergleichen (TALBOT et al., 2022). Der RELSA-Score fand innerhalb der Forschergruppe DFG-2591 (DFG-FOR2591, 2024) bereits Anwendung in einer vergleichenden Belastungseinschätzung von depressionsassoziierten und gastrointestinalen Mausmodellen, wodurch eine evidenzbasierte Priorisierung geringer belasteter Tiermodelle möglich war (MALLIEN et al., 2022; TALBOT et al., 2023).

Composite Measure Scheme

Der bioinformatische Workflow für das Design eines spezies-, modell- und laborspezifischen *Composite Measure Schemes* (CMS) wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt (VAN DIJK et al., 2020). Der CMS ist ein Werkzeug, mit welchem man sensitive und informative Parameter zur evidenzbasierten Belastungseinschätzung identifizieren und darüber hinaus eine Belastungsklassifizierung anhand mehrerer, selektierter Parameter vornehmen kann (VAN DIJK et al., 2020). Verschiedene Tiermodelle können hinsichtlich ihrer Belastung direkt verglichen werden, sodass eine Tiermodellpriorisierung auf Basis des Tierschutzes stattfinden kann (VAN DIJK et al., 2020). Des Weiteren können mit Hilfe des CMS *Refinement*-Methoden validiert werden (VAN DIJK et al., 2020). Mehrere bioinformatische Arbeitsschritte wurden hierfür retrospektiv an Datensätzen von Ratten-Epilepsie-Modellen durchgeführt (VAN DIJK et al., 2020): vorerst fand eine Präselektion der Parameter statt, sodass nur Parameter mit informativem Mehrwert für eine Belastungseinschätzung verwendet wurden. Im Folgenden wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt und einer von zwei stark korrelierenden Parametern exkludiert. Mit jeweils 80 % des Datensatzes wurde nun 100-mal eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Relevante Parameter (im folgenden Hauptparameter genannt), welche bei den Hauptkomponentenanalysen wiederholt verantwortlich für die Varianz innerhalb des Datensatzes und die Auftrennung der experimentellen Gruppen waren, wurden identifiziert. Aus diesen Parametern wurde ein zusammengefasster Score gebildet. Dieser durchlief dann 100-mal eine Klusteranalyse, die auf maschinellem Lernen durch einen *unsupervised k-means* Algorithmus basierte. Hiermit wurden Tiere aller experimentellen Gruppen verschiedenen Belastungskategorien zugeordnet. Durch die 100-fache Wiederholung der Hauptkomponenten- und Klusteranalyse mit jeweils 80 % des Datensatzes konnte die Robustheit der Ergebnisse erhöht werden. Im Falle der Ratten-Epilepsie-Modelle konnten Wühlverhalten, Lokomotion im Open-Field, soziale Interaktion und der Saccharinpräferenztest als Hauptparameter identifiziert werden (VAN DIJK et al., 2020). Es konnte gezeigt werden, dass Ratten des elektrischen post-Status-Epilepticus (SE) -Modells, dicht gefolgt von Ratten des chemischen post-SE-Modells am stärksten belastet waren. Für Versuche mit Ratten-Epilepsie-Modellen, sollte demnach das Kindling-Modell als geringst belastetes Modell bevorzugt werden (VAN DIJK et al., 2020). Der CMS wurde

ebenfalls bei murinen Epilepsiemodellen und genetisch veränderten Mauslinien angewandt. Bei der Spezies Maus konnten keine Hauptparameter identifiziert werden, vielmehr waren mehrere, multidimensionale Parameter notwendig, um die tatsächliche Belastung bestmöglich widerzuspiegeln (REIBER et al., 2023). Bei murinen Epilepsiemodellen sollte das Kindling-Modell dem chemisch induzierten Kainat-Modell vorgezogen werden. Dabei sollte die Amygdala als Implantationslokalisierung der Tiefenstimulationselektrode im Vergleich zum Hippocampus für das Kindling-Modell präferiert werden (REIBER et al., 2023).

3. Einzel- und Gruppenhaltung von Labormäusen

3.1. Natürliches Sozialverhalten der Maus

Die Hausmaus (*Mus musculus*) konnte sich durch opportunistisches Verhalten, ihre Anpassungsfähigkeit und eine hohe Reproduktionsrate weltweit in verschiedenen Habitaten verbreiten. Man findet entweder wildlebende Hausmäuse in einer geringen Populationsdichte oder kommensale Hausmäuse in hoher Populationsdichte vor. Letztere leben in Koexistenz mit dem Menschen, wodurch sie mit ausreichenden Ressourcen wie Futter und Unterschlupf ausgestattet sind (BRONSON, 1979; LATHAM und MASON, 2004). Die Mauspopulation ist in sog. *Demes* oder Subpopulationen, welche sich größtenteils isoliert fortpflanzen, strukturiert (ZEGEREN, 1979). Eine solche Subpopulation, die in kommensalen, verdichteten Populationen vorherrscht (BRONSON, 1979), besteht aus einem dominanten Männchen, mehreren Weibchen und deren gemeinsamen Nachwuchs (BRONSON, 1979; ZEGEREN, 1979). Ursächlich für diese Populationsstruktur, ist das männliche Territorialverhalten der Hausmaus (ZEGEREN, 1979). Obwohl monogame Beziehungen bei der Hausmaus beschrieben worden sind (BERRY, 1970), pflanzen sich die Mäuse meist polygam innerhalb ihrer Subpopulation fort (KÖNIG, 1993; LATHAM und MASON, 2004). Dabei wird der Nachwuchs häufig gemeinschaftlich von mehreren Weibchen einer Subpopulation gesäugt und aufgezogen (KÖNIG, 1993). Dies wirkt sich positiv auf das Geburtsgewicht sowie bei verwandten Weibchen auf die Anzahl abgesetzter Jungtiere und deren Körpergewicht aus (KÖNIG, 1993). Das dominante Männchen etabliert für die Subpopulation ein räumliches Territorium, dessen Grenzen es wiederholt durch Uringeruchsmarkierungen absteckt (LATHAM und MASON, 2004). Diese Territorien sind in kommensalen Populationen kleiner, weisen stabile Grenzen auf

und müssen häufig verteidigt werden (BRONSON, 1979). In wildlebenden Populationen sind die Territorien größer, variieren in ihrer Ausdehnung und Lokation je nach Futterangebot und bedürfen weniger Verteidigung (BRONSON, 1979; LATHAM und MASON, 2004). Die Duftmarkierungen enthalten wertvolle Informationen über die Spezies, das Alter, das Geschlecht und den sozialen Status der Maus und sind somit ein Kommunikationsinstrument (HURST und BEYNON, 2004). Zudem geben nicht-flüchtige Proteine im Urin, sog. *major urinary proteins* (MUPs) eine einzigartige Zusammensetzung von volatilen Duftstoffen ab, welche die Erkennung eines jeden Individuums ermöglichen (ROBERTS et al., 2018). Die kompetitive Duftmarkierung und das räumlich-zeitliche Muster derer, spielt eine wichtige Rolle in der Kommunikation. Setzt beispielsweise ein unbekanntes Männchen eine Urinmarkierung in einem besetzten Territorium ab, demonstriert das dort dominante Männchen seine Vorherrschaft gegenüber Dritten, indem es möglichst schnell eine Gegenmarkierung hinterlässt (HURST und BEYNON, 2004). Die kompetitive Duftmarkierung wird nach einem vorausgegangenem Konflikt abhängig von dessen Ausgang adaptiert und intensiviert (MILLER et al., 2023). Die Duftmarkierungen ziehen darüber hinaus paarungsbereite Weibchen an und können deren Östruszyklus induzieren (DRICKAMER, 1997).

3.2. Aggressives Verhalten

Aggression kann als ein Verhalten definiert werden, woraufhin das zweite Tier mit Unterwerfung oder einem Gegenangriff auf den Aggressor reagieren muss (LIDSTER et al., 2019). Der Aggressor attackiert seinen Opponenten, kann eine *boxing position* stehend auf den Hinterbeinen einnehmen oder initiiert einen Kampf, bei welchem sich die Kontrahenten beißen, treten, miteinander ringen und umschlungen rollen (ZEGEREN, 1979). Der Opponent drückt seine submissive Haltung aus, indem er sich beispielsweise zusammenkauert, auf den Rücken legt oder flieht (ZEGEREN, 1979). Aggressives Verhalten dient der Verteidigung des Territoriums einer Subpopulation. Hierbei beteiligen sich alle Mäuse einer Subpopulation, wobei das dominante Männchen die führende Rolle einnimmt, um Nomaden oder Herausforderer abzuhalten (ZEGEREN, 1979; LATHAM und MASON, 2004). Des Weiteren dient die Aggressivität dominanter Männchen innerhalb einer Subpopulation dazu, untergeordneten, jungen Männchen, welche die sexuelle Reife erlangen, Grenzen aufzuzeigen (BRONSON, 1979; ZEGEREN, 1979). Da die Gefahr besteht, durch das dominante Männchen schwer verletzt oder

getötet zu werden (LATHAM und MASON, 2004), verlassen letztere daraufhin meist die Subpopulation, um ein eigenes Territorium zu etablieren (Dispersion) (BRONSON, 1979; ZEGEREN, 1979). Jedoch ist das Abwehrverhalten gegenüber subadulten Männchen innerhalb der Subpopulation sowie gegenüber unterlegenen Eindringlingen weniger ausgeprägt im Vergleich zu dem Abwehrverhalten gegenüber benachbarten, dominanten Männchen. In diesem Fall muss das Territorium verteidigt und die Abwehrkraft beider Männchen stetig reevaluiert werden (ZEGEREN, 1979). Diese Problematik ist zudem verschärft in Habitaten mit hoher Populationsdichte, wodurch die Territorien kleiner ausfallen und häufige Wechsel der dominanten Tiere auftreten. In wildlebenden Mauspopulationen mit einer geringen Populationsdichte ist es von verringerter Bedeutung, Territorien aufzubauen und diese zu verteidigen (BRONSON, 1979; ZEGEREN, 1979).

Weibchen zeigen vermehrt aggressives Verhalten kurz vor der Geburt und während der Laktationsphase (LATHAM und MASON, 2004). Dieses dient der Verteidigung des Nests und der Nachkommen, inklusive Nachkommen anderer Weibchen in gemeinschaftlich genutzten Nestern (BERRY, 1970; ZEGEREN, 1979). Des Weiteren wurde aggressives Verhalten im Kampf um Ressourcen bei wildlebenden Weibchen in geringer Populationsdichte beschrieben (FRYNTA et al., 2005).

3.2.1. Einflussfaktoren auf aggressives Verhalten

Verschiedene Faktoren können die Entstehung von Aggressivität unter männlichen Mäusen beeinflussen. Dazu gehören nicht nur die Populationsdichte und der damit einhergehende Kampf um Ressourcen, auch die Entwicklung vom Embryo bis zur adulten Maus spielt eine Rolle. Es wurde gezeigt, dass pränataler Stress durch Belastung des Muttertiers zu einer Feminisierung und verringerten Aggressivität der männlichen Nachkommen führt (KINSLEY und SVARE, 1986), was Chancen auf Fortpflanzung und den Aufbau eines Territoriums verringert (LATHAM und MASON, 2004). Ein Nahrungsentzug des Muttertiers während der Gestation wirkt sich negativ auf die Aggressivität und die Größe der akzessorischen Geschlechtsdrüsen der männlichen Nachkommen aus (MEIKLE und WESTBERG, 2001). Die Größe und Zusammensetzung der Würfe als auch die elterliche Pflege beeinflusst die Aggressivität der männlichen Mäuse im Erwachsenenalter (LATHAM und MASON, 2004). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die *attack latency* von Männchen, die in Würfen gemischten Geschlechtes aufwuchsen,

deutlich kürzer ausfielen als die von Männchen aus rein männlichen Würfen (MENDL, 1991b). Des Weiteren wiesen Mäuse aus großen Würfen mit einer geringeren Verfügbarkeit maternaler Milch initial eine erhöhte Aggressivität auf (RYAN und WEHMER, 1975). Um einen Einfluss der Genetik auf die Ausprägung der Aggressivität zu beweisen, ist es durch gezielte Selektion gelungen, einen SAL- (*short-attack-latency*) Mausstamm und einen LAL- (*long-attack-latency*) Mausstamm zu züchten (OORTMERSSSEN, 1981; BENUS et al., 1989). Weitere Züchtungen von aggressiven Mauslinien bestätigen die Heritabilität mutmaßlich durch verschiedene Gene auf dem Y-Chromosom (MICZEK et al., 2001). Des Weiteren kann die Präsenz von paarungsbereiten Weibchen aggressives Verhalten bei männlichen Tieren hervorrufen (MENDL, 1991b). Dies ist vermutlich durch einen Anstieg von Testosteron vermittelt (BATTY, 1978).

3.2.2. Parameter zur Quantifizierung aggressiven Verhaltens

Aggressives Verhalten kann quantifiziert werden, indem die soziale Interaktion der Mäuse direkt oder über Videoaufnahmen observiert wird. Dabei werden beispielsweise die Latenzzeit bis zur ersten Attacke, die Häufigkeit und Dauer von Kämpfen und bestimmte agonistische Verhaltensmuster erfasst (bspw. *tail rattling*, *mounting*, *boxing*, *attack*, *aggressive bite*, *chase* siehe <https://mousebehavior.org/> (GARNER et al., 2024)) (SIMON et al., 1983; KWIATKOWSKI et al., 2021). Dies kann beispielsweise innerhalb von 20 Minuten nach dem Käfigwechsel (MERTENS et al., 2019) oder nach Öffnen des Käfigs geschehen (THEIL et al., 2020). Durch den Resident-Intruder-Test kann territoriales Aggressionsverhalten provoziert werden, indem eine fremde Maus (*intruder*) in die gewohnte Umgebung einer bestehenden Maus (*resident*) verbracht wird (MENDL, 1991b; KWIATKOWSKI et al., 2021). Einige Studien plädieren für einen zusammengesetzten, einheitlichen Score, um die Quantifizierung aggressiven Verhaltens während des Testes mit oben genannten Parametern zu vereinheitlichen (SIMON et al., 1983; KWIATKOWSKI et al., 2021).

Indirekt kann das Ausmaß aggressiven Verhaltens an entstandenen Verletzungen der Haut abgeschätzt werden. Dabei wird die Haut der Mäuse entweder regelmäßig während der Studie adspektorisch untersucht (MERTENS et al., 2019; THEIL et al., 2020) oder nach der Euthanasie einer makroskopischen, pathologischen Untersuchung unterzogen (GASKILL et al., 2017; JIRKOF et al., 2020a; BARABAS et al., 2022). Gaskill und Kollegen (2017) entwickelten hierfür den

Pelt-Aggression-Lesion-Scale (PALS), um die Läsionen der Subkutis quantitativ pro Körperregion erheben zu können. Häufig betroffene Körperregionen von aggressionsassoziierten Verletzungen sind der hintere Rücken und der Schwanz (LIDSTER et al., 2019; BARABAS et al., 2022).

Information über die soziale Hierarchie und Dominanz innerhalb einer Subpopulation können durch die thermographische Analyse von Urinmarkierungsmustern (MILLER et al., 2023) oder über die Menge an produziertem Sperma und dem Gewicht der *Glandula vesicularis* erhoben werden (BAYRAM et al., 2020).

3.3. Abnormales Verhalten: *Barbering*

Barbering ist ein abnormales Verhalten, bei welchem eine Maus (*Barber*) einer anderen Maus (*Recipient*) oder sich selbst Fell und/ oder Tasthaare (*fur trimming* respektive *Vibrissen trimming*) ausreißt, wodurch idiosynkratische Muster von Haarlosigkeit entstehen (DUFOUR und GARNER, 2010). Dabei hält der *Barber* die andere Maus beispielsweise mit den Vorderpfoten im Nacken und Rückenbereich fest, fixiert mit den Schneidezähnen ein (Tast-)Haar, reißt dieses mit samt der Haarwurzel aus und manipuliert das ausgerissene (Tast-)Haar (SARNA et al., 2000). Beim Selbst-*Barbering* entstehen Allopeziemuster häufig an der Brust, Bauch- und Anogenitalregion sowie an den Innenseiten der Gliedmaßen, demnach hauptsächlich an ventralen Körperoberflächen (GARNER et al., 2004). Beim Fremd-*Barbering* hingegen sind vor allem die Tasthaare und dorsale Körperregionen wie das Gesicht und die Kopf- und Nackenregion betroffen (GARNER et al., 2004). Das *Barbering* tritt meist bei Erlangen der sexuellen Reife auf und das Risiko für *Barbering* steigt mit zunehmendem Alter der Mäuse (GARNER et al., 2004). Weibliche Mäuse und Mäuse, die für die Zucht verwendet werden, sind vermehrt betroffen (GARNER et al., 2004). *Barbering* tritt nicht nur in Käfigen gleichgeschlechtlicher Tiere auf, sondern auch während der Verpaarung oder während der Laktation, wobei entweder die Jungtiere Fell entlang der Gesäugeleiste des Muttertieres oder die Elterntiere Fell am kaudalen Rücken der Jungtiere entfernen (KALUEFF et al., 2006; DUFOUR und GARNER, 2010). Die Ätiologie von *Barbering* ist nicht abschließend erforscht, jedoch bestehen einige Theorien hierzu: die Annahme, dass *Barbering* ein Dominanzverhalten ist und der Etablierung einer sozialen Hierarchie dient (LONG, 1972), wurde mittlerweile widerlegt, da sich sowohl der *Barber* als auch der *Recipient* an der Ausübung

beteiligen (VAN DEN BROEK et al., 1993). Jedoch kann die soziale Rangordnung das Ausmaß an Alopezie durch *Barbering* beeinflussen, wobei sich dominante Mäuse dem *Barbering* weniger fügen als unterwürfige Mäuse (DUFOUR und GARNER, 2010). Die Coping-Hypothese plädiert dafür, dass *Barbering* der Verarbeitung von Stress, ausgelöst durch unnatürliche Haltungsbedingungen von Labormäusen, dient. Da *Barbering* aber keinen nachgewiesenen, adaptiven Mehrwert bietet, scheint die Pathologie-Hypothese, welche annimmt, dass dieses Verhalten durch eine abnormale Gehirnfunktion entsteht, naheliegender zu sein (DUFOUR und GARNER, 2010). Basierend darauf wurde *Barbering* bei der Labormaus als Tiermodell zur Erforschung der humanen Trichotillomanie, einer repetitiven Verhaltensstörung, bei welcher ebenfalls Haare ausgerissen werden, vorgeschlagen (GARNER et al., 2004). Das Auftreten von *Barbering* ist ein tierschutzrelevantes Problem sowohl für den *Recipient* als auch für den *Barber* selbst: die Alopezie beeinträchtigt die Thermoregulation und erhöht das Risiko für Hautverletzungen beim *Recipient*. Es wird spekuliert, dass der *Recipient* durch die Ausschüttung von Endorphinen das *Barbering* über sich ergehen lässt, obwohl das Ausreißen der Haare schmerzhaft ist (VAN DEN BROEK et al., 1993; SARNA et al., 2000). Zudem verliert der *Recipient*, insofern Tasthaare betroffen sind, ein wichtiges sensorisches Organ für die räumliche Orientierung (KAHNAU et al., 2022). Durch *whisking*, die aktive Bewegung der Vibrissen, werden taktile Informationen von einzelnen Vibrissen an säulenartig angeordnete Neuronengruppen im somatosensorischen Kortex weitergeleitet. Die taktilen Informationen werden dort summiert, sodass eine räumliche Karte entsteht, mit deren Hilfe sich die Maus auch bei schwacher Belichtung sicher fortbewegen kann (FILIPKOWSKI, 2000; PLUTA et al., 2017). Bei Mäusen ohne Tasthaare ist die Dichte der Dendriten in den säulenartig angeordneten Neuronengruppen verringert (SARNA et al., 2000). Der *Barber* selbst leidet unter einer maladaptiven Verhaltensstörung. Des Weiteren steigt die Gefahr einer Abszessbildung im Ober- und Unterkiefer, da die ausgerissenen Tasthaare nach Manipulation im *Sulcus gingivalis* zu Irritation und Entzündung des Zahnfleisches, der Zahnwurzel und des Kieferknochens führen können (LAWSON, 2010). *Barbering* sollte nicht nur aus Gründen des Tierschutzes, sondern auch aufgrund des potentiellen Einflusses auf die Studienqualität und Validität adressiert werden. Denn der Einsatz von *Barber*- und *Recipient*-Mäusen in Experimenten, insbesondere in Verhaltensexperimenten, bei welchen zur Orientierung intakte Tasthaare benötigt werden, ist äußerst

fragwürdig (KAHNAU et al., 2022).

3.4. Versuchstierhaltung

3.4.1. Status quo und rechtlicher Rahmen

Gemäß der RL 2010/63/EU ist für die Gesundheit und das Wohlergehen der Versuchstiere eine angemessene Unterbringung zu gewährleisten und die Einschränkungen bezüglich der Befriedigung von physiologischen und ethologischen Bedürfnissen auf ein Minimum zu reduzieren (Art. 33 Abs. 1a und b RL 2010/63/EU)⁶. Im Anhang III Art. 3 Abs. 3a RL 2010/63/EU⁵ ist die Unterbringung und Pflege der Tiere genauer dargelegt: Versuchstiere, welche in der Natur in einem Gruppenverbund leben, sollen demnach zu Versuchszwecken in stabilen, kompatiblen Gruppen untergebracht werden. Nur in Ausnahmen, aus Gründen der Wissenschaft, des Tierschutzes oder der Tiergesundheit (Art. 33, Abs. 3 RL 2010/63/EU)⁵, dürfen solche Versuchstiere einzeln gehalten werden. Die Dauer der Einzelhaltung soll auf das nötige Mindestmaß reduziert werden und es muss stets ein Sicht-, Hör-, Riech- und/ oder Berührungskontakt zu anderen Tieren aufrechterhalten bleiben. Die GV-Solas empfiehlt Jungtiere nach dem Absetzen in gleichgeschlechtlichen Gruppen, am besten bestehend aus Wurfgeschwistern, zu halten (DAMMANN et al., 2021). Adulte, weibliche Mäuse sollen ebenfalls in Gruppen von mindestens zwei Tieren gehalten werden (DAMMANN et al., 2021). Die Einzelhaltung von adulten männlichen Mäusen hingegen wird ab einem bestimmten, stammesabhängigen Alter als akzeptable Haltungsform angesehen (DAMMANN et al., 2021). Obwohl Mäuse in der Labortierhaltung nicht ihrem vollständigen, natürlichen Verhaltensrepertoire nachgehen können, ist das Verständnis der Biologie der wildlebenden Hausmaus relevant, um negative Einflüsse auf das Wohlergehen der Mäuse in Gefangenschaft erkennen und beheben zu können. In der Labortierhaltung existieren unter anderem zwei besonders tierschutzrelevante Problematiken: zum einen aggressives Verhalten in männlichen Gruppenhaltungen und zum anderen die Problematik des *Barberings*. Durch die räumliche Begrenzung innerhalb eines Käfigs kann beispielsweise ein submissives Männchen territorial aggressivem Verhalten eines dominanten Männchens nicht durch Flucht ausweichen (LATHAM und MASON, 2004).

⁶ Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ABI. EU L 276, 20.10.2010, S 33 -79.

Lidster und Kollegen (2019) untersuchten die Prävalenz von aggressionsbedingten Verletzungen an männlichen Mäusen, indem sie von 40 Tierhaltungen mit insgesamt 137.580 Mäusen über vier Wochen Informationen sammelten. Im Durchschnitt erlitten 1,53 % der männlichen Mäuse während des Untersuchungszeitraumes aggressionsbedingte Verletzungen (LIDSTER et al., 2019). Dabei fielen 2,94 % der Käfige mit männlichen Mäusen in Gruppenhaltung durch aggressionsbedingte Verletzungen auf (LIDSTER et al., 2019). Das Auftreten von Aggressionsverhalten kann jedoch höher liegen, wie eine Prävalenzstudie der Stanford University über den Zeitraum eines Jahres zeigte: in 13,8 % der Käfige mit männlichen Mäusen in Gruppenhaltungen wurde Kampfverhalten beobachtet (THEIL et al., 2020). Innerhalb der betroffenen Gruppenkäfige zeigten jedoch nur 13,8 % der männlichen Mäuse aggressionsbedingte Verletzungen (THEIL et al., 2020). Aggressionsbedingte Wunden wurden mit 15 % als die zweithäufigste spontane Erkrankung von Labormäusen identifiziert (MARX et al., 2013). Die Reduktion der komplexen und diversen Umwelt der wildlebenden Hausmaus zu einem experimentellen Haltungskäfig könnte einen Einfluss auf die Entstehung von abnormalem Verhalten wie Stereotypien oder *Barbering* haben (LATHAM und MASON, 2004). Eine präliminäre Umfrage zum Vorkommen von *Barbering* in 32 deutschen Tierhaltungen ergab, dass *Barbering* in jeder befragten Tierhaltung beobachtet wurde und meistens weniger als 10 % der Mäuse davon betroffen waren (KAHNAU et al., 2022). Garner und Kollegen (2004) identifizierten in ihrer Maushaltung 7,2 % der Mäuse als *Barber*. Das Auftreten von aggressionsbedingten Verletzungen und von *Barbering* stellt nicht nur ein tierindividuelles Tierschutzproblem dar, vielmehr führt eine Exklusion der Tiere aus Studien oder das Erreichen des humanen Endpunktes zu einer Erhöhung der benötigten Gesamtanzahl für einen Versuch (THEIL et al., 2020). Des Weiteren erhöhen aggressives Verhalten und *Barbering* die Varianz innerhalb eines Versuches, was die Aussagekraft der Ergebnisse beeinträchtigen könnte (THEIL et al., 2020; KAHNAU et al., 2022). Nachdem für eine Vielzahl an Parametern widerlegt wurde, dass der Sexualzyklus weiblicher Mäuse zu einer erhöhten Varianz der experimentellen Daten führt (PRENDERGAST et al., 2014), wurde postuliert das weibliche Geschlecht gleichermaßen in die präklinische Forschung zu involvieren, damit eine Translation der Forschungsergebnisse in die Humanmedizin für beide Geschlechter gerechtfertigt ist (CLAYTON und COLLINS, 2014). Um die

Ergebnisse einer experimentellen Studie jedoch vergleichbar zu machen, müsste die Haltungsform bei beiden Geschlechtern identisch sein oder dürfte die Varianz und die Studienqualität nicht beeinflussen (KAPPEL et al., 2017). Somit ist eine adäquate Haltungsform essentiell, um die Reproduzierbarkeit, Validität und Translation tierexperimenteller Studien als auch das Wohlergehen der Versuchstiere und die Reduktion von Tierversuchszahlen sicherzustellen. Eine wissenschaftliche begründete Einzelhaltung, insbesondere männlicher Mäuse, könnte ein Lösungsansatz sein (DAMMANN et al., 2021). Hierzu müssen die Einflüsse, welche die Einzel- und Gruppenhaltung auf das Wohlergehen, den affektiven Status und die Physiologie der Maus ausüben können, bekannt sein und im Kontext des Studiendesigns beurteilt werden (KAPPEL et al., 2017).

3.4.2. Vor- und Nachteile der Einzelhaltung

Ein offensichtlicher Vorteil der Einzelhaltung besteht in der Prävention von aggressionsbedingten Wunden und *Barbering* durch andere Mäuse. Wildlebende männliche Mäuse verbringen Phasen ihres Lebens, beispielweise während der Dispersion alleine (DAMMANN et al., 2021). Außerdem können männliche Mäuse in der Einzelhaltung ihr eigenes Territorium etablieren und bequem aufrechterhalten, sodass natürliche Verhaltensaspekte ausgelebt werden können (KAPPEL et al., 2017). Nach einer initialen Erhöhung des Kortikosteronspiegels zu Beginn der Einzelhaltung (ORTEGA-SAEZ et al., 2023), scheint der Stresslevel einzelgehaltener Mäuse geringer als in Gruppenhaltung (KAMAKURA et al., 2016). Des Weiteren zeigte eine Studie bei C57BL/6J Mäusen, dass der Fettanteil und der Knochenmineralisationsgrad bei einzeln gehaltenen Mäusen einheitlicher ist, wodurch die Varianz in Studien gesenkt werden kann (NAGY et al., 2002).

Die Einzelhaltung bringt jedoch auch einige Nachteile mit sich, da sie viele Effekte auf das Verhalten und die Physiologie der Mäuse ausübt (KAPPEL et al., 2017). Beispielsweise ist die Herzfrequenz von einzeln gehaltenen, männlichen NMRI Mäusen signifikant erhöht im Vergleich zu männlichen NMRI, welche mit ovariectomierten Weibchen zusammenleben (SPÄNI et al., 2003). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich die soziale Isolation negativ auf die Knochenzusammensetzung von männlichen, nicht jedoch von weiblichen Mäusen auswirkte (MOUNTAIN et al., 2023). Ebenso induzierte eine Einzelhaltung bei männlichen CD1 Mäusen eine Reduktion von Mono- und Granulozyten, welche eine wichtige Funktion in der Immunabwehr haben (ORTEGA-SAEZ et al., 2023).

Zudem zeigten einzeln gehaltene Männchen eine reduzierte Aktivität in ihrem Heimkäfig (FUNABASHI et al., 2022) und Unterbrechungen in ihrem zirkadianen Schlafmuster (SPÄNI et al., 2003). Außerdem wurde beobachtet, dass sozial isolierte männliche Mäuse vermehrtes angstassoziiertes Verhalten im Open-Field-Test und Elevated-Zero-Maze-Test sowie vermehrtes depressionsassoziiertes Verhalten im FST in Kombination mit einer Aktivierung der neuroendokrinen Stressachse zeigten (BERRY et al., 2012). Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen, ist bei Mausmodellen des „sozialen Isolationssyndroms“ mit Entzug von sämtlichen olfaktorischen, auditiven und visuellen Stimuli nach dem Absetzen der Jungtiere von einer entsprechenden Belastung auszugehen (KAPPEL et al., 2017).

3.4.3. Vor- und Nachteile der Gruppenhaltung

In der Gruppenhaltung können Mäuse ihrem natürlichen Verhalten im Kontakt zu Artgenossen nachkommen. Obwohl wildlebende, männliche Mäuse phasenweise alleine leben, verbringen sie als Jungtier und später als dominantes oder geduldetes, unterwürfiges Männchen viel Zeit in den Subpopulationen. Mehrere Studien belegen, dass auch männliche Labormäuse hoch motiviert sind, sozialen Kontakt zu Artgenossen aufzunehmen (KAPPEL et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass männliche Mäuse unabhängig von der sozialen Hierarchie oder Verwandtschaft die Nähe eines anderen Männchens einem leeren Käfig vorzogen (VAN LOO et al., 2001a). Männliche Mäuse bevorzugten auch eine gemeinsame Nestnutzung in Ruhephasen (VAN LOO et al., 2004; KAPPEL et al., 2017), was geringe positive Effekte auf die Thermoregulation mit sich bringen kann (MAHER et al., 2015). Ein weiterer Vorzug der Gruppenhaltung ist das sog. *social buffering* (KAPPEL et al., 2017). Dieses Phänomen, bei welchem Artgenossen einen positiven Einfluss auf die Bewältigung von aversiven Stimuli aus der Umwelt haben, wurde schon bei einigen Säugetieren beschrieben (KIKUSUI et al., 2006). Beispielsweise zeigten in Gruppen gehaltene Mäuse im Vergleich zu Mäusen in Einzelhaltung keine Entwicklung von angst- und depressionsassoziierten Verhaltensmustern nach mehrmaliger Exposition mit *restraint stress* (Stress durch Immobilisierung) (LIU et al., 2013). Die Gruppenhaltung erhöht zudem die nozizeptiven Schwellen nach Opioidgabe unter Geschwistertieren (D'AMATO und PAVONE, 1996) und hat geringe, positive Effekte auf die Erholungsphase nach einem operativen Eingriff (JIRKOF et al., 2012; TIRADO-MUÑIZ et al., 2023).

Abgesehen von den offensichtlichen Nachteilen, dass in Gruppenhaltung das Risiko

für aggressionsbedingte Wunden und *Barbering* vorhanden ist, kann sich die Gruppenhaltung von Männchen auch durch das Entstehen von sozialem Stress negativ auswirken. Innerhalb eines Käfigs können dabei statische oder dynamische Hierarchien entstehen. Varholick und Kollegen (2019) zeigten, dass Swiss Mäuse hauptsächlich dynamische Hierarchien aufbauten, welche sich über die Zeit veränderten. Routinepraktiken in der Labortierhaltung, wie beispielsweise der Käfigwechsel, stören die Kommunikation über Geruchsmarkierungen in einem Haltungskäfig und können neue Rankkämpfe forcieren (KAPPEL et al., 2017). Nicht nur unterwürfige, sondern auch dominante männliche Mäuse können unter sozialem Stress in der Gruppenhaltung leiden. Die dominanten Männchen müssen sich der Herausforderung stellen, ihre Position wiederholt zu verteidigen. Trotz häufiger Gewinne können dominante Männchen verstärktes aggressions- und angstassoziiertes Verhalten, Hyperaktivität und Stereotypien entwickeln (KUDRYAVTSEVA et al., 2014; KAPPEL et al., 2017). Auf der anderen Seite kann das unterwürfige Männchen sein submissives Verhalten nur bedingt demonstrieren, da die räumliche Begrenzung des Käfigs beispielsweise Fluchtverhalten unmöglich macht. Das unterwürfige Männchen läuft somit ständig Gefahr, das Dominanzverhalten des Territorialinhabers zu erwecken. Selbst ohne aggressionsbedingte Läsionen davonzutragen, kann das Wohlergehen unterwürfiger Männchen beeinträchtigt sein (KAPPEL et al., 2017). Unterwürfige Männchen zeigten beispielsweise ein beeinträchtigtes Lernvermögen im Vergleich zu dominanten Männchen, was auch nach einer Änderung der Haltungsförm noch bestehen blieb (FITCHETT et al., 2005). Des Weiteren zeigten unterwürfige Männchen gefüllte Harnblasen und ein zurückhaltendes Urinabsatzverhalten im Gruppenkäfig, was Unbehagen hervorrufen könnte (DESJARDINS et al., 1973; KAPPEL et al., 2017). Die soziale Dominanz und Rangordnung innerhalb von Gruppenhaltungen verursachten nachweislich eine phänotypische Varianz in klassischen Verhaltenstests (VARHOLICK et al., 2019) und in der Körperzusammensetzung (NAGY et al., 2002). Da teils widersprüchliche Studienergebnisse vorliegen, muss noch weiter an der Auswirkung von sozialen Rangordnungen auf das Wohlbefinden von männlichen Labormäusen geforscht werden (KAPPEL et al., 2017).

3.4.4. Refinement in der Versuchstierhaltung

Die Gründe für die Entstehung von aggressivem Verhalten bei männlichen

Gruppenhaltungen sind multifaktoriell. Mehrere Studien identifizierten einige Einflussfaktoren, welche gleichzeitig auch einen Ansatzpunkt für entsprechende *Refinement*-Maßnahmen zur Prävention von Aggressivität in Labortierhaltungen darstellen (siehe Tab. 1) (GASKILL et al., 2017; LIDSTER et al., 2019; JIRKOF et al., 2020a; THEIL et al., 2020; WEBER et al., 2022). Aggressives Verhalten ist in Mausstämmen unterschiedlich stark ausgeprägt. Während C57BL/6J- und BALB/C-Mausstämme eine geringe Prävalenz für aggressionsbedingte Verletzungen aufwiesen, zeigten CD1-, DBA-, CBA- und C3H-Linien in aufsteigender Reihenfolge eine höhere Prävalenz (LIDSTER et al., 2019; WEBER et al., 2022). Studienergebnisse bezüglich mancher Einflussfaktoren widersprechen sich jedoch teilweise (KAPPEL et al., 2017; LIDSTER et al., 2019; THEIL et al., 2020). Beispielsweise ist der Nutzen von *Enrichment* für die Reduktion des aggressiven Verhaltens in männlichen Gruppenhaltungen umstritten. Manche Studien beschrieben eine Verringerung aggressiven Verhaltens durch den Einsatz von *Enrichment* (AMBROSE und MORTON, 2000; OLSSON und DAHLBORN, 2002), andere berichteten jedoch beim Einsatz von beispielsweise einem Laufrad (HOWERTON et al., 2008) von einer gesteigerten Aggressivität (OLSSON und DAHLBORN, 2002; MARASHI et al., 2003). Möglicherweise induziert *Enrichment* einen Kampf um vorhandene Ressourcen innerhalb eines Käfigs, sodass vermehrt aggressives Verhalten auftritt (WEBER et al., 2017). Außerdem wird diskutiert, dass unveränderbares *Enrichment* wie Maushäuser aggressives Verhalten fördern, wohingegen veränderbares *Enrichment* wie Nestmaterial aggressives Verhalten mildern könnte (HOWERTON et al., 2008; KAPPEL et al., 2017). Diese Annahme wurde durch einen kürzlich veröffentlichten *Systematic Review* zur Aggression bei männlichen Gruppenhaltungen von Weber und Kollegen (2022) belegt: nur 20 % der inkludierten Studien berichteten von einem Anstieg der Aggression durch *Enrichment*, wobei hauptsächlich nicht veränderbares *Enrichment* wie Laufräder und Maushäuser ursächlich waren. Hohlbaum und Kollegen (2020) konnten keine positiven Auswirkungen einer alternativen Haltungform feststellen, bei welcher Männchen paarweise in einem Käfig mit Trennwand gehalten wurden, die visuelle und olfaktorische Kontaktaufnahme erlaubte. Weitere Forschung mit Fokus auf der Belastungseinschätzung von Einzel- und Gruppenhaltung inklusive verschiedener Rangordnungen, auf Schmerzen und aversiven Stimuli, auf Erlangen sozialer Kontrolle (freie Auswahl des Käfigpartnertieres) und auf Defiziten in der sozialen Kommunikation zwischen

Mäusen ist notwendig, um die Kausalitäten des aggressiven Verhaltens in der Labortierhaltung zu verstehen und nachhaltig intervenieren zu können (KAPPEL et al., 2017; WEBER et al., 2017).

Einflussfaktoren	Effekte möglicher <i>Refinement</i> -Ansätze
Jahreszeit	<ul style="list-style-type: none"> • Studienplanung präferentiell in Wintermonaten, da erhöhtes Risiko für aggressives Verhalten in den Sommermonaten (THEIL et al., 2020)
Absetzen vom Muttertier	<ul style="list-style-type: none"> • Bei frühem Absetzen weniger Läsionen (PALS) (14 < 21 < 28 Tage) • Durchmischen von Jungtieren nach Absetzen bis zum Verschicken durch den Züchter hat keinen Einfluss auf Entstehung von Läsionen (PALS) (GASKILL et al., 2017)
Gruppenzusammensetzung	<ul style="list-style-type: none"> • Randomisiertes Einsetzen der Mäuse nach Lieferung durch den Züchter erhöht aggressionsbedingte Verletzungen (LIDSTER et al., 2019) • Weniger Läsionen (PALS) in 3er als in 2er Gruppenhaltung (JIRKOF et al., 2020a) • Mehr aggressionsbedingte Verletzungen in 3er, weniger in 5er Gruppenhaltungen (LIDSTER et al., 2019) • Weniger Aggression in 3er bis 5er als in 8er Gruppenhaltungen (VAN LOO et al., 2001b) • Haltung mit Geschwistern reduziert aggressionsbedingte Verletzungen (LIDSTER et al., 2019)
Handling	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Tail Handling</i> führte im Vergleich zu Pinzetten- oder Tunnel-Handling nicht zu verstärkten Aggressionen nach dem Käfigwechsel (MERTENS et al., 2019) • Tägliches <i>Handling</i> reduzierte Läsionen (PALS) im Vergleich zu einmal wöchentlichem <i>Handling</i> (JIRKOF et al., 2020a)
Käfigwechsel	<ul style="list-style-type: none"> • Spot-Cleaning (Ausmisten von Kleinflächen) reduzierte aggressionsbedingte Läsionen (LIDSTER et al., 2019) • Transfer von gebrauchtem Nestmaterial reduzierte aggressionsbedingte Läsionen,

	Transfer von gebrauchter Einstreu erhöhte diese (VAN LOO et al., 2000; LIDSTER et al., 2019)
Haltungssystem	<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhtes Risiko für aggressives Verhalten in IVC-Käfigen mit Maiskolbeneinstreu als in offenen Käfigen mit Holzschnitzeinstreu (THEIL et al., 2020) • Erhöhtes Risiko für aggressives Verhalten in oberen Reihen des Käfiggestells (THEIL et al., 2020) • Erhöhtes Risiko für aggressives Verhalten, wenn das Käfiggestell parallel zur Wand angeordnet war (THEIL et al., 2020)
Markierungsmethode	<ul style="list-style-type: none"> • Bei Schwanztätowierung weniger Läsionen (PALS) als bei Ohrlochung (GASKILL et al., 2017)

Tabelle 1: Refinement-Ansätze.

Übersicht einer Literaturrecherche zu Effekten von möglichen *Refinement*-Ansätzen für die Gruppenhaltung männlicher Mäuse.

Im Gegensatz zur Prävention von Aggression scheint *Enrichment* wertvoll in der Reduktion von *Barbering* in Gruppenhaltungskäfigen zu sein. Die Prävalenz von *Barbering* war signifikant reduziert bei Mäusen, welche in einem angereicherten Käfig (Unterschlupf und Baumwollnestmaterial immer verfügbar, zusätzliches Nestmaterial und ein weiteres *Enrichment* zweiwöchentlich rotierend) im Vergleich zu einem Käfig mit Standardausstattung (Unterschlupf und Baumwollnestmaterial), gehalten wurden (BECHARD et al., 2011). Dabei schien ein Papiertaschentuch und ein in Nestform dargereicherter Papierstreifen das zu präferierende Nestmaterial für die Reduktion von *Barbering* zu sein (MOODY et al., 2021).

4. Postoperativer Schmerz und Analgesie

4.1. Pathophysiologie des Schmerzes

Es muss zwischen den Begriffen „Nozizeption“ und „Schmerz“ differenziert werden. Schmerz beim Menschen wurde als subjektive, emotionale Empfindung von der IASP (*International Association for the Study of Pain*) 2020 wie folgt definiert: “An unpleasant sensory and emotional experience associated with, or resembling that associated with, actual or potential tissue damage” (RAJA et al.,

2020). Schmerz beim Tier hingegen ist „eine aversive sensorische Erfahrung, die durch aktuelle oder potenzielle Verletzungen verursacht wird, protektive motorische oder vegetative Reaktionen auslöst, zur erlernten Vermeidung solcher Reize führt und somit das Verhalten modifiziert“ (VON ENGELHARDT et al., 2015). Analog zum Menschen, kann auch bei Wirbeltieren von einer affektiven Erfahrung im Zusammenhang mit Schmerz ausgegangen werden (VON ENGELHARDT et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Des Weiteren ist zu betonen, dass alle Wirbeltiere, insbesondere Säugetiere und Vögel, Schmerzen empfinden können (GEBHART et al., 2009; FOLEY et al., 2019). Das nozizeptive System umfasst das periphere und zentrale Nervensystem und dient der Erkennung, Weiterleitung und Verarbeitung von potentiell gewebeschädigenden Stimuli, sog. Noxen (VON ENGELHARDT et al., 2015). Die Nozizeption ist am Beispiel einer Hautinzision zur Vorbereitung eines neurochirurgischen Eingriffes bei der Maus schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Noxische Reize oder periphere Mediatoren, die bei Gewebeschädigung frei werden, können von zwei verschiedenen Nozizeptortypen wahrgenommen werden: Mechanonozizeptoren werden durch hohe, mechanische Reize erregt und geben die Information über schnell leitende, myelinisierte A δ Fasern weiter an das ZNS (Zentrales Nervensystem). Die Aktivierung der Mechanonozizeptoren resultiert in scharfem, kurzem Schmerz. Polymodale Nozizeptoren hingegen werden durch mechanische, thermische oder chemische Noxen aktiviert und geben diese Information über langsam leitende, unmyelinisierte C-Fasern an das ZNS weiter, was sich in diffusen, dumpfen Schmerzen äußert (GEBHART et al., 2009; VON ENGELHARDT et al., 2015). Die Signale der peripheren Nozizeptoren werden über Synapsen im Dorsalhorn des Rückenmarkes umgeschaltet. Hier können direkt motorische Neurone des ipsi- oder kontralateralen Ventralhorns aktiviert werden, sodass motorische Schutzreflexe wie beispielsweise Wegziehreflexe von dem schädigenden Reiz erfolgen (VON ENGELHARDT et al., 2015). Zudem können direkt präganglionäre, sympathische Neurone moduliert und sympathische Reflexe aktiviert werden (VON ENGELHARDT et al., 2015). Die Weiterleitung der Information über noxische Reize zum Gehirn erfolgt über aufsteigende Bahnen, wie den *Tractus spinoreticularis* zur *Formatio reticularis* im Hirnstamm, den *Tractus spinomesencephalicus* zum Mittelhirn und *spinothalamicus* zum Thalamus (GEBHART et al., 2009). Im Hirnstamm und im Hypothalamus wird das vegetative Nervensystem als Reaktion auf den noxischen Reiz aktiviert. Thalamische Neurone

projizieren die Information in den somatosensorischen Cortex, wo die bewusste Wahrnehmung und die Lokalisation der noxischen Reize vermittelt werden (GEBHART et al., 2009; VON ENGELHARDT et al., 2015). Die affektive Bewertung des noxischen Reizes findet im limbischen System statt. Die Aktivierung des nozizeptiven Systems inklusive ausgelöster Reaktionen kann ohne die Empfindung von Schmerz vorstattengehen. Erst die Prozessierung des noxischen Reizes im cerebralen Cortex führt letztendlich zur Wahrnehmung von Schmerz (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Das nozizeptive System weist eine Plastizität auf, sodass beispielsweise Entzündungsprozesse eine Sensibilisierung des nozizeptiven Systems nach sich ziehen. So kann es zu Hyperalgesie, einer verstärkten Schmerzwahrnehmung bei noxischen Reizen, oder gar zur Allodynie, einer Schmerzwahrnehmung bei nicht-noxischen Reizen kommen (GEBHART et al., 2009; VON ENGELHARDT et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Schmerz kann nach folgenden Kriterien klassifiziert werden: Anatomie (Lokalisation), Ätiologie (Ursache), Intensität, Dauer (akut, persistierend, chronisch) und Pathophysiologie (ORR et al., 2017). Bei der pathophysiologischen Klassifizierung unterscheidet man zwischen nozizeptivem Schmerz und neuropathischem Schmerz. Nozizeptiver Schmerz entsteht wie oben beschrieben über die Aktivierung von Nozizeptoren und stellt einen physiologischen Schutzmechanismus dar. Je nach Herkunft kann dabei zwischen viszeralem Schmerz (Organe in Brust-, Bauch- und Beckenhöhle betreffend) und somatischem Schmerz (Haut und muskuloskelettales System betreffend) unterschieden werden. Neuropathischer Schmerz resultiert aus einer Läsion am peripheren und zentralen Nervensystem selbst (ORR et al., 2017). Die Aktivierung des nozizeptiven Systems und/oder die Empfindung von Schmerz hat weitreichende physiologische Folgen: durch die Aktivierung des vegetativen Nervensystems, insbesondere des Sympathikus kommt es zu kardiovaskulären und respiratorischen Veränderungen (VON ENGELHARDT et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). So konnte nach dem operativen Eingriff der Laparotomie bei Mäusen ohne Analgesie eine erhöhte Herzfrequenz und Körpertemperatur und eine erniedrigte Herzratenvariabilität festgestellt werden (ARRAS et al., 2007). Über die Aktivierung des Hypothalamus im noxischen System wird ebenfalls die Hypothalamus-Hypophysen-Achse angeregt. Dies führt insbesondere bei starken Schmerzen zu erhöhten Katecholamin-, Glukagon-, ACTH- und Cortisolserumspiegeln. Bei chronischen Schmerzen wird die Hypothalamus-

Hypophysen-Achse herunterreguliert und es kann zu einem Mangel an bestimmten Hormonen kommen (TENNANT, 2013; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Das nozizeptive System ist zudem stark mit dem Immunsystem verbunden. Lang anhaltender Schmerz kann zu Immunsuppression (DEMARCO und NUNAMAKER, 2019) und erhöhtem Krebswachstum führen (LARSON et al., 2019).

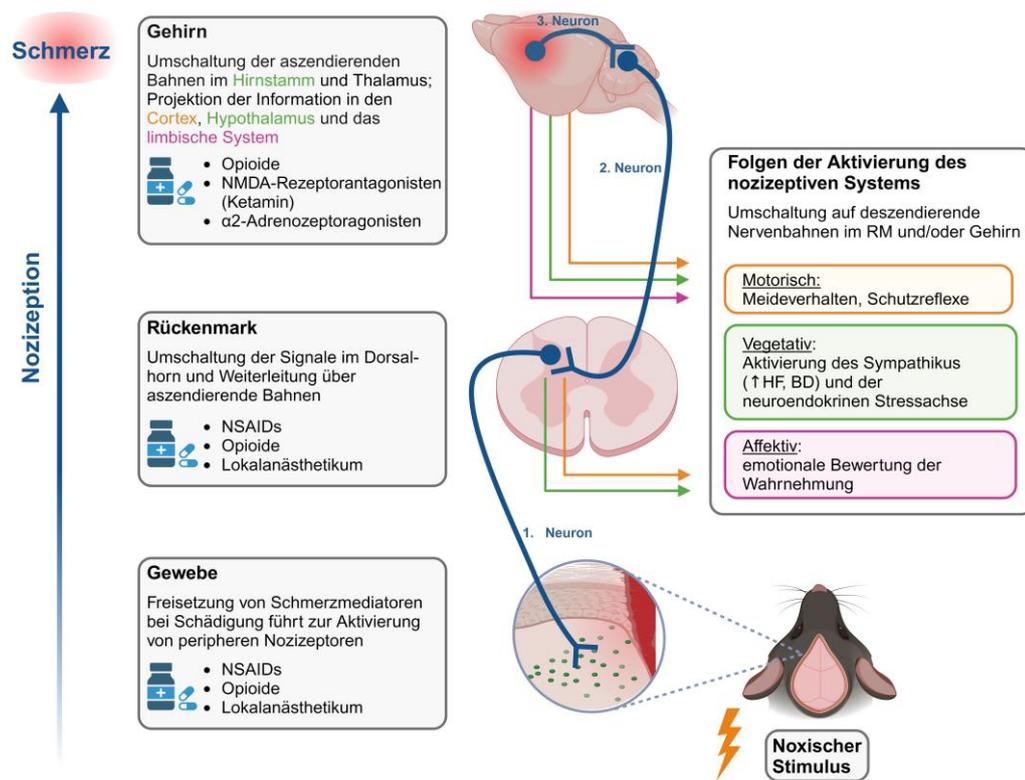


Abbildung 1: Das nozizeptive System.

Das nozizeptive System ist in dieser Abbildung schematisch dargestellt. Die Aktivierung peripherer Nozizeptoren durch Noxe, beispielsweise durch eine Hautinzision für die Vorbereitung eines neurochirurgischen Eingriffs sowie die Weiterleitung dieser Information über das Rückenmark, die aufsteigenden Nervenbahnen, den Hirnstamm und Thalamus, ist hier veranschaulicht. Erst die Projektion der Information über die Noxe auf den somatosensorischen Cortex führt zur bewussten Schmerzempfindung und -lokalisierung. Motorische, vegetative und affektive Folgen der Aktivierung des nozizeptiven Systems werden durch absteigende Nervenbahnen vom Rückenmark und/oder vom Gehirn vermittelt. Mehrere pharmakologische Wirkstoffklassen können auf unterschiedlichen Ebenen des nozizeptiven Systems die Nozizeption oder die Schmerzempfindung beeinflussen und damit eine analgetische Wirkung entfalten. NMDA = *N*-Methyl-D-Aspartat, NSAIDs = *non-steroidal anti-inflammatory drugs*, RM = Rückenmark, HF = Herzfrequenz, BD = Blutdruck, \uparrow = Anstieg. Erstellt mit BioRender.com.

4.1.1. Schmerz bei neurochirurgischen Eingriffen

Die Kraniotomie ist eine neurochirurgische Operation, bei welcher ein Teil des Schädelknochens temporär entfernt wird, um einen intrakraniellen Eingriff vornehmen zu können. In der Humanmedizin wird dieser Eingriff zur Behandlung von intrakraniellen Hämatomen, Tumoren, Aneurysmen und Gefäßfehlbildungen angewandt (FERNÁNDEZ-DE THOMAS et al., 2023). In der neurowissenschaftlichen Forschung wird dieser Eingriff häufig bei Mäusen durchgeführt, um über intrakranielle Implantate das Elektroenzephalogramm abzuleiten, bestimmte Hirnareale elektrisch zu stimulieren oder Substanzen zu applizieren (CHO et al., 2019; KING et al., 2023). Dabei erfolgt der Zugang zum Gehirn oft über kleine Trepanationen, sodass keine ganzen Teile des Schädelknochens entfernt und anschließend wieder eingesetzt werden müssen. Somit ist der Begriff Kraniotomie für den neurochirurgischen Eingriff, der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt wurde, nicht definitionsgemäß angewandt, wird aber im Folgenden als treffendste Beschreibung verwendet. Die Kraniotomie war in der retrospektiven Analyse von Tierversuchsanträgen, die 2010 in Deutschland eingereicht worden sind, bei Ratten der zweithäufigste, bei Mäusen der dritthäufigste geplante chirurgische Eingriff (HERRMANN und FLECKNELL, 2019). Kraniotomieinduzierter Schmerz wird der somatischen Schmerzqualität zugeordnet: dieser resultiert aus der Stimulation von Nozizeptoren durch die Inzision der Kopfhaut, die Retraktion des subkutanen Bindegewebes, der *Galea aponeurotica* sowie der perikraniellen Muskulatur und durch das Entfernen des Periosts zur Freilegung des knöchernen Schädels. Der postoperative Schmerz wird deswegen hauptsächlich an der Inzisionsstelle und dem umgebenden Gewebe als pulsierend und pochend wahrgenommen. Verletzungen der Meningen sowie veränderter intrakranieller Druck auf die Meningen, können zudem einen diffusen, dumpfen Kopfschmerz neuropathischer Natur auslösen. Der knöcherne Schädel und das Gehirn selbst sind nicht sensibel innerviert (DE GRAY und MATTA, 2005; DUNN et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2017; LUTMAN et al., 2018). Kraniotomieinduzierter Schmerz wurde in der Humanmedizin lange unterschätzt. Neuere Studien zeigen, dass 69 % der Patienten am ersten postoperativen Tag und 48 % am zweiten postoperativen Tag über moderate bis schwere Schmerzen berichteten und inadäquat analgetisch versorgt wurden (GOTTSCHALK et al., 2007). Das perioperative Schmerzmanagement bei Humanpatienten ist herausfordernd: der Einsatz von Opioiden ist meist kontraindiziert, da

Nebenwirkungen wie Sedation die neurologische Untersuchung intra- oder postoperativ beeinträchtigen und es zu einer Steigerung des intrakraniellen Hirndruckes kommen kann (BELLO et al., 2022). Daher wird häufiger auf eine Kombination aus Paracetamol, NSAIDs und Lokalanästhesie zurückgegriffen. Andererseits führt inadäquat behandelter Schmerz zu einem systemischen Blutdruckanstieg und erhöht damit die Gefahr intrakranieller Blutungen und erhöhter Mortalität (DUNN et al., 2016). Kraniotomieinduzierte Kopfschmerzen (*Post-craniotomy headache*, PCH) sind eine häufige Folge des chirurgischen Eingriffs und chronifizieren bei 30 % der Patientinnen und Patienten (BELLO et al., 2022). In der multifaktoriellen Pathogenese der PCH spielen Nervenschädigungen, die Entstehung von Neuomen, die Bildung von Adhäsionen zwischen Meningen und anderem Gewebe oder die Verletzung der Muskulatur eine Rolle (BELLO et al., 2022). Mitglieder der ACLAM (*American College of Laboratory Animal Medicine*) Taskforce stuften den kraniotomieinduzierten Schmerz bei Versuchstieren als mild bis moderat ein (KOHN et al., 2007). Durch die Anwendung des *WWHow*-Konzeptes, mit dem prospektiv, anhand der Lokalisation des Operationsgebiets (*Where*), der betroffenen anatomischen Strukturen (*What*) und der methodischen Aspekte (*How*) die postoperative Belastung kategorisiert werden kann, wurde die Belastung nach Kraniotomien als gering eingestuft (TAPPE-THEODOR et al., 2022). Diese Einstufung ist insbesondere im Hinblick auf die Berichte aus der Humanmedizin kritisch zu hinterfragen (KING et al., 2023). Mit Hilfe des MGS konnte bei CD1 und C57BL/6N Mäusen ohne analgetische Versorgung, Schmerz nach einer Kraniotomie für mindestens 48 Stunden nachgewiesen werden (CHO et al., 2019).

4.1.2. Postoperative Schmerzerkennung

Das Erkennen von postoperativem Schmerz bei Labormäusen ist die Voraussetzung für *Refinement* und ein gezieltes Eingreifen im Versuch. Eine korrekte Einschätzung des postoperativen Schmerzes inklusive Dauer und Intensität ist nötig für ein gelungenes Schmerzmanagement, die Definition und Anwendung von humanen Endpunkten und die abschließende Belastungsbeurteilung (GEBHART et al., 2009; FLECKNELL, 2018). Mehrere Faktoren erschweren jedoch die Schmerzerkennung bei Labormäusen: zu der offensichtlichen Non-Verbalität kommt hinzu, dass Mäuse als Beutetiere versuchen, Schmerzen weitgehend zu verbergen, um nicht von Raubtieren als leichtes Opfer identifiziert zu werden

(ARRAS et al., 2007; VON ENGELHARDT et al., 2015). Das Phänomen Schmerzenszustände zu verbergen, tritt in der Anwesenheit von Menschen ebenso auf (ARRAS et al., 2007; TURNER et al., 2019). Das *Handling* der Labormaus, insbesondere von männlichen Mitarbeitern, kann zudem eine stressinduzierte transiente Analgesie auslösen (SORGE et al., 2014; TURNER et al., 2019). Diese Faktoren können die Aussagekraft des täglich durchgeführten klinischen Scorings verfälschen. Der klinische Score erfasst subjektiv schmerzassoziierte Veränderungen wie reduzierte Aktivität, reduzierte Fellpflege, Piloerektion, reduziertes Körpergewicht infolge von geringer Futteraufnahme, gekrümmte Körperhaltung, apathisches oder aggressives Verhalten, verändertes Verhalten in der Gruppe und Vokalisation (ARRAS et al., 2007; GEBHART et al., 2009; VON ENGELHARDT et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Der klinische Score zeigt oft erst moderate bis schwere Schmerzen an (KOHN et al., 2007; TURNER et al., 2019), sodass weitere, sensitive, optimalerweise objektive und nicht durch *Handling* beeinflusste Parameter nötig sind. In Tabelle 2 sind durch Schmerz induzierte Veränderungen physiologischer, verhaltensbezogener und biochemischer Parameter für die Anwendung bei der Labormaus aufgelistet. Zur Erhebung mancher Parameter muss die Maus aus ihrem Heimkäfig entnommen werden (ex HK) oder ein operativer Eingriff zur Implantation von Transmittern wird benötigt (TI). Viele der folgenden Parameter können jedoch durch Videoaufnahmen und analytische Softwares im Heimkäfig der Labormaus ohne menschliche Interaktion erhoben werden (HK). Dadurch kann die Transmitterimplantation zunehmend durch nicht-invasive Methoden ersetzt werden.

Schmerzinduzierte Parameterveränderung		HK	TI	Ex HK
physiologisch	Reduktion des Körpergewichts (ADAMSON et al., 2010; JIRKOF et al., 2015)			√
	Erhöhung der Herzfrequenz , Reduktion der Herzratenvariabilität (ARRAS et al., 2007; MÖSCH et al., 2023)	√	√	
	Erhöhung der Atemfrequenz (TURNER et al., 2019; BREUER et al., 2023)	√	√	
	Erhöhung der Körpertemperatur (ARRAS et al., 2007; MÖSCH et al., 2023)	√	√	
verhaltensbezogen	Reduktion der Aktivität (im Heimkäfig und auf dem Laufrad) (ADAMSON et al., 2010; DURST et al., 2021)	√	√	
	Ethogramm : verändertes Auftreten von physiologischen Verhaltensmustern wie <i>Rearing, Sniffing, Walking, Stretching</i> ; verstärktes Auftreten von schmerzassoziierten Verhaltensmustern wie <i>Writhing, Pressing down, Arching, Scratching wound</i> nach einer Laparotomie (ROUGHAN et al., 2009; LEACH et al., 2012; MILLER et al., 2012; ROUGHAN et al., 2016)	√		
	Einstellen von sog. Luxusverhalten wie Wühl-, Nestbau- und Fellpflegeverhalten (JIRKOF et al., 2010; JIRKOF et al., 2013; EVANGELISTA-VAZ et al., 2018; OLIVER et al., 2018; FURUMOTO et al., 2022)	√		
	Veränderte Vokalisation im Ultraschallbereich (SMITH et al., 2020)	√		
	Vorhandenes Schmerzgesicht (MGS) (MATSUMIYA et al., 2012; CHO et al., 2019)			√
	Anhedonie (Saccharine Präferenz Test) (ULKER et al., 2022)	√		
	Veränderte Motivation der spontanen Analgetikaaufnahme im Conditioned-Place-Preference/ Avoidance-Test (ROUGHAN et al., 2014; TAPPE-THEODOR et al., 2019)			√
	Veränderungen in angst- und depressionassoziierten Verhaltenstests (SELLMEIJER et al., 2018; TAPPE-THEODOR et al., 2019)			√

biochemisch	Erhöhte Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse: Nachweis von Stresshormonmetaboliten in Blut, Haaren und Fäzes (WRIGHT-WILLIAMS et al., 2007; ADAMSON et al., 2010; DURST et al., 2021)	√		√
--------------------	--	---	--	---

Tabelle 2: Schmerzinduzierte Veränderung von Parametern.

Die Erhebung der physiologischen, verhaltensbezogenen und biochemischen Parameter kann heimkäfgebasiert (HK), durch die vorausgegangene Implantation von Transmittern (TI) im Heimkäfig oder durch Entnahme des Tieres aus dem Heimkäfig (ex HK) erfolgen.

Die Limitation der aufgeführten Parameter ist ihre mangelnde Spezifität für Schmerz. So wird beispielsweise die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse auch bei Stress durch *Handling* aktiviert oder die Herzfrequenz wird durch Einzelhaltung erhöht (SPÄNI et al., 2003; TURNER et al., 2019). Die Veränderung eines einzelnen Parameters sollte daher besser im Kontext eines multidimensionalen Konzeptes für die Erfassung postoperativer Schmerzen interpretiert werden (TURNER et al., 2019). Des Weiteren sind Parameter und Methoden gefordert, welche kostengünstig sind, leicht in bestehende In-vivo-Versuche integriert werden können und eine Beurteilung der Tiere zeitgleich zum Versuch ermöglichen, sodass eine rechtzeitige Intervention möglich ist (GEBHART et al., 2009). Mit algometrischen Assays wie dem Hot-Plate-Test, Tail-Flick-Test oder von Frey-Test lassen sich die Nozizeption auf einen noxischen Reiz (thermischer Reiz bei Hot-Plate- und Tail-Flick-Test) untersuchen (FLECKNELL, 2018; TURNER et al., 2019). Zwar erhöhte sich die Reaktionszeit auf die noxischen Reize bei der Gabe von Analgetika (ZELCER et al., 2005; MIRANDA et al., 2018), jedoch können diese Assays nicht die Affektivität und die Komplexität von postoperativen Schmerzen abbilden (FLECKNELL, 2018; FOLEY et al., 2019; TURNER et al., 2019). Es ist zu betonen, dass sich (postoperativer) Schmerz bei Versuchstieren aufgrund seiner subjektiven und affektiven Komponenten nicht exakt quantifizieren lassen kann. Vielmehr kann durch eine Kombination von mehreren, unterschiedlichen Parametern lediglich eine Annäherung an das Schmerzempfinden der Versuchstiere gelingen (TURNER et al., 2019).

4.2. Analgesie

Die Analgesie ist die Unterdrückung von Schmerzempfindungen. Dieser Zustand

wird durch die Gabe von Analgetika erreicht, welche auf verschiedenen Ebenen in das nozizeptive System eingreifen und dadurch mit der Schmerzwahrnehmung und -transmission interferieren. Dabei werden nichtsteroidale Antiphlogistika und antipyretische Analgetika, steroidale Entzündungshemmer (Glukokortikoide), Opioidanalgetika und sedativ-hypnotische Analgetika ($\alpha 2$ -Adrenozeptoragonisten) sowie weitere Substanzen mit analgetischer Wirkung unterschieden (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Die für die Studie *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien relevanten Analgetika werden im Folgenden behandelt.

4.2.1. Analgesie in der Versuchstierkunde

Art. 14 Abs. 1 der RL 2010/63/EU⁷ scheidet die Applikation von Analgetika bei Versuchstieren vor, um Schmerzen, Leiden und Schäden bei experimentellen Versuchen auf ein Minimum zu reduzieren. Es darf jedoch von der Schmerzmittelapplikation abgesehen werden, wenn dies mehr Schmerzen, Leiden und Schäden hervorrufen würde als der experimentelle Versuch selbst oder dies mit dem Versuchsziel unvereinbar ist (Art. 14 Abs. 2 RL 2010/63/EU)⁸. In Art. 14 Abs. 4 RL 2010/63/EU⁷ wird explizit eine perioperative Analgesie vorgeschrieben. Trotz dieser rechtlichen Vorgaben scheint der mangelnde Einsatz von Analgetika in experimentellen Studien ein Problem darzustellen (STOKES et al., 2009; HERRMANN und FLECKNELL, 2019; KING et al., 2023). Eine retrospektive Analyse von im Jahr 2010 eingereichten Tierversuchsanträgen in Deutschland ergab, dass für 30 % der 684 geplanten chirurgischen Interventionen keine Analgesie vorgesehen war (HERRMANN und FLECKNELL, 2019). Eine häufige Befürchtung beim Einsatz von Analgetika ist der potentielle Einfluss dieser auf die Versuchsergebnisse (CARBONE und AUSTIN, 2016; JIRKOF und POTSCHKA, 2021; KING et al., 2023). Anstatt deswegen auf eine Analgesie zu verzichten, kann dieses Problem jedoch mit zusätzlichen Kontrollgruppen, Pilotstudien oder einer längeren Erholungsphase nach dem operativen Eingriff mit Analgesie adressiert werden (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Des Weiteren muss ebenfalls bedacht werden, dass unbehandelter Schmerz massive Auswirkungen auf viele Mechanismen und Stoffwechselwege im Körper hat, was wiederum die Varianz der

⁷ Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ABI. EU L 276, 20.10.2010, S 33 -79.

⁸ Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ABI. EU L 276, 20.10.2010, S 33 -79.

experimentellen Daten erhöht und der Qualität abträglich ist (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Häufig wird über die Verwendung von Analgetika in wissenschaftlichen Publikationen nicht ausreichend Bericht erstattet, was die Interpretation der Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit erschwert (CARBONE und AUSTIN, 2016; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Die evidenzbasierte Auswahl des Analgetikums, der Dosierung und des Applikationsintervalls ist zudem eine Herausforderung, da umfassende pharmakokinetische und -dynamische sowie toxikologische Studien rar sind (FOLEY et al., 2019). Häufig werden therapeutische Plasmakonzentrationen von anderen Spezies zur Beurteilung der analgetischen Wirkung herangezogen (FOLEY et al., 2019). Darüber hinaus müssen Einflüsse wie das Alter, das Geschlecht und der Mausstamm auf die Schmerzwahrnehmung und Analgesie bedacht werden (SMITH, 2019; MURALIDHARAN et al., 2020). Das Analgesieregime sollte zudem auf das entsprechende Tiermodell und die erwartete Schmerzqualität und -dauer zugeschnitten werden (FOLEY et al., 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Eine weitere Herausforderung stellt die Wahl des Applikationsweges dar: zwar fällt bei einer Selbstmedikation über das Trinkwasser oder Futter der handlingassoziierte Stress bei parenteralen Injektionen für das Versuchstier weg, Faktoren wie Löslichkeit des Analgetikums, Schmackhaftigkeit und Neophobie, der First-Pass-Effekt, die postoperative Reduktion der Futter- und Wasseraufnahme, die individuelle Varianz und der Einfluss des zirkadianen Rhythmus auf die Aufnahme müssen jedoch bedacht werden (FOLEY et al., 2019). Somit sollte die Häufigkeit des benötigten *Handlings* für wiederholte Injektionen von Analgetika gegenüber der Unsicherheit einer suffizienten Dosierung über Selbstmedikation genau abgewogen werden (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Auch das Konzept der präemptiven Analgesie sollte berücksichtigt werden. Nach diesem Konzept sollten Analgetika in ausreichender Zeit vor dem operativen oder schmerzhaften Eingriff appliziert werden, um eine Sensibilisierung des nozizeptiven Systems während des Eingriffes zu verhindern. Letztere kann nachfolgend zu verstärktem Schmerzempfinden (sekundäre Hyperalgesie) und gesteigerten postoperativen Schmerzen führen (FLECKNELL, 2001; FOLEY et al., 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021).

4.2.2. Nichtsteroidale Antiphlogistika

NSAIDs werden bei entzündungsassoziiertem Schmerz eingesetzt und haben eine

analgetische, anipyretische und antiphlogistische Wirkung (LÖSCHER et al., 2014). Sie inhibieren die Cyclooxygenase, ein Enzym, welches die Synthese von Prostaglandinen aus der Arachidonsäure induziert. Letztere spielen als periphere Mediatoren unter anderem eine Rolle bei der Entstehung der kardinalen Entzündungssymptome, inklusive der Entstehung von Schmerz (LÖSCHER et al., 2014). Es existieren zwei Isoformen des Enzyms: die Cyclooxygenase-1 (Cox-1) ist konstitutiv in verschiedenen Geweben und Organen exprimiert, wohingegen die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) hauptsächlich bei einem Entzündungsgeschehen induziert wird, aber auch konstitutiv in Niere, Uterus und im ZNS exprimiert wird (LÖSCHER et al., 2014; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Nebenwirkungen der NSAIDs umfassen unter anderem gastrointestinale Ulzerationen, da Prostaglandine auch für den Schutz der Magenschleimhaut verantwortlich sind, und Nierenschäden aufgrund einer verringerten Perfusion. Präferenzielle oder selektive Cox-2 Hemmstoffe, beispielsweise Coxibe, wurden entwickelt, um das Auftreten von Nebenwirkungen zu reduzieren (LÖSCHER et al., 2014; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Ob eine Überlegenheit der präferenziellen und selektiven Cox-2 Hemmstoffe in der Reduktion von Nebenwirkungen besteht, bleibt jedoch unklar: beispielsweise wurden mehr Nebenwirkungen bei einer Verabreichung von Coxiben im Vergleich zu nicht-Coxiben bei Hunden und Katzen im Vereinigten Königreich festgestellt (HUNT et al., 2015; LEES et al., 2022). Viele NAIDs zeigen eine hohe Affinität zur Ausbreitung in Entzündungsgebieten. Dies liegt unter anderem daran, dass sie schwache Säuren sind und eine hohe Proteinbindung aufweisen. Deswegen kann von Blutkonzentrationen der NSAIDs und deren Halbwertszeiten nur eingeschränkt auf die tatsächliche Wirkstoffkonzentration im Entzündungsgebiet geschlossen werden (LÖSCHER et al., 2014). Nichtsdestotrotz werden die Plasmahalbwertszeit und die therapeutischen Plasmaspiegel als Anhaltspunkt aufgeführt, da selten über Daten der NSAID-Konzentrationen im Entzündungsexsudat von Labormäusen berichtet wurde.

Im Folgenden wird im Detail auf die NSAIDs Carprofen und Meloxicam eingegangen, da diese am häufigsten für das Schmerzmanagement bei Kraniotomien eingesetzt werden (KING et al., 2023). Es werden Dosierungen von 5 mg/kg alle 12 h bis 20 mg/kg alle 24 h für die subkutane Administration (FOLEY et al., 2019; ARRAS et al., 2020) und 10 bis 25 mg/kg für die orale Administration von Carprofen empfohlen (ARRAS et al., 2020). Pharmakokinetische

Untersuchungen zeigten, dass mit Dosierungen von 5 mg/kg und 20 mg/kg nach subkutaner Injektion die Plasmaeliminationshalbwertszeit 6,88 h und 8,52 h betrug (KENDALL et al., 2014; GLASENAPP et al., 2023). Mit 5 mg/kg sinkt die Carprofen Plasmakonzentration nach ca. 10 h (KENDALL et al., 2014) unter den mutmaßlichen therapeutischen Plasmaspiegel von 20 - 24 µg/ml (LEES et al., 2004; FOLEY et al., 2019), mit 20 mg/kg erst nach 24 h (GLASENAPP et al., 2023). Mäuse zeigten eine hohe Akzeptanz von oral dargereichtem Carprofen im Trinkwasser (INGRAO et al., 2013; GLASENAPP et al., 2023). Innerhalb von 12 h nach Gabe von mit 25 mg/kg Carprofen angereichertem Trinkwasser wurde die Zieldosierung von den Mäusen aufgenommen und innerhalb von 24 h wurde ein *Steady State* um 60 µg/ml weit über dem mutmaßlichen therapeutischen Plasmaspiegel erreicht (GLASENAPP et al., 2023). Mit einer Dosierung von 10 mg/kg Carprofen über das Trinkwasser wurde nach 12 h der maximale Plasmaspiegel von 17 µg/ml erreicht (INGRAO et al., 2013). Glasenapp und Kollegen (2023) stellten keine Nebenwirkungen nach einer fünftägigen oralen Applikation von 25 mg/kg fest. Jedoch waren in dieser Studie einige Irwin-Score-Parameter geringgradig verändert, die Körpertemperatur erhöht und bei männlichen Tieren die Laufradaktivität verringert (GLASENAPP et al., 2023). Sowohl eine Dosierung von 25 mg/kg über fünf Tage oral als auch 20 mg/kg über sieben Tage s.c. (subkutan) alle 24 h verursachten keine pathohistologischen Veränderungen im Gastrointestinaltrakt von C57BL/6J und CD1 Mäusen (KENDALL et al., 2022; GLASENAPP et al., 2023). Mehrere Studien zeigten jedoch, dass Dosierungsempfehlungen im unteren Bereich keine ausreichende analgetische Wirkung besaßen: so reduzierte die Dosierung von 25 mg/kg Carprofen s.c. vor allem innerhalb der ersten Stunden bei CD1 Mäusen und insgesamt bei C57BL/6N Mäusen den kraniotomieinduzierten Schmerz besser als eine Dosierung von 10 mg/kg (CHO et al., 2019). Auch Matsumiya und Kollegen (2012) evaluierten den postoperativen Schmerz nach einer Laparotomie mittels MGS und konnten einen analgetischen Effekt erst bei einer Dosierung von 20 und 25 mg/kg feststellen. Die Applikation von 50 mg/kg Carprofen verbesserte das Nestbauverhalten nach einer Laparotomie nur geringgradig, 5 mg/kg Carprofen gar nicht (JIRKOF et al., 2013). Dahingegen bewies eine andere Studie, dass eine Dosierung von 5 mg/kg Carprofen genügend analgetische Wirkung entfaltet, dass C57BL/6J Mäuse nach Anästhesie und Laparotomie ähnliche Latenzzeiten bis zu Beginn des Wühlverhaltens zeigten wie Mäuse der Anästhesie-Kontrollgruppe (JIRKOF et al., 2010). Die

Dosierungsempfehlungen für Meloxicam liegen bei subkutaner Applikation zwischen 2 bis 10 mg/kg alle 6 bis 12 h und für die orale Applikation bei 10 bis 20 mg/kg alle 12 h (FOLEY et al., 2019; ARRAS et al., 2020). Pharmakokinetische Studien ergaben eine Plasmaeliminationshalbwertszeit von 3,08 h für 1 mg/kg (KENDALL et al., 2014) und von 5,0 h für 10 mg/kg (KIM et al., 2023) nach subkutaner Applikation. Die Plasmakonzentration lag bis zu 4 oder 6 Stunden (KENDALL et al., 2014; KIM et al., 2023) über der mutmaßlichen therapeutischen Konzentration von 0,39 bis 0,911 µg/ml (FOLEY et al., 2019). Im Widerspruch zu der Empfehlung der GV-Solas, scheint sich Meloxicam nicht für die orale Applikation im Trinkwasser zu eignen, da Mäuse keine spontane Aufnahme vermutlich aufgrund von geringer Schmackhaftigkeit zeigten (INGRAO et al., 2013). Wird Meloxicam jedoch einem angesüßten, geleeartigen Material zugesetzt, wird es von den Mäusen aufgenommen (CHO et al., 2019). Mehrere Studien weisen auf lokale Nebenwirkungen an der Injektionsstelle des Meloxicams hin: konzentrationsabhängige nekrotische Veränderungen der Epidermis und kavitäre Läsionen in der Subkutis wurden nach sechstägiger s.c. Applikation von 20 mg/kg Meloxicam bei C57BL/6N Mäusen entdeckt (SARFATY et al., 2019). Ähnliche Läsionen wurden abhängig vom genutzten Präparat bei 20 mg/kg in C57BL/6J Mäusen (ANTIORIO et al., 2022) und bei 25 % der CD1 Mäuse bei einer Dosierung von 10 mg/kg beobachtet (KIM et al., 2023). Bei einer Dosierung von 20 mg/kg Meloxicam s.c. über sieben Tage zeigten sich toxische Nebenwirkungen auf den Gastrointestinaltrakt von CD1 Mäusen in Form von okkultem Blut in den Fäzes und einer histopathologischen diagnostizierten Gastritis (KENDALL et al., 2022). Sarfaty und Kollegen (2019) entdeckten hingegen keine pathologischen Veränderungen des Gastrointestinaltraktes bei derselben Dosierung und Applikationsdauer bei C57BL/6N Mäusen. Die analgetische Wirkung geringer Dosierungen wird auch bei Meloxicam kritisch hinterfragt (FOLEY et al., 2019; KIM et al., 2023): kraniotomieinduzierter Schmerz wurde bei C57BL/6N Mäusen mit einer Dosierung von 5 mg/kg besser reduziert als mit 2 mg/kg Meloxicam (CHO et al., 2019). Obwohl Dosierungen von 5, 10 oder 20 mg/kg Meloxicam ausreichen, um schmerzassoziierte Verhaltensveränderungen nach einer Vasektomie zu verringern, wurden 20 mg/kg benötigt, um den postoperativen Stress zu reduzieren (WRIGHT-WILLIAMS et al., 2007). Auch Kim und Kollegen (2023) konnten eine verbesserte Analgesie nach einer Laparotomie von 10 mg/kg Meloxicam im Gegensatz zu 2,5 mg/kg alle 12 h feststellen. Jedoch reichte die hohe Dosierung

nicht aus, um eine Reduktion der Lokomotion postoperativ zu verhindern (KIM et al., 2023). Eine weitere Studie konnte zwar eine Reduktion der Inflammation nach einer Laparotomie bei Applikation von 5 und 20 mg/kg Meloxicam feststellen, jedoch hatte selbst die Dosierung von 20 mg/kg keinen positiven Effekt auf den MGS, das Körpergewicht und die Aktivität (ROUGHAN et al., 2016).

4.2.3. Opioide

Opioidanalgetika vermitteln ihre Wirkung an den drei Opioidrezeptoren μ , δ und κ , welche im zentralen und peripheren Nervensystem als auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert sind, und greifen in das endogene Opioidsystem ein (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Opioidanalgetika umfassen natürliche Opioide, wie Morphin, welches aus dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns isoliert wird, sowie halbsynthetische und vollsynthetische Derivate (LÖSCHER et al., 2014). Die starke analgetische Wirkung beruht auf einer Hemmung der Weiterleitung von Schmerz auf peripherer, spinaler und supraspinaler Ebene als auch auf dem Eingreifen in die emotionale Bewertung des Schmerzes (LÖSCHER und RICHTER, 2016; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Das Wirkungsspektrum von Opioiden umfasst häufig unerwünschte Nebenwirkungen, die jedoch auch die Behandlung weiterer Indikationen ermöglichen. Zu den zentralen Wirkungen der Opioide zählen die Atemdepression, die Sedation oder eine dopaminerge induzierte Exzitation bis hin zu Katatonie, die Euphorie (μ -Opioidrezeptor vermittelt) oder Dysphorie (κ -Opioidrezeptor vermittelt), die antitussive Wirkung, initiale emetische, dann antiemetische Effekte und neuroendokrine Störungen. Peripher reduzieren Opioide die Magendarmperistaltik, erhöhen den Tonus der glatten Schließmuskulatur und führen durch einen erhöhten Vagustonus zu Bradykardie und Bronchospasmus (LÖSCHER et al., 2014; LÖSCHER und RICHTER, 2016).

Ein Nachteil der Opioidverabreichung ist die Gefahr der physischen und psychischen Abhängigkeit. Des Weiteren kommt es zu einer Toleranzentwicklung gegenüber regelmäßig applizierten Dosierungen, sodass höhere Dosierungen erforderlich sind, um den gleichen analgetischen Effekt zu erzielen (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Eine solche Erhöhung kann jedoch zu einer opioidinduzierten Hyperalgesie führen, da es bei langfristiger Gabe zu pronozizeptiven Veränderungen des Opioidsystems kommen kann (RIVAT und BALLANTYNE, 2016; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Bei dem Einsatz von Opioiden in der Versuchstierkunde sollte Folgendes beachtet werden: die Nebenwirkung der

Atemdepression sollte bei der Planung von Anästhesieprotokollen berücksichtigt werden. Des Weiteren führte das Opioid Buprenorphin bei Mäusen zu einer verringerten Futteraufnahme und folglich einem Gewichtsverlust (HEALY et al., 2014; JIRKOF et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Die verringerte Futteraufnahme könnte einerseits durch die Entstehung von Obstipationen begünstigt werden, da Opioide an μ -Opioidrezeptoren im Magendarmtrakt die Sekretion verringern, die Absorption von Flüssigkeit erhöhen und zeitgleich die Peristaltik senken (HEALY et al., 2014) und somit die intestinale Passagezeit erhöht wird (WEBSTER et al., 2016). Andererseits werden Opioidrezeptoren in der Chemotriggerzone aktiviert, wodurch Nausea und Erbrechen hervorgerufen werden. Das Übelkeitsgefühl führt bei Ratten nach der Gabe von Buprenorphin zu Pica-Verhalten, d.h. dem Aufnehmen von Substanzen ohne Nährwert (TAKEDA et al., 1993; CLARK et al., 1997; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Darüber hinaus konnten bei Buprenorphinapplikation Verhaltensänderungen wie *Circling*, *Tiptoe gate* und *Straub tail* (Kreisdrehen, Zehenspitzengehen und aufgestellter Schwanz) sowie eine Hyperlokomotion mit Verlust des zirkadianen Rhythmus festgestellt werden (HEALY et al., 2014; JIRKOF et al., 2015). Der Einfluss von Opioiden sollte insbesondere bei Tiermodellen zur Erforschung von Immunsystem, Krebs, Inflammation und Endokrinologie beachtet werden (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Das am häufigsten eingesetzten Opioid für postoperatives Schmerzmanagement bei Nagetieren ist Buprenorphin (STOKES et al., 2009; KING et al., 2023). Buprenorphin ist ein partieller Agonist mit hoher Affinität am μ -Opioidrezeptor und ein κ -Opioidrezeptorantagonist und kann bei moderaten Schmerzen eingesetzt werden. Buprenorphin unterliegt einem Ceiling-Effekt, was bedeutet, dass eine Dosiserhöhung irgendwann nicht mehr mit einer Steigerung der Wirksamkeit einhergeht (TRESKOT et al., 2008; LÖSCHER und RICHTER, 2016). Dosierungsempfehlungen bei der Maus reichen von 0,1 bis 0,5 mg/kg alle 4 bis 8 h für die subkutane Applikation und 1 mg/kg für die orale Applikation im Trinkwasser (FOLEY et al., 2019; ARRAS et al., 2020). Pharmakokinetische Studien zeigten, dass eine analgetische Wirkung oberhalb der mutmaßlichen therapeutischen Konzentration von 1 ng/ml bei 0,1 mg/kg aufgrund kurzer Plasmahalbwertszeiten für ca. 4 h erreicht wird (CLARK et al., 2014; KENDALL et al., 2014; JIRKOF et al., 2015). Dies zeigte, dass frühere Applikationsintervalle von 8 bis 12 h keine ausreichende Analgesie erzeugten (FOLEY et al., 2019). Da wiederholte Injektionen Stress für Mäuse darstellen (MEIJER et al., 2007;

WOLTER et al., 2023), wurden Alternativen wie die Applikation über das Trinkwasser (JIRKOF et al., 2019), mit Nuss-Nugat-Creme (ABELSON et al., 2012) oder über wässriges Gelee (HOVARD et al., 2015) getestet. Als weitere Alternative wurden Buprenorphinformulierungen mit verzögertem Wirkeintritt für die subkutane Applikation in Mäusen entwickelt. In den USA wurden mehrere kommerzielle für Labornager zugelassene oder umgewidmete Produkte erhältlich [vgl. (HUSS und PACHARINSAK, 2022)]: Animalgesic® für Mäuse (Animalgesic Labs, Millersville, USA, aktuell nicht mehr erhältlich), Bup ER Lab® (ZooPharm zugehörig zu Wedgewood Pharmacy, New Jersey, USA), Ethiqua XR® für Mäuse, Ratten und Frettchen (Fidelis Animal Health, New Jersey, USA) und Simbadol™ für Katzen (Zoetis-US, Pasipenny, New Jersey, USA). Diese Sustained-Release-Formulierungen erzeugten Plasmakonzentrationen über dem therapeutischen Plasmaspiegel für 12 h (CLARK et al., 2014), für 24 bis 48 h (KENDALL et al., 2014; JIRKOF et al., 2015), für 48 h (CHAN et al., 2022) und für bis zu 72 h in einer Studie, welche das Bup ER Lab® und Ethiqua XR® verglich (SAENZ et al., 2022). Die analgetische Wirkung hielt in nozizeptiven Tests zwischen 12 h (CARBONE et al., 2012) und 48 h (HEALY et al., 2014) an. Eine mit wiederholt appliziertem, herkömmlichem Buprenorphin vergleichbare Analgesie für 24 bis 48 h nach einer Laparotomie konnte mit den Sustained-Release-Formulierungen erreicht werden (JIRKOF et al., 2015; CHAN et al., 2022). Entgegen dieser vielversprechenden Ergebnisse hat eine Studie Hinweise für eine akute Opioidtoleranz bei Verabreichung von einer Sustained-Release-Formulierung in einer herkömmlichen Dosierung von 1 mg/kg gezeigt. In dieser Studie wurde eine Wirkungsdauer von maximal 2 h postuliert (LARSON et al., 2020). Ein Import der Sustained-Release-Formulierungen nach Europa ist bei Berücksichtigung der rechtlichen Vorschriften zur Umwidnungskaskade laut VO 2019/6/EU (Art. 112 Abs. 2)⁹ prinzipiell möglich. Aufgrund der erschwerten Importbedingungen und dem Auftreten lokaler Reaktionen an der Injektionsstelle der Bup ER Lab® Formulierung (CARBONE et al., 2012; CLARK et al., 2014), stellte Herr Prof. Huwyler mit seinem Team eine Sustained-Release-Formulierung auf Basis von Buprenorphin beladenen PLGA (Poly-lactic-co-glycolic acid)

⁹ Verordnung (EU) 2019/6 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 11. Dezember 2018 über Tierarzneimittel und zur Aufhebung der Richtlinie 2001/82/EG, PE/45/2018/REV/1, 7.1.2019, S. 43–167

Mikropartikeln (BUP-Depot) her (SCHREINER et al., 2020). In einer pharmakokinetischen Studie konnte bewiesen werden, dass eine s.c. Injektion von BUP-Depot relevante Konzentrationen im Plasma für 12 bis 24 h und im Gehirn für mindestens 24 h bis hin zu 72 h bei C57BL/6J Mäusen hervorrief (SCHREINER et al., 2020). Das BUP-Depot wurde zur postoperativen Analgesie in einem murinen Fraktur-Modell eingesetzt und erzielte eine Analgesie bis zu 72 h, welche vergleichbar mit kontinuierlich dargereichtem Tramadol im Trinkwasser war (WOLTER et al., 2023).

4.2.4. Lokalanästhesie

Mit einer Lokalanästhesie kann örtlich begrenzt die Schmerzempfindung, ohne Verlust des Bewusstseins, ausgeschaltet werden (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Dabei blockieren Lokalanästhetika spannungsabhängige Natriumkanäle an Nervenzellmembranen und verhindern den Einstrom von Natrium, die nachfolgende Depolarisation des Neurons und damit die Entstehung eines Aktionspotentials, sodass die Transmission von nozizeptiven Stimuli zum zentralen Nervensystem unterbunden wird und keine Schmerzwahrnehmung entsteht (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Es werden Lokalanästhetika vom Ester-Typ, welche nach Applikation schnell gespalten und inaktiviert werden, sowie Lokalanästhetika vom Amid-Typ, welche eine längere Wirkungsdauer aufweisen und in der Leber metabolisiert werden, unterschieden (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Lokalanästhetika können zur Oberflächen-, Infiltrations-, Leitungs- und Rückenmarksanästhesie sowie zur intravenösen Regionalanästhesie eingesetzt werden (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Zu den Nebenwirkungen zählt eine verstärkte Blutungsneigung durch Vasodilatation am Applikationsort. Eine systemische Applikation oder zu hohe Konzentrationen können einen Blutdruckabfall, Bradykardie und Herzrhythmusstörungen, im Besonderen initiale zentrale Erregungserscheinungen, gefolgt von zentraler Depression mit finaler Atemlähmung bewirken. Um der Blutungsgefahr bei Anwendung in Operationsgebieten sowie der Gefahr von systemischen Nebenwirkungen vorzubeugen und die Wirkungsdauer zu verlängern, werden den Lokalanästhetika häufig Sperrkörper wie Katecholamine zugesetzt, welche eine lokale Vasokonstriktion bewirken (LÖSCHER und RICHTER, 2016).

Dosierungsempfehlungen zur Anwendung bei der Maus variieren zwischen 1 bis 8 mg/kg Bupivacain und 2 bis 10 mg/kg Lidocain (ARRAS et al., 2020; DURST et

al., 2021). Die Wirkung von Bupivacain setzt bei Hund und Katze nach 10 bis 15 min ein und hält bis zu 8 h an (LASCELLES und KIRKBY SHAW, 2016). Bei der Maus berichten verschiedene Studien von einer Wirkungsdauer zwischen 5 und 60 min (SMITH, 1997; FOLEY et al., 2019). Die Wirkungsdauer von Lidocain entfaltet sich bei Hund und Katze bereits nach 5 min und hält 2 h an (LASCELLES und KIRKBY SHAW, 2016). Bei der Maus wird von einer Wirkung unter 5 min bis 30 min berichtet (FOLEY et al., 2019). Um die Wirkungsdauer der Lokalanästhetika zu erhöhen, wurden ebenfalls Sustained-Release-Bupivacain-Formulierungen entwickelt (SHIKANOV et al., 2007; SOKOLSKY-PAPKOV et al., 2009). Studien, welche die topische Applikation von Lokalanästhetika bei der Entnahme von Schwanzbiopsien oder beim Stanzen von Ohrmarkierungen untersuchten, konnten keine Vorteile der Gabe von Lokalanästhetika beweisen (MILLER und LEACH, 2015; DUDLEY et al., 2016). Durst und Kollegen (2021) kombinierten die Lokalanästhetika Lidocain und Bupivacain für eine Infiltrationsanästhesie bei einer Laparotomie von C57BL/6J Mäusen, um die Wirkungsdauer beider Lokalanästhetika zu maximieren (FLECKNELL, 2018). Hierbei wurden keine systemischen Nebenwirkungen oder Wundheilungsstörungen beobachtet (DURST et al., 2021).

4.2.5. Multimodale Analgesie

Die Kombination von zwei oder mehreren Analgetika mit komplementären Wirkmechanismen und pharmakokinetischen Profilen führt zu einem additiven oder synergistischen Effekt in der Potenzierung der Analgesie (FOLEY et al., 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Dadurch kann die Dosierung der einzelnen Analgetika wiederum reduziert werden, was das Risiko des Auftretens von unerwünschten Nebenwirkungen minimiert (FLECKNELL, 2001; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Auch adjuvante Wirkstoffe, welche primär für andere Indikationen angewandt werden, wie Muskelrelaxanzien, Antidepressiva und auch Lokalanästhetika, kommen bei multimodalen Analgesieregimen zum Einsatz (JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Das Nebenwirkungsprofil der einzelnen Komponenten sollte bei einer Kombination berücksichtigt werden, sodass sich diese nicht gegenseitig verstärken (FLECKNELL, 2001; FOLEY et al., 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Multimodale Analgesieregime werden im postoperativen Schmerzmanagement von Labornagern kaum angewandt (HERRMANN und FLECKNELL, 2019; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Ein

Systematic Review aus unserer Arbeitsgruppe, welches die perioperative Analgesie bei experimentellen Kraniotomien untersuchte, konnte zeigen, dass im Jahr 2009 nur 1,8 % und im Jahr 2019 5,7 % der Studien von dem Einsatz multimodaler Analgesieregime berichteten (KING et al., 2023). Einige Studien konnten den synergistischen Effekt von Dexketoprofen und Tramadol, Gabapentin und Tramadol oder Hydro-/Oxycodon und Ibuprofen mittels nozizeptiven Tests in Mausmodellen für entzündungsbedingten Schmerz (MIRANDA et al., 2012), für die diabetische Neuropathie (MIRANDA et al., 2018) und bei naiven Tieren (ZELCER et al., 2005) belegen. Eine weitere Studie bewies den synergistischen, analgetischen Effekt von Fentanyl, Trazodon und Paracetamol mit einer geringeren Ausprägung von motorischen Nebenwirkungen bei Reduktion der einzelnen Dosierungen in einem Mausmodell für viszeralen Schmerz (FERNÁNDEZ-DUEÑAS et al., 2011). Für das perioperative Schmerzmanagement bei einer Laparotomie wirkte sich die Kombination aus 0,1 mg/kg Buprenorphin alle 12 h und 30 mg/kg Carprofen über das Trinkwasser für 72 h positiver auf das postoperative Nestbauerhalten, das Putzverhalten und den Von-Frey-Test aus als bei Applikation der einzelnen Analgetika. Hingegen zeigten Mäuse mit multimodalem Analgesieregime ohne operativen Eingriff eine deutliche Gewichtsabnahme (OLIVER et al., 2018). Auch ein multimodales Regime aus 0,1 mg/kg Buprenorphin alle 8 h und bis zu 5 mg/kg Meloxicam alle 24 h erwies sich als erfolgreich in der Reduktion von laparotomieinduziertem, postoperativem Schmerz (FURUMOTO et al., 2022). Parker und Kollegen (2011) bewiesen, dass eine Kombination von Buprenorphin und Carprofen bei Embryotransfer keinen nachteiligen Effekt auf die Erfolgsrate des Transfers hatte. Einige Studien konnten jedoch keinen synergistischen Effekt bei der Kombination von Analgetika identifizieren: dieser blieb bei der Kombination von 5 mg/kg Meloxicam und 50 mg/kg Paracetamol nach dem Eingriff der Vasektomie bei CD1 Mäusen aus (MILLER et al., 2012). Auch nach der Resektion von Milchdrüsenfettgewebe an FVB Mäusen konnte kein positiver Einfluss der Kombination aus einmaliger Gabe von 5 mg/kg Carprofen und zweimaliger Applikation von 0,2 mg/kg Buprenorphin identifiziert werden (ADAMSON et al., 2010). Durst und Kollegen (2021) konnten mit ihrem multimodalen Regime, bestehend aus einer Zubereitung von 3 mg/kg Bupivacain und 10 mg/kg Lidocain als Lokalanästhetikum und 200 mg/kg Paracetamol im Trinkwasser, keine überlegene Schmerzlinderung nach operativer Laparotomie demonstrieren.

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Sowohl die Haltung der Labormäuse als auch das perioperative Schmerzmanagement bei chirurgischen Eingriffen sind Einflussfaktoren, die eine zentrale Rolle für das Wohlbefinden der Mäuse und gleichzeitig für die Entstehung von Varianz in tierexperimentellen Studien spielen. Deshalb sollte im Rahmen dieser Dissertation das *Refinement*-Potential anhand einer evidenzbasierten Belastungseinschätzung beispielhaft für die soziale Haltungsform der Labormäuse und den chirurgischen Eingriff der Kraniotomie in zwei In-vivo-Studien untersucht werden.

Das Wohlergehen von Mäusen in konventionellen Labortierhaltungen kann sowohl durch die Problematik von aggressionsbedingten Verletzungen und *Barbering* bei Gruppenhaltung als auch durch die soziale Isolation bei Einzelhaltung beeinträchtigt werden. Das Ziel des ersten Teilprojektes dieser Dissertation war es, die tatsächliche Belastung der Einzel- und Gruppenhaltung von weiblichen und männlichen Labormäusen zu untersuchen, da dies bisher noch nicht im Detail erforscht wurde (KAPPEL et al., 2017). Als Hauptzielgrößen wurden die Ausprägung der „Wohlfühlparameter“ Nestbau- und Wühlverhalten sowie die Parameter zum affektiven Status (Open-Field-Test, Elevated-Zero-Maze-Test, Forced-Swim-Test) und die Stresshormonausschüttung ausgewählt. Diese Studie wurde im Rahmen der Forschergruppe „Severity Assessment in Animal-Based Research“ (DFG-FOR2591, 2024) als multizentrische Studie an vier Standorten durchgeführt.

Folgende zentralen Studienhypothesen wurden untersucht:

- Weibliche Tiere fühlen sich in Gruppenhaltung wohler als in Einzelhaltung.
- Männliche Tiere fühlen sich in Gruppenhaltung wohler als in Einzelhaltung. Aber mehr Individuen aus der Gruppenhaltung weisen eine reduzierte Fähigkeit zur Stressbewältigung auf.

Folgende Fragestellungen wurde untersucht:

- Hat die Haltungsform einen Einfluss auf verschiedene Hauptzielgrößen?
- Muss der Einfluss der Haltungsform auf die Hauptzielgrößen in der Interpretation von Studienergebnissen berücksichtigt werden?

Kraniotomien bei Labormäusen stellen einen in der neurowissenschaftlichen Forschung häufig durchgeführten chirurgischen Eingriff dar. Laut eines kürzlich veröffentlichten *Systematic Reviews* unserer Arbeitsgruppe, scheint der *Status quo* der analgetischen Versorgung bei intrakraniellen Eingriffen an Labornagern besorgniserregend (KING et al., 2023). Da unseres Wissens nach, das *Refinement-Potential* multimodaler Analgesieregime für murine Kraniotomien bisher noch nicht erforscht wurde, war das Ziel der zweiten Studie dieser Dissertation, die Verträglichkeit und die Wirksamkeit vier verschiedener Analgesieregime in der Reduktion postoperativer Schmerzen nach einem intrakraniellen Eingriff in C57BL/6J Mäusen zu untersuchen. Die vier verschiedenen Analgesieregime bestanden aus einer NSAID-Monotherapie und aus drei multimodalen Regimen, welche sich aus Kombinationen von NSAID, Opioid und Lokalanästhetikum zusammensetzten. Der postoperative Schmerz wurde mit Hilfe einer Testbatterie, bestehend aus (patho-)physiologischen, verhaltensbezogenen und biochemischen Parametern, quantifiziert. Als Hauptzielgröße wurde der Parameter MGS festgelegt. Diese Studie zielte erstens darauf ab Parameter, welche sich als sensitiv für die Belastungseinschätzung erwiesen haben [vgl. z.B. (BOLDT et al., 2021; BUCHECKER et al., 2022; REIBER et al., 2022b)], für die Quantifizierung postoperativer Schmerzen zu validieren. Zweitens sollte die Verträglichkeit der angewandten Analgesieregime für weibliche und männliche Mäuse bestätigt werden. Der CMS, welcher anhand eines bioinformatischen Workflows erstellt wurde [vgl. (VAN DIJK et al., 2020; REIBER et al., 2023)], sollte einen direkten Vergleich der postoperativen Belastung unter verschiedenen Analgesieregimen ermöglichen. Drittens sollten schließlich basierend auf den Ergebnissen der Studie evidenzbasierte Empfehlungen zum perioperativen Schmerzmanagement nach intrakraniellen Eingriffen für männliche und weibliche Mäuse erarbeitet werden.

Folgende zentrale Studienhypothese wurde untersucht:

Multimodale Analgesieregime reduzieren den postoperativen Schmerz besser als ein monotherapeutisches Regime.

Folgende weitere Fragestellungen wurden untersucht:

- Eignen sich ausgewählte Parameter zur Erfassung postoperativer Schmerzen und Nebenwirkungen?
- Haben die verschiedenen Analgesieregime in entsprechenden Kontrollgruppen einen Einfluss auf diese Parameter?

- Kommt es durch die Applikation verschiedener Analgesieregime zu unerwünschten Nebenwirkungen?
- Eignet sich die orale Applikation von Carprofen zum perioperativen Schmerzmanagement von Kraniotomien?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung

1.1. Studiendesign

Um Einflüsse unterschiedlicher Tierhaltungen auf die Versuchsergebnisse zu erfassen, partizipierten vier Arbeitsgruppen (Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim, Universität Hannover, Universität Heidelberg und LMU München) im Rahmen der Forschergruppe „Severity Assessment in Animal-Based Research“ (DFG-FOR2591, 2024) an dieser multizentrischen Studie. Dem Zentralinstitut für seelische Gesundheit Mannheim oblag die zentrale Versuchsplanung und Koordination. Die Studiendurchführung fand an allen Standorten zeitgleich unter Anwendung einheitlicher SOPs (*standard operating procedures*) und möglichst standardisierter Einflussfaktoren über einen Gesamtzeitraum von fast neun Wochen statt. Die nachfolgende Abbildung 2 zeigt eine Übersicht zum Studiendesign. In den ersten vier Wochen der Studie wurden die Tiere in der jeweiligen Haltungsform (Einzel- oder Gruppenhaltung) untergebracht und nach einer Eingewöhnungswoche täglich gewogen und in Augenschein genommen, um den Wund-, Fell-, und Vibrissen-Score zu erfassen. Zusätzlich fand nach jedem Käfigwechsel, immer montags, eine zehnminütige Beobachtung im Hinblick auf ein mögliches aggressives Verhalten statt. Auf die vierwöchige Haltungsphase folgte die experimentelle Phase. Dabei wurde in Woche 5 das Wühlverhalten analysiert. In der darauffolgenden Woche wurde das Nestbauverhalten bewertet sowie der Open-Field- und der Elevated-Zero-Maze-Test durchgeführt. In Woche 7 wurde der Forced-Swim-Test an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt und Kotproben wurden aus den Heimkäfigen entnommen. In der letzten Versuchswoche wurde das Nestbauverhalten erneut untersucht und Kotproben wurden gesammelt. Am Ende des Versuches wurden den Tieren unter Inhalationsnarkose (Isofluran, 3-4 %) Blutproben durch finale Herzpunktion entnommen und die Mäuse anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die weiteren Untersuchungen der Blutproben und der Gehirne fielen in die Zuständigkeit des Zentralinstituts für seelische Gesundheit und sind deshalb nicht Gegenstand dieser Dissertation.

Bei der Ankunft wurden die Tiere randomisiert (R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2022)),

einfache Randomisierung) den Versuchsgruppen a) Einzelhaltung (n = 12 pro Geschlecht) und b) Gruppenhaltung (4 Tiere/ Käfig, n = 20 pro Geschlecht) zugeteilt. Die Position von Einzelhaltungs- und Gruppenhaltungskäfigen im Käfigregal wurde zusätzlich vor Beginn der Studie mit einer einfachen Randomisierung (R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2022)) definiert. Um das Verzerrungspotential zu minimieren, wurde die Reihenfolge in der die Tiere den Open-Field-, Elevated-Zero-Maze-, und Forced-Swim-Test durchliefen, durch eine einfache Randomisierung (R 4.1.1. (R CORE TEAM, 2022)) festgelegt. Dabei wurde bei Tieren aus der Gruppenhaltung eine Randomisierung auf Basis des Gruppenkäfigs vorgenommen, sodass eine Störung der Gruppenhierarchie durch wiederholtes Entnehmen individueller Tiere verringert werden konnte. Vor Studienbeginn wurden In- und Exklusionskriterien definiert: bei Ankunft gesunde, C57BL/6N Mäuse im Alter von 5 Wochen wurden in der Studie aufgenommen. Folgende Exklusionskriterien wurden angewandt: a) hochgradige Verwundung mit der Konsequenz die Gruppenhaltung aufzulösen, b) Erreichen der Abbruchkriterien, c) eine Ermüdung und ein daraus resultierendes vorzeitiges Beenden des Tests für individuelle Mäuse, führt zu deren Exklusion von der Datenanalyse (nur für den Forced-Swim-Test) und d) Störung der technischen Ausrüstung. Da die Gruppenzugehörigkeit durch die Haltungsform offensichtlich wurde, waren weder die Tierpfleger noch die Experimentatorinnen verblindet. Die Nest-Fotos konnten jedoch verblindet durch eine dritte Person retrospektiv bewertet werden. Bis auf die Analyse des Elevated-Zero-Mazes und die Erhebung des Wund-, Fell- und Vibrissen-Scores, erfolgte die Datenerhebung gravimetrisch, softwarebasiert oder durch verblindete Kooperationspartner.

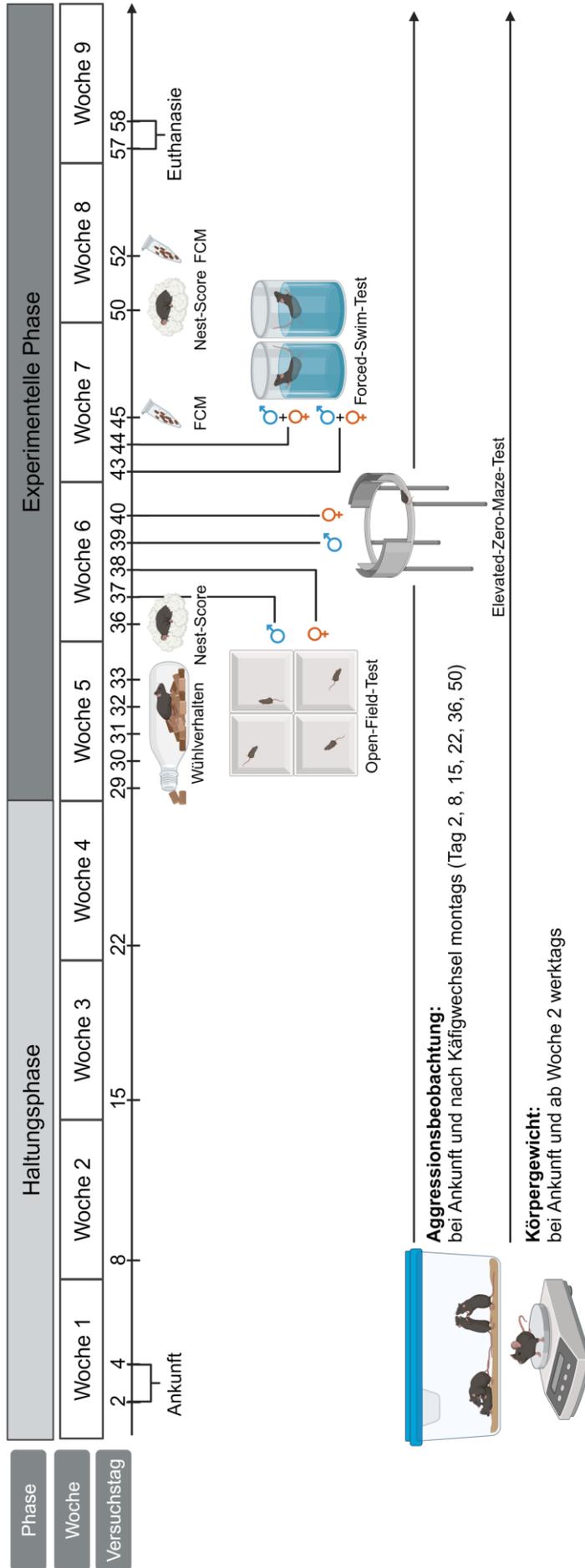


Abbildung 2: Studiendesign Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung.

Studiendesign der Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung von Labormäusen. FCM = fäkale Kortikosteronmetaboliten.
Erstellt mit BioRender.com

1.2. Versuchstiere

Alle Experimente sind am Standort München in Übereinstimmung mit der Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt worden (Lizenznummer: ROB-55.2-2532.Vet_02-19-31). Die beschriebenen Tierversuche wurden unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes sowie der RL 2010/63/EU ausgeführt. Die Berichterstattung erfolgte gemäß der ARRIVE-Empfehlung-2.0 (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (PERCIE DU SERT et al., 2020). Für jeden Standort wurden C57BL/6NRj Mäuse (n = 32 Weibchen und n = 32 Männchen) im Alter von fünf Wochen bei Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) bestellt. Aufgrund von Lieferverzögerungen und -schwierigkeiten auf Seiten des Züchters, fiel zum einen der Versuchszeitraum in die Umstellung von Sommer- auf Winterzeit und zum anderen bestand ein zweitägiger Unterschied in der Anlieferung der weiblichen Mäuse im korrekten Alter. Die Mäuse wurden in geschlechtergetrennten Räumlichkeiten (22 ± 2 °C und 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit, 12-Stunden-Hell-Dunkel-Beleuchtungszyklus, mit der Hellphase von 06:00-18:00 Uhr MESZ bzw. 05:00-17:00 MEZ) untergebracht. Die Tiere wurden in Makrolon Typ III Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland), ausgestattet mit Holzschnitzeleinstreu (SAFE® Select, J. Rettenmaier & Söhne GmbH & CO KG, Rosenberg, Deutschland) und *ad libitum* Zugang zu Leitungswasser und Standard-Futterpellets (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gehalten. Tiere in Einzelhaltung erhielten als *Enrichment* ein Baumwollnestlet, Tiere in Gruppenhaltung zwei Baumwollnestlets (Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Beim wöchentlichen Käfigwechsel montags bekamen die Tiere frische Einstreu, Baumwollnestlets und Wasser. Dabei wurde bei den männlichen Tieren in Gruppenhaltung eine Handvoll gebrauchte Einstreu mit in den neuen Käfig transferiert. Um die Geschlechtertrennung aufrecht zu erhalten und die Übertragung weiblicher Pheromone in den männlichen Haltungsraum zu verhindern, betrat die Experimentatorin erst den männlichen Haltungsraum und im Anschluss den weiblichen Haltungsraum. Des Weiteren wurde die Schutzkleidung zwischen den Haltungsräumen gewechselt. Aufgrund von Bisswunden erreichte n = 1 männliches Tier aus der Gruppenhaltung den humanen Endpunkt am Ende der Haltungsphase (Versuchstag 23) und wurde tierschutzgerecht getötet. Die verbliebenen Männchen aus diesem Gruppenkäfig n = 3 wurden als präventive Maßnahme einzeln gesetzt. Die verbliebenen Männchen durchliefen alle weiteren Experimente, jedoch wurden

die erhobenen Daten größtenteils von der Gesamtauswertung exkludiert (siehe Kapitel V.1.).

2. ***Refinement der Analgesie für murine Kraniotomien***

2.1. **Vorstudien**

Der erste geplante Durchlauf der Studie musste im vierten Batch ($n = 32$ verwendete C57BL/6J Mäuse) vorzeitig abgebrochen werden, da unerwartete lokale Unverträglichkeiten an der Injektionsstelle des NSAIDs aufgetreten waren. Das NSAID Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) wurde bei allen Analgesiegruppen 60-90 min präoperativ und viermal postoperativ alle 24 h subkutan in den Nacken injiziert (1 ml Einmalspritzen, Covetrus GmbH, Düsseldorf, Deutschland und Sterican Insulinkanüle 26 G x ½ braun, B. Braun SE, Melsungen, Deutschland). Die Carprofen-Injektionslösung wurde 1:10 mit Aqua iniectabilia (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) verdünnt und in einer Dosierung von 20 mg/kg appliziert. Beim Durchlauf des dritten und vierten *Batches* wurden bei zwei Tieren ca. 1 h nach der ersten Carprofen-Injektion offene Hautstellen im Nackenbereich identifiziert, welche möglicherweise sekundär durch Automutilation aufgrund von Irritation und Pruritus, hervorgerufen durch die Injektion, entstanden sind. Diese Tiere wurden umgehend euthanasiert und aus dem Versuch exkludiert. Basierend auf dieser Beobachtung wurden alle Versuchstiere aus Batch 3 und 4 nach der Euthanasie am Ende des Versuches genauer inspiziert. Dabei sind nach Rasur des Nackenbereiches bei vielen Tieren ($n = 15$ von 16) eine oder mehrere krustige, gerötete Läsionen aufgefallen. Die histopathologische Untersuchung identifizierte supraepidermale serozelluläre Krusten infiltriert von neutrophilen Granulozyten, fokalen Ulzerationen der Epidermis sowie Infiltration des subkutanen Bindegewebes mit Entzündungszellen. Mögliche Ursachen wie Kanülengröße, Verdünnung und Chargenfehler wurden in Betracht gezogen. Alternative NSAIDs und Applikationswege wurden in Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen aus der Forschergruppe DFG 2591 (DFG-FOR2591, 2024) und unter Beachtung derer präliminären Ergebnisse zur Pharmakokinetik und Verträglichkeit einiger relevanter Analgetika diskutiert. Um einen erneuten Beginn der Studie zu ermöglichen, wurde eine Tierzahlerhöhung um $n = 32$ Tiere sowie eine Pilotstudie beantragt und von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Als Alternative zur subkutanen Injektion entschieden wir uns für eine orale Verabreichung des Carprofens *ad libitum* über das Trinkwasser. In einer Pilotstudie wurde das Analgesieregime hinsichtlich Verträglichkeit untersucht und die Methode der Schmerzmittelapplikation über das Trinkwasser in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Dabei wurden zwei Behandlungsgruppen verglichen: a) 20 mg/kg Carprofen s.c. 60-90 min präoperativ und b) 25 mg/kg Carprofen oral über das Trinkwasser 20-24 h präoperativ. Beide Gruppen erhielten 25 mg/kg Carprofen oral über das Trinkwasser für vier Tage postoperativ. Für die Pilotstudie wurden $n = 12$ ($n = 6$ männliche, $n = 6$ weibliche) C57BL/6J Mäuse von Charles River Laboratories im Alter von 70 bis 76 Tagen bei Ankunft verwendet. Der operative Eingriff (siehe Kapitel IV.2.5.), die weiteren Analgetika (siehe Kapitel IV.2.4.) sowie die erhobenen Parameter (siehe Kapitel IV.3.) entsprachen größtenteils der Hauptstudie.

2.2. Studiendesign

Die Tiere wurden randomisiert (R 4.1.1 (R CORE TEAM, 2022), einfache Randomisierung) drei experimentellen Gruppen zugeordnet (siehe Abb. 3B): der naiven Gruppe ($n = 16$), der Substanz-Kontroll-Gruppe ($n = 64$) und der Operations (OP) -Gruppe ($n = 64$). Mäuse der Substanz-Kontroll- und der OP-Gruppe wurden mit Isofluran anästhesiert und erhielten zudem eines von vier verschiedenen Analgesieregimen ($n = 16$ je Analgesieregime): +N, +NL, +NO, +NLO (N = NSAID, L = Lokalanästhesie, O = Opioid). Tiere aus der OP-Gruppe wurden einer neurochirurgischen Operation unterzogen. Mäuse beider Geschlechter waren in gleicher Anzahl in jeder experimentellen und Analgesieregimegruppe vertreten. Alle Mäuse durchliefen dasselbe Studiendesign (siehe Abb. 3A), bestehend aus einer siebentätigen Akklimatisierungsphase nach der Ankunft (Do bis Do; Tag -11 bis -4), darauffolgenden Baselinemessungen (Do bis Fr; Tag -4 bis -3) und dem operativen Eingriff oder Anästhesie (Mo, Tag 0) sowie einer nachfolgenden experimentellen Phase für das Monitoring des postoperativen Schmerzes (Mo bis Fr; Tag 0 bis 4). Im Rahmen des Forschungskonsortiums (DFG-FOR2591, 2024) wurden in Kooperation mit der AG Czaplik (Priv.-Doz. Dr. med. Michael Czaplik, Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Aachen) mehrere thermographische Aufnahmen (Wärmebildkamera FLIR E95, Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA) des Elektrodenimplantates der Mäuse postoperativ gemacht. Diese Aufnahmen wurden verwendet, um mittels maschinellen Lernens eine

Methodik zur korrekten Wunderkennung zu entwickeln und anschließend automatisch Wundheilungsstörungen im Implantatbereich frühzeitig erkennen zu können. Die Verarbeitung und Analyse der thermographischen Bilder wird durch Wissenschaftler der AG Czaplík durchgeführt, sodass dies nicht Gegenstand dieser Dissertation ist. Am Ende des Versuches an Tag 4 wurden die Mäuse mit Pentobarbital euthanasiert. Verschiedene Proben wie Blutplasma, das Gehirn sowie der Gastrointestinaltrakt und die BUP-Depot Injektionsstelle wurden bei jedem Tier entnommen.

Der Versuch wurde in 20 *Batches* zu jeweils acht Tieren (10 *Batches* Männchen, 10 *Batches* Weibchen) aufgeteilt. Da männliche Mäuse häufiger für intrakranielle Eingriffe verwendet werden (KING et al., 2023), wurden vorerst alle männlichen *Batches* durchgeführt (Winterzeit; Nov. 2022 – Jan 2023) und deren Daten analysiert, um bei deutlichen Gruppenunterschieden, Tierzahlen im Sinne der *Reduction* in den weiblichen *Batches* reduzieren zu können. Da keine eindeutigen Schlussfolgerungen aus den Datensätzen der männlichen Tiere ableitbar waren, wurden die weiblichen *Batches* in der Sommerzeit von April 2023 bis Juli 2023 durchgeführt. Um *Batch*-Effekte zu vermeiden, waren in jedem *Batch* verschiedene experimentelle und Analgesieregimegruppen vertreten. Die zeitliche Reihenfolge der Operation oder Anästhesie der einzelnen Analgesieregimegruppen, wurde für jeden *Batch* mit einer Randomisierung (R 4.1.1 (R CORE TEAM, 2022), einfache Randomisierung) festgelegt. Die naiven Mäuse wurden am Operationstag auch in den Operationsvorbereitungsraum verbracht und durchliefen die Testserie aus (patho-)physiologischen, biochemischen und verhaltensbezogenen Parameter ebenfalls zu verschiedenen, mit der OP-Gruppe vergleichbaren Zeitpunkten. Die Platzierung der Mäuse des ersten postoperativen Zeitpunkts im Käfigregal, rotierte nach jedem *Batch* im Uhrzeigersinn eine Position weiter. Vor dem Beginn der Studie wurden In- und Exklusionskriterien festgelegt: lediglich gesunde C57BL/6J Wildtyp-Mäuse von Charles River mit intakten Tasthaaren wurden in die Studie aufgenommen. Weiterhin wurden folgende Exklusionskriterien bestimmt: 1) hochgradige intraoperative Blutung, Wundinfektion oder Verlust des Elektrodenimplantates, 2) Erreichen von Abbruchkriterien, 3) Für den Parameter Latenz bis zum Wühlverhalten: Ausbleiben von Wühlverhalten in der Videoanalyse zum Baseline Zeitpunkt und 4) Störung der technischen Ausrüstung. Wenn beim Erreichen der Abbruchkriterien die Vermutung bestand, dass im klinischen Score-

Sheet erhobene Veränderungen aufgrund von Durchbruchschmerzen bestanden, flossen die erhobenen Daten für dieses Tier bis zum Tag der Euthanasie in die Datenauswertung ein. Da das Auftreten von Durchbruchschmerzen ein wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Analgesieregimes ist, sollten die bis zum humanen Endpunkt erhobenen Daten in diesem Fall verwendet werden. Falls eine Abweichung der Gruppengröße von $n = 8$ bestand, ist dies in den Abbildungslegenden für einzelne Parameter vermerkt. Im Gegensatz zu den Tierpflegern und den technischen Assistenten, war die Experimentatorin aufgrund der Durchführung der Operationen und der Applikation der Analgetika bei der Erhebung der Daten nicht verblindet. Jedoch wurden bis auf den Neuro-Score alle Daten entweder gravimetrisch und mittels Software-Analyse erhoben oder retrospektiv verblindet ausgewertet. Allerdings war bei der Analyse von Bild- und Videomaterial die Zuordnung zu den OP-Gruppen aufgrund des sichtbaren Implantates unvermeidlich erkennbar, doch die Zuordnung zur Analgesieregimegruppe und zu den postoperativen Zeitpunkten blieb verblindet.

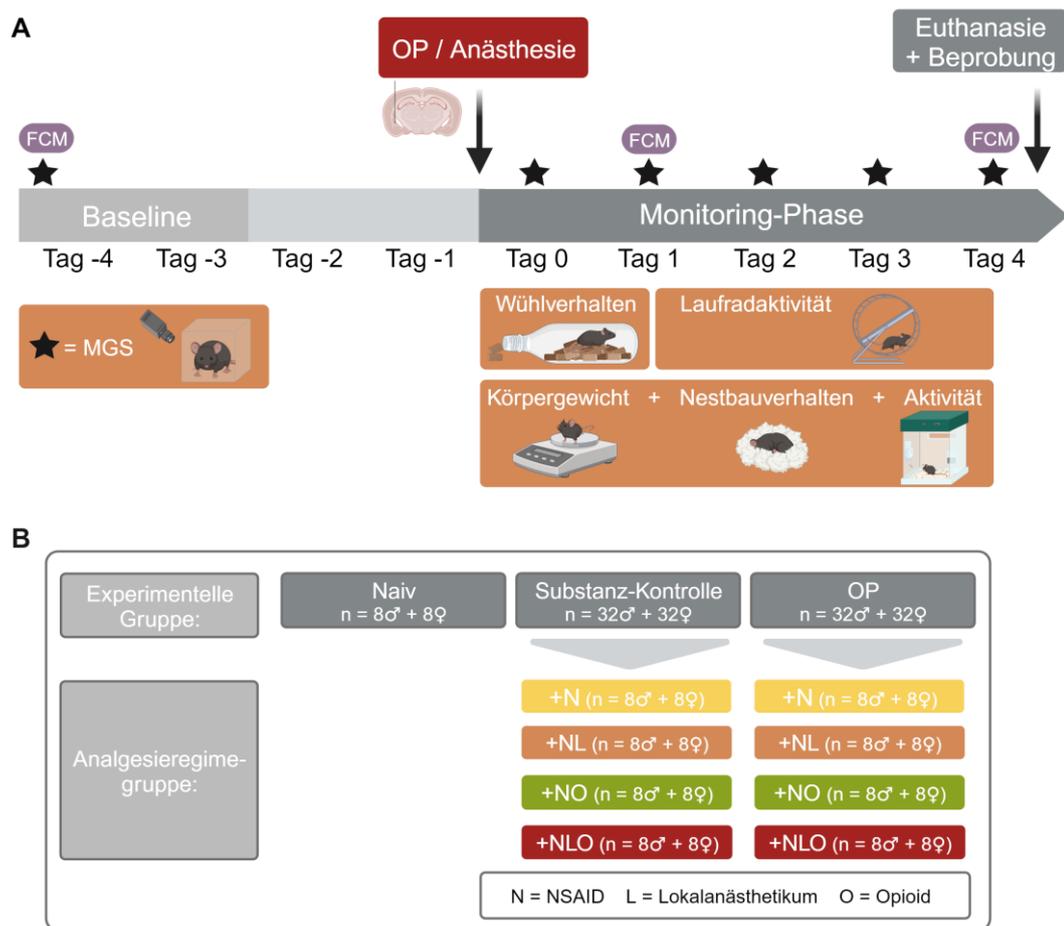


Abbildung 3: Studiendesign *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien.

Studiendesign (A) und experimentelle Gruppen (B) der Studie zum *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien. MGS = Mouse Grimace Sale, FCM = fäkale Kortikosteronmetaboliten, OP = Operation; erstellt mit BioRender.com.

2.3. Versuchstiere

Alle Experimente sind entsprechend der Tierversuchsgenehmigung der Regierung von Oberbayern und unter Beachtung des deutschen Tierschutzgesetzes sowie der RL 2010/63/EU durchgeführt worden (Lizenznummer: ROB-55.2-2532.Vet_02-19-157). Die Berichterstattung erfolgte gemäß der ARRIVE-Empfehlung-2.0 (PERCIE DU SERT et al., 2020). 73 männliche und 76 weibliche C57BL/6J Mäuse von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 70 bis 76 Tagen (Ankunftsgewicht Männchen M (Mittelwert) = 25,3 g, SD (*standard deviation*) = 0,627 und Weibchen M = 19,8 g, SD = 0.389) wurden für diese Studie verwendet. In der Tierhaltung herrschten kontrollierte Umweltbedingungen (22 ± 2 °C und 55 ± 10 % Luftfeuchtigkeit) und ein vorgegebener 12-Stunden-Hell-Dunkel-Beleuchtungszyklus (Hellphase: 6:00 bis 18:00 Uhr MESZ bzw. 5:00 bis

17:00 Uhr MEZ). Während der Akklimatisierungsphase und den Baselinemessungen wurden die männlichen Tiere einzeln in Makrolon Typ III Käfigen (Ehret GmbH & Co. KG), ausgestattet mit Holzschnitzeleinstreu (SAFE® Select, J. Rettenmaier & Söhne GmbH & CO KG), einem Baumwollnestlet (Zoonlab GmbH) und einem Maushaus (Zoonlab GmbH) gehalten. Weibliche Tiere wurden bis zu Beginn der Baselinemessungen der Wasser- und Futteraufnahme an Tag -7 in Gruppen von vier Tieren pro Makrolon Typ III Käfig mit einem Maushaus und zwei Baumwollnestlets gehalten und ab Tag -7 wie die männlichen Tiere einzeln gehalten. Den Tieren standen Futterpellets einer Standarddiät (Ssniff Spezialdiäten GmbH) und Leitungswasser (250 ml Tränkeflasche, Ehret GmbH & Co. KG) zur freien Verfügung. Die Tiere wurden während der Akklimatisierungsphase einmal täglich (Mo bis Fr, Tag -7 bis -3) von der Versuchsdurchführenden an das Tail-Handling (Herausnehmen aus dem Käfig an der Schwanzbasis) sowie die Fixation im Nacken gewöhnt. Zudem wurden sie mit der Wühlröhre für das Wühlverhalten (Sa bis Mo, Tag -9 bis -7) vertraut gemacht. In der experimentellen Phase wurden die Mäuse einzeln in einem weiteren Heimkäfig (PhenoTyper®, Noldus, Wageningen, Niederlande) untergebracht (Mo - Fr, Tag 0 bis 4). Die in den Käfigdeckeln der PhenoTyper® integrierten Kameras, ermöglichten kontinuierliche Videoaufzeichnung der Mäuse. Die PhenoTyper® waren ausgestattet mit Holzschnitzeleinstreu, einem Baumwollnestlet sowie einem für Infrarotlicht durchlässigem Maushaus (Noldus) und den Mäusen standen *ad libitum* Futterpellets einer Standarddiät und Leitungswasser (Tränkeflasche, Noldus) zur Verfügung. In den PhenoTypern® war entweder die Wühlröhre (Mo bis Di, Tag 0 bis 1) oder ein Laufrad (PhenoWheel, Noldus), welches an einer Seitenwand des PhenoTypers® befestigt wurde (Di bis Fr, Tag 1 bis 4), aufgebaut. Die Tiere wurden täglich in Augenschein genommen und ihr Wohlbefinden mit Hilfe eines klinischen Scores beurteilt. Während der Studie mussten $n = 5$ Mäuse exkludiert werden (Erreichen der Abbruchkriterien $n = 1$, hochgradige intraoperative Blutung $n = 1$, *Barbering* während der Akklimatisierung $n = 3$). Diese Ausfälle wurden mit fünf Reservetieren ersetzt, welche in zwei kleineren Reservetier-Batches das Studiendesign durchliefen. Eine männliche Maus der OP-Gruppe des +N-Analgesieregimes erreichte aufgrund von Durchbruchschmerzen den humanen Endpunkt an Tag 3 des Versuches. Die bis Tag 3 erhobenen Daten wurden wie oben erläutert für die Datenanalyse verwendet.

2.4. Analgesie

Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen, Zoetis Deutschland GmbH) wurde in einer Dosierung von 25 mg/kg über das Trinkwasser verabreicht. Die Baseline-Wasseraufnahme pro *Batch* und Tag wurde bestimmt, indem die Wasserflasche jedes Tieres alle 24 h während der Akklimatisierungsphase (Mo bis Fr, Tag -7 bis -3) gewogen wurde. Ein Korrekturfaktor für den durchschnittlichen Wasserverlust durch Tropfen der Wasserflaschen, welcher vor Versuchsbeginn erhoben wurde, wurde von den täglichen Gewichtsunterschieden der Wasserflaschen subtrahiert. Basierend auf der durchschnittlichen Wasseraufnahme pro Tier und Tag sowie dem durchschnittlichen Körpergewicht der Mäuse (Do und Fr, Tag -4 und -3) wurde die Konzentration des Carprofens für die Herstellung der Stammlösung (Rimadyl® und Leitungswasser) für jeden *Batch* individuell berechnet (Konzentration des Carprofens in der Stammlösung: Männchen $M = 0,1283$ mg/ml, $SD = 0,02095$; Weibchen $M = 0,1226$ mg/ml, $SD = 0,01113$). Um das photosensitive Carprofen vor Veränderung durch Licht zu schützen, wurden die Trinkflaschen mit Aluminiumfolie umhüllt und mit 50-60 g der Stammlösung befüllt. Die Mäuse erhielten das mit Carprofen angereicherte Trinkwasser 20 bis 24 h vor dem operativen Eingriff oder der Anästhesie und hatten postoperativ freien Zugang dazu bis zu Tag 4 (So bis Fr, Tag -1 bis 4). Das mit Carprofen angereicherte Trinkwasser wurde täglich in gleicher Konzentration erneuert. Unter Berücksichtigung eines Korrekturfaktors für die Trinkflaschen des PhenoTypers®, wurde die Aufnahme des carprofenhaltigen Trinkwassers ermittelt (Mo bis Fr, Tag 0 bis 4). Durch ein Materialtransferabkommen mit Kooperationspartnern (Prof. Dr. Jörg Huwyler, Department Pharmazeutische Wissenschaften, Universität Basel und Dr. Paulin Jirkof, Abteilung Tierwohl und 3 R, Universität Zürich, Schweiz) war es möglich, eine Buprenorphin-Formulierung mit verzögertem Wirkungseintritt (BUP-Depot) anzuwenden. Aus diesem Lyophilisat (1,25 mg Buprenorphinhydrochlorid pro Durchstechfläschchen) wurde mit 4 ml Aqua ad iniectabilia (B. Braun SE) eine Lösung hergestellt. Das BUP-Depot wurde 60 bis 90 min vor dem operativen Eingriff oder der Anästhesie subkutan in der unteren abdominalen Region injiziert. Das Lokalanästhetikum Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % Jenapharm® (Mibe Arzneimittel GmbH, Brehna, Deutschland) in einer Dosierung von 8 mg/kg, 1:1 verdünnt mit Kochsalzlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. Vet., B. Braun SE, Melsungen, Deutschland), wurde während der Allgemeinanästhesie

subkutan entlang der Hautschnittlinie installiert. Nach einer Wartezeit von 15 min, wurde der Hautschnitt gesetzt. Ein Tropfen der Verdünnung wurde zudem auf den freigelegten Schädel geträufelt und verteilt, bevor das Periost entfernt wurde.

2.5. Operativer Eingriff

Für den operativen Eingriff [vgl. (BOLDT et al., 2021)] wurden die Mäuse mit Isofluran CP® (Isofluran 1 ml/ml, VP-Pharma Handelsges.mbH, Burgdorf, Deutschland) narkotisiert (Einleitung: 4 %, Erhalt: 1,8–2 %). Während der Narkose lagen die Mäuse auf einer Wärmematte (PVC-Heizmatte IP67, Dragon Terraristik Bedarf, Duisburg, Germany). Zur Narkoseüberwachung wurde die Körpertemperatur mit Hilfe eines Thermometers (Temp JKT Thermocouple Thermometer, Oakton), die Atmung adspektorisch sowie der Zwischenzehenreflex zur Bestimmung der Narkosetiefe regelmäßig überprüft. Auf die Augen wurde zum Schutz vor Austrocknung eine Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Der Mäuseschädel von Tieren aus den OP-Gruppen wurde mit Hilfe eines Stereotakten (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) fixiert. Nachdem das Fell auf dem Schädel rasiert und das Operationsfeld desinfiziert (octenisept®, Schülke & Mayr GmbH, von Covetrus DE GmbH, Norderstedt, Deutschland) war, wurde die Haut eröffnet und mit Hilfe von Bulldog-Klemmen seitlich fixiert, sodass der knöcherne Schädel exponiert war. Die exakte Implantationsstelle für die rechte Amygdala (Koordinaten Männchen: lat: 3,3; ap: -1,4; dv: 5,0; Koordinaten Weibchen: lat: 3,3 ap: -1,4 dv: 4,9) wurde in Bezug auf den Knochennahtkreuzungspunkt *Bregma* lokalisiert. An dieser Stelle wurde ein kleines Loch mit einem Dentalbohrer (Durchmesser 1,2 mm, Fischer Goldschmiedebedarf, Pforzheim, Deutschland) in die Schädeldecke gebohrt. Um Fixationsschrauben (BN 650, M 1,2x2, Schrauben Preisinger GmbH, München, Deutschland) an der Schädeldecke anzubringen, wurden drei weitere Löcher rostral, lateral und kaudal der Implantationsstelle gebohrt (Dentalbohrer, Durchmesser 1,0 mm, Fischer Goldschmiedebedarf, Pforzheim, Deutschland). Ein kaltpolymerisierender Kunststoff (Paladur®; Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland) wurde um die Elektrode und die Fixationsschrauben modelliert, um das Implantat am Schädel zu fixieren. Die Wundränder um das Implantat wurden adaptiert und mit resorbierbarem Nahtmaterial (Surgicryl® Monofilament USP 5/0 EP 1, Smi AG, St. Vith, Belgien) verschlossen. Des Weiteren erhielten die Mäuse 10 ml/kg Ringer-Laktat-

Infusionslösung (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) subkutan appliziert, um Flüssigkeitsverluste während der Anästhesie auszugleichen. Jeweils zwei Mäuse des gleichen Analgesieregimes, von welchen die eine der Substanz-Kontroll-Gruppe und die andere der OP-Gruppe angehörte, wurden zeitgleich narkotisiert. Der Zeitpunkt, zu dem die Mäuse nach der Anästhesie Reflexe zeigten und bei vollem Bewusstsein waren, wurde als Erholungszeitpunkt definiert. Nach dem Aufwachen aus der Narkose, wurden die Mäuse auf einer Heizmatte platziert und ca. 1,5 h später in die Tierhaltung zurückgebracht.

3. Erhobene Parameter

In diesem Kapitel werden Parameter beschrieben, welche sowohl in beiden oder nur in einer der experimentell durchgeführten Studien erhoben wurden. In welcher Studie die Parameter Verwendung fanden, ist in den einzelnen Beschreibungen aufgeführt und auch aus den Illustrationen zu den beiden Studiendesigns ersichtlich (Abb. 2 und 3).

3.1. (Patho-)physiologische Parameter

3.1.1. Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde sowohl in der Studie zur Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung (Zeitpunkte: bei Ankunft, ab Woche 2 werktags 1-2 h nach der Dunkelphase) als auch in der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie (Zeitpunkte: Ankunft, Tag -4, Tag -3, prä- und direkt postoperativ, 6 h postoperativ und an Tag 1 bis 4) mit einer Tischwaage (FCB 3KO.1, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) erhoben.

3.1.2. Wund-Score

In der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung wurden insbesondere die männlichen Mäuse wöchentlich beim Käfigwechsel und in bereits aggressionsauffälligen Gruppenkäfigen auch täglich im Rahmen der Körpergewichtsmessung untersucht. Hierbei wurde mit einem Wattestäbchen gegen die Haarwuchsrichtung über den Rücken des Tieres gestrichen, um die Haut sichtbar zu machen. Dies wurde im Verdachtsfall auch nach Fixation im Nacken, am Bauch des Tieres durchgeführt. Wunden wurden nach dem Wund-Score angelehnt an Mertens und Kollegen (2019) klassifiziert (siehe Tab. 3). Zusätzlich wurde die Lokalisation der Wunde mit nachfolgendem Schema modifiziert nach

Lidster und Kollegen (2019) definiert (siehe Abb. 4). Ein einzelnes Tier wurde erneut beurteilt, falls sich der Wund-Score erhöhte oder weitere Lokalisationen der Wunden auftraten. Der Rückgang der Wunden durch Abheilen wurde nicht mit dem Wund-Score erfasst. Beim Auftreten eines Wund-Scores von 3 und 4 wurde, abhängig vom Allgemeinzustand des Tieres und der Einschätzung des Versuchsleiters, eine Trennung der Tiere innerhalb der Gruppe oder eine Euthanasie erwogen.

Score	Beschreibung
0	Keine Wunde sichtbar
1	Raue Stelle(n)
2	Oberflächliche Wunde oder < 1 cm Länge/Durchmesser
3	Tiefe Wunde oder 1 – 1,5 cm Länge/Durchmesser
4	Ulzeration, > 3 Wunden oder > 1,5 cm Länge/Durchmesser

Tabelle 3: Wund-Score.

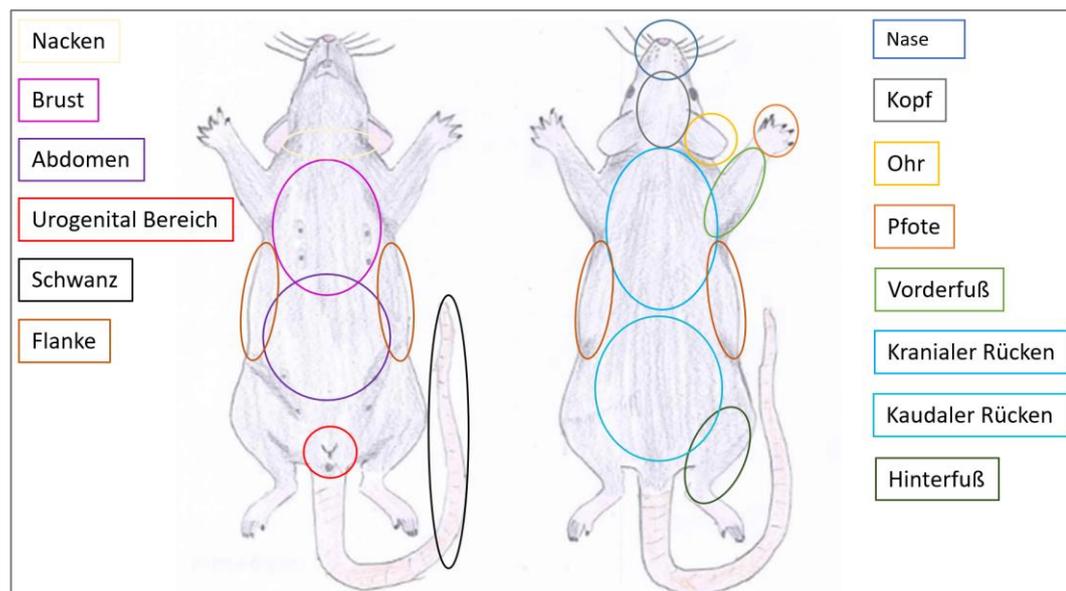


Abbildung 4: Körperregionen der Maus.

Ventrale Ansicht links, dorsale Ansicht rechts. Eigene Darstellung.

3.1.3. *Barbering*

Um das *Barbering* in der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung zu erfassen, wurden der Vibrissen- und der Fell-Score entwickelt (siehe Tab. 4). Auf *Barbering*-Verhalten wurde während der täglichen Kontrolle, insbesondere aber beim Käfigwechsel geachtet. Der Vibrissen-Score beschreibt den

Grad des Vibrissenverlustes, wohingegen der Fell-Score den Grad des Fellverlustes am ganzen Körper berücksichtigt. Beim Fell-Score wurde zusätzlich die Lokalisation beschrieben (siehe Abb. 4).

Score	Fell-Score	Vibrissen-Score
0	Kein Fellverlust	Kein Verlust von Vibrissen
0,5	< 30% Fellverlust	< 30% Vibrissenverlust
1	< 50% Fellverlust	< 50% Vibrissenverlust
1,5	< 75% Fellverlust	< 75% Vibrissenverlust
2	100% Fellverlust	100% Vibrissenverlust

Tabelle 4:Fell- und Vibrissen-Score.

Der Fell-Score beschreibt ein abnormales Fellrumpfverhalten, welches zu Alopezie führt. Der Vibrissen-Score beschreibt das Ausrupfen oder Trimmen der Vibrissen.

3.2. Heimkäfigassoziertes Verhalten

3.2.1. Aggressionsverhalten

In der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung wurden die Gruppenkäfige männlicher und weiblicher Mäuse nach dem Käfigwechsel in Woche 1, 2, 3, 4, 6 und 8 für 10 min im Käfigregal beobachtet. Die Parameter Latenz bis zur ersten Attacke, Dauer der ersten Attacke und die Anzahl der Attacken wurden adspektorisch erhoben. In Woche 5 und 7 fand aufgrund der Durchführung des Wühlverhaltenstests und des Forced-Swim-Tests keine Beobachtung des aggressiven Verhaltens statt.

3.2.2. Nestbaurverhalten

Für die Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung wurde das Nestbaurverhalten an Versuchstag 37 und 51 beurteilt. 2 ± 1 h vor der Dunkelphase fand am vorhergehenden Tag der Käfigwechsel mit Gabe von einem (Einzelhaltung) oder zwei (Gruppenhaltung) neuen Baumwollnestlets statt. Am Folgetag wurde zu Beginn der Hellphase (+ 1 h) das Nestbaurverhalten evaluiert. In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde das Nestbaurverhalten ebenfalls zu folgenden Zeitpunkten erfasst: 2 h, 4 h, 6 h am Tag -4, 1 bis 2 h nach dem Lichtwechsel an Tag -3, 4 h, 6 h, 8 h nach dem Erholungszeitpunkt an Tag 0 sowie 1-2 h nach dem Lichtwechsel an Tag 1 bis 4. Um eine Zerstörung der Nester durch Aufscheuchen der Tiere zu verhindern,

wurden in der ersten Studie vorerst alle Nester mit dem Nest-Score durch die Experimentatorin bewertet, bevor Fotos (LUMIX DMC-LF1, Panasonic Corporation, Kadoma, Japan) in lateraler Ansicht und von oben gemacht wurden. In der zweiten Studie wurden Aufnahmen in lateraler Ansicht, Ansicht von oben und im 45° Winkel angefertigt. Die Nestfotos beider Studien wurden retrospektiv von einer trainierten, verblindeten Person evaluiert. Dabei wurde ein modifizierter Nest-Score nach Jirkof (JIRKOF et al., 2013) und Deacon (DEACON, 2006a) angewandt:

- Score 1: Nestlet ist kaum manipuliert (> 90 % intakt)
- Score 2: Nestlet ist aufgerissen (50-90 % intakt)
- Score 3: Nestlet ist fast vollständig zerrissen (50-90 % ist zerrissen)
 - < 50 % des Nestlets ist intakt
 - < 90 % der zerrissenen Nestlets befinden sich in einem Viertel des Käfigs
 - Stücke des Nestlets sind überall im Käfig verteilt und formen kein identifizierbares Nest
- Score 4: flaches, identifizierbares Nest (> 90 % sind zerrissen)
 - Stücke des Nestlets sind nur in einem Viertel des Käfigs verteilt
 - < 50 % der Wände des Nests sind höher als eine schlafende Maus
- Score 5: nahezu perfektes Nest (> 90 % sind zerrissen)
 - 50 % der Wände des Nests sind höher als eine schlafende Maus
- Score 6: perfektes Nest (> 90 % sind zerrissen)
 - 90 % der Wände des Nests sind höher als eine schlafende Maus

3.2.3. Wühlverhalten

Zur Erfassung des Wühlverhaltens wurde ein Protokoll in Anlehnung an Deacon verwendet (DEACON, 2006b). Dafür wurde eine Wühlröhre (Zoonlab GmbH, Länge: 20 cm, Durchmesser Flaschenhals: 3,5 cm) mit 200 g (\pm 1 g) Futterpellets (Ssniff Spezialdiäten GmbH) gefüllt und in den Heimkäfig gelegt. Nach einer definierten Zeit, wurde die Wühlröhre gewogen und das Gewicht der entfernten Pellets bestimmt.

In der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung wurden alle Tiere fünf Tage in Folge (Versuchstag 29 bis 33) 2 h (\pm 1 h) vor der Dunkelphase in einen neuen Käfig transferiert, um das Wühlverhalten von jedem

Tier individuell messen zu können. Dieser Käfig (Typ III Makrolon hoch, Ehret GmbH & Co. KG) war mit etwa der Hälfte an Holzschnitzeleinstreu (SAFE® Select, J. Rettenmaier & Söhne GmbH & CO KG), mit einer Trinkflasche und der Wühlröhre versehen. Nach zwei Stunden des Verhaltenstests wurden die Tiere wieder in ihre ursprünglichen Heimkäfige und Gruppenkonstellationen zurückgeführt. Die aus der Wühlröhre entfernten Pellets wurden aus dem individuellen Wühlkäfig entnommen, sodass der experimentelle Aufbau für die folgenden Versuchstage konsistent war.

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurden die Mäuse an Tag -9 bis -7 an den experimentellen Aufbau der gefüllten Wühlröhre im Heimkäfig gewöhnt. Das Baseline-Wühlverhalten wurde an Tag -4 bis Tag -3 im Anschluss an den Käfigwechsel getestet. Das Gewicht der entfernten Pellets wurde 2 h, 4 h, 6 h und 20 h nach dem Käfigwechsel bestimmt. Zusätzlich wurden seitliche Videoaufnahmen (Axis M1065-L Netzwerk Kamera, Axis Communications AB, Lund, Schweden) dazu verwendet, um die *latency to burrow* (Zeit bis die Mäuse mindestens 10 s kontinuierliches oder mindestens 20 s Wühlverhalten mit kurzen Pausen von maximal 5 s zeigen) retrospektiv zu erfassen. Mäuse, welche bei den Baselinemessungen kein Wühlverhalten in der Videoaufnahme zeigten, wurden für die postoperativen Messungen des Parameters *latency to burrow* exkludiert. Der gleiche experimentelle Aufbau wurde nach dem Erholungszeitpunkt von Tag 0 bis Tag 1 im PhenoTyper® angewandt. Das Gewicht entfernter Pellets wurde 4 h, 6 h, 8 h und 20 h nach dem Erholungszeitpunkt bestimmt (Mäuse wurden 2 h nach dem Erholungszeitpunkt in die PhenoTyper® gesetzt). Konnte im Beobachtungszeitraum kein Wühlverhalten in den Videoaufnahmen identifiziert werden, so wurde für die statistische Auswertbarkeit die *latency to burrow* der maximalen Beobachtungsdauer von 20 h gleichgesetzt.

3.2.4. Aktivität

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurden Videoaufzeichnungen mit den PhenoTypern® (Noldus) ab 2 h nach dem Erholungszeitpunkt bis Tag 4 aufgenommen, welche zeitgleich mit Hilfe einer Software (EthoVision® XT 15, RRID:SCR_000441, Noldus) durch Detektion und Tracking der Mäuse ausgewertet wurden. Damit konnten folgende Parameter erfasst werden: zurückgelegte Distanz (cm) und die Aufenthaltsdauer in Sekunden in einem definierten Bereich über dem Maushaus (sog. Zone Haus).

3.2.5. Laufradaktivität

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde von Tag 1 bis 4 eine seitliche PhenoTyper® Wand mit einem Laufrad (Durchmesser: 15 cm, Breite 7 cm; PhenoWheel, Noldus) ausgestattet. Die zurückgelegte Distanz (m) wurde über erfasste Laufradumdrehungen pro Minute (EthoVision® XT 15, RRID:SCR_000441, Noldus) berechnet.

3.3. Verhaltenstests

3.3.1. Neuro-Score

Der Neuro-Score, welcher in der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie verwendet wurde, stellt einen modifizierten Irwin-Score dar (BUHECKER et al., 2022; REIBER et al., 2022c), der das Allgemeinbefinden sowie neurologische Veränderungen der Maus erfasst. Der Neuro-Score wurde an Tag -4 als Baselinewert, 4 h nach dem Erholungszeitpunkt an Tag 0 sowie an Tag 1 bis 4 erfasst. Vorerst wurden Parameter des Neuro-Scores bewertet, welche keine Interaktion mit dem Tier voraussetzen und durch Adspektion im Heimkäfig erfasst werden können. Danach wurden weitere Parameter bei abgenommenem Käfigdeckel im Heimkäfig beurteilt. Schlussendlich wurde der Neuro-Score durch Parameter vervollständigt, bei welchen eine Fixation des Tieres notwendig ist. Die Auflistung der einzelnen Parameter findet sich in Kapitel X.6 Tab. 10.

3.3.2. Mouse-Grimace-Scale

Um ein Scoring der Mausmimik für die Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie ohne Präsenz der Experimentatorin zu ermöglichen, wurden zehnminütige Videoaufnahmen der Tiere gemacht. Aus diesen Videoaufnahmen wurden Standbilder gewonnen und retrospektiv beurteilt. Für die Videoaufnahmen mit einer Spiegelreflexkamera (EOS 800D Digitalkamera + EF-S 18-55mm f/4-5,6 IS STM Objektiv, Canon Inc, Tokyo, Japan) wurden die Tiere in Plexiglasboxen mit Lüftungslöchern (Länge: 9cm, Breite: 5 cm, Höhe: 5 cm) gesetzt und in einem Lichtzelt (Photo Studio Lichtzelt Diffusion Soft Box, Schießwürfel 80 x 80 cm, NEEWER, East Brunswick NJ, USA) mit einer Helligkeit von 400-410 lux platziert. Nach der zehnminütigen Aufnahme wurden die Tiere wieder in ihren Heim- oder Transportkäfig transferiert. Videoaufnahmen für den MGS wurden an Tag -4 für die Baseline sowie an Tag 0 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach dem Erholungszeitpunkt sowie an Tag 1 bis 4 durchgeführt. Mit Hilfe eines

Bildverarbeitungsprogrammes (Kooperationspartner: Prof. Dr.-Ing. Dorit Merhof, Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen) (ERNST et al., 2020b) wurden aus den Videoaufnahmen ca. 600 einzelne Bilder ausgeschnitten. Diese Bilder wurden manuell nach folgenden Qualitätskriterien vorselektiert: a) Vorder- oder Profilansicht, b) mindestens ein Auge sichtbar (exkludiert: geschlossene Augen aufgrund von Blinzeln oder Schlafen), c) Nasen- und Wangenbereich sichtbar, d) mindestens ein Ohr sichtbar, e) statische, ruhige Position (keine Fellpflegeverhalten oder Schnüffeln) und f) gute Bildqualität (ERNST et al., 2020b). Aus diesen vorselektierten Bildern wurden zehn Bilder, jeweils am nächsten zur Mitte einer jeden Aufnahmeminute (0:30, 1:30 min usw.), ausgewählt, sodass pro Zeitpunkt und Tier zehn Bilder für das Scoring zur Verfügung standen. Alle MGS Bilder wurden von einer trainierten Experimentatorin randomisiert und verblindet innerhalb von zwei Wochen pro Geschlecht mit Hilfe des MGS-Score-Tools (Kooperationspartner: Prof. Dr.-Ing. Dorit Merhof, Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen) (ERNST et al., 2020b) beurteilt. Hierbei wurde der Mouse-Grimace-Scale nach Langford (LANGFORD et al., 2010) angewandt. Ein Mittelwert-MGS pro Tier pro Zeitpunkt wurde berechnet. Falls eine *action unit* nicht bewertet werden konnte, wurde dies in der Kalkulation berücksichtigt.

3.3.3. Open-Field-Test

Der Open-Field-Test wurde im Rahmen der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung in Woche 6 des Versuchs durchgeführt. Um die Geschlechtertrennung aufrecht zu erhalten, wurden an Tag 37 die Männchen und an Tag 38 die Weibchen getestet. Der Versuch begann 2 h nach der Dunkelphase mit einer dreißigminütigen Habituation an den Versuchsraum bei einer durchschnittlichen Lichtintensität von 25 lux. An allen Standorten wurde ein quadratisches, weißes Open-Field mit vier Arenen, welche jeweils die Maße 50 x 50 x 50 cm aufwiesen, verwendet. Die Arenen wurden mit einer Lichtintensität von 25 lux gleichmäßig ausgeleuchtet. Vier Mäuse pro Versuchsdurchlauf wurden zeitgleich von zwei Experimentatorinnen in der Mitte der Arena platziert. Während des zehnminütigen Verhaltenstests, wurden die Mäuse auf Video (CCTV Kamera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurden die Arenen mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt. Die Analyse der Videoaufnahmen fand mit der Tracking-Software EthoVision (EthoVision® XT 8.5, Noldus) statt. Die innere Zone maß 30 x 30 cm. Der 10 cm Abstand zu den Wänden der Arena

bildete die äußere Zone. Erhoben wurden folgende Parameter: zurückgelegte Strecke (cm), mittlere Geschwindigkeit (cm/s), Aufenthaltsdauer in der äußeren und inneren Zone der Arena (s) und Dauer der Immobilität (s).

3.3.4. Elevated-Zero-Maze-Test

Dieser Versuch wurde für die Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung in Woche 6 an Tag 39 und 40 geschlechtergetrennt durchgeführt. Das Elevated-Zero-Maze bestand aus einer erhöhten, runden Plattform von 6 cm Breite, welche in zwei offene Quadranten und in zwei geschlossene Quadranten mit 11 cm hohen seitlichen Wänden gegliedert war. Zum Schutz vor dem Herunterfallen der Tiere wurde die Plattform mit einer angerauten Oberfläche (Skateboard Griptape, LIOOBO, City of Industry, USA) ausgestattet. Die Mäuse wurden zu Versuchsbeginn in denselben geschlossenen Quadranten des *Mazes* gesetzt. Über Videoaufnahmen (CCTV Kamera, Panasonic, Suzhou, China) wurden zeitgleich zum Versuch von zwei Forscherinnen manuell folgende Parameter erhoben: Latenz bis zum ersten Eintritt in den offenen Quadranten (s), Aufenthaltsdauer in dem offenen Quadranten (s), Anzahl an Eintritten in den offenen Quadranten (alle vier Pfoten außerhalb des geschlossenen Bereiches), Anzahl an Übertritten (Wechsel von einem in den anderen geschlossenen Bereich). Nach einer Dauer von 5 min, wurden die Tiere wieder in ihren Heimkäfig verbracht. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurde die Plattform mit 0,1%iger Essigsäure gereinigt.

3.3.5. Forced-Swim-Test

Der *Forced-Swim-Test* fand in der siebten Versuchswoche der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung statt. Hierbei wurde jedes Tier an zwei aufeinanderfolgenden Tagen getestet, sodass an einem Tag beide Geschlechter getestet wurden. Vier Messzylinder (Rotilabo 2000 ml hohe Form, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) wurden mit 24 °C warmen Wasser gefüllt und in eine Halterung mit Sichttrennung zwischen den einzelnen Messzylindern gestellt. Die pro Durchlauf zu testenden Tiere wurden 8 min vor Beginn des Versuches in den Versuchsraum transferiert. Zwei Forscherinnen ließen vier Mäuse zeitgleich in das Wasser des Messzylinders gleiten. Der sechsminütige Test wurde durch eine seitliche Kamera (GoPro Hero 9, GoPro, San Mateo, USA) aufgezeichnet. Zeitgleich wurden die Tiere von einer Deckenkamera (CCTV

Kamera, Panasonic, Suzhou, China) aufgezeichnet, sodass sie außerhalb des Versuchsraumes überwacht werden konnten und bei möglichen Anzeichen einer Gefährdung eine sofortige Intervention möglich gewesen wäre. Nach Ablauf von 6 min wurden die Mäuse aus dem Wasser geholt, mit Baumwolltüchern abgetrocknet und unter Beobachtung 10 min in ihrem Heimkäfig mit einer Infrarotlampe gewärmt. Zwischen den einzelnen Durchläufen wurden die Messzylinder gespült und mit frischem Wasser gefüllt. Die Analyse der Videoaufnahmen wurde mit der Tracking-Software EthoVision (EthoVision® XT 15, Noldus) durchgeführt. Folgende Parameter wurden analysiert: Latenz bis zur ersten Immobilität (s), Dauer der Immobilität (s).

3.4. Probenverarbeitung und Analyse

3.4.1. Kotproben für die FCM Analyse

Um individuelle Werte von Tieren aus der Gruppenhaltung im Rahmen der Studie zur Belastungsbeurteilung bei Einzel- und Gruppenhaltung erheben zu können, war es vorgesehen, Kotproben an Tag 29 und 32 des Wühltests aus den individuellen Käfigen zu sammeln. Bei einigen Arbeitsgruppen konnte innerhalb von 2 h jedoch nicht genügend Probenmaterial gesammelt werden. Deswegen wurden zwei weitere Zeitpunkte zur Kotprobensammlung bestimmt. Hierbei handelte es sich jedoch um Sammelkotproben, die auf Käfigebene aufgelesen wurden. Tiere erhielten nach dem FST einen neuen Käfig, aus welchem 24 h später an Tag 45 Kot gesammelt wurde. An Tag 51 auf 52 wurde gleichermaßen verfahren. Zudem wurde darauf geachtet, allen Kot aus dem Käfig zu sammeln, um ein möglichst repräsentatives Ergebnis von allen Tieren in Gruppenkäfigen und über den gesamten Beprobungszeitraum zu erhalten.

Im Rahmen der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde bei weiblichen Tieren Kot an Tag -7 und -4, bei männlichen Tieren an Tag -4 als Baselinewert gesammelt. Weiterhin wurde Kot an Tag 1 und Tag 4 gesammelt. Kotproben wurden nach der zehnmütigen MGS-Aufnahme aus den Plexiglasboxen, beim Neuro-Score und bis zu zwei h nach der MGS-Aufnahme aus dem frisch eingestreuten Heimkäfig an Tag -7/-4 oder dem Transportkäfig an Tag 1 bis Tag 4 entnommen.

Die Kotproben beider Studien wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gelagert. Um die Proben für die Extraktion der

Kortikosteronmetaboliten in Methanol vorzubereiten, wurden diese nach dem Auftauen mit Stößel und Spatel homogenisiert und bei 60°C im Trockenschrank getrocknet, um ein feines Pulver zu erhalten. 50 mg des Pulvers einer jeden Probe wurden in ein weiteres Reaktionsgefäß eingewogen und 1 ml 80%iger Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Nachdem die Proben 30 min auf einem Vortexer (RapidVap, LABCONCO, Kansas City, MO, USA) geschüttelt wurden, wurden sie bei 3.500 rpm (*rounds per minute*) 10 min zentrifugiert (gekühlte Tisch-Mikrozentrifuge 5418 R, Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland). 500 µl des Überstandes und eine Rückstellprobe wurden anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80 °C gelagert. Alle Proben wurden auf Trockeneis zu dem Labor von Prof. Dr. Rupert Palme (Institut für Physiologie, Pathophysiologie und Biophysik, Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie; Veterinärmedizinische Universität Wien, Österreich) versandt. Dort fand die Mengenbestimmung der FCMs in dem Methanolextrakt mit Hilfe eines 5 α -Pregnan-3 β ,11 β ,21-triol-20-eins Enzym-Immunoassays statt (TOUMA et al., 2004).

3.4.2. Blutplasma für die Carprofen Konzentrationsbestimmung

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde den Mäusen nach vorheriger Analgesie (100 mg/kg Metamizol 1:10 verdünnt in 0,2%iger Saccharinlösung, p. o., 30 min vor der Euthanasie (Vetalgin®, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland)) und darauffolgender Euthanasie mit Pentobarbital (600 mg/kg, i.p., Narkodorm® 182,3 mg/ml, CP-Pharma GmbH, Burgdorf, Deutschland) durch finale Herzpunktion Blut entnommen. Dieses wurde in eine Microvette (Microvette 200 K3 EDTA, 200 µl, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) transferiert, auf Eis gelagert und schnellstmöglich bei 2.500 g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. 25 µl des überständigen Blutplasmas wurden in 1,5 ml Probengefäße pipettiert. Wenn möglich wurde ein Aliquot als Rückstellprobe entnommen. Die Plasmaproben wurden bei -80 °C gelagert und an eine Kooperationspartnerin (Prof. Dr. Marion Bankstahl, Dr. Ayлина Glasenapp, Experimentelle Chirurgie und Anästhesiologie, Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland) für die Quantifizierung des Carprofens mittels *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie) geschickt (GLASENAPP et al., 2023).

3.4.3. Histopathologische Untersuchung

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde den euthanasierten Tieren aus den Behandlungsgruppen +NO und +NLO vor der transkardialen Perfusionsfixation die Haut um die Einstichstelle des BUP-Depots entnommen. Nach der transkardialen Perfusionsfixation mit 4%igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 Mol Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden der Magen sowie das Duodenum aus der Bauchhöhle der Maus präpariert. Um den Mageninhalt zu entfernen, wurde der Magen durch einen kleinen Scherenschnitt geöffnet sowie mit Kochsalzlösung gespült. Beide Proben wurden in Schnappdeckel-Gläser, gefüllt mit 4%igem PFA in 0,1 Mol Phosphatpuffer (pH 7,4), gelegt und zur histopathologischen Untersuchung (Paraffineinbettung, Hämatoxylin-Eosin, Giemsa Färbung und zusätzlich PAS (*periodic acid Schiff*)-Reaktion für Hautproben) an das Institut für Tierpathologie (Prof. Dr. Andreas Parzefall, Effrosyni Michelakaki, Institut für Tierpathologie, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München) übergeben.

3.4.4. Gehirnentnahme

In der Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde der Kopf der Mäuse nach der transkardialen Perfusionsfixation abgetrennt und das Gehirn freipräpariert. Das Gehirn wurde 24 h in 4%igen PFA in 0,1 Mol Phosphatpuffer (pH 7,4) aufbewahrt und dann in 30%ige Sucrose-Lösung transferiert. Nachdem das Gehirn sich in letzterer Lösung abgesetzt hatte, wurde es mit flüssigem Stickstoff (Besamungsstation München/Grub, Deutschland) in einem Fixiergel (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Fintec Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande) eingefroren und bei -80 °C gelagert, um es für zukünftige Untersuchungen aufzubewahren.

4. Auswertung und Statistik

Der Stichprobenumfang wurde für beide Studien durch eine *a priori* Stichprobenberechnung mit dem Programm G*Power 3.1.9.2 (Universität Düsseldorf) festgelegt, wobei ein α -Fehler von 0,05 und eine Power von 0,8 angesetzt wurde. Eine Maus wurde als experimentelle Einheit angesehen (Ausnahme: Studie zur Belastung von Einzel- und Gruppenhaltung, Parameter „Nestbauverhalten“ auf Käfigebene bei Gruppenhaltung). Die Stichprobenberechnung für die Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und

Gruppenhaltung wurde anhand mehrerer Parameter (Wühlverhalten Effektstärke $f = 0,44$, Nestbauverhalten $f = 0,44$, Open-Field-Test: zurückgelegte Distanz $f = 0,37$, Geschwindigkeit $f = 0,36$, Aufenthalt im Zentrum $f = 0,26$, FST $f = 0,5$, Elevated-Zero-Maze $f = 0,5$, Körpergewicht $f = 0,4$, FCM $f = 0,364$) mit einer F-Test-ANOVA (*analysis of variance, between factors, within factors und interaction*) durchgeführt. Bei wiederholten Messungen wurde eine F-Test-ANOVA mit Messwiederholung angewandt. Für vier experimentelle Gruppen ergab sich eine minimale Stichprobengröße von $n = 112$ Tiere. Da diese Studie jedoch als multizentrische Studie geplant war und von einem Klustereffekt zwischen den Arbeitsgruppen ausgegangen wurde, betrug die Stichprobengröße nach Einberechnung des Intra-Kluster Korrelationskoeffizienten $\rho = 0,09$ noch $n = 64$ Tiere (bei beiden Geschlechtern $n = 12$ in Einzelhaltung und $n = 20$ in Gruppenhaltung) pro Arbeitsgruppe. Für die Studie zum *Refinement* der perioperativen Analgesie wurde eine benötigte Stichprobenzahl von $n = 144$ mit $n = 8$ Tieren für 18 experimentelle Gruppen anhand des Hauptparameters MGS ($f = 0,41$, biologisch relevanter Unterschied $= 0,25$, $SD = 0,3$) mit dem F-Test-ANOVA (zweifaktoriell mit Messwiederholung (*between factors, within factors und interaction*) sowie einfaktoriell) berechnet.

Unterschiede zwischen experimentellen Gruppen wurden bei parametrischen Datensätzen mit einer *one-way*, einer *two-way*, einer *two-way repeated measures* (RM) oder einer *three-way* RM-ANOVA untersucht (Haupteffektgrößen Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung: Geschlecht, Haltungsbedingung, Zeit; Haupteffektgrößen *Refinement* der perioperativen Analgesie: Analgesieregime, Zeit). Signifikante Unterschiede der Haupteffektgrößen wurden daraufhin mit der Bonferroni-Korrektur geprüft. Im Fall von einzelnen fehlenden Werten wurde anstatt der ANOVA, welche keine fehlenden Werte zulässt, ein Mixed-Effects-Model gerechnet (fester Effekt: Analgesieregime, Zeit; zufälliger Effekt: Subjekt, *compound symmetry covariance matrix, restricted maximum likelihood*). Nicht-parametrische Datensätze wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test und einem nachfolgenden *Dunn's post-hoc*-Test analysiert. P-Werte $\leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Datensätze sind entweder als Mittelwert \pm SD oder als Median \pm IQR (*interquartile range*) graphisch illustriert. Für die statistische Analyse und die graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism 10.0.2 (GraphPad Software,

Boston, MA, USA) und R Version 4.1.1 (R CORE TEAM, 2022) verwendet. In der Studie zur Belastungseinschätzung von Einzel- und Gruppenhaltung wurden Daten separat für beide Geschlechter analysiert und dargestellt, wenn eine signifikante Interaktion der Haupteffektgrößen Geschlecht und Haltungsbedingung vorhanden war. Wenn keine signifikante Interaktion identifiziert wurde, wurden die Daten beider Geschlechter zusammengefasst (BUCH et al., 2019). Das Ziel der Studie zum perioperativen *Refinement* war es, Einflüsse der Haupteffektgrößen Zeit und Analgesieregime auf Mäuse der verschiedenen OP- und Substanz-Kontroll-Gruppen im Vergleich zu der naiven Gruppe zu identifizieren. Dabei war der Einfluss der Haupteffektgröße Geschlecht und dessen Interaktionen nicht Gegenstand der Untersuchung und die Datensätze wurden deswegen geschlechtergetrennt analysiert und ausgewertet. Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede der *post-hoc*-Tests zwischen OP- oder Substanz-Kontroll-Gruppen und naiven Gruppen im Ergebnisteil und in den Graphen dargestellt. Signifikante Unterschiede der *post-hoc*-Tests zwischen verschiedenen Analgesieregimegruppen wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit tabellarisch im Anhang aufgeführt (siehe Kapitel X.10. Tab. 15). Die Spearman Korrelationsanalyse wurde mit Hilfe des R-Paketes *corrplot* (SIMKO, 2021) berechnet und visualisiert. Das R-Paket *ggplot2* (WICKHAM, 2016) diente der graphischen Darstellung der Hauptkomponentenanalyse (*principle component analysis*, PCA). Die einzelnen Schritte des bioinformatischen Workflows zum Design des CMS orientierten sich an bereits veröffentlichten Studien (VAN DIJK et al., 2020; REIBER et al., 2023). Für die Erstellung des CMS wurde das R-Paket *cms*, welches unter <https://github.com/mytalbot/cms> erhältlich ist, verwendet (TALBOT, 2022).

V. ERGEBNISSE

1. Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung

Die Ergebnisse aller Arbeitsgruppen der multizentrischen Studie und die übergreifende Datenanalyse werden anderweitig publiziert [vgl. Tagungsbeitrag (MALLIEN, 2023)] und sind nicht Gegenstand dieser Dissertation. Da $n = 1$ männliches Tier in Gruppenhaltung aufgrund von Bisswunden den humanen Endpunkt erreichte, wurde sowohl dieses Tier als auch dessen Käfiggenossen $n = 3$, welche folglich einzeln gehalten wurden, von der Analyse dieser Parameter exkludiert: Körpergewicht, Wühlverhalten, Nestbauverhalten, Open-Field-Test, Elevated-Zero-Maze-Test, FST und FCM. Die Gruppengrößen betragen somit $n = 12$ Mäuse in Einzelhaltung pro Geschlecht, $n = 20$ weibliche Mäuse und $n = 16$ männliche Mäuse in Gruppenhaltung. Da das Auftreten aggressionsbedingter Verletzungen ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war, flossen die erhobenen Wund-Scores, das *Barbering* und die Aggressionsbeobachtungen dieses männlichen Gruppenkäfigs bis zum Versuchstag 23 in die deskriptive Auswertung mit ein.

1.1. Körpergewicht

Für die statistische Analyse der Entwicklung des Körpergewichtes während des gesamten Versuches wurden die Werte bei Ankunft und in den folgenden Wochen von Montagen und Freitagen verwendet (Abb. 5). Sowohl der Faktor Zeit, als auch die Interaktion der Faktoren Zeit und Haltungsform, hatten einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichtes von weiblichen Tieren (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: $F_{4,533, 136,0} = 350,3, p < 0,001$; Zeit x Haltungsbedingung: $F_{14, 420} = 5,234, p < 0,001$). Weibliche Tiere in Einzelhaltung zeigten an Versuchstag 36 ein signifikant höheres und an Versuchstag 47 einen Trend für höheres Körpergewicht als Weibchen in Gruppenhaltung (Bonferroni-Korrektur, $p = 0,04$ und $p = 0,05$). Der Faktor Zeit hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Entwicklung des Körpergewichtes der Männchen (Mixed-Effects-Modell: Zeit: $F_{2,687,69,66} = 319,6, p < 0,001$). Bei den männlichen Tieren zeigten sich keine Unterschiede aufgrund der Haltungsform.

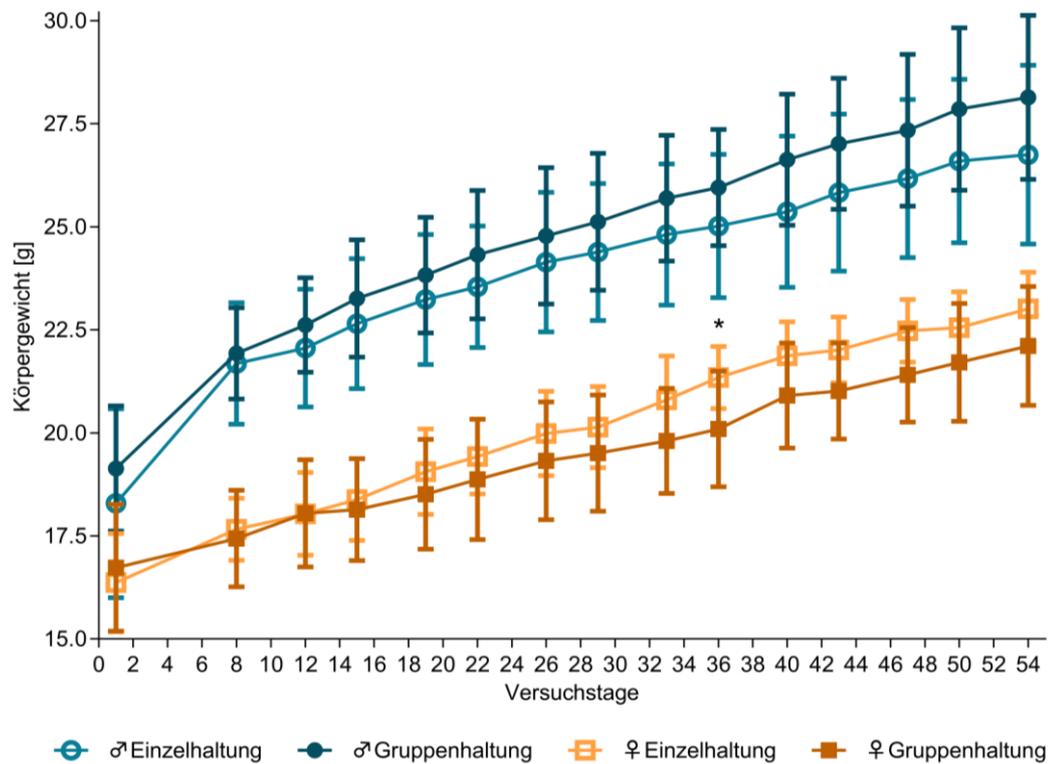


Abbildung 5: Entwicklung des Körpergewichtes.

Entwicklung des Körpergewichtes während des gesamten Versuchszeitraums. Weibliche und männliche Tiere zeigten eine Körpergewichtszunahme über den Versuchszeitraum. Weibchen in Einzelhaltung zeigten an Tag 36 ein signifikant höheres Körpergewicht. Bei männlichen Tieren konnten keine Gruppenunterschiede analysiert werden. *Two-way* RM-ANOVA pro Geschlecht, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$.

1.2. Wund-Score

An Versuchstag 23 erreichte $n = 1$ Männchen den humanen Endpunkt aufgrund von Bisswunden (Wund-Score 4) und einer von fünf Gruppenkäfigen mit männlichen Tieren musste daraufhin aufgelöst werden. An 55 % der männlichen Tiere wurden im Laufe des gesamten Versuchszeitraums Wunden beobachtet (Abb. 6A). Dabei wurde im Verhältnis zur Gesamtanzahl an erteilten Wund-Scores mit 64,1 % am häufigsten Wund-Score 1, gefolgt von Wund-Score 2 mit 23,1 %, Wund-Score 3 mit 7,7 % und Wund-Score 4 mit 5,1 % festgestellt (Abb. 6B). Die erfassten Wund-Scores, ausgedrückt durch den kumulativen Wund-Score aller Tiere innerhalb einer Woche, stiegen nach Ankunft der Tiere an und erreichten bei einem Lebensalter von 8 Wochen einen Höhepunkt, bevor die ermittelte Wund-Score-Kurve anschließend bis zu Versuchsende wieder abflachte (Abb. 6C). Am häufigsten von Bisswunden betroffene Körperregionen waren mit 42,2 % der kaudale Rücken und mit 28,9 % der kraniale Rücken der Mäuse (Abb. 6D).

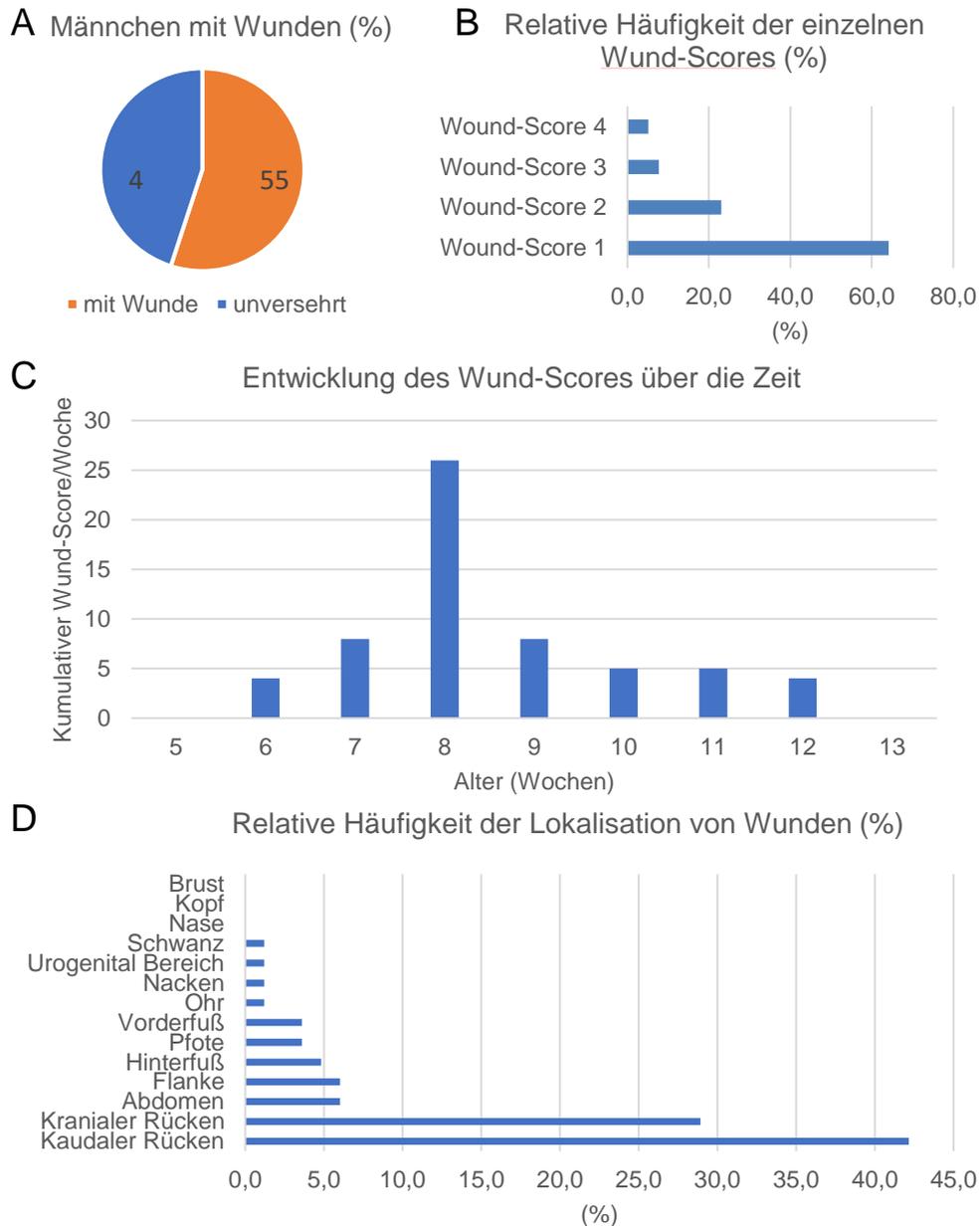


Abbildung 6: Wund-Score.

Wund-Score bei männlichen Mäusen in Gruppenhaltung ($n=20$). Das Tortendiagramm **A** zeigt die relative Anzahl männlicher Mäuse, welche Biss- oder Kratzwunden im Laufe des gesamten Versuchszeitraumes erlitten. **B** zeigt die relative Häufigkeit von einzelnen Wund-Scores in Bezug auf die Gesamtanzahl angewandter Wund-Scores. **C** veranschaulicht den kumulativen Wund-Score (Summe aller erhobenen Wund-Scores innerhalb einer Woche) in Bezug auf das Alter der Tiere zum Zeitpunkt des Scorings. **D** zeigt die relative Häufigkeit der Lokalisationen von Wunden.

1.3. *Barbering*

Mit 85 % war der Großteil der Mäuse nicht von *Barbering*-Verhalten betroffen. Bei 12,5 % der Mäuse waren die Vibrissen und bei 2,5 % das Fell durch *Barbering*-Verhalten verändert (Abb. 7A). Von allen betroffenen Tieren wurde bei 50 % der männlichen Tiere und bei 33,3 % der weiblichen Tiere ein Vibrissen-Score sowie bei 16,7 % der weiblichen Tiere ein Fell-Score erhoben (Abb. 7B).

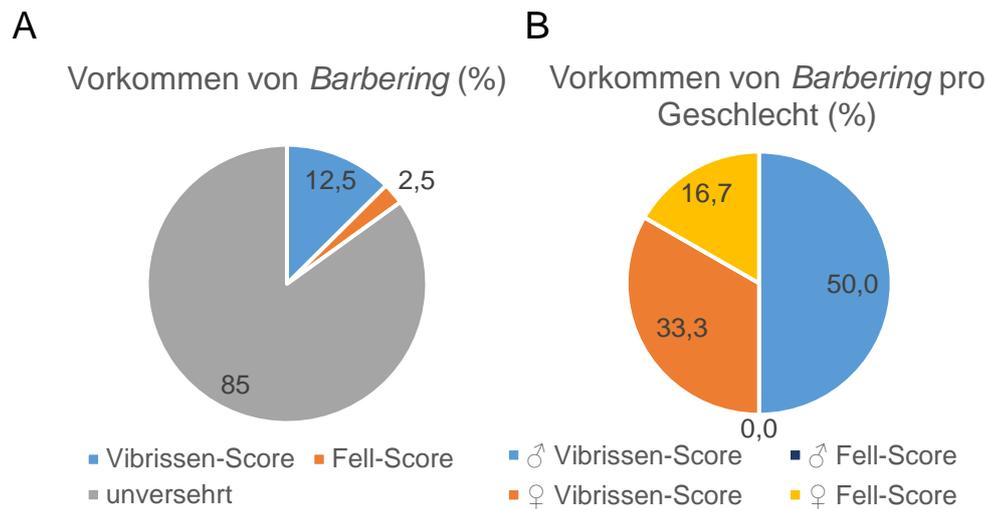


Abbildung 7: *Barbering*.

Auswirkungen des *Barbering*-Verhaltens in Gruppenhaltungen (n = 40). **A** veranschaulicht das prozentuale Vorkommen von Veränderungen an Vibrissen und Fell durch *Barbering* bei allen Mäusen in Gruppenhaltungen. **B** zeigt das prozentuale Vorkommen des Vibrissen- und Fell-Scores pro Geschlecht bei von *Barbering* betroffenen Tieren (n = 6).

1.4. Aggressionsverhalten

Bei weiblichen Tieren in Gruppenhaltung konnte kein Aggressionsverhalten nach dem Käfigwechsel beobachtet werden, sodass sich die folgenden Ergebnisse nur auf männliche Gruppenhaltungen beziehen (Tab. 5). In der zweiten Woche zeigte nur ein Gruppenkäfig aggressives Verhalten innerhalb der ersten 10 min nach Käfigwechsel. Im Laufe der Studie ließen 4 von 5 Gruppenkäfigen aggressives Verhalten nach Käfigwechsel erkennen. Die Latenzzeit bis zum ersten Angriff nach Käfigwechsel verkürzte sich innerhalb der individuellen Käfige während des Versuchszeitraums. Die Dauer des ersten Angriffs belief sich auf 1 bis 7 s. Innerhalb der zehnminütigen Beobachtungsdauer konnten zwischen 2 bis 12 Angriffe gezählt werden.

Aggressionsbeobachtung	Woche 2					Woche 4					Woche 6					Woche 8				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Käfignummer	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Vorkommen von Aggression	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	ja	x	nein	ja	ja	ja	x	nein	ja
Latenz bis zum ersten Angriff [s]	n.a.	n.a.	458	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	360	n.a.	590	n.a.	450	x	n.a.	165	379	5	x	n.a.	5
Dauer des ersten Angriffs [s]	n.a.	n.a.	3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	2	n.a.	2	n.a.	1	x	n.a.	2	1	7	x	n.a.	5
Anzahl der Angriffe	n.a.	n.a.	6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	12	n.a.	2	n.a.	7	x	n.a.	5	2	5	x	n.a.	10

Tabelle 5: Aggressionsbeobachtung.

Aggressionsbeobachtungen nach Käfigwechsel der männlichen Gruppenkäfige (n=5). Folgende Parameter wurden untersucht: Vorkommen von aggressivem Verhalten ja/nein, Latenzzeit bis zum ersten Angriff (s), Dauer des ersten Angriffs (s), Anzahl der Angriffe innerhalb der zehnminütigen Beobachtungszeit. In Woche 1 und 3 konnte kein Aggressionsverhalten beobachtet werden. Käfig 3 wurde aufgelöst, sodass in Woche 6 und 8 keine Werte mehr erhoben werden konnten. n.a. = nicht anwendbar.

1.5. Wühlverhalten

Das Wühlverhalten wurde an Versuchstag 29 bis 33 für jedes Tier individuell innerhalb eines Zeitraums von 2 h erhoben. Eine *three-way* RM-ANOVA zeigte, dass das Wühlverhalten signifikant von dem Hauptfaktor Geschlecht und der Interaktion zwischen den Hauptfaktoren Geschlecht und Haltungsbedingung beeinflusst wurde (*three-way* RM-ANOVA: Geschlecht: $F_{1, 56} = 7,528$, $p = 0,008$; Geschlecht x Haltungsbedingung: $F_{1, 56} = 4,376$, $p = 0,04$). Aufgrund dessen erfolgte die weitere Analyse geschlechtergetrennt mittels einer *two-way* RM-ANOVA. Bei den weiblichen Tieren wurde das Wühlverhalten durch den Faktor Zeit beeinflusst (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: $F_{4, 120} = 4,147$, $p = 0,003$). Sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Mäusen konnte kein Effekt der Haltungsform nachgewiesen werden (Abb. 8A und C).

Da eine große Varianz bezüglich der Leistung im Wühlverhaltenstest bestand, wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt: „Wühlverhalten“ und „kein Wühlverhalten“. Tiere, welche 5 g oder mehr Pellets aus der Wühlröhre gewühlt haben, gehörten der Gruppe „Wühlverhalten“ an. Alle anderen Tiere wurden der Gruppe „kein Wühlverhalten“ zugeordnet. Das Vorkommen von „Wühlverhalten“ oder „kein Wühlverhalten“ wurde über die 5 Versuchstage für die Gruppen Einzel- und Gruppenhaltung summiert. Ein zweiseitiger *Fisher's Exact* Test wurde durchgeführt. Dieser zeigte, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen Haltungsbedingung und Vorkommen von Wühlverhalten bei weiblichen Tieren bestand (*Fisher's Exact* Test, zweiseitig, $p = 0,048$). 70 % der Tiere in Einzelhaltung zeigten „kein Wühlverhalten“, wohingegen in Gruppenhaltung nur 54 % „kein Wühlverhalten“ zeigten (Abb. 8D). Bei männlichen Tieren konnte kein Zusammenhang zwischen Haltungsform und Vorkommen des Wühlverhaltens festgestellt werden (Abb. 8B).

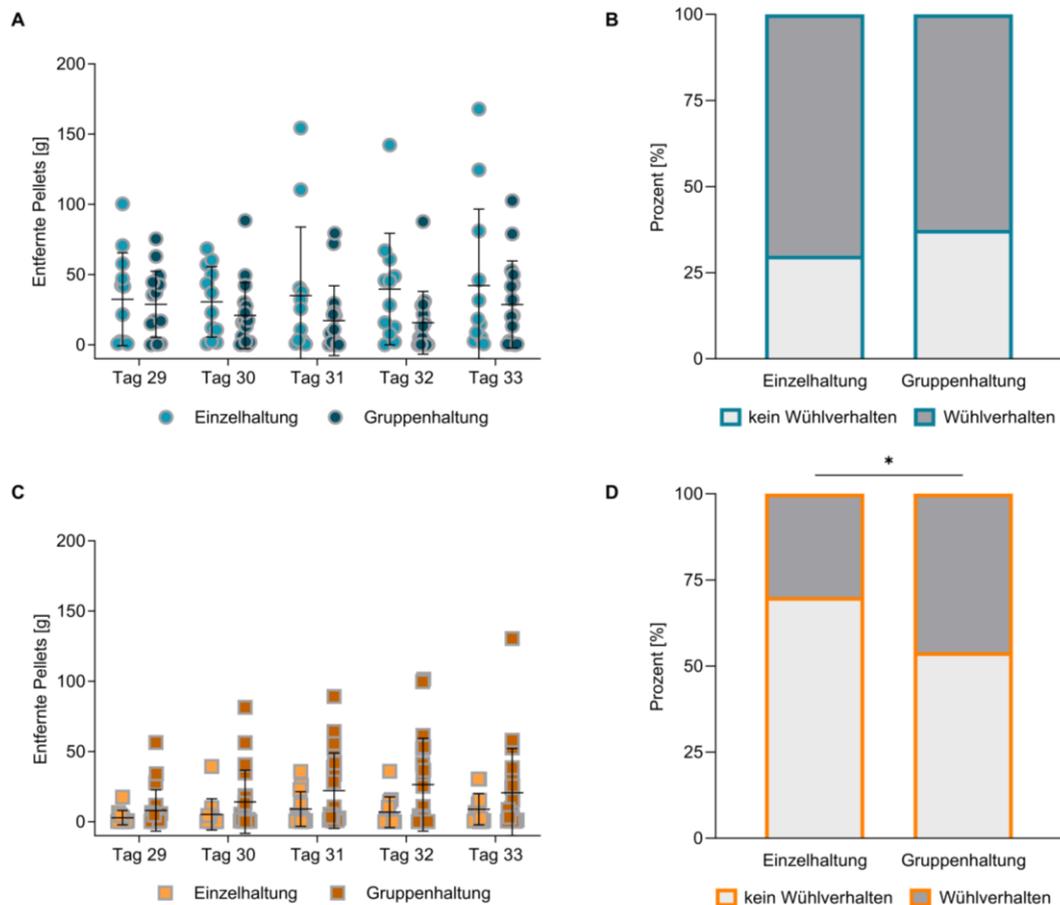


Abbildung 8: Wühlverhalten.

Wühlverhalten an Versuchstag 29 bis 33. Eine *two-way* RM-ANOVA zeigte keine Effekte der Haltungsform auf die Ausprägung des Wühlverhaltens von männlichen Tieren (A) und weiblichen Tieren (C). Die Analyse des zusammengefassten Auftretens von „Wühlverhalten“ oder „kein Wühlverhalten“ ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Ausprägung des Wühlverhaltens und der Haltungsform für weibliche Tiere (D), jedoch nicht für männliche Tiere (B). A + C: *Two-way* RM-ANOVA Mittelwert \pm SD, B + D: *Fisher's Exact Test*, Angaben in Prozent, * = $p < 0,05$.

1.6. Nestbauerhalten

Das Nestbauerhalten wurde an Tag 37 und 51 verblindet erfasst. Da für diesen Parameter nicht die gleiche Versuchseinheit zwischen den experimentellen Gruppen vorlag (Versuchseinheit in Gruppenhaltung = ein Käfig, Versuchseinheit in Einzelhaltung = eine Maus), konnte nur eine deskriptive Statistik durchgeführt werden. An Tag 37 (Abb. 9A und B) zeigten Männchen in Einzelhaltung mit einem Median von 5 (IQR = 1) besseres Nestbauerhalten, als Weibchen in Einzelhaltung mit einem Median von 4 (IQR = 3,5). Auch die Männchen in Gruppenhaltung zeigten mit einem Median von 5,5 (IQR = 1,75) besseres Nestbauerhalten als Weibchen in Gruppenhaltung mit einem Median von 4 (IQR = 1). An Tag 51 (Abb.

9C und D) wiesen Mäuse in Einzelhaltung ein ähnliches Nestbauverhalten auf (Männchen Median 5 (IQR = 1); Weibchen Median 4,5 (IQR = 1)). In der Gruppenhaltung wiesen männliche Tiere mit einem Median von 5 (IQR = 0,75) ein besseres Nestbauverhalten auf als weibliche Tiere mit einem Median von 4 (IQR = 2).

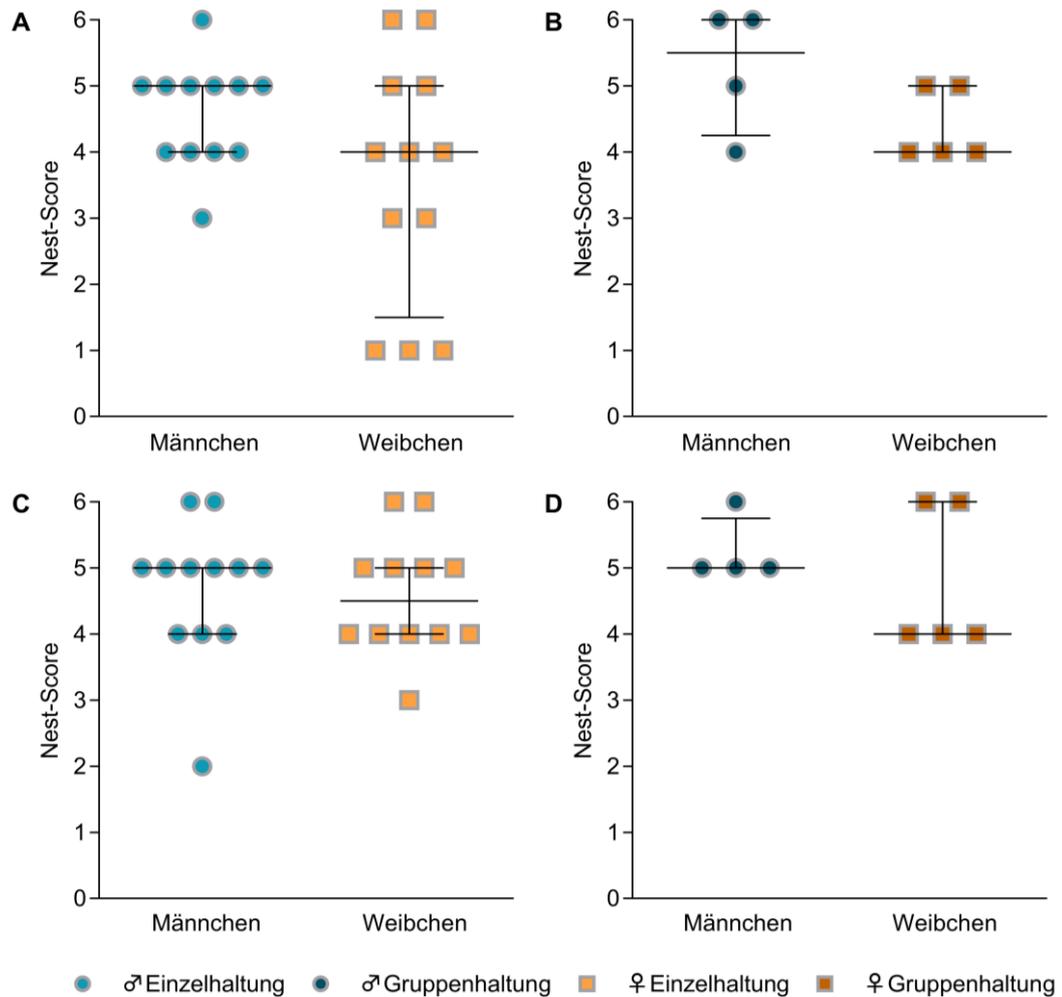


Abbildung 9: Nestbauverhalten.

Nestbauverhalten an Versuchstag 37 (A + B) und 51 (C + D). Das Nestbauverhalten wurde deskriptiv analysiert. Versuchseinheit für A + C = ein Tier, Versuchseinheit für B + D = ein Gruppenkäfig; Median \pm IQR.

1.7. Open-Field-Test

Mit einer *two-way* ANOVA konnte kein Effekt des Geschlechtes und auch keine relevante Interaktion von Geschlecht und Haltungsbedingung auf die Open-Field-Parameter identifiziert werden. Deswegen erfolgte eine zusammengefasste Analyse und graphische Darstellung beider Geschlechter. Die Analyse demonstrierte jedoch einen signifikanten Einfluss der Haltungsform auf alle Open-Field-Parameter (*two-way* ANOVA: Haltungsform: zurückgelegte Strecke: $F_{1,56} = 5,039$, $p = 0,02$; Geschwindigkeit: $F_{1,56} = 4,831$, $p = 0,03$; Immobilität: $F_{1,56} = 8,202$, $p = 0,006$; Zeit in innerer Zone: $F_{1,56} = 6,465$, $p = 0,01$; Zeit in äußerer Zone: $F_{1,56} = 6,81$, $p = 0,01$). Mäuse in Einzelhaltung legten eine signifikant längere Strecke mit einer signifikant höheren Geschwindigkeit zurück als Mäuse in Gruppenhaltung. Mäuse in Gruppenhaltung fielen umgekehrt durch signifikant längere Immobilitätsphasen auf. Außerdem hielten sich Mäuse in Gruppenhaltung signifikant länger in der inneren Zone und signifikant kürzer in der äußeren Zone des Open-Fields auf, als Mäuse in Einzelhaltung (Abb. 10).

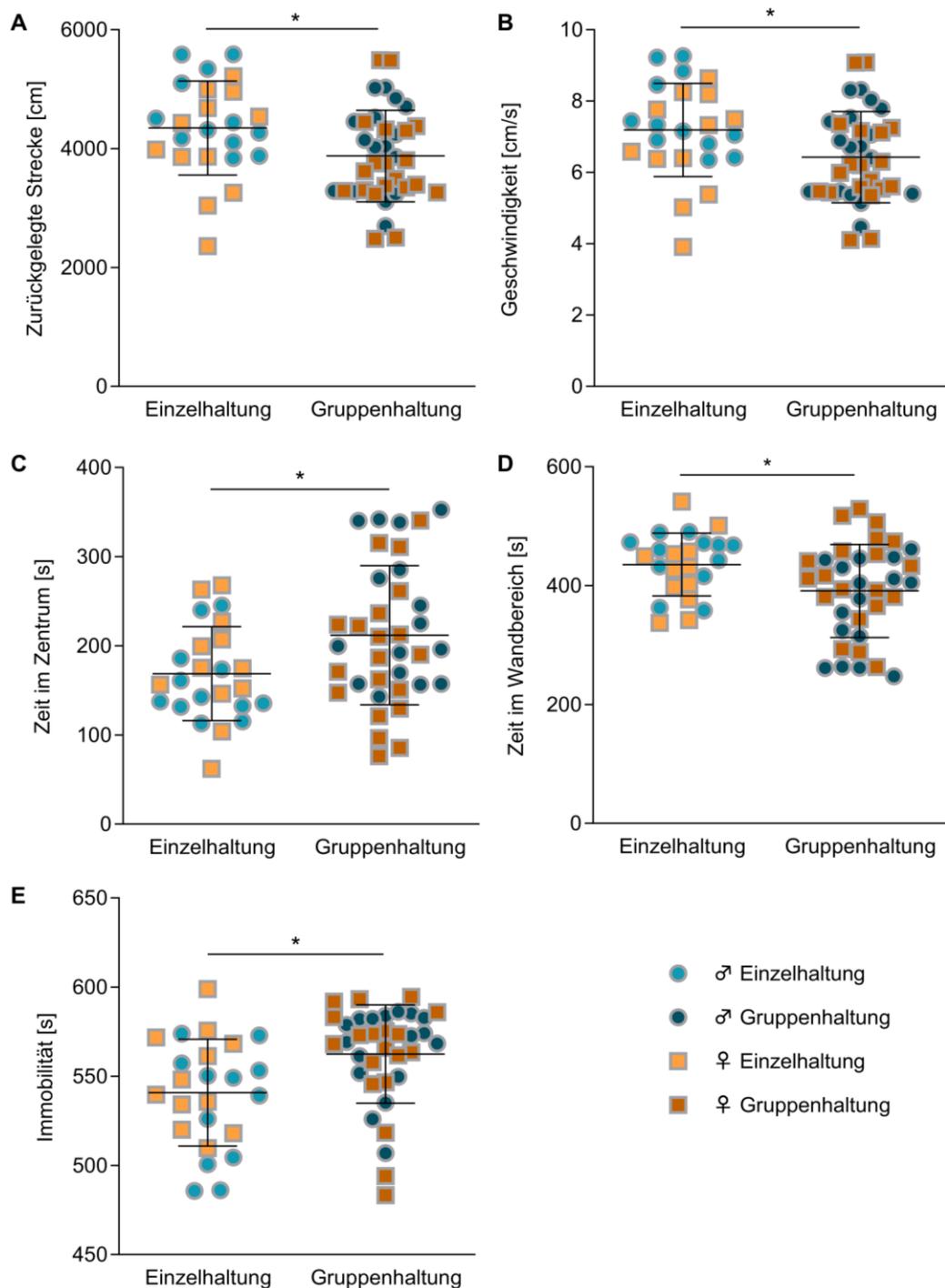


Abbildung 10: Open-Field-Test.

Ergebnisse des Open-Field-Tests an Versuchstag 37 (♂) und 38 (♀). Es konnte kein Einfluss des Geschlechts detektiert werden. Die Haltungform beeinflusste signifikant die zurückgelegte Strecke (A), die Geschwindigkeit (B), die Immobilität (C) sowie die Aufenthaltsdauer im Zentrum (D) und im Wandbereich (E) des Open-Fields. *Two-way* ANOVA Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$.

1.8. Elevated-Zero-Maze-Test

Da nur für den Parameter Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in das *Maze* ein Effekt des Geschlechtes identifiziert wurde (*two-way* ANOVA: Geschlecht: $F_{1,56} = 5,777$,

$p = 0,02$), für die anderen Parameter des Elevated-Zero-Mazes jedoch nicht, fand keine geschlechtsspezifische Analyse und graphische Darstellung statt (Abb. 11). Die Analyse der Aufenthaltsdauer in dem Bereich des offenen Quadranten ergab keine Unterschiede zwischen den Haltungsformen. Die statistische Analyse offenbarte jedoch einen signifikanten Effekt der Haltungsform auf die Anzahl der Eintritte in die offenen Quadranten (*two-way* ANOVA: Haltungsform: $F_{1, 56} = 4,192$, $p = 0,045$). Die Anzahl der Übertritte von einem geschlossenen Quadranten in den nächsten, wird ebenfalls signifikant durch die Haltungsform beeinflusst (*two-way* ANOVA: Haltungsform: $F_{1, 56} = 7,646$, $p = 0,008$).

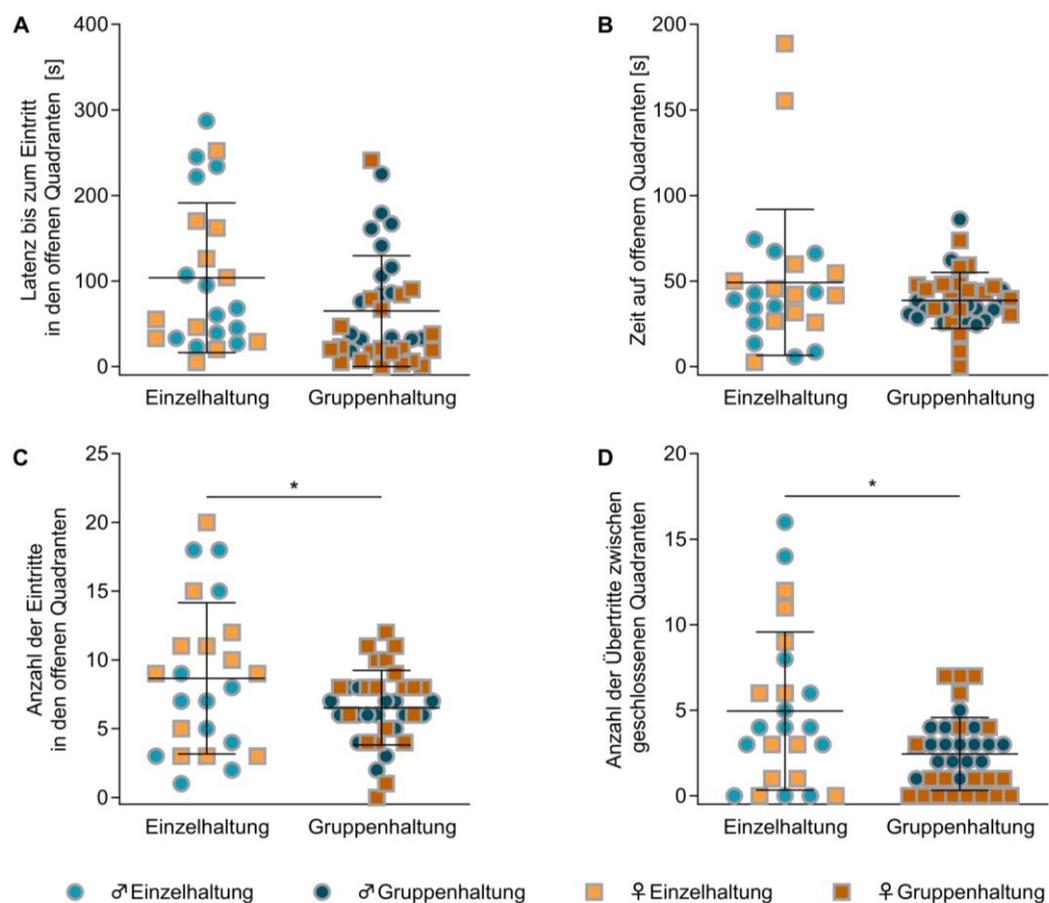


Abbildung 11: Elevated-Zero-Maze-Test.

Ergebnisse des Elevated-Zero-Maze-Tests an Versuchstag 39 (♂) und 40 (♀). Für die Latenz bis zum ersten Eintritt in den offenen Quadranten (A) konnte ein Effekt des Geschlechtes nachgewiesen werden. Für die Zeit in den Bereichen der offenen Quadranten (B) ergaben sich keine Gruppenunterschiede. Die Anzahl an Eintritten in offene Quadranten (C) und die Anzahl an Übertritten zwischen geschlossenen Quadranten (D) wird signifikant durch die Haltungsform beeinflusst. *Two-way* ANOVA, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$.

1.9. Forced-Swim-Test

Der FST wurde sowohl an Versuchstag 43 als auch an Versuchstag 44 durchgeführt (Abb. 12). Die Interaktion der Hauptfaktoren Geschlecht und Haltungform erwies sich bei der Analyse der Dauer der Immobilität an Versuchstag 43 als signifikant (*two-way* ANOVA: Geschlecht x Haltungform: $F_{1, 56} = 5,244$, $p = 0,03$). Es konnten sowohl bei dem Parameter Latenz bis zur Immobilität an beiden Tagen sowie bei dem Parameter Dauer der Immobilität an Tag 44 keine weiteren Effekte identifiziert werden.

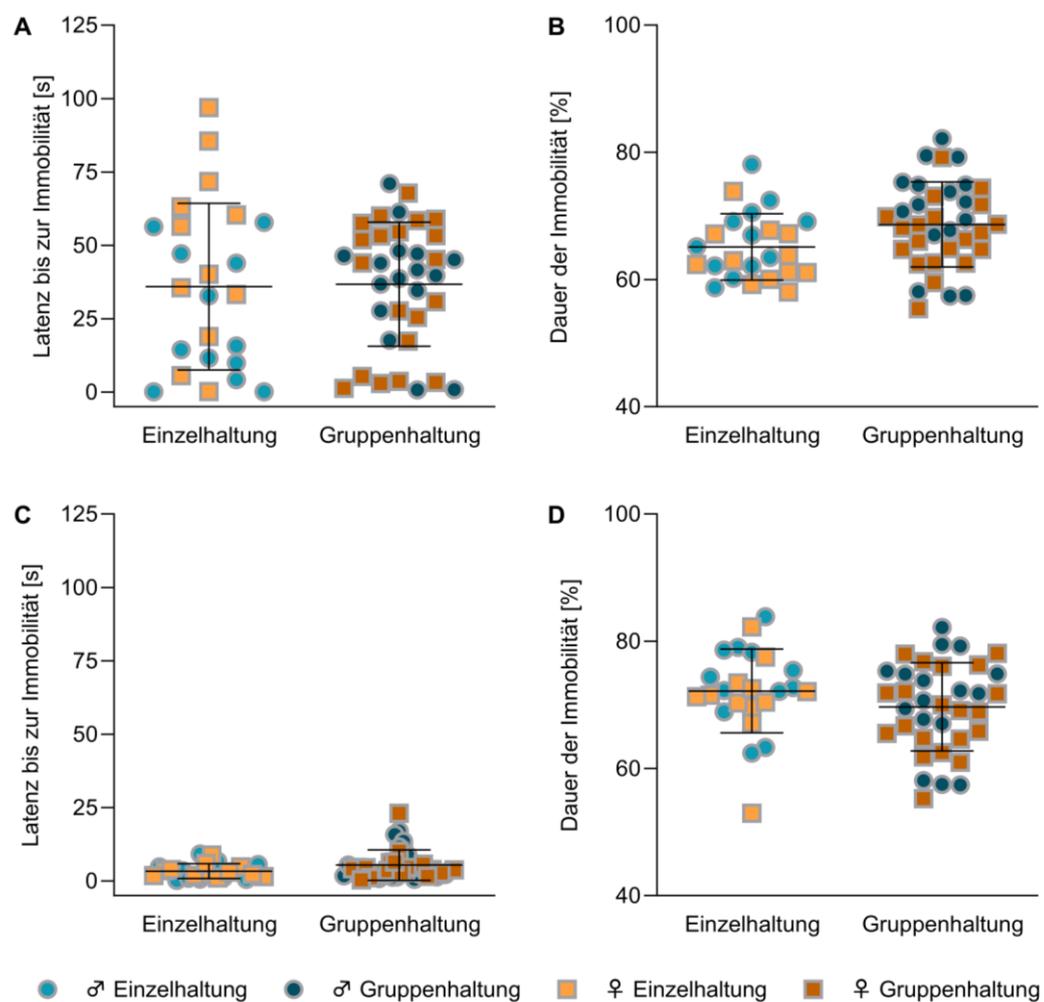


Abbildung 12: Forced-Swim-Test.

Ergebnisse des Forced-Swim-Tests an Versuchstag 43 (A + B; ♂+♀) und 44 (C + D; ♂+♀). Die Dauer der Immobilität an Tag 43 (B) wird signifikant durch die Interaktion Geschlecht und Haltungform beeinflusst. Es konnten keine Unterschiede bei der Latenz bis zur Immobilität an Tag 43 (A) und 44 (C) sowie bei der Dauer der Immobilität an Tag 44 (D) entdeckt werden. *Two-way* ANOVA, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$.

1.10. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Obwohl sich die Berechnungsbasis für den Parameter FCM aufgrund der Sammelkotprobe in Gruppenhaltungen unterscheidet, konnte trotzdem eine statistische Analyse durchgeführt werden. Bei der Kotprobensammlung wurde darauf geachtet, allen Kot innerhalb eines Gruppenkäfigs zu sammeln und somit ergab sich ein repräsentativer Wert der Konzentration an FCMs aller Tiere eines Käfigs. Die Analyse der FCM an Versuchstag 45 direkt nach dem FST (Abb. 13A) ergab einen signifikanten Geschlechterunterschied (*two-way* ANOVA: Geschlecht: $F_{1, 29} = 58,7, p < 0,001$). Signifikant höhere FCM bei weiblichen Tieren, bestätigten sich auch an Versuchstag 52 nach einer Erholungsphase (Abb. 13B) (*two-way* ANOVA: Geschlecht: $F_{1, 29} = 56,14, p < 0,001$). Es konnte kein Einfluss der Haltungsform auf die FCM-Konzentrationen nachgewiesen werden.

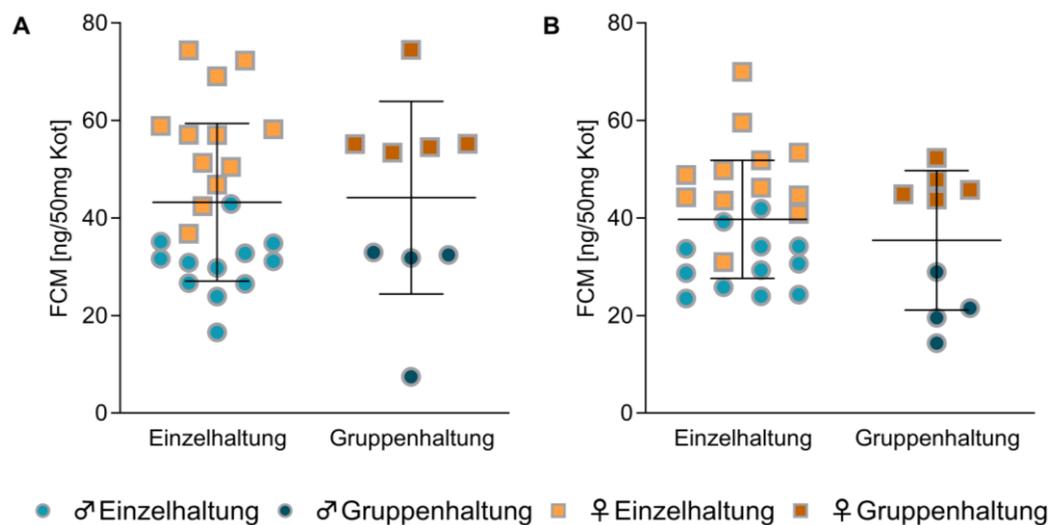


Abbildung 13: FCMs.

Die Konzentrationen der fäkalen Kortikosteronmetaboliten sind für Versuchstag 45 nach dem FST in **A** und für Versuchstag 52 nach einer Erholungsphase in **B** dargestellt. An beiden Versuchstagen konnte ein signifikanter Effekt des Geschlechtes, nicht jedoch der Haltungsform nachgewiesen werden. *Two-way* ANOVA, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$.

1.11. Korrelationsanalyse

Eine Spearman-Korrelationsanalyse aller Parameter wurde jeweils für Tiere in Einzel- und in Gruppenhaltung durchgeführt (Abb. 14 und 15). Bei Tieren aus der Gruppenhaltung wurden auch die Aggressionsbeobachtung, der Wund-Score und das *Barbering* berücksichtigt. Starke Korrelationen (Korrelationskoeffizient $r > 0,7$ oder $< -0,7$ in Verbindung mit $p \leq 0,05$) innerhalb eines Verhaltenstests sind zu erwarten und bestätigen dessen Validität. Beispielsweise korrelierten die Ergebnisse des Wühlverhaltens an allen Versuchstagen positiv miteinander. Die zurückgelegte Distanz im Open-Field-Test korrelierte negativ mit der Dauer der Immobilität im Open-Field und positiv mit der Geschwindigkeit. Korrelationen innerhalb eines Tests sind hinsichtlich der Belastungsbeurteilung zu vernachlässigen und wurden nicht in der tabellarischen Auflistung berücksichtigt. Eine stark positive Korrelation bei Tieren in Gruppenhaltung konnte zwischen der Summe an Wund-Scores und der summierten Anzahl an Attacken identifiziert werden (Spearman-Korrelationsanalyse: $r = 0,77$, $p < 0,05$). Eine Erklärung zu den einzelnen Parametern findet sich im Anhang (siehe Kapitel X.8. Tab. 11) und Korrelationen von $r \geq 0,5$ oder $r \leq -0,5$ sind in Tab. 12 und 13 (siehe Kapitel X.8.) aufgeführt.

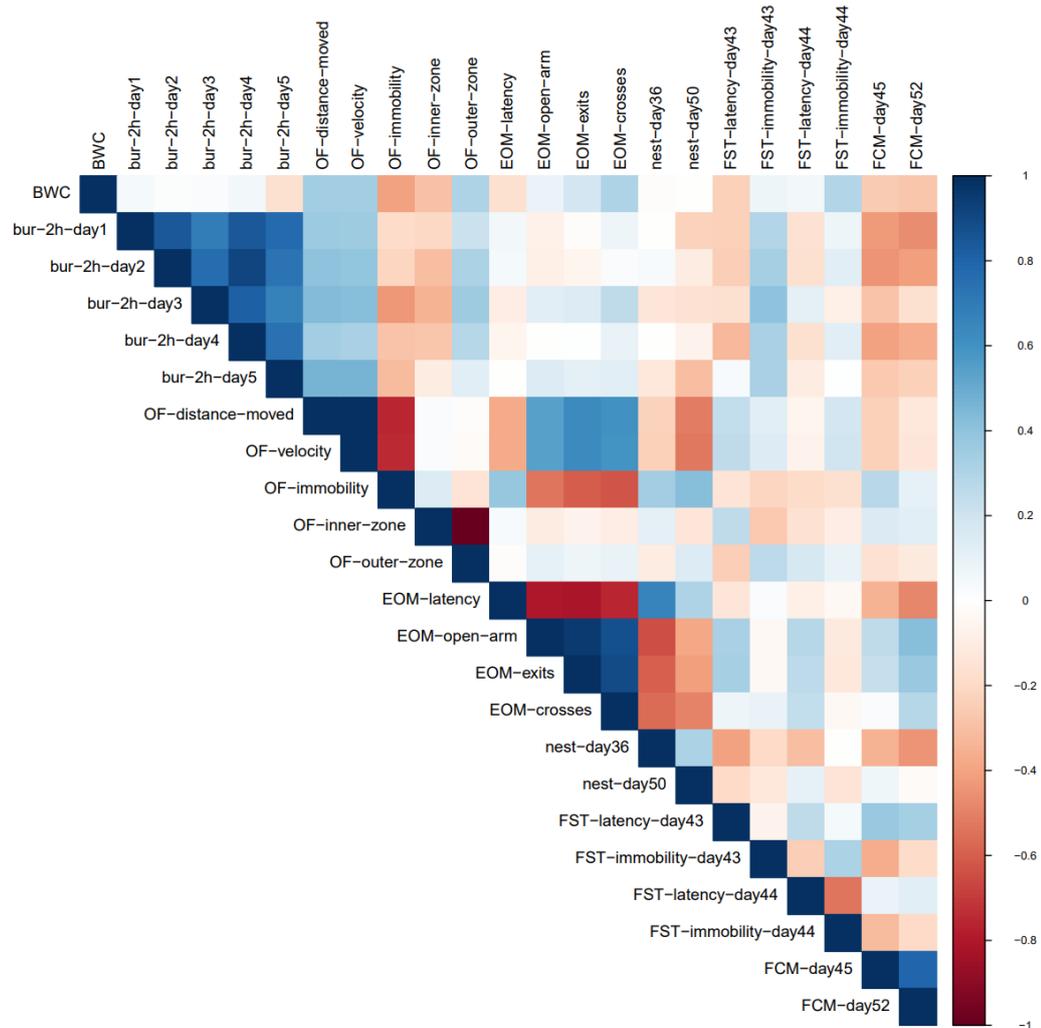


Abbildung 14: Spearman-Korrelationsanalyse Einzelhaltung.

Die *Heatmap*-Korrelationsmatrix veranschaulicht die Ergebnisse einer Spearman-Korrelationsanalyse der Tiere in Einzelhaltung. Eine positive Korrelation zweier Parameter ist in Blau dargestellt ($r > 0$), eine negative Korrelation ist in Rot dargestellt ($r < 0$). Die verwendeten Abkürzungen der Parameter werden in Tab. 11 erläutert.

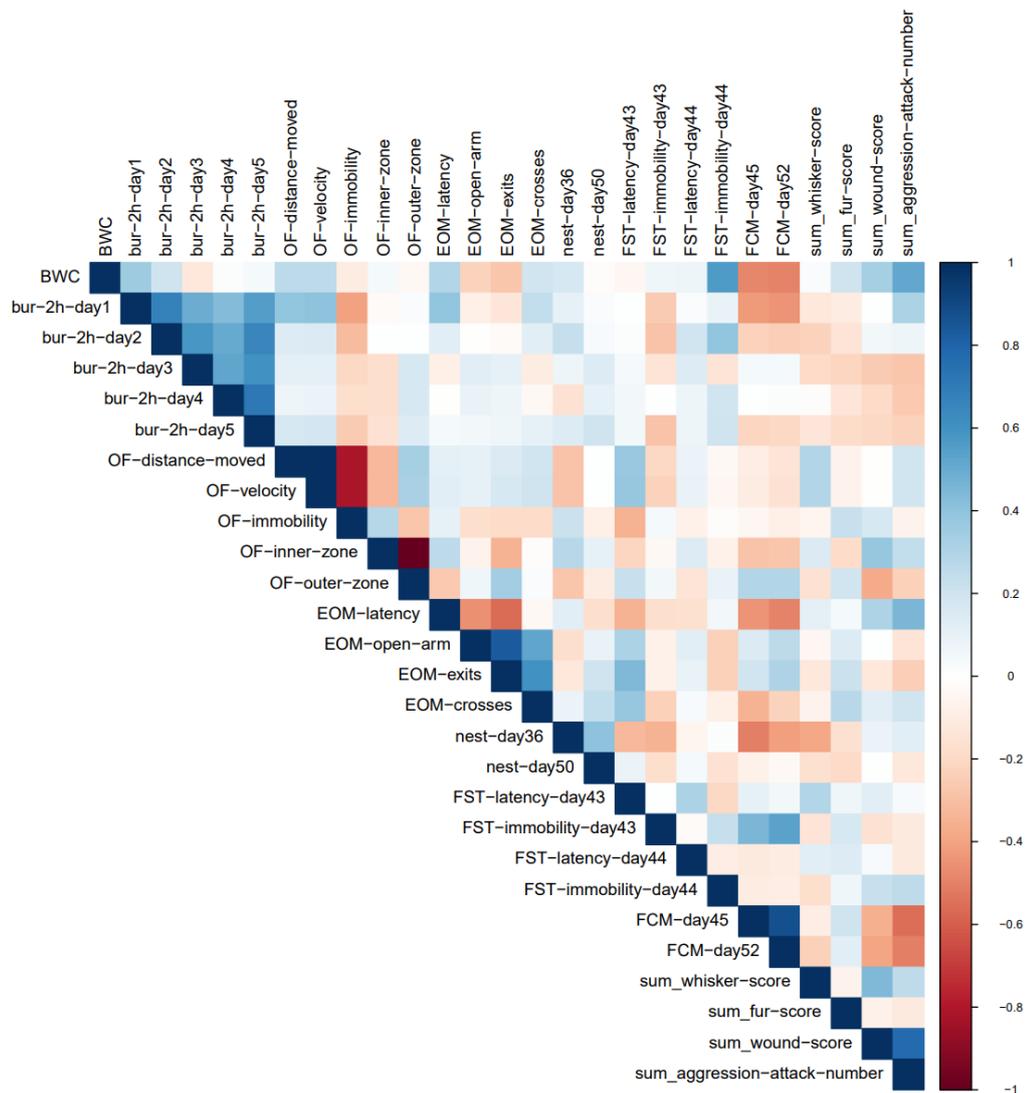


Abbildung 15: Spearman-Korrelationsanalyse Gruppenhaltung.

Die *Heatmap*-Korrelationsmatrix veranschaulicht die Ergebnisse einer Spearman-Korrelationsanalyse der Tiere in Gruppenhaltung. Eine positive Korrelation zweier Parameter ist in Blau dargestellt ($r > 0$), eine negative Korrelation ist in Rot dargestellt ($r < 0$). Die verwendeten Abkürzungen der Parameter werden in Tab. 11 erläutert.

2. *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien

In Fällen, in denen die Tieranzahl pro experimentelle Gruppe von $n = 8$ abweicht, ist dies in den Abbildungslegenden beschrieben.

2.1. Pilotstudie

Die Erhebungen des klinischen Scores und Neuro-Scores sowie die Entwicklung des Körpergewichts ergaben, dass die orale Verabreichung des Carprofens hinsichtlich der Verträglichkeit unbedenklich ist. Histopathologische Untersuchungen des Gastrointestinaltraktes brachten jedoch in beiden Behandlungsgruppen geringgradige erosive Läsionen in der nicht-glandulären Magenschleimhaut bei $n = 2$ Mäusen zum Vorschein. Diese wurden aber von unseren Kooperationspartnern des Instituts für Tierpathologie als klinisch nicht relevant eingestuft. Bei der Behandlungsgruppe b) mit einmaliger Injektion von Carprofen, traten abermals Läsionen an der Injektionsstelle bei einer Maus auf. Die deskriptive Datenanalyse (siehe Kapitel X.9. Tab. 14) wies auf eine bessere Körpergewichtszunahme sowie besseres Wühl- und Nestbauverhalten in Behandlungsgruppe a) hin. Durch die Ergebnisse der Pilotstudie konnte die Sicherheit der oralen Carprofen-Applikation bei C57BL/6J Mäusen bestätigt werden. Aufgrund der Läsion an der Carprofen-Injektionsstelle einer Maus in Behandlungsgruppe b), entschieden wir uns für eine ausschließlich orale Verabreichung des NSAIDs in der Hauptstudie.

2.2. Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde täglich nach dem operativen Eingriff oder der Anästhesie erhoben. Die Abweichung der erhobenen Körpergewichte zu einem mittleren Baseline-Körpergewicht wurde für jedes Tier individuell berechnet und als Körpergewichtsveränderung in Prozent für die statistische Analyse verwendet. Die prozentuale Körpergewichtsveränderung wurde bei männlichen naiven und Substanz-Kontroll-Mäusen von der Haupteffektgröße Zeit (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: $F_{3,65, 127,8} = 41,98, p < 0,001$) und bei den männlichen naiven und OP-Mäusen von der Haupteffektgröße Zeit und der Interaktion zwischen Zeit und Analgesieregime beeinflusst (Mixed-Effects-Modell: Zeit: $F_{3,235, 112,7} = 38,12, p < 0,001$; Zeit x Analgesieregime: $F_{24, 209} = 3,521, p < 0,001$). Eine signifikante Reduktion der Körpergewichtsveränderung konnte mittels Bonferroni-Korrektur bei männlichen OP-Mäusen der +NL- ($p = 0,003$) und +NLO- ($p = 0,001$)

Analgesieregime an Tag 1 identifiziert werden. Die Körpergewichtsveränderung bei weiblichen naiven und Substanz-Kontroll-Mäusen wurde durch die Haupteffektgröße Zeit sowie deren Interaktion mit dem Analgesieregime beeinflusst (Mixed-Effects-Modell: Zeit: $F_{3,939, 137,2} = 37,37$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{24, 209} = 2,253$, $p = 0,001$). Die Haupteffektgröße Zeit und die Interaktion mit dem Analgesieregime nahm einen Einfluss auf die Körpergewichtsveränderung weiblicher naiver und OP-Mäuse (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: $F_{3,53, 123,5} = 66,49$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{24, 210} = 3,778$, $p < 0,001$). Dabei bestätigte die Bonferroni-Korrektur einen signifikanten Abfall der Körpergewichtsveränderungen von OP-Mäusen des +NO-Analgesieregimes an Tag 1 und 2 ($p = 0,001$, $p = 0,035$) und des +NLO-Analgesieregimes an Tag 1 ($p = 0,009$). Die Analyse des absoluten Körpergewichts zeigte einen Einfluss der Haupteffektgröße Zeit bei beiden Geschlechtern (Mixed-Effects-Modell Weibchen Substanz-Kontroll-Gruppe: Zeit: $F_{1,644, 57} = 39,72$, $p < 0,001$; Weibchen OP-Gruppe: Zeit: $F_{1,498, 52,26} = 44,94$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{36, 314} = 1,664$, $p = 0,01$; *two-way* RM-ANOVA Männchen Substanz-Kontroll-Gruppe: Zeit: $F_{1,162, 40,66} = 16,29$, $p < 0,001$; Mixed-Effects-Modell Männchen OP-Gruppe: Zeit: $F_{1,095, 38,21} = 21,59$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{36, 314} = 1,988$, $p = 0,001$) (siehe Abb. 16A für die Körpergewichtsveränderung; das absolute Körpergewicht ist nicht graphisch dargestellt).

2.3. Neuro-Score

Bei der Erhebung des Neuro-Scores fiel eine individuelle Varianz einiger Parameter (Vokalisation bei Fixation, Berührungsreaktion, Reizbarkeit, Harn- und Kotabsatz) zu unterschiedlichen Zeitpunkten inklusive der Baseline auf. Nach der Anästhesie oder Operation waren jedoch folgende Parameter häufig verändert: Körperlage, Beckenhöhe, Schwanzhöhe, Beinrotation, lokomotorische Aktivität und Neugier. Zum Zeitpunkt von 4 h nach der Anästhesie oder Operation wurden bei einem Großteil der Mäuse der +NO- und +NLO-Analgesieregime erhobene Schwänze und ein geringeres Neugierverhalten beobachtet. Insbesondere bei Substanz-Kontroll-Gruppen dieser Analgesieregime fiel zudem eine Hyperlokomotion auf. In den folgenden postoperativen Tagen waren hauptsächlich lokomotionsassoziierte Parameter, wie Hüfthöhe, Beinrotation und lokomotorische Aktivität zu unterschiedlichem Ausmaß bei OP-Mäusen beider Geschlechter unabhängig vom

Analgesieregime betroffen (siehe Abb. 16B für einen Überblick veränderter Parameter und Tab. 16 für eine detaillierte Auflistung der Neuro-Score Ergebnisse).

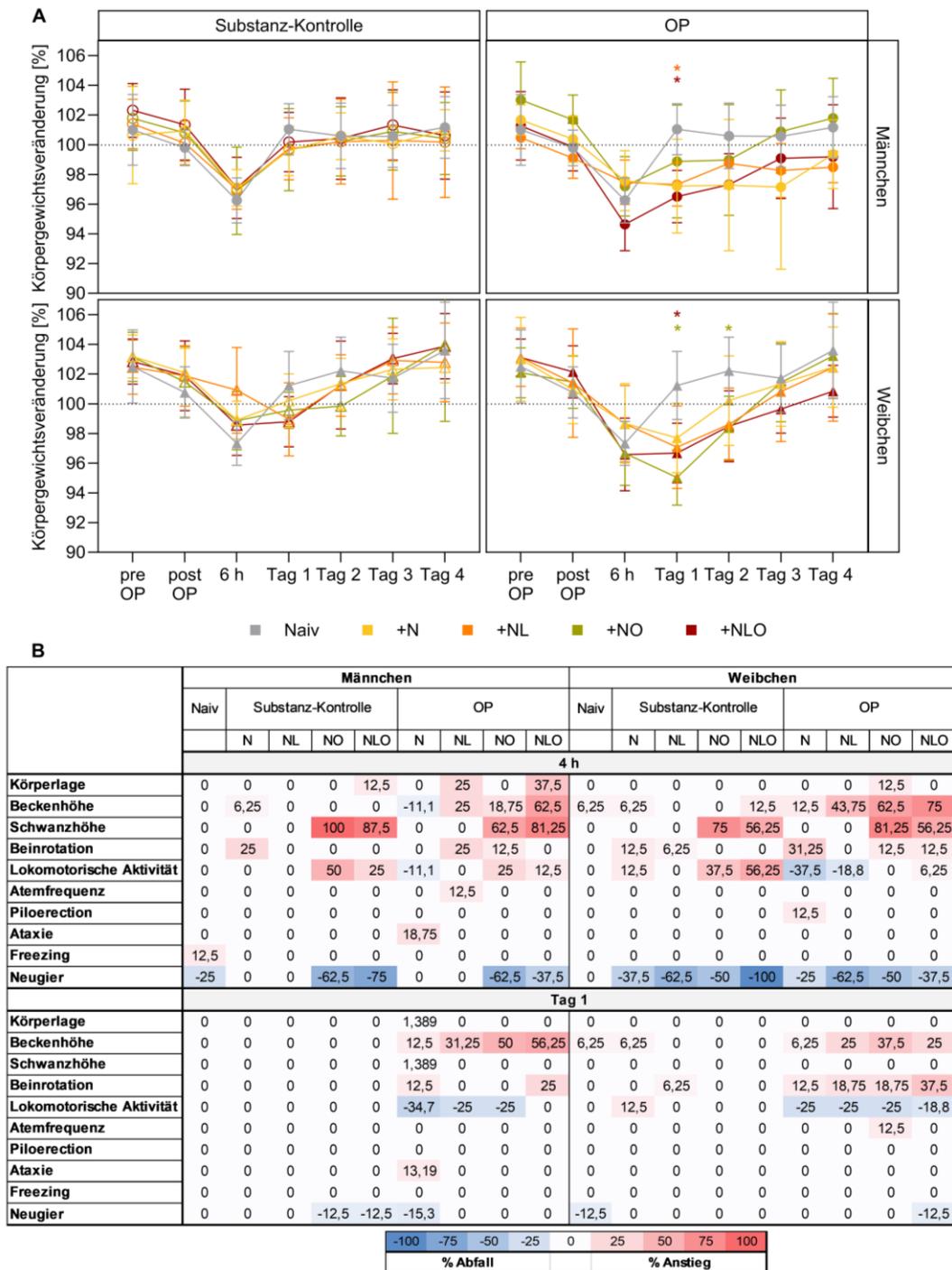


Abbildung 16: Veränderung des Körpergewichts und Neuro-Scores.

Die tierindividuelle prozentuale Veränderung des Körpergewichts im Vergleich zum mittleren Baseline-Körpergewicht ist in **A** dargestellt (abweichende Gruppengröße: ♂: Tag 4 +N-OP n = 7; ♀: 6 h +NL-Substanz-Kontrolle n = 7). Relevante Neuro-Score-Parameter des 4 h Zeitpunktes und an Tag 1 werden in **B** als mittlerer prozentualer Anstieg (rot hinterlegt) oder Abfall (blau hinterlegt) für einzelne Scores pro Geschlecht und Analgesieregime illustriert. A: *Two-way* RM-ANOVA, Mittelwert ± SD, * = p < 0,05, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.4. Mouse-Grimace-Scale

Der Hauptparameter MGS, als Indikator für postoperative Schmerzen, wurde nach der Anästhesie und der Operation intensiv verfolgt. 2 h nach der Anästhesie war der MGS bei allen Substanz-Kontroll-Mäusen unabhängig vom Analgesieregime bei beiden Geschlechtern vorübergehend signifikant erhöht (*two-way* RM-ANOVA Männchen: Zeit: $F_{5,723, 200,3} = 31,7$, $p < 0,001$, Analgesieregime: $F_{4, 35} = 9,62$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{32, 280} = 2,448$, $p < 0,001$, *post-hoc*: +N $p = 0,012$, +NL $p = 0,017$, +NO $p = 0,028$, +NLO $p = 0,003$; *two-way* RM-ANOVA Weibchen: Zeit: $F_{5,147, 180,1} = 20,5$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{32, 280} = 2,613$, $p < 0,001$, *post-hoc*: +N $p = 0,040$, +NL $p < 0,001$, +NO $p = 0,002$, +NLO $p = 0,002$). Dieser Anstieg konnte bei Männchen des +NLO-Analgesieregimes länger (4 h: $p = 0,001$; 6 h: $p = 0,006$) nach der Anästhesie nachgewiesen werden. An Tag 1 zeigten Substanz-Kontroll-Männchen des +NL-Analgesieregimes ($p = 0,005$) ebenfalls einen erhöhten MGS. Im Vergleich zu den naiven Mäusen war der MGS in weiblichen Substanz-Kontroll-Mäusen des +N- ($p = 0,04$) und +NLO- ($p = 0,01$) Analgesieregimes nach 4 h immer noch signifikant erhöht.

An Tag 0 war der MGS unabhängig vom Analgesieregime bei allen OP-Mäusen beider Geschlechter signifikant höher im Vergleich zu den naiven Mäusen (Mixed-Effects-Modell Männchen: Zeit: $F_{5,672, 197,1} = 103,1$, $p < 0,001$, Analgesieregime: $F_{4, 35} = 27,59$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{32, 278} = 6,798$, $p < 0,001$, *post-hoc* 2h: +N & +NL & +NLO $p < 0,001$, +NO $p < 0,001$, *post-hoc* 4h: +N & +NO & +NLO $p < 0,001$, +NL $p = 0,001$, *post-hoc* 6h: +NO & +NLO $p < 0,001$, +N $p = 0,003$, +NL $p = 0,007$, *post-hoc* 8h: +N $p = 0,02$, +NL $p = 0,01$, +NO $p < 0,001$, +NLO $p < 0,001$; *two-way* RM-ANOVA Weibchen: Zeit: $F_{2,748, 19,24} = 94,06$, $p < 0,001$, Analgesieregime: $F_{2,766, 19,36} = 29,54$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{5,925, 41,48} = 8,327$, $p < 0,001$, *post-hoc* 2h & 4h: all $p < 0,001$, *post-hoc* 6h: +N $p = 0,02$, +NL $p = 0,002$, +NO $p = 0,005$, +NLO $p < 0,001$, *post-hoc* 8h: +N $p = 0,006$, +NL $p = 0,011$, +NO $p = 0,014$, +NLO $p < 0,001$). Der Anstieg blieb in männlichen Mäusen bis Tag 2 bestehen, wobei Mäuse des +N-Analgesieregimes als erstes den MGS-Stand der naiven Mäuse an Tag 1 wieder erreichten (*post-hoc* Tag 1: +NO $p = 0,002$, +N & +NL & +NLO $p < 0,001$, *post-hoc* Tag 2: +NL $p = 0,018$, +NO $p = 0,001$, +NLO $p = 0,007$). Im Vergleich zu weiblichen naiven Mäusen waren die MG-Scores der weiblichen OP-Mäuse an Tag 1 immer noch signifikant erhöht in

den +N- ($p = 0,032$), +NO- ($p = 0,005$) und +NLO- ($p = 0,007$) Analgesieregimegruppen. Ein weiterer MGS-Anstieg wurde an Tag 4 für weibliche +NL-OP-Mäuse ($p = 0,032$) verzeichnet (Abb. 17).

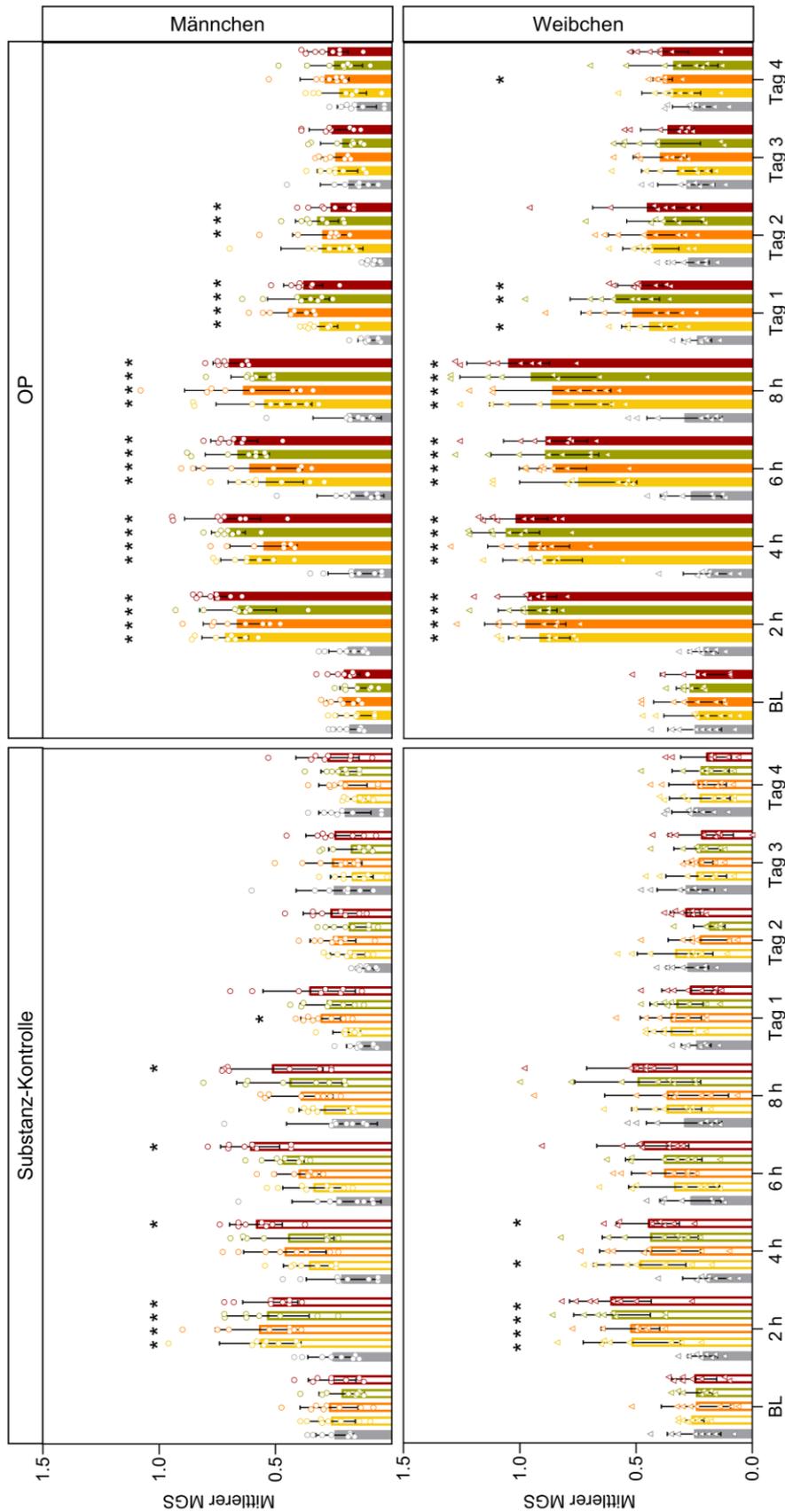


Abbildung 17: MGS.

Der mittlere MGS ist für Substanz-Kontroll- und OP-Gruppen im Vergleich zur naiven Gruppe pro Geschlecht für die Baseline und für verschiedene Zeitpunkte nach der Intervention dargestellt (abweichende Gruppengröße: ♂: 4 h +NL-OP n = 7, Tag 4 +NOP n = 7). Two-way RM-ANOVA oder Mixed-Effects-Modell, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.5. Wühlverhalten

Die Haupteffektgröße Zeit wirkte sich innerhalb des zwanzigstündigen Wühlverhaltenstests bei beiden Geschlechtern auf die Menge der entfernten Pellets aus (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: Männchen Substanz-Kontroll-Gruppe: $F_{1,041, 7,29} = 25,58, p = 0,001$; Männchen OP-Gruppe: $F_{1,013, 35,44} = 11,54, p = 0,002$; Weibchen Substanz-Kontroll-Gruppe: $F_{1,119, 39,18} = 39,12, p < 0,001$; Weibchen OP-Gruppe: $F_{1,147, 40,15} = 19,44, p < 0,001$). Obwohl die Haupteffektgröße Analgesieregime ebenfalls einen Einfluss auf die Menge entfernter Pellets der OP-Mäuse beider Geschlechter hatte (*two-way* RM-ANOVA Männchen OP-Gruppe: Analgesieregime: $F_{4, 35} = 3,693, p = 0,013$; Weibchen OP-Gruppe: Analgesieregime: $F_{4, 35} = 5,532, p = 0,002$, Analgesieregime x Zeit: $F_{12, 105} = 3,905, p < 0,001$), konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Analgesieregimegruppen und der naiven Gruppe identifiziert werden (Abb. 18A). Unter Berücksichtigung des Baseline-Wühlverhaltens (Δ)-Wühlverhalten = Baseline-Wühlverhalten – experimentelles Wühlverhalten) konnte ein Einfluss des Analgesieregimes bei weiblichen Substanz-Kontroll-Mäusen auf die Menge entfernter Pellets bestätigt werden (*two-way* RM-ANOVA: Analgesieregime: $F_{4, 35} = 5,086, p = 0,002$). In der Bonferroni-Korrektur konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden (Abb. 18B).

Drei männliche OP-Mäuse und eine männliche Substanz-Kontroll-Maus zeigten bei der Analyse der seitlichen Videoaufnahmen kein Wühlverhalten nach der Operation oder Anästhesie. Für die Auswertung wurde deswegen ihre Latenzzeit bis zum Wühlverhalten auf die maximale Beobachtungsdauer von 72.000 s gesetzt. Die Latenzzeit bis zum Wühlverhalten war bei OP-Mäusen, welche mit dem +NO-Analgesieregime behandelt wurden, signifikant erhöht (*one-way* ANOVA Männchen OP-Gruppe: $F_{4, 34} = 4,359, p = 0,006, post-hoc: p = 0,003$; Weibchen OP-Gruppe: $F_{4, 35} = 3,45, p = 0,018, post-hoc: p = 0,019$) (Abb. 18C). Allerdings bestätigte sich dies bei der Berücksichtigung der Baseline mit der Δ -Latenzzeit zum Wühlverhalten nur für weibliche OP-Mäuse (*one-way* ANOVA: $F_{4, 35} = 3,473, p = 0,017, post-hoc: p = 0,017$) (Abb. 18D).

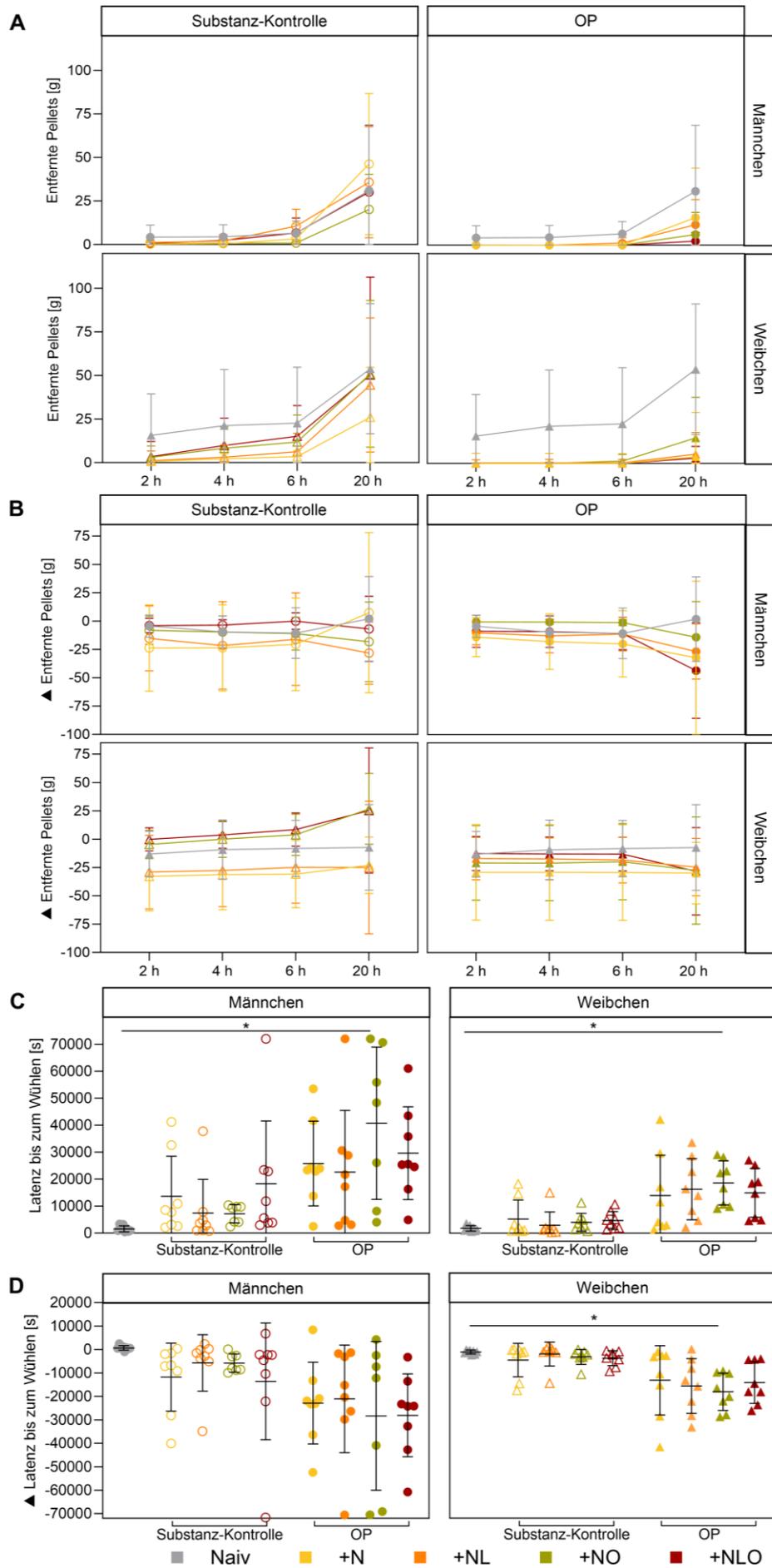


Abbildung 18: Wühlverhalten.

Die entfernte Menge an Pellets [g] innerhalb 20 h nach der Operation oder Anästhesie ist pro Geschlecht in Graph **A** abgebildet. Unter Berücksichtigung des Baseline-Wühlverhaltens ist die entfernte Menge an Pellets [g] zusätzlich als delta (Δ)-Wert in **B** dargestellt. Die Latenz in Sekunden bis zum ersten Wühlverhalten ist in **C** als absoluter Wert und in **D** als Δ -Wert inklusive Berücksichtigung der Baselinemessung abgebildet (abweichende Gruppengrößen: ♂: +NO-Substanz-Kontrolle und OP $n = 7$). A + B: *Two-way* RM-ANOVA, C + D: *one-way* ANOVA, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.6. Nestbauverhalten

Im Vergleich zu naiven Mäusen war die Nestkomplexität von männlichen und weiblichen Mäusen in den ersten 6 h nach dem operativen Eingriff signifikant beeinträchtigt (Kruskal-Wallis-Test Männchen: 2 h: $p = 0,001$, 4 h und 6 h: $p = 0,006$; Weibchen: 2 h, 4 h, 6 h: $p < 0,001$). Männliche Mäuse der +NL-, +NO- und +NLO- sowie weibliche Mäuse aller Analgesieregime zeigten niedrigere Nest-Scores als die entsprechenden naiven Mäuse (Männchen *post-hoc* 2 h: +NL, +NO und +NLO $p = 0,006$; 4 h und 6 h: +NO und +NLO $p = 0,01$; Weibchen *post-hoc* 2 h: alle $p < 0,001$; 4 h: +NL $p = 0,017$, +N, +NO und +NLO $p = 0,001$; 6 h: +NL $p = 0,002$, +N, +NO und +NLO $p < 0,001$). Ein Tag nach dem operativen Eingriff war das Nestbauverhalten weiblicher Mäuse immer noch beeinträchtigt (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,003$), wobei +NL- ($p = 0,002$), +NO- ($p = 0,046$) und +NLO- ($p = 0,03$) OP-Mäuse geringere Nest-Scores als weibliche naive Mäuse aufwiesen. Weder die Anästhesie noch die verschiedenen Analgesieregime hatten einen signifikanten Einfluss auf die Nestkomplexität der Substanz-Kontroll-Mäuse (Abb. 19). Ebenso konnten keine Unterschiede der Nestkomplexität bei den Baselinemessungen festgestellt werden.

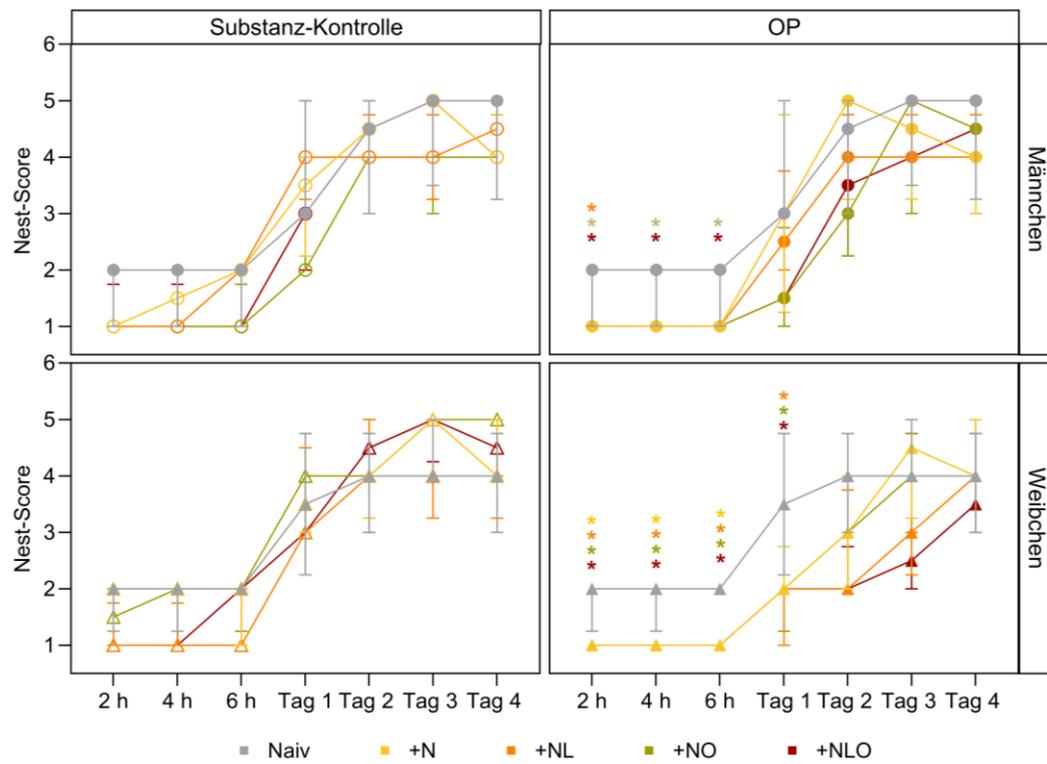


Abbildung 19: Nestbauverhalten.

Die Nest-Scores, welche während der experimentellen Phase erhoben wurden, sind geschlechtergetrennt graphisch dargestellt (abweichende Gruppengröße: ♂: Tag 2 +NO-Substanz-Kontrolle n = 7, Tag 4 +N-OP n = 7). Kruskal-Wallis-Test, Median ± IQR, * = p < 0,05, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.7. Aktivität im Heimkäfig

Ungeachtet des Analgesieregimes zeigten männliche und weibliche Mäuse eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Distanz im Vergleich zu naiven Mäusen innerhalb der ersten 20 h nach dem operativen Eingriff (*one-way* ANOVA Männchen: $F_{4,35} = 6,237$, $p < 0,001$, *post-hoc*: +N $p = 0,009$, +NL $p = 0,001$, +NO $p = 0,026$, +NLO $p = 0,002$; Weibchen: $F_{4,35} = 7,772$, $p < 0,001$, *post-hoc*: +N $p = 0,001$, +NO $p = 0,005$, +NL und +NLO $p < 0,001$) (Abb. 20A). Die reduzierte Aktivität spiegelte sich in einer signifikant reduzierten, mittleren Geschwindigkeit innerhalb der ersten 20 h bei OP-Mäusen der Analgesieregime +N (Weibchen: $p = 0,04$), +NL (Männchen: $p = 0,007$; Weibchen: $p = 0,01$), +NLO (Männchen: $p = 0,009$; Weibchen: $p = 0,02$) wider (*one-way* ANOVA Männchen: $F_{4,35} = 4,579$, $p = 0,004$; Weibchen: $F_{4,35} = 4,306$, $p = 0,006$) (Abb. 20B). Die statistische Analyse der zurückgelegten Distanz innerhalb des gesamten postoperativen Zeitraums der männlichen OP-Mäuse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Analgesieregimegruppen und der naiven Gruppe (Mixed-Effects-Modell: Zeit: $F_{3,126,102,6} = 56,07$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{24,197} = 2,213$, $p = 0,002$, Analgesieregime: $F_{4,35} = 1,774$, $p = 0,16$). Während der Dunkelphase an Tag 0 war die zurückgelegte Distanz bei weiblichen Mäusen aller Analgesieregime (+N $p = 0,049$, +NL $p = 0,04$, +NO $p = 0,02$, +NLO $p = 0,01$) und an Tag 1 in der Dunkelphase bei +NL- ($p = 0,048$), +NO ($p = 0,007$) und +NLO- ($p = 0,04$) Analgesieregimegruppen hingegen signifikant reduziert im Vergleich zu weiblichen naiven Tieren (*two-way* RM-ANOVA: Zeit: $F_{3,301,115,5} = 151$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{24,210} = 3,803$, $p < 0,001$, Analgesie Regime: $F_{4,35} = 5,439$, $p = 0,002$). Die Aktivität der Substanz-Kontroll-Mäuse wurde nicht durch die Allgemeinanästhesie oder die verschiedenen Analgesieregime beeinflusst (Abb. 20C).

Da manche Mäuse die Wühlröhre als Unterschlupf benutzten oder auch ihr Nest außerhalb des Maushauses aufbauten, erwies sich der Parameter Aufenthaltsdauer in der „Zone Haus“ als unschlüssig und wurde deshalb von der Analyse exkludiert.

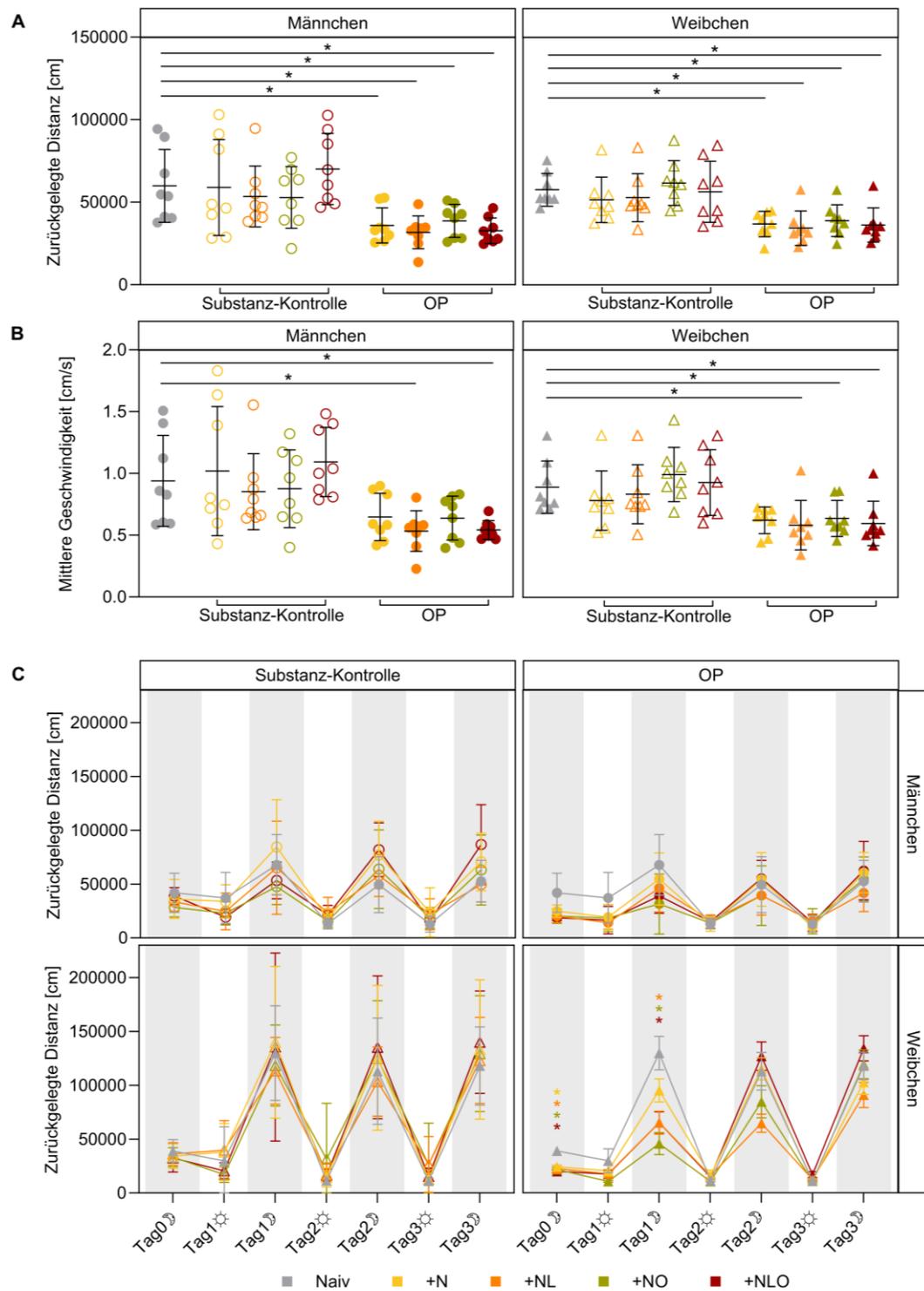


Abbildung 20: Aktivität im Heimkäfig.

Die zurückgelegte Distanz und die mittlere Geschwindigkeit im PhenoTyper® Heimkäfig innerhalb der ersten 20 h nach der Intervention sind in **A** beziehungsweise **B** graphisch dargestellt. Die zurückgelegte Distanz im PhenoTyper® Heimkäfig während des gesamten experimentellen Zeitraumes ist für jeweils 12 h Hell- und Dunkelphase in Graph **C** abgebildet (abweichende Gruppengröße: ♂: Tag 2 Hell- und Dunkelphase und Tag 3 Hellphase +N-OP n = 7, Tag 4 Hell- und Dunkelphase +N-OP n = 6 und alle anderen Gruppen n = 7). A + B: One-way ANOVA, C: Two-way RM-ANOVA oder Mixed-Effects-Modell, Mittelwert \pm SD, * = $p < 0,05$, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.8. Laufradaktivität

Zwar konnte die Analyse der Laufradaktivität ab der Dunkelphase an Tag 1 keine Auswirkungen des Analgesieregimes zeigen, jedoch ließen sich Auswirkungen der Hauptzielgröße Zeit in Substanz-Kontroll- und OP-Mäusen beider Geschlechter erkennen (Mixed-Effect-Modell Männchen Substanz-Kontroll-Gruppe: Zeit: $F_{2,066, 68,16} = 31,89$, $p < 0,001$; Männchen OP-Gruppe: Zeit: $F_{1,986, 64,05} = 40,7$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{16, 129} = 2,48$ $p = 0,003$; *two-way* RM-ANOVA Weibchen Substanz-Kontroll-Gruppe: $F_{2,292, 80,2} = 96,88$, $p < 0,001$; Weibchen OP-Gruppe: Zeit: $F_{2,607, 91,23} = 94,45$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{16,140} = 2,091$, $p = 0,012$) (Abb. 21).

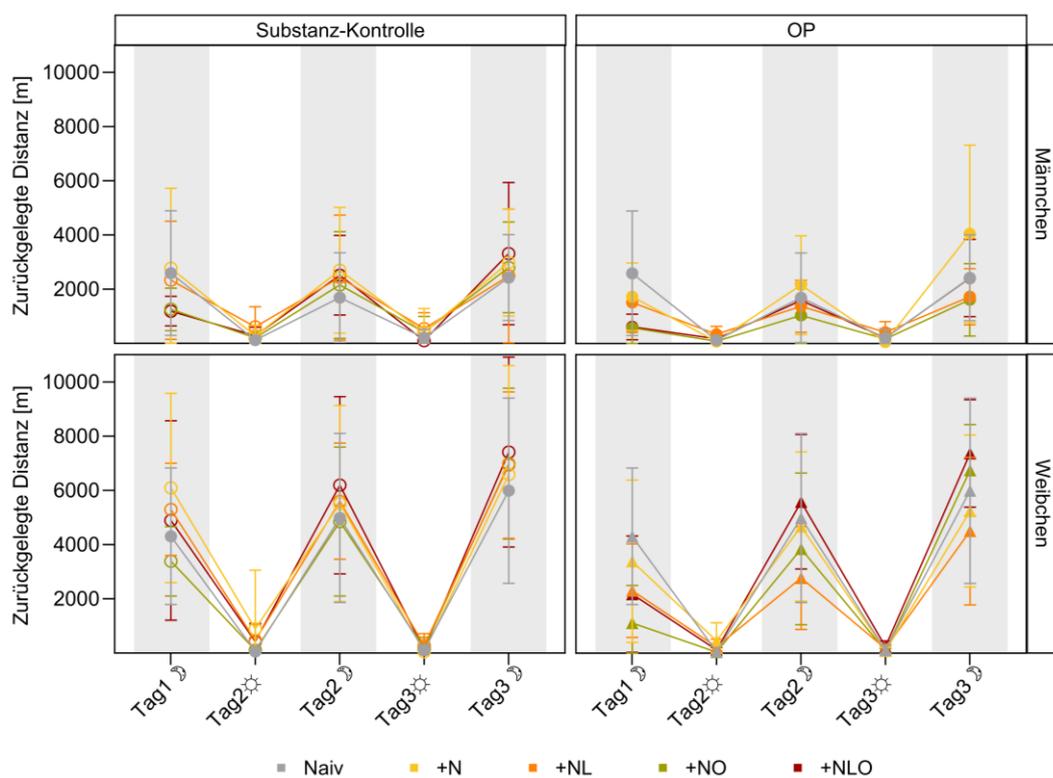


Abbildung 21: Laufradaktivität.

Die zurückgelegte Distanz im Laufrad des PhenoTypers® ist ab der Dunkelphase von Tag 1 durchgehend für jeweils 12 h Hell- und Dunkelphase erfasst worden (abweichende Gruppengrößen: ♂: Tag 2 Hell- und Dunkelphase und Tag 3 Hellphase +N-OP n = 7, Tag 4 Hell- und Dunkelphase +N-OP n = 6 und alle anderen Gruppen n = 7). *Two-way* RM-ANOVA, Mittelwert \pm SD, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.9. Fäkale Kortikosteronmetaboliten

Die Konzentration der Stresshormonmetaboliten war bei männlichen Mäusen der Analgesieregimegruppe +NO (*one-way* ANOVA: $F_{4, 35} = 3,019$, $p = 0,03$, *post-hoc*: $p = 0,03$) und bei weiblichen Mäusen der Analgesieregimegruppen +NO und +NLO (*one-way* ANOVA: $F_{4, 35} = 5,253$, $p = 0,002$, *post-hoc*: $p = 0,01$, $p = 0,005$) am ersten postoperativen Tag signifikant erhöht. Obwohl die FCM-Konzentrationen der weiblichen Substanz-Kontroll-Mäuse von der Haupteffektgröße Analgesieregime beeinflusst wurde (*one-way* ANOVA: $F_{4, 35} = 3,399$, $p = 0,019$), konnten mittels Bonferroni-Korrektur keine signifikanten Unterschiede zwischen den Analgesieregimen und naiven Gruppen etabliert werden. Die Analyse der FCM-Konzentrationen zu Baselinezeitpunkten und an Tag 4 offenbarten keine Unterschiede bezüglich der Analgesieregime (Abb. 22).

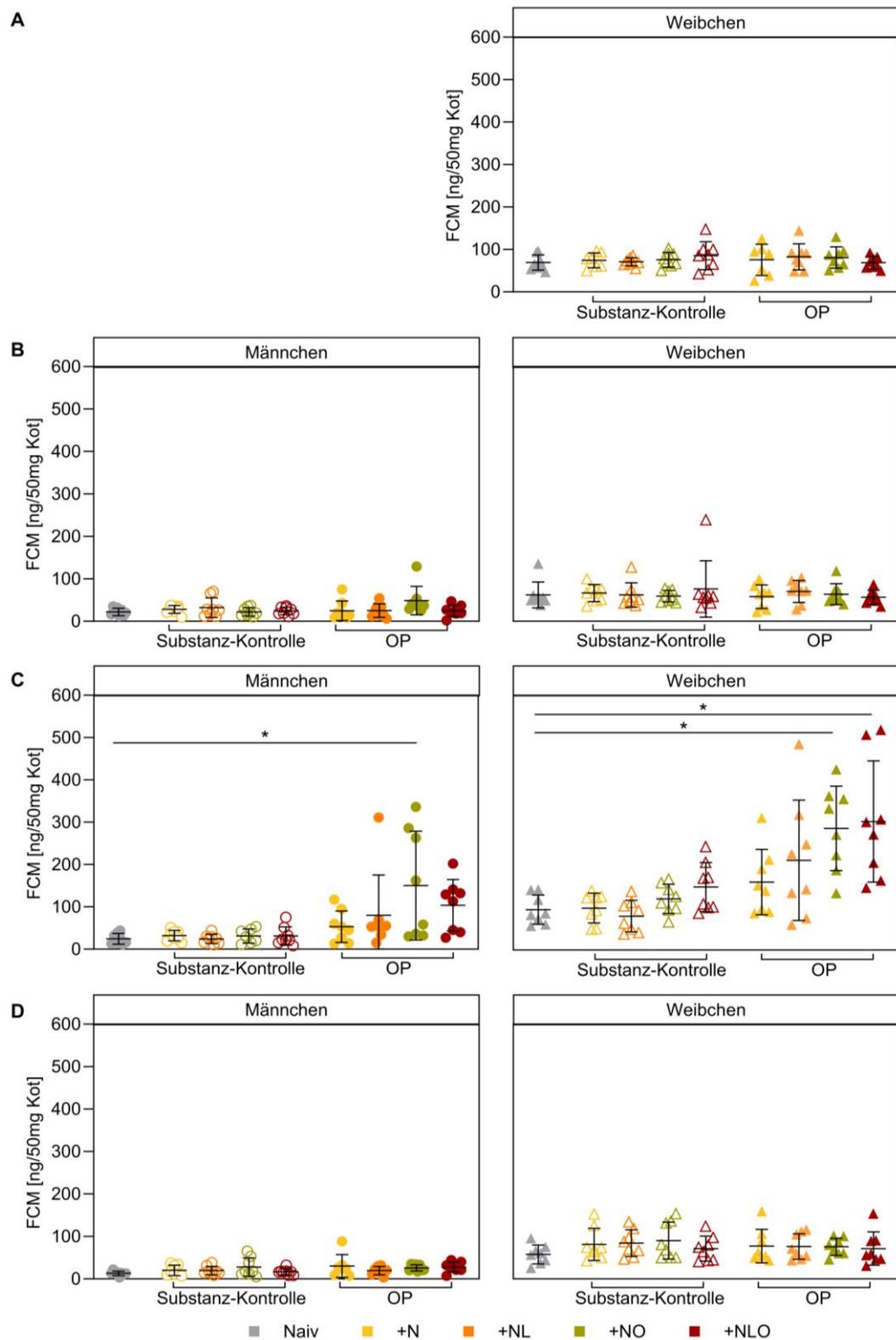


Abbildung 22: FCMs.

Die Baselinekonzentration der FCM im Kot wurde bei Weibchen an Tag -6 in Gruppenhaltung (A) und an Tag -3 in Einzelhaltung bei beiden Geschlechtern (B) evaluiert. Nach der Operation oder Anästhesie wurden die FCM-Konzentrationen an Tag 1 (C) und an Tag 4 (D) gemessen (abweichende Gruppengröße: ♂: Tag 1: +NO-Substanz-Kontrolle n = 7, Tag 4: +N-OP n = 7; ♀: Tag -6 +N-OP und Substanz-Kontrolle n = 7). A, B, C, D: One-way ANOVA, Mittelwert ± SD, * = p < 0,05, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.10. Flüssigkeitsaufnahme und Carprofenkonzentration im Plasma

Zur Berechnung der benötigten Carprofenkonzentration im Trinkwasser, wurde die mittlere Baseline-Wasseraufnahme pro Tag erhoben. Diese betrug für Männchen 5,3 g (SD = 1,5) und für Weibchen 4,2 g (SD = 0,5). Um die orale Aufnahme des Carprofens beurteilen zu können, wurde die Flüssigkeitsaufnahme ebenfalls ab Tag -1 bis Tag 4 erhoben. Dabei wurde die Flüssigkeitsaufnahme bei männlichen Mäusen von der Haupteffektgröße Zeit beeinflusst (*two-way* RM-ANOVA Substanz-Kontroll-Gruppe: Zeit: $F_{2,326, 81,39} = 18,91$, $p < 0,001$; Mixed-Effects-Modell OP-Gruppe: Zeit: $F_{1,921, 67,2} = 24,88$, $p < 0,001$), doch weder das Analgesieregime noch der operative Eingriff oder die Anästhesie veränderte die Flüssigkeitsaufnahme signifikant im Vergleich zur naiven Gruppe. Weibliche Substanz-Kontroll- und OP-Mäuse, bis auf die +N-Gruppe, nahmen hingegen an Tag -1, als das mit Carprofen angereicherte Trinkwasser zum ersten Mal angeboten wurde, signifikant mehr Flüssigkeit zu sich (*two-way* RM-ANOVA: Substanz-Kontroll-Gruppe: Zeit: $F_{1,691, 11,84} = 15,22$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{4,287, 30,01} = 5,655$, $p = 0,001$, *post-hoc*: +N $p = 0,005$, +NL $p = 0,02$, +NO $p = 0,002$, +NLO $p = 0,005$; OP-: Zeit: $F_{2,816, 98,56} = 41,57$, $p < 0,001$, Zeit x Analgesieregime: $F_{20, 175} = 5,687$, $p < 0,001$, *post-hoc*: +NL $p = 0,002$, +NO $p = 0,007$, +NLO $p = 0,037$). Zudem war die Flüssigkeitsaufnahme an Tag 0 in der +NO- ($p = 0,007$) und + NLO- ($p = 0,037$) Gruppe weiblicher OP-Mäuse signifikant reduziert (Abb. 23A).

Mit Hilfe der Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie wurde die Carprofenkonzentration der Plasmaproben, welche nach einer kontinuierlichen, oralen Applikation des Carprofens über 5 Tage am Euthanasietag gesammelt wurden, erhoben. Die mittlere Carprofenkonzentration im Plasma betrug dabei bei Männchen 162,8 $\mu\text{g/ml}$ (SD = 70,98) und in Weibchen 281,9 $\mu\text{g/ml}$ (SD = 59,31). Die gemessenen Konzentrationen überstiegen die in der Literatur vorgeschlagenen therapeutischen Carprofenplasmakonzentrationen von 20 – 24 $\mu\text{g/ml}$ (LEES et al., 2004; FOLEY et al., 2019; GLASENAPP et al., 2023) um das 6- bis 11-fache. Überraschenderweise wurden auch bei naiven Mäusen, welche nur mit Leitungswasser versorgt wurden, geringe Konzentrationen des Carprofens im Plasma nachgewiesen (Männchen: M = 0,33 $\mu\text{g/ml}$, SD = 0,44; Weibchen: M = 0,13 $\mu\text{g/ml}$, SD = 0,05) (Abb. 23B). Diese Erkenntnisse lassen eine Carprofenkontamination bereits gespülter Trinkflaschen in unserer Tierhaltung vermuten. Diese Annahme bestätigten wir, indem wir Wasserproben gespülter

Trinkflaschen, welche vorher mit carprofenangereichertem Wasser befüllt waren, untersuchen ließen.

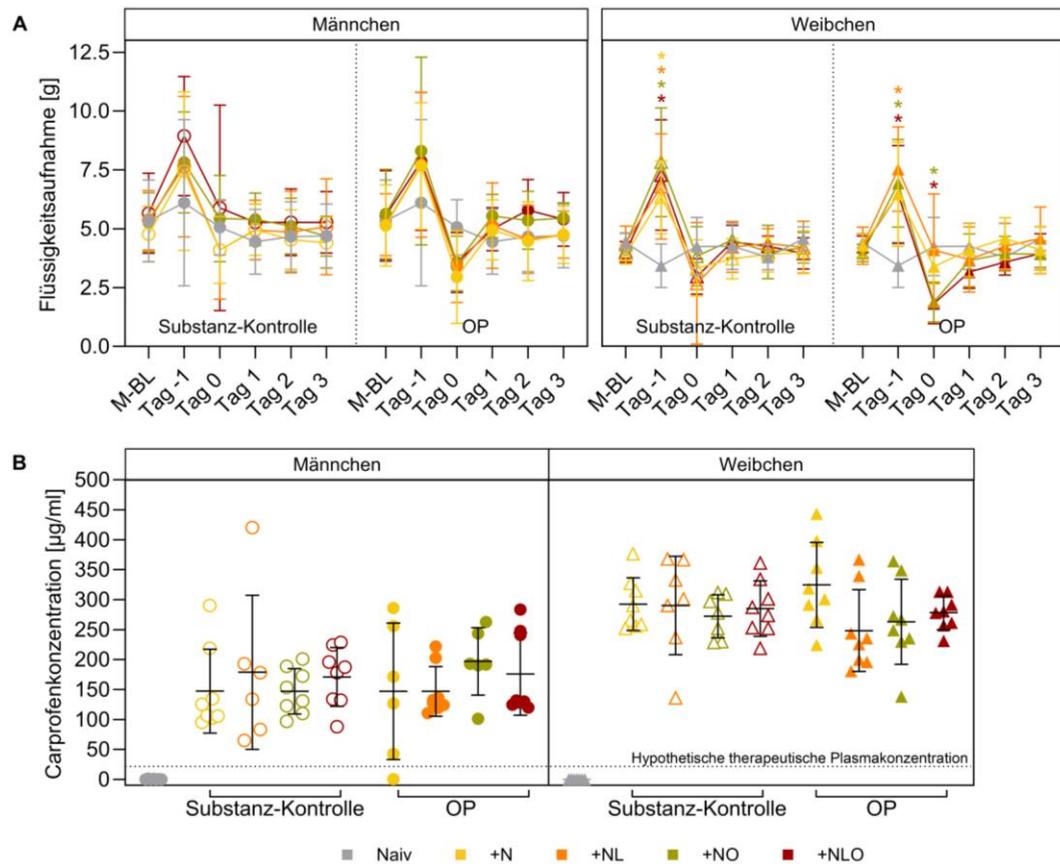


Abbildung 23: Wasseraufnahme und Carprofenkonzentration im Plasma.

Die mittlere Wasseraufnahme zum Baselinezeitpunkt (M-BL) und die Aufnahme des carprofenangereicherten Trinkwassers ein Tag prä- und bis Tag 3 postoperativ ist in Graph **A** veranschaulicht (abweichende Gruppengröße: ♂: Tag 4 +N-OP n = 7; ♀: Tag 0 +NL-Substanz-Kontrolle n = 7). Die Carprofenkonzentration im Plasma, welche zur Euthanasie an Tag 4 erhoben wurde, ist im Vergleich zu der hypothetischen therapeutischen Plasmakonzentration, beschrieben in der Literatur, in **B** dargestellt (abweichende Gruppengrößen: ♂ naiv, +N-OP, +NL-Substanz-Kontrolle n = 7, +NO-OP n = 6; ♀: naiv, +NL- & +NO-Substanz-Kontrolle, n = 7). A: *Two-way* RM-ANOVA, Mittelwert ± SD, * = p < 0,05, Analgesieregime ist farbcodiert.

2.11. Histopathologische Ergebnisse

Um Nebenwirkungen der NSAID-Applikation auf den Gastrointestinaltrakt und der BUP-Depot-Injektion auf das umliegende Hautgewebe ausschließen zu können, wurden Proben des Magens, Duodenums und der Injektionsstelle *post mortem* entnommen und histopathologisch von unseren Kooperationspartnern untersucht. Eine detaillierte, tabellarische Auflistung der histopathologischen Untersuchung befindet sich im Anhang (siehe Kapitel X.12. Tab. 17).

Bei 24 % der OP- und Substanz-Kontroll-Mäuse wurden pathologische Läsionen im Magen, welche hauptsächlich auf der nicht-glandulären Magenschleimhaut oder dem Übergang von der nicht-glandulären zur glandulären Magenschleimhaut lokalisiert waren, identifiziert. Dabei konnte kein Muster bezüglich Geschlechts- oder Analgesieregimezugehörigkeit erkannt werden. Bei 11,7 % dieser Mäuse wurde eine milde bis moderate, fokale Infiltration gemischter Entzündungszellen in der Mukosa und Submukosa sowie fokale intraepitheliale Mikroabszesse, teilweise einhergehend mit fokaler Granulationsgewebsbildung, beobachtet. Bei 10,2 % der Mäuse konnten fokale Erosionen der Magenschleimhaut entdeckt werden. Fokale Ulzerationen der Magenschleimhaut hingegen konnten bei 2,3 % der Mäuse identifiziert werden. Bei den naiven Mäusen, welchen kein Schmerzmittel appliziert wurde, wurden hingegen keine vergleichbaren Läsionen identifiziert. Äußerst milde, fokale Erosionen im Duodenum wurden nur bei zwei weiblichen Mäusen des +NO- und +NLO-Analgesieregimes entdeckt (Abb. 24A-D).

68,8 % der Mäuse des +NO- und +NLO-Analgesieregimes, welche subkutan mit BUP-Depot injiziert wurden, wiesen eine milde bis moderate, fokal ausgedehnte, zellulär gemischte Panniculitis auf. Exemplarische Untersuchungen der Haut von naiven Mäusen zeigten keine histopathologischen Veränderungen (Abb. 24E und F).

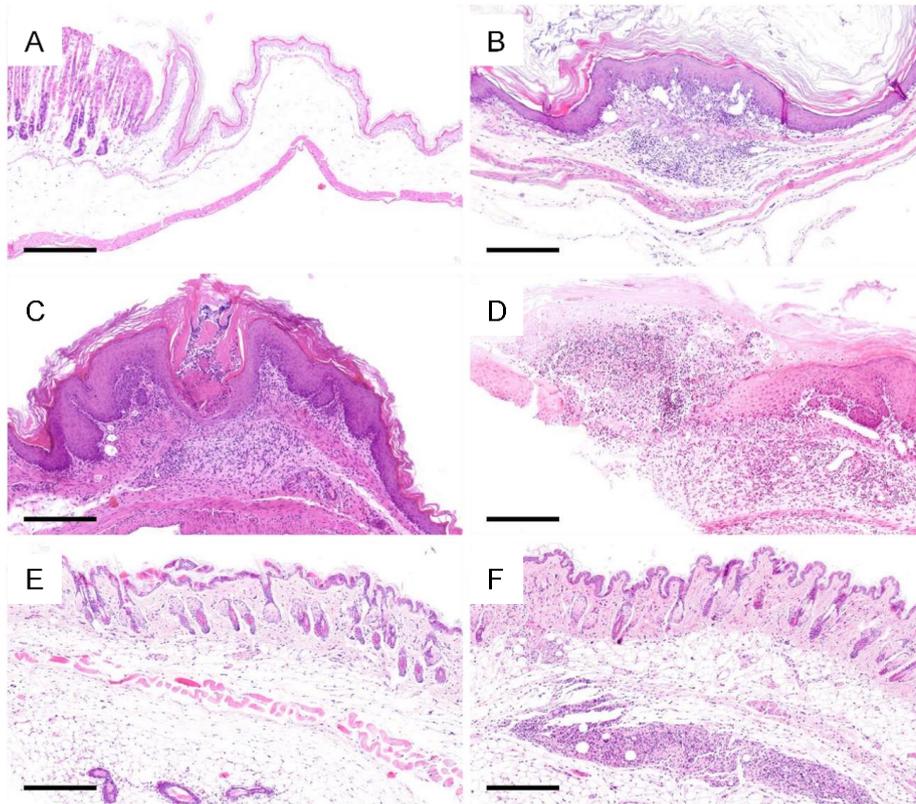


Abbildung 24: Histopathologische Untersuchung.

Exemplarische histologische Darstellung der Magenschleimhaut (**A**, **B**, **C**, **D**) und behaarten Haut (**E**, **F**). Ein Spektrum histopathologischer Befunde der Magenschleimhaut wurde beobachtet: keine pathologischen Veränderungen (**A**), eine moderate, fokale, zellulär gemischte Gastritis mit intakter Magenschleimhaut (**B**), fokale Erosionen des Epithels, begleitet von einer gemischten intraepithelialen (Mikroabszesse) und mukösen Inflammation sowie Bildung von Granulationsgewebe und Hyperplasie des intakten Epitheliums (**C**) und eine ulzerative Läsion mit assoziierter Inflammation (**D**). Während in **E** ein unverändertes histologisches Bild der Haut dargestellt ist, sieht man in **F** eine fokal ausgedehnte, milde bis moderate, zellulär gemischte Panniculitis an der Hautinjektionsstelle. (a: m, naïv; b: w, +N-OP; c: m, +NL-Substanz-Kontrolle; d: m, +NO-Substanz-Kontrolle; e: w, naïv; f: w, +NLO-Substanz-Kontrolle; m = männlich, w = weiblich).

2.12. Zusammenfassung der Ergebnisse

Parameter:	OP + N		OP + NL		OP + NO		OP + NLO	
Geschlecht:	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀
BWC Tag1	→	→	↓	→	→	↓	↓	↓
BWC Tag2	→	→	→	→	→	↓	→	→
Nest 2h, 4h, 6h	→	↓	(↓)	↓	↓	↓	↓	↓
Nest Tag1	→	→	→	↓	→	↓	→	↓
Latenz Wühlverhalten	→	→	→	→	↑	↑	→	→
▲Latenz Wühlverhalten	→	→	→	→	→	↑	→	→
MGS 2h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MGS 4h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MGS 6h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MGS 8h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MGS Tag1	↑	↑	↑	→	↑	↑	↑	↑
MGS Tag2	→	→	↑	→	↑	→	↑	→
PT zurückgelegte Distanz 20h	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
PT zurückgelegte Distanz Tag0-dunkel	→	↓	→	↓	→	↓	→	↓
PT zurückgelegte Distanz Tag1-dunkel	→	→	→	↓	→	↓	→	↓
PT Geschwindigkeit 20h	→	→	↓	↓	→	↓	↓	↓
PT Geschwindigkeit Tag0-dunkel	→	→	→	→	→	↓	→	↓
PT Geschwindigkeit Tag1-dunkel	→	→	→	→	→	↓	→	↓
Flüssigkeitsaufnahme Tag-1/h	→	→	→	↑	→	↑	→	↑
Flüssigkeitsaufnahme Tag0/h	→	→	→	→	→	↓	→	↓
FCM Tag1	→	→	→	→	↑	↑	→	↑
Neuro-Score: Hüfthöhe 4h	→	→	→	→	→	→	→	↑
Neuro-Score: Schwanzhöhe 4h	→	→	→	→	↑	↑	↑	↑
Neuro-Score: Lokomotion Tag3	→	↓	→	→	→	→	→	→

Parameter:	Substanz-Kontrolle + N		Substanz-Kontrolle + NL		Substanz-Kontrolle + NO		Substanz-Kontrolle + NLO	
Geschlecht:	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀	♂ / ♀
MGS 2h	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
MGS 4h	→	↑	→	→	→	→	↑	↑
MGS 6h	→	→	→	→	→	→	↑	→
MGS Tag1	→	→	↑	→	→	→	→	→
Neuro-Score: Lokomotion 4h	→	→	→	→	→	→	→	↑
Neuro-Score: Schwanzhöhe 4h	→	→	→	→	↑	↑	↑	↑

Tabelle 6: Zusammenfassung signifikant veränderter Parameter.

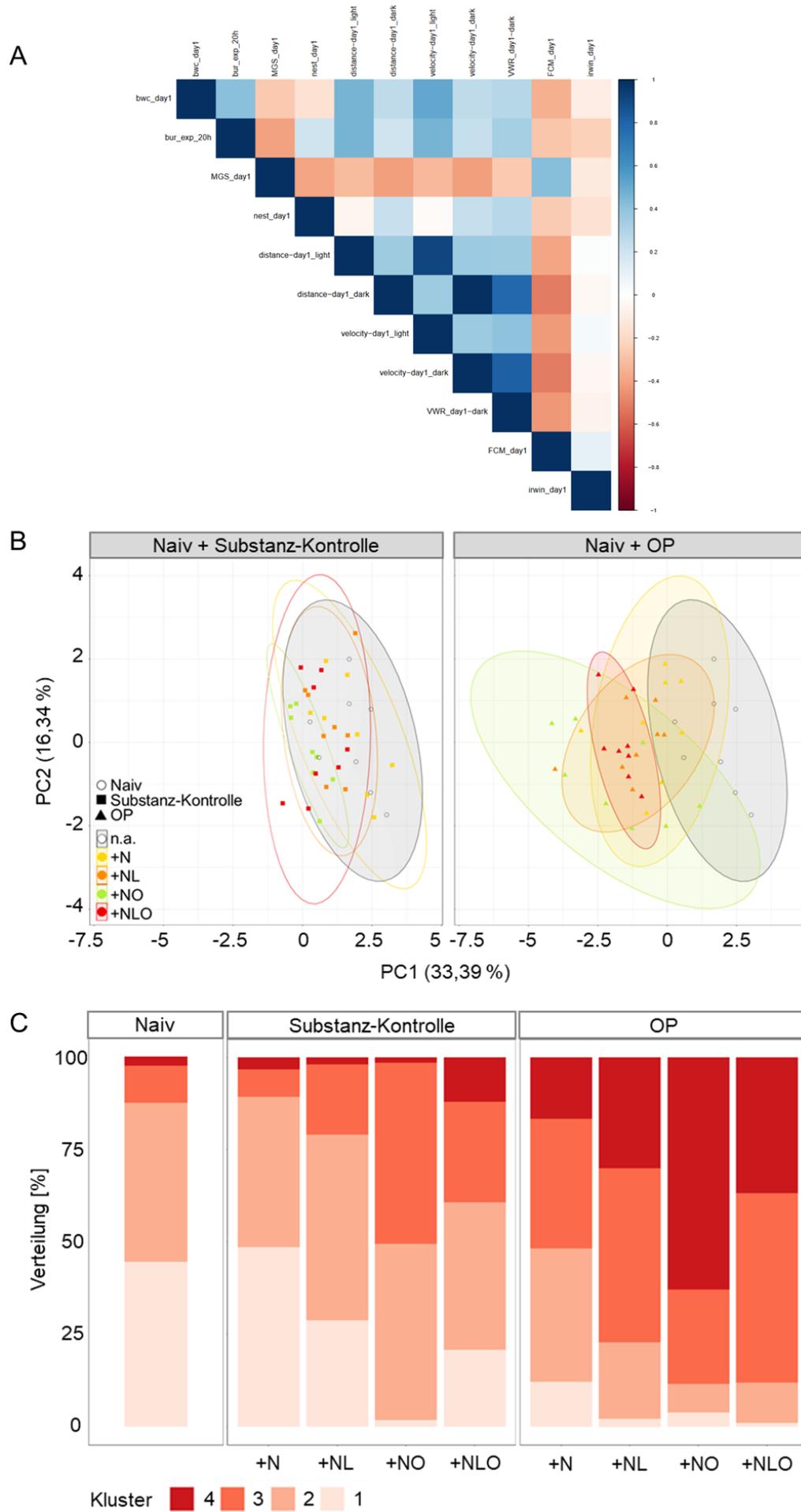
Tabellarische Zusammenfassung aller signifikant veränderter Parameter zu bestimmten Zeitpunkten pro Geschlecht und Analgesieregimegruppe für naive vs. OP- (obere Tabellenhälfte) und naive vs. Substanz-Kontroll-Gruppen (untere Tabellenhälfte). Grün hinterlegte Zellen repräsentieren keinen signifikanten Unterschied, rot hinterlegte Zellen repräsentieren signifikante Unterschiede (↑: Anstieg, ↓: Abfall). ♂ = Männchen, ♀ = Weibchen; BWC = *body weight change* (Körpergewichtsveränderung); MGS = Mouse-Grimace-Scale; PT = PhenoTyper® Heimkäfig; FCM = Fäkale Kortikosteronmetaboliten; dunkel = erhoben innerhalb der 12 h-Dunkelphase; ▲ = delta.

2.13. Design eines *Composite Measure Schemes*

Um eine vergleichende Belastungseinschätzung von elektrodenimplantierten Mäusen unter verschiedenen Analgesieregimen durchführen zu können, wurde ein von unserer Arbeitsgruppe entwickelter bioinformatischer Workflow für das Design eines CMS angewandt (VAN DIJK et al., 2020; REIBER et al., 2023). Da einzelne Parameter hauptsächlich an dem postoperativen Tag 1 beeinträchtigt waren und in den folgenden Tagen nur geringe, persistierende Veränderungen identifiziert werden konnten, fokussierten wir uns für das Design eines CMS auf den ersten postoperativen Tag. Zuerst wurden elf Parameter (siehe Kapitel X.13 Tab. 18), welche zusätzliche Informationen für die Belastungseinschätzungen lieferten, vorselektiert: Körpergewichtsveränderung, MGS, Wühlverhalten innerhalb 20 h, Nestbauverhalten, Neuro-Score, FCM, zurückgelegte Distanz und Geschwindigkeit gemessen im PhenoTyper® während der Hellphase und zurückgelegte Distanz, Geschwindigkeit und VWR gemessen im PhenoTyper® während der Dunkelphase. Daraufhin wurde eine Spearman-Korrelationsanalyse durchgeführt, um Korrelationen zwischen Parametern zu identifizieren (definiert als Korrelationskoeffizient $r < -0,5$ oder $> 0,5$ in Kombination mit $p < 0,05$). Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse sind in einer *Heatmap* in Abbildung 25 A und E dargestellt und tabellarisch im Anhang (siehe Kapitel X.13. Tab. 19 und 20) aufgeführt. Starke Korrelationen ($r < -0,7$ oder $> 0,7$) zwischen der zurückgelegten Distanz in der Dunkel- sowie Hellphase, Geschwindigkeit in der Dunkel- sowie Hellphase und VWR in der Dunkelphase ($r = 0,78$ bis $0,99$, alle Korrelationen $p < 0,001$) führten zur Exklusion der Parameter Geschwindigkeit und VWR. Somit blieben acht Parameter für die weitere Analyse bestehen. Die Datensätze der männlichen und weiblichen Mäuse wurden dann einer zentrierten und skalierten Hauptkomponentenanalyse unterzogen. Die Hauptkomponente 1 erklärte 33,39 % (SD = 1,14) respektive 37,14 % (SD = 1,72) und die Hauptkomponente 2 16,34 % (SD = 1,09) respektive 16,26 % (SD = 1,14) der gesamten Varianz des Datensatzes männlicher und weiblicher Mäuse. Die Ergebnisse einer Hauptkomponentenanalyse pro Geschlecht sind zur besseren Veranschaulichung getrennt für die naiven und Substanz-Kontroll-Gruppen oder OP-Gruppen in Abbildung 25 B und F dargestellt. Eine deutliche Trennung der Daten der naiven und Substanz-Kontroll-Gruppen entlang der Hauptkomponenten 1 und 2 war nicht gelungen. Jedoch deuteten die Datensätze beider Geschlechter auf eine Trennung zwischen naiven und OP-Mäusen entlang der Hauptkomponente 1 hin. Allerdings

konnte keine eindeutige Trennung der verschiedenen Analgesieregimegruppen der OP-Mäuse entlang der zwei dargestellten Hauptkomponenten erkannt werden. Für eine robuste Identifikation von relevanten Hauptparametern wurden die Datensätze der Hauptkomponenten 1 und 2 100-fachen Hauptkomponentenanalysen unterzogen, wobei für eine Erhöhung der Robustheit jedes Mal 80 % des Datensatzes neu beprobt wurde (VAN DIJK et al., 2020). Die folgenden Parameter waren hauptsächlich verantwortlich für die Varianz des Datensatzes männlicher Mäuse und kamen wiederholt auf den ersten vier Positionen vor: Nestbauverhalten, Körpergewichtsveränderung, MGS, FCM und die zurückgelegte Distanz in der Hellphase. Im Datensatz weiblicher Mäuse wurden folgende Hauptparameter identifiziert: Neuro-Score, zurückgelegte Distanz in der Hellphase, FCM, Körpergewichtsentwicklung und Nestbauverhalten (siehe Kapitel X.13. Tab. 21 und 22). Obwohl manche Parameter nur für einen geringen Anteil der Gesamtvarianz verantwortlich waren, erschienen alle acht Parameter unter den Hauptparametern. Um den Verlust des informativen Mehrwerts dieser Parameter zu verhindern, wurden alle Parameter, wie es bereits für murine Datensätze beschrieben wurde (REIBER et al., 2023), für das Erstellen des multidimensionalen *Composite Scores* inkludiert. Die Klusteranzahl wurde festgelegt, indem ein *Scree Plot* der Summe der Abweichungsquadrate innerhalb eines Klusters (*within-cluster sum of squares*) entlang der Hauptkomponenten 1 und 2 interpretiert wurde (siehe Kapitel X.13. Abb. 26 und 27). Anschließend wurde eine 100-fache, auf *k-means* basierte und maschinelles Lernen gestützte Clusteranalyse durchgeführt, wobei ebenfalls jeweils 80 % des Datensatzes entlang der Hauptkomponenten 1 und 2 neu beprobt wurden, um die Grenzwerte der vier selektierten Cluster bestimmen zu können (VAN DIJK et al., 2020). Mäuse der verschiedenen Analgesieregimegruppen wurden dadurch einem der vier Cluster zugeordnet. Per Definition repräsentiert Cluster 4 die höchste Belastungsstufe, während Cluster 3, 2 und 1 schrittweise absteigende, geringere Belastungsstufen repräsentieren. Bei den männlichen OP-Mäusen war die Zuordnung zu Cluster 4 in der +NO-Analgesieregimegruppe (62,8 %) am höchsten, gefolgt von Mäusen der +NLO- (36,7 %), der +NL- (30,0 %) und der +N- (16,6 %) Analgesieregimegruppen. Ein ähnlicher Anteil von Mäusen der naiven und Substanz-Kontroll-Gruppen wurden dem Cluster 4 zugeteilt (1,4 bis 12 %). In Cluster 3 konnten allerdings Unterschiede zwischen +NO- (49,0 %) und +NLO- (27,1 %) im Vergleich zu +NL- (19,0 %) und +N- (7,4 %) Substanz-Kontroll-Gruppen und naiven Mäusen (10 %) ausgemacht

werden. Der prozentuale Anteil der weiblichen OP-Mäuse, welcher zu Cluster 4 mit der höchsten Belastung zugeordnet wurde, war wie folgt: +NO (44,9 %), +NL (32,9 %), +NLO (31,4 %) und +N (27,5 %). Die Clusterzuordnung der weiblichen Substanz-Kontroll-Mäuse schien abgesehen von einem geringen Unterschied in Cluster 2 in der +NLO-Analgesieregimegruppe (54,9 % vs. 30,4 % bei naiven Mäusen) ähnlich zu den naiven Mäusen zu sein. Die Clusterzuordnung der einzelnen Gruppen ist graphisch in Abbildung 25 C und G dargestellt und tabellarisch im Anhang (siehe Kapitel X.13. Tab. 23 und 24) aufgeführt.



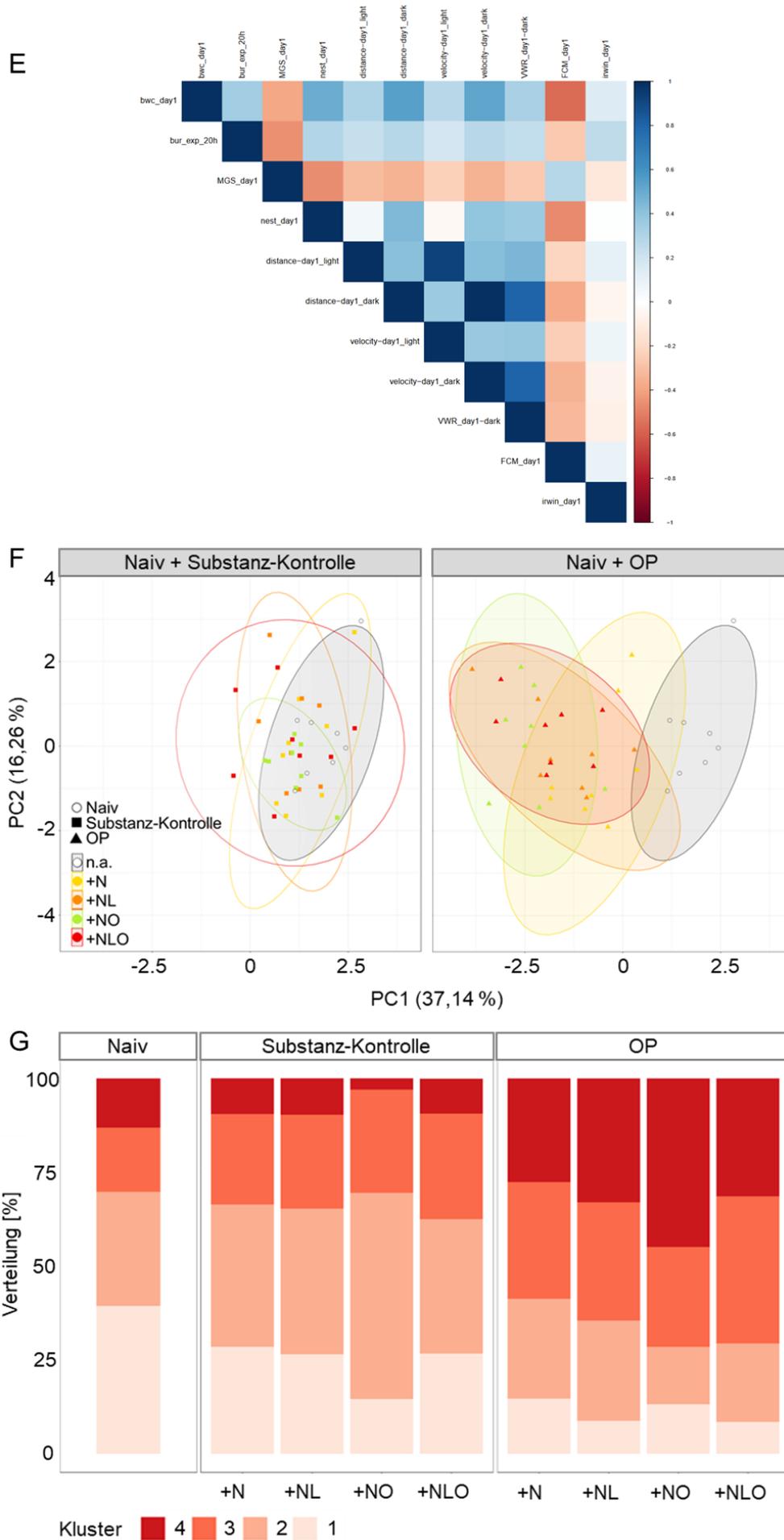


Abbildung 25: Composite Measure Scheme.

Das Design eines CMS anhand selektierter Parameter ist in den Graphen für männliche (A, B, C) und weibliche Mäuse (D, E, F) für den ersten postoperativen Tag dargestellt. Die Graphen **A** und **D** illustrieren jeweils die Spearman-Korrelationsanalyse mittels einer *Heatmap* (positive Korrelationen sind in Blau, negative Korrelationen in Rot dargestellt). Die verwendeten Abkürzungen der Parameter der Korrelationsanalyse sind in Tab. 18 erläutert. Eine exemplarische Hauptkomponentenanalyse beider Geschlechter ist in Graph **B** und **E** für jeweils die naiven und Substanz-Kontroll- oder OP-Mäuse dargestellt. In **C** und **F** ist die Zuordnung individueller Tiere aus den verschiedenen experimentellen Gruppen zu vier Klustern prozentual dargestellt. Diese Zuordnung erfolgte mit Hilfe einer *k-means* basierten Clusteranalyse. Cluster 4 entspricht hier der höchsten Belastungsstufe, während Cluster 1 der niedrigsten Belastungsstufe entspricht.

VI. DISKUSSION

1. Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung

Im Rahmen der ersten In-vivo-Studie dieser Dissertation sollte die Belastung von männlichen und weiblichen C57BL/6NRj Mäusen in der Einzel- und Gruppenhaltung vergleichend evaluiert werden. Dabei bestätigte sich zum einen die in vielen Tierhaltungen auftretende Problematik aggressionsbedingter Verletzungen bei männlichen Mäusen in Gruppenhaltung. Ebenso konnte zum anderen *Barbering*-Verhalten in Gruppenhaltungen bei Mäusen beiderlei Geschlechts registriert werden. Bei weiblichen Mäusen konnten geringgradige Auswirkungen der Einzelhaltung auf das Körpergewicht sowie das Wühlverhalten festgestellt werden. Außerdem zeigten die Mäuse in Einzelhaltung unabhängig vom Geschlecht im Vergleich zu den Mäusen in Gruppenhaltung vermehrt angstassoziiertes Verhalten und ein reduziertes Vermögen der Risikobeurteilung. Bei männlichen Mäusen in Gruppenhaltung wurden keine Hinweise auf eine reduzierte Fähigkeit zur Stressbewältigung beobachtet. Die Analyse der Kortikosteronmetaboliten ergab dahingegen keinen Hinweis auf einen Einfluss der Haltungsform auf den Stresspegel der Tiere.

Eine Körpergewichtszunahme innerhalb des achtwöchigen experimentellen Zeitraums, bei welchem pubertäre Mäuse (ab 36 Tage *post natum*) zu jung bis reif adulten Mäusen (70-120 Tage *post natum*) heranwachsen, war anzunehmen (REIBER et al., 2022b) und trat wie erwartet im Rahmen der vorliegenden In-vivo-Studie ein. Die Haltungsform beeinflusste das **Körpergewicht** männlicher Mäuse nicht. Dies bestätigt Ergebnisse anderer Studien, die bei männlichen Mäusen in Isolation oder Gruppenhaltung ebenfalls keinen Gewichtsunterschied identifizieren konnten, obwohl Männchen in sozialer Isolation vermehrt Futter zu sich nahmen und eine geringere Aktivität in der Dunkelphase zeigten (BENFATO et al., 2022; FUNABASHI et al., 2022). Funabashi und Kollegen (2022) mutmaßten, dass Mäuse in Isolation mehr Energie für die Thermoregulation aufwendeten, wodurch sie trotz erhöhter Futteraufnahme und reduzierter Aktivität nicht zunahmen. Andere Studien hingegen berichteten von einem geringeren Körpergewicht männlicher CD1- und C57BL/6-Mausstämme in Einzelhaltung und, ausgenommen von verwundeten CD1-Männchen, einem höheren Körpergewicht in Gruppenhaltung (KAMAKURA et al., 2016; MERTENS et al., 2019; HOHLBAUM et al., 2020;

JIRKOF et al., 2020a). Eine höhere Varianz in der Körperzusammensetzung männlicher Mäuse aus Gruppenhaltung wurde ebenfalls beschrieben (NAGY et al., 2002). Der Einfluss von aggressionsbedingten Verletzungen auf das Körpergewicht wurde in dieser Studie nicht explizit untersucht, jedoch ergab die Korrelationsanalyse keinen Hinweis auf einen Zusammenhang. Im Gegensatz zu den männlichen Mäusen konnte bei weiblichen Mäusen ein geringer Einfluss der Haltungsform auf das Körpergewicht beobachtet werden, wobei Weibchen in Einzelhaltung ein höheres Gewicht hauptsächlich in der zweiten Hälfte des Experimentes aufwiesen. In Experimenten zu dem Einfluss einer achtwöchigen sozialen Isolation, wurde ebenfalls eine Körpergewichtszunahme bei weiblichen C57BL/6-Mäusen beschrieben (CHALLA et al., 2023). Dies könnte durch chronischen Stress, welcher zu einer Hyperkortisolämie und in Folge dessen zu vermehrter Futteraufnahme und Gewichtszunahme führen kann, ausgelöst werden (CHALLA et al., 2023). Die Einzelhaltung sollte jedoch nicht mit einer Haltung der Tiere in sozialer Isolation, wie sie bei sozialen Isolationsexperimenten stattfindet, gleichgesetzt werden: bei sozialen Isolationsexperimenten, welche seit der COVID-19-Pandemie zur Erforschung zusätzlicher Gesundheitsrisiken vermehrt durchgeführt werden, haben die Mäuse weder olfaktorischen noch visuellen Kontakt zu Artgenossen (BENFATO et al., 2022; FUNABASHI et al., 2022; CHALLA et al., 2023). Durch die Haltung in konventionellen, offenen Käfigsystemen konnten die Tiere im Rahmen der vorliegenden In-vivo-Studie jedoch auch in Einzelhaltung verschiedene sensorische Stimuli erfahren.

Nach dem Käfigwechsel beobachteten wir kein **aggressives Verhalten** in weiblichen Gruppenkäfigen. Dies stimmt mit einem Großteil der Literatur überein, in der nur sporadisch von aggressivem Verhalten in weiblichen Gruppenhaltungen berichtet wird (THEIL et al., 2020). In vier von fünf männlichen Gruppenkäfigen beobachteten wir jedoch im Laufe der Studie zunehmendes Aggressionsverhalten nach dem Käfigwechsel. Zunehmendes aggressives Verhalten nach dem Käfigwechsel mit steigendem Alter der männlichen Mäuse wurde bereits beschrieben (VAN LOO et al., 2001b; LOCKWORTH et al., 2015). Durch den Transfer in einen neuen Käfig mit frischer Einstreu gehen Geruchsmarkierungen, welche die soziale Hierarchie innerhalb der Gruppenhaltung beschreiben, verloren (GRAY und HURST, 1995). Dies kann dazu führen, dass die Rangordnung nach einem Käfigwechsel neu ausgefochten werden muss. Um dieses Phänomen zu

mildern, empfehlen Studien, gebrauchtes Nestmaterial in den frischen Käfig zu überführen oder nur verschmutzte Kleinflächen auszumisten (VAN LOO et al., 2000; LIDSTER et al., 2019). Die 80%ige Prävalenz aggressiven Verhaltens in der vorliegenden Studie kann dabei nicht verglichen werden mit der 14%igen Prävalenz, welche von Theil und Kollegen (2020) angegeben wurde, da diese das Verhalten durch Beobachten eines geschlossenen Käfigs beurteilten. Welche Methode zur Messung aggressiven Verhaltens gewählt wird, kann eine entscheidende Rolle spielen: Beobachtungen im Heimkäfig und Erfassen der Wunden lösen frühere Methoden, welche territoriale Aggression (bspw. *resident intruder test*, *tube test*, *social defeat test*) außerhalb des Heimkäfig induzierten, zunehmend ab (WEBER et al., 2022). Letztere Methoden eignen sich nicht, um aggressives Verhalten im Heimkäfig und Behandlungseffekte zu quantifizieren, da die Methode selbst aggressives Verhalten provozieren kann (WEBER et al., 2022). Interessanterweise wurde in der vorliegenden Studie aggressives Verhalten auch außerhalb des Untersuchungszeitraumes von zehn Minuten nach dem Käfigwechsel, beispielsweise nach den zehn Minuten oder nach der täglichen Körpergewichtsmessung oder dem *Handling*, beobachtet. Es wurde bereits beschrieben, dass eine Störung der Mäuse während der Hellphase, sprich eine Störung des Schlafrythmus, aggressives Verhalten fördern kann (BENEDETTI et al., 2008). Somit können Routineeingriffe, für welche Individuen für kurze Zeit aus der Gruppenhaltung genommen werden, zu einer erhöhten Aggression im Heimkäfig führen (ANNAS et al., 2013; LOCKWORTH et al., 2015; WEBER et al., 2017). Eine vorhersehbare, tägliche Störung durch *Handling* löste jedoch im Vergleich zu einmal wöchentlichem *Handling* keinen Anstieg des aggressiven Verhaltens aus (JIRKOF et al., 2020a). Da Jirkof und Kollegen (2020) im Rahmen der täglichen Routinebeobachtung kaum aggressive Interaktionen zwischen Männchen entdeckten, jedoch einige Läsionen *post-mortem* an der Haut auffielen, schlugen sie ein kontinuierliches Videomonitoring zur Erfassung aggressiven Verhaltens auch in der Dunkelphase vor. Überraschenderweise wurde in anderen Arbeitsgruppen dieser multizentrischen Studie nur teilweise aggressives Verhalten beobachtet, sodass aggressives Verhalten in männlichen Gruppenhaltungen abhängig von der jeweiligen Tierhaltung zu sein scheint (MALLIEN, 2023).

55 % der männlichen Mäuse in Gruppenhaltung erlitten **aggressionsbedingte Verletzungen**. Geringgradige Verletzungen wurden dabei häufiger beobachtet als

hochgradige Verletzungen. Ein Männchen erreichte aufgrund seiner Verletzungen den humanen Endpunkt und einer von fünf Gruppenkäfigen mit männlichen Tieren wurde deswegen aufgelöst. Dabei liegt die Prävalenz aggressionsbedingter Verletzungen in dieser Studie deutlich über der Prävalenz von 1,5 %, welche von Lidster und Kollegen (2019) innerhalb eines Monats in 40 verschiedenen Tierhaltungen erhoben wurde. Eine Erklärung für diesen großen Unterschied könnte die Methode zur Wundfassung darstellen: wir scheitelten das Fell der Mäuse für die Erhebung des Wund-Scores, um die Haut genau untersuchen zu können. Gerade geringgradige Verletzungen (Wund-Score 1-2) wären durch reine Adspektion sonst übersehen worden. In der Studie von Lidster und Kollegen (2019) wurden jedoch rein adspektorisch sichtbare Wunden von unterwiesenen Tierpflegern erfasst. Laut der Literatur sind aggressionsbedingte Verletzungen häufig am kaudalen Rücken und dem Schwanz der Mäuse lokalisiert (LIDSTER et al., 2019; BARABAS et al., 2022). Auch in dieser Studie wurden der kaudale und der kraniale Rücken als besonders betroffene Körperregionen identifiziert. In unserer Studie erreichte der kumulative Wund-Score ein Maximum bei Mäusen im Alter von acht Wochen und flachte anschließend ab. Es ist beschrieben, dass männliche Mäuse mit Erlangen der sexuellen Reife (fünfte bis sechste Lebenswoche) vermehrt aggressives Verhalten zeigen können (LATHAM und MASON, 2004). In männlichen Gruppenhaltungen wurden die meisten aggressionsbedingten Verletzungen ebenfalls zwischen einem Lebensalter von sieben bis 14 Wochen verzeichnet und innerhalb der ersten sieben Wochen nach Zusammenstellen der Gruppen (LIDSTER et al., 2019). Mit der Zeit nahm der kumulative Wund-Score in dieser Studie ab. In einem *Systematic Review* wurden neun Studien identifiziert, die ebenfalls eine Abnahme des aggressiven Verhaltens über die Zeit feststellten (WEBER et al., 2022). Dabei wiesen die Ergebnisse jedoch eine Ambivalenz auf: zehn Studien verzeichneten keinen Einfluss der Zeit und 19 Studien beobachteten einen Anstieg der Aggression über die Zeit (WEBER et al., 2022). Ein im Rahmen dieser Dissertationsarbeit erfasster Zusammenhang zwischen aggressivem Verhalten und dem Auftreten von Verletzungen bei Mäusen konnte mittels der Korrelationsanalyse bekräftigt werden. Überraschenderweise beobachteten andere Arbeitsgruppen der multizentrischen Studie keinerlei aggressionsbedingte Verletzungen (MALLIEN, 2023).

15 % der Mäuse in Gruppenhaltung waren von **Barbering** betroffen, wobei

hauptsächlich die Vibrissen und seltener das Fell von Käfiggenossen entfernt wurden. Dies entspricht einer Prävalenz von ca. 10 %, welche in einer präliminären Umfrage in Tierhaltungen in Deutschland festgestellt wurde (KAHNAU et al., 2022). Eine fundierte Datenlage zur Prävalenz des *Barberings* existiert jedoch bis dato nicht.

Mit Hilfe des **Wühlverhaltens**, ein sog. „Wohlfühlparameter“, kann das Wohlbefinden der Mäuse erfasst werden (JIRKOF, 2014). Bei der Analyse des fünftägigen Wühlverhaltenstests für jeweils zwei Stunden im Rahmen dieser Studie konnte kein Einfluss der Haltungsform festgestellt werden. Lediglich eine Verbesserung der Leistung im Hinblick auf das Entfernen der Pellets aus der Wühlröhre innerhalb des fünftägigen Untersuchungszeitraums konnte bei Mäusen beiderlei Geschlechts identifiziert werden. Da eine hohe Varianz der Leistung im Wühlverhaltenstest bestand und manche Mäuse gar kein messbares Wühlverhalten zeigten, wurden die Mäuse für die Analyse in zwei Gruppen (Wühlverhalten versus kein Wühlverhalten) eingeteilt und die Datensätze reanalysiert. Hier ergab sich ein signifikanter Effekt der Haltungsform: weibliche Mäuse in Einzelhaltung zeigten häufiger kein Wühlverhalten als Weibchen in Gruppenhaltung. Der Einfluss unterschiedlicher Haltungsformen auf das Wühlverhalten wurde bisher nur in einer Studie bei männlichen C57BL/6JRj Mäusen analysiert: hier zeigte sich wie in der vorliegenden Studie kein Unterschied aufgrund der Haltungsform (HOHLBAUM et al., 2020).

Ein weiterer „Wohlfühlparameter“, das **Nestbauverhalten** wurde ebenfalls im Rahmen dieses Dissertationsprojektes zu zwei verschiedenen Zeitpunkten erhoben. Da aufgrund der Haltungsform unterschiedliche experimentelle Einheiten vorlagen, konnten keine statistischen Unterschiede berechnet werden. Der Median des Nest-Scores lag bei beiden Geschlechtern höher in Gruppen- als in der Einzelhaltung. Auffällig war zudem, dass manche Weibchen in Einzelhaltung am ersten Messzeitpunkt besonders niedrige Nest-Scores aufwiesen. Dies widerspricht vorausgegangenen Studien, die von höheren Nest-Scores bei einzeln gehaltenen Männchen berichteten (MERTENS et al., 2019; JIRKOF et al., 2020a). Diese Ergebnisse können entweder so interpretiert werden, dass in beiden Studien das Wohlergehen einzeln gehaltener Männchen besser im Vergleich zu Männchen in Gruppenhaltung war oder dass die Nestkomplexität einzeln gehaltener Mäuse aufgrund von vermehrtem Kältestress höher ausfiel (MERTENS et al., 2019;

JIRKOF et al., 2020a). Maher und Kollegen (2015) konnten jedoch in ihrer Studie belegen, dass sowohl das Vorhandensein von Nestbaumaterial als auch die Haltung in Gruppen den Kältestress, den Mäuse in einer Umgebung mit einer Temperatur von 20 °C erfuhren, nur minimal reduzierten. Eine weitere Studie hinterfragte die Vergleichbarkeit der Nester in Einzel- und Gruppenhaltung, da Nester in Gruppenhaltung größer und flacher ausfallen und somit generell niedrigere Scores erzielen (HOHLBAUM et al., 2020).

Um den Einfluss der Haltungsform auf angstassoziiertes Verhalten und die Lokomotion zu ergründen, wurde der **Open-Field-Test** angewandt. Geschlechtsunabhängig wurde bei der Analyse der Open-Field-Parameter ein signifikanter Effekt der Haltungsform identifiziert. Die Analyse der lokomotorischen Parameter ergab, dass Mäuse in Einzelhaltung eine größere Distanz mit höherer Geschwindigkeit als Mäuse in Gruppenhaltung zurücklegten. In einer anderen Studie konnte kein Unterschied bezüglich der lokomotorischen Aktivität im Open-Field-Test zwischen Mäusen in Einzel- und Gruppenhaltung festgestellt werden (BERRY et al., 2012). Jedoch konnte eine weitere Studie Unterschiede in der lokomotorischen Aktivität im Open-Field-Test abhängig von dem sozialen Status männlicher Mäuse innerhalb der Gruppenhaltung aufzeigen: unterwürfige Männchen legten eine größere Distanz als dominante Männchen zurück (VARHOLICK et al., 2019). Des Weiteren zeigte unsere Datenanalyse, dass Mäuse in Gruppenhaltung weniger angstassoziiertes und mehr exploratives Verhalten aufwiesen, wohingegen Mäuse in Einzelhaltung mehr angstassoziiertes Verhalten und eine stärkere Ausprägung der Thigmotaxis aufwiesen. Unsere Ergebnisse werden durch andere Studien bestätigt, die ebenfalls von einem erhöhten angstassoziierten Verhalten im Open-Field-Test einzeln gehaltener, männlicher Mäuse berichteten (BERRY et al., 2012; MERTENS et al., 2019). Allein die Ergebnisse von Benfato und Kollegen (2022) widersprechen dieser Annahme. Ein Vergleich der Ergebnisse des Open-Field-Tests zwischen verschiedenen Studien kann jedoch durch die Anwendung verschiedener Testprotokolle limitiert sein (BOURIN et al., 2007).

Mit Hilfe des **Elevated-Zero-Maze-Tests** wurde ebenfalls der Einfluss der Haltungsform auf das angstassoziierte Verhalten erfasst. Unabhängig vom Geschlecht war die Anzahl an Eintritten und Übertritten in den offenen, ungeschützten Quadranten bei Mäusen aus der Einzelhaltung höher als bei

Artgenossen aus der Gruppenhaltung. Die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt sowie die Aufenthaltsdauer auf dem offenen Quadranten wurden nicht durch die Haltungsform beeinflusst. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse des Open-Field-Tests, bei welchem Mäuse in Einzelhaltung vermehrt angstassoziiertes Verhalten zeigten, deuten die Ergebnisse des Elevated-Zero-Maze-Tests darauf hin, dass Mäuse in Einzelhaltung ein reduziertes Vermögen in der Risikobeurteilung aversiver Situationen aufweisen können. Ergebnisse aus der Literatur beschränken sich auf Analysen des Elevated-Plus-Mazes bei Männchen und sind deswegen nur bedingt vergleichbar mit Ergebnissen dieser Studie. Diese Studien konnten aber auch Einflüsse der Haltungsform auf das angstassoziierte Verhalten im Elevated-Plus-Mazes identifizieren: so zeigten Mäuse aus sozialer Isolation eine längere Latenzzeit bis zum Eintritt in den offenen Bereich des Mazes (BENFATO et al., 2022) und einzeln gehaltene Mäuse verbrachten eine kürzere Zeit im offenen Bereich des Mazes (BERRY et al., 2012; MUTA et al., 2023).

Da die soziale Isolation beim Menschen chronischen Stress auslösen kann und dies wiederum ein Risikofaktor für die Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen darstellt (COMMONS et al., 2017; CHALLA et al., 2023), wurde in dieser Studie der potentielle Einfluss der Haltungsform auf die Bewältigung einer akuten Stresssituationen mit Hilfe des **Forced-Swim-Tests** erhoben. Dabei konnte kein Einfluss der Haltungsform auf die Latenz bis zur Immobilität oder die Dauer der Immobilität identifiziert werden. Die Konstruktvalidität des FST für depressionsassoziiertes Verhalten, wurde bereits unter Punkt II.2.7. dieser Dissertationsschrift kritisch beleuchtet. Wie bereits dargestellt, sollte bei der Interpretation von Ergebnissen des FST anstatt von depressionsassoziiertem Verhalten eher vom Vermögen der Bewältigung akuter Stresssituationen gesprochen werden (COMMONS et al., 2017). Um den Inhalt anderer Studien nicht zu verändern, wird im Folgenden der Begriff „depressionsassoziiert“ für die Darstellung der Ergebnisse verwendet. Andere Studien weisen jedoch auf geringgradige Einflüsse der Haltungsform auf Parameter des FST hin. Berry und Kollegen (2012) belegten, dass männliche C57BL/6J Mäuse in Einzelhaltung längeres *Floating* und damit ein erhöhtes depressionsassoziiertes Verhalten zeigten. Challa und Kollegen (2023) konnten eine geringgradige Erhöhung des depressionsassoziierten Verhaltens nur bei weiblichen, nicht aber bei männlichen sozial isolierten C57BL/6 Mäusen feststellen. Dass die Einzelhaltung

depressionsassoziiertes Verhalten in Swiss-Webster-Mäusen auslösen kann, wurde mit Hilfe des FST und des Tail-Suspension-Tests bewiesen (KAROLEWICZ und PAUL, 2001). Im Gegensatz zu Ergebnissen aus der Literatur scheinen Mäuse in unserer Studie unabhängig von der Haltungsform in der Lage gewesen zu sein, akute Stresssituation bewältigen zu können.

Ob die unterschiedlichen Haltungsformen zu einer Aktivierung der neuroendokrinen Stressachse führen können, wurde in dieser Studie mit der Quantifizierung von **fäkalen Kortikosteronmetaboliten** zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Die erste Probennahme fand 24 h nach dem FST, die zweite Probennahme innerhalb der letzten Versuchswoche ohne ein dem Probennahmezeitpunkt direkt vorangegangenes Experiment statt. Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigten auch unsere Ergebnisse deutlich höhere FCM-Konzentrationen bei weiblichen als bei männlichen Mäusen (TOUMA et al., 2004; REIBER et al., 2022b). Des Weiteren konnte kein Einfluss der Haltungsform auf die Aktivierung der neuroendokrinen Stressachse festgestellt werden. Die Datenlage zur Auswirkung der Haltungsform ist ambivalent: einige Studien berichteten von einem Anstieg der Kortikosteronmetaboliten bei männlichen Mäusen zu Beginn der Einzelhaltung (KAMAKURA et al., 2016; ORTEGA-SAEZ et al., 2023) oder bei einer kurzzeitigen Einzelhaltung in einem metabolischen Käfig (MUTA et al., 2023). Berry und Kollegen (2012) verzeichneten zudem einen Anstieg der Kortikosteronmetaboliten in einzeln gehaltenen Männchen nach einem Social-Interaction-Test. Andere Studien wiederum konnten wie die vorliegende Studie keinen Effekt der Haltungsform auf die Konzentration der Kortikosteronmetaboliten männlicher Mäuse (HOHLBAUM et al., 2020; JIRKOF et al., 2020a) oder weiblicher Mäuse (CHALLA et al., 2023) identifizieren. Eine Vielzahl von Studien stellten jedoch fest, dass bei Untersuchungen zu langfristigen Auswirkungen der Haltungsformen die Konzentration der Kortikosteronmetaboliten bei Männchen in Gruppenhaltungen höher ausfiel (KAMAKURA et al., 2016; MERTENS et al., 2019; CHALLA et al., 2023). Eine Erklärung hierfür könnte der empfundene soziale Stress in Gruppenhaltungen männlicher Mäuse, in welchen Rangordnungen wiederholt ausgefochten werden müssen, darstellen. Diese Hypothese wird von Varholick und Kollegen (2019) gestützt, welche einen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der Kortikosteronmetaboliten und instabilen Gruppenhierarchien belegen konnten. In

der vorliegenden Studie wurden weder die kurzfristigen Einflüsse der Einzelhaltung auf die fäkalen Kortikosteronmetaboliten noch der Zusammenhang zwischen Rangordnung und fäkalen Kortikosteronmetaboliten untersucht. Zu beachten ist außerdem, dass gerade bei langfristigem chronischen, sozialen Stress in männlichen Gruppenhaltungen ein negativer Rückkopplungsprozess in der neuroendokrinen Stressachse aktiviert werden könnte, sodass die Kortikosteronmetaboliten trotz Stress sinken würden (VON ENGELHARDT et al., 2015).

2. ***Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien**

Im Rahmen der Studie zum *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien bestand das erste Ziel in der Validierung **sensitiver Parameter** der Belastungseinschätzung **für die Quantifizierung postoperativer Schmerzen**. Im Rahmen des DFG-Forschungskonsortiums „*Severity Assessment in Animal-Based Research*“ (severity-assessment.de) (DFG-FOR2591, 2024) wurden in unserer Arbeitsgruppe während der ersten Förderperiode bereits sensitive Parameter, welche sich zur Belastungseinschätzung von Epilepsiemodellen bei Labornagern eigneten, identifiziert und validiert. Mit Hilfe eines bioinformatischen Workflows zum Design eines CMS, wurde die Relevanz von vier Parametern (Wühlverhalten, zurückgelegte Strecke im Open-Field, Soziale Interaktion und Saccharin-Präferenz Test) hervorgehoben, welche hauptsächlich verantwortlich waren für die Gruppenunterschiede zwischen naiven Ratten, Sham-Ratten und Ratten des chemischen und elektrischen *Post-Status-Epilepticus*- sowie des elektrischen Kindling-Modells (KOSKA et al., 2019; MÖLLER et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019; VAN DIJK et al., 2020). Bei der Selektion von besonders relevanten Parametern zur Belastungseinschätzung von murinen Epilepsie-Modellen und genetisch modifizierten Mauslinien neuropsychiatrischer Modelle, stellte sich jedoch heraus, dass viele Parameter informativen Mehrwert lieferten und daher umfassende, multidimensionale Testbatterien benötigt werden, um Gruppenunterschiede feststellen zu können (BOLDT et al., 2021; BUCHECKER et al., 2022; REIBER et al., 2022b; REIBER et al., 2022c; REIBER et al., 2022a; REIBER et al., 2023). Mit dieser Studie sollte daher die Anwendung einer umfassenden, multidimensionalen Testbatterie für die Quantifizierung von postoperativen Schmerzen validiert werden. Die Quantifizierung postoperativer Schmerzen ist von Nöten, um gemäß der RL 2010/63/EU die prospektive und retrospektive Belastungsbeurteilung nach Schweregraden in Tierversuchen

gewährleisten zu können. Darüber hinaus ist sie auch die Voraussetzung für ein adäquates Schmerzmanagement während des Tierversuchs, der Festlegung humaner Endpunkte und der Validierung von *Refinement*-Ansätzen. Im Folgenden wird die Eignung der einzelnen Parameter für die Schmerzquantifizierung anhand vorliegender Studienergebnisse diskutiert.

Die prozentuale **Körpergewichtsveränderung** im Vergleich zum Baselinezeitpunkt wurde nach der Intervention täglich beobachtet. Überraschenderweise zeigten alle experimentellen Gruppen inklusive der naiven Mäuse einen starken Abfall des relativen Körpergewichts sechs Stunden nach der Intervention. Einerseits könnte dies an einer reduzierten Futteraufnahme aufgrund des Stresses durch den Transport aus dem Tierhaltungsraum und durch das Abstellen der Käfige im Operationsvorbereitungsraum liegen. In einer Studie, in welcher Ratten neun Tage in Folge für eine Stunde aus dem Haltungsraum in ein anderes Labor verbracht wurden, konnte ein ähnlicher Rückgang des Körpergewichts aufgezeigt werden (BUHECKER et al., 2020). Andererseits ist bekannt, dass Mäuse hauptsächlich in der Dunkelphase, während der sie aktiv sind, Futter zu sich nehmen (FRANCOIS et al., 2022). Da die Erhebung des Körpergewichts sechs Stunden nach der Intervention stattfand und somit in den zweiten Teil der Hellphase oder in den Beginn der Dunkelphase fiel, könnte auch die circadiane Aufnahme von Futter ursächlich sein. In der vorliegenden Studie konnten keine Einflüsse der Analgesieregime auf das Körpergewicht der Substanz-Kontroll-Mäuse festgestellt werden. In anderen Studien hatte die Buprenorphin Verabreichung einen Abfall des Körpergewichts, vermutlich ausgelöst durch Opioid Nebenwirkungen wie einer verlangsamten Magen-Darmperistaltik und/oder einem Übelkeitsgefühl, zur Folge (HEALY et al., 2014; JIRKOF et al., 2015; JIRKOF und POTSCHKA, 2021). Nach dem operativen Eingriff zeigten männliche Mäuse des +NL- und +NLO- sowie weibliche Mäuse des +NO- und +NLO-Analgesieregimes am ersten postoperativen Tag und weibliche Mäuse des +NO-Analgesieregimes auch am zweiten postoperativen Tag einen signifikanten Abfall des relativen Körpergewichts. Auch nach anderen chirurgischen Eingriffen verloren Labormäuse deutlich an Körpergewicht (ADAMSON et al., 2010; OLIVER et al., 2018). Schmerzen, Disstress, ein reduziertes Wohlbefinden sowie Störung des Lichtrhythmus können den Appetit vermindern, die Futteraufnahme reduzieren und somit Einfluss auf das Körpergewicht nehmen. Mit dieser Studie konnte daher

gezeigt werden, dass sich die Veränderung des Körpergewichts als Parameter zur postoperativen Belastungseinschätzung eignet. Jedoch sollte der Parameter nicht alleine, sondern im Zusammenhang mit weiteren Parametern interpretiert werden und modellspezifische Veränderungen berücksichtigt werden (TALBOT et al., 2020). In der vorliegenden Studie ist beispielsweise bei der Körpergewichtsmessung direkt nach der Operation, der Einfluss der intraoperativen, subkutan applizierten Flüssigkeitssubstitution und das zusätzliche Gewicht des Elektrodenimplantates, welches nach der Euthanasie gewogen und von den Messungen abgezogen wurde, zu beachten.

Der **Neuro-Score** wurde zu mehreren Zeitpunkten innerhalb der Studie erhoben, um Einflüsse auf das periphere, zentrale und autonome Nervensystem zu detektieren. Vier Stunden nach der Operation oder Anästhesie fielen bei Mäusen, welchen das BUP-Depot verabreicht wurde, Veränderungen der Parameter Schwanzhöhe, Neugier und Lokomotion auf. Der *straub tail* und die Hyperlokomotion gehören zu dem bereits beschriebenen, charakteristischen Nebenwirkungsprofil des Buprenorphins bei Mäusen (HEALY et al., 2014; JIRKOF et al., 2015). Das verminderte Interesse mancher männlichen Mäuse an einem gezeigten Stift, welches bei Erhebung des Parameters Neugier auffiel, stellt ein interessantes Ergebnis dar. Ob die exzitatorische Nebenwirkung der Opioide ursächlich für eine veränderte Wahrnehmung der Umgebung war, ist eine rein spekulative Vermutung. Eine Opioid-induzierte Veränderung scheint unwahrscheinlich, da bei weiblichen Mäusen ähnliche Veränderungen unabhängig vom Analgesieregime auftraten. Daher könnte auch ein Einfluss der Anästhesie ursächlich sein. Am ersten Tag postoperativ waren teilweise lokomotionsassoziierte Parameter bei operierten Mäusen unabhängig vom Analgesieregime verändert. Eine geringgradig ausgeprägte Hypolokomotion bei Erhebung des modifizierten Irwin Scores, wurde schon in der postoperativen Phase bei Mäusen des Kindling-Epilepsie-Modells innerhalb unserer Arbeitsgruppe beschrieben (BOLDT et al., 2021). Auch nach anderen operativen Eingriffen zeigten sich Veränderungen der lokomotionsassoziierten Ethogram-Parameter, welche auf postoperative Schmerzen hinweisen (ROUGHAN et al., 2009; MILLER et al., 2012). Einige Parameter des Neuro-Scores wie Vokalisation, Kot- und Harnabsatz beim *Handling* waren sowohl in der Baseline als auch zu postoperativen Zeitpunkten individuell mit hoher Varianz verändert, sodass diese Parameter

ungeeignet für die postoperative Belastungseinschätzung scheinen. Bei vielen weiteren Parametern des Neuro-Scores (beispielsweise Tränenfluss, Hypersalivation, Hautdurchblutung und Zuckungen, Krämpfe) wurden hingegen keine Veränderungen identifiziert. Dass der intrakranielle Eingriff und die verabreichten Analgetika kaum Veränderungen des autonomen Nervensystems oder Veränderungen bestimmter exzitationsassoziierter Parameter hervorrufen, entspricht unseren Erwartungen. Schlussendlich eignen sich insbesondere lokomotionsassozierte und ausgewählte Parameter, die zu erwartende Nebenwirkungsprofile der Analgetika abdecken, für die postoperative Belastungseinschätzung bei Mäusen nach intrakraniellen Eingriffen.

Der Hauptparameter in dieser Studie, der **Mouse-Grimace-Scale**, wurde bereits erfolgreich für die Detektion unterschiedlicher Schmerzqualitäten (gemischt: (DE ALMEIDA et al., 2020), viszeral: (HASSAN et al., 2017), neuropathisch: (AKINTOLA et al., 2017), akut: (ROSSI et al., 2020), vgl. (WHITTAKER et al., 2021)) angewandt. Auch für die Detektion von postoperativer Schmerzen wurde er häufig eingesetzt [vgl. (AULEHNER et al., 2022)] und weist einen hohen Evidenzgrad auf (EVANGELISTA et al., 2022). Trotz allem, wird die Spezifität für Schmerzen und damit die Konstruktvalidität des MGS in Frage gestellt (MOTA-ROJAS et al., 2020). Ein Anstieg des MGS wurde nämlich auch bei *Tail Handling* im Vergleich zu *Tunnel Handling* (ROUGHAN und SEVENOAKS, 2019) und bei einem murinen Sepsis-Model, das nicht nur Schmerzen sondern auch Übelkeit auslöst, verzeichnet (DWIVEDI et al., 2016; MOTA-ROJAS et al., 2020). Ein veränderter Gesichtsausdruck der Mäuse, insbesondere im Bereich der Augen und Ohren, wurde auch in aggressiven und ängstlichen Kontexten beobachtet (DEFENSOR et al., 2012). Auch die vorliegende Studie bestätigt Belege der Literatur, dass das Inhalationsnarkotikum Isofluran zu einem transienten Anstieg des MGS in CD1, männlichen DAB2 und weiblichen C57BL/6JRj Mäusen führen kann (MATSUMIYA et al., 2012; MILLER et al., 2015; HOHLBAUM et al., 2017). Unabhängig des Analgesieregimes konnte in unserer Studie ein Anstieg des MGS in allen Substanz-Kontroll-Mäusen zwei Stunden nach der Anästhesie nachgewiesen werden. Dies übersteigt die zeitlichen Auswirkungen der Isoflurannarkose auf den MGS der oben benannten Studien. Eine Erklärung hierfür könnte die Dauer der Anästhesie sein, die sich in unserer Studie auf ca. 1 h 45 min belief, in den anderen Studien aber maximal 45 min betrug. Des Weiteren wurde in

der vorliegenden Studie ein verlängerter MGS-Anstieg in männlichen +NLO-Substanz-Kontroll-Mäusen bis zu sechs Stunden nach der Anästhesie festgestellt. Ob es sich hierbei um einen Buprenorphin induzierten MGS-Anstieg handelt ist fraglich, denn bei männlichen +NO- und weiblichen +NO- und +NLO-Substanz-Kontroll-Mäusen war dieser Effekt nicht erkennbar und in der Literatur ist dies bisher nicht beschrieben (MATSUMIYA et al., 2012; HOHLBAUM et al., 2017). Vielmehr könnte die Kombination drei verschiedener Analgetika bei Männchen ursächlich sein. Bei männlichen Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg des MGS von bis zu zwei Tagen nach dem operativen Eingriff nachgewiesen werden, wohingegen dieser bei weiblichen Mäusen nur bis zu einem Tag nach der Operation anhielt. Männchen des +N- und Weibchen des +NL-Analgesieregimes erreichten als Erstes postoperativ wieder MG-Scores, die mit denen naiver Mäuse vergleichbar waren. Es bestehen Hinweise, dass abhängig vom Mausstamm geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Höhe des erreichten MGS auftreten können (MOTA-ROJAS et al., 2020). Cho und Kollegen (2019) zeigten mit der Erhebung des MGS unbehandelter CD1 Mäuse, dass postoperative Schmerzen nach einem intrakraniellen Eingriff bis zu 48 h bestehen bleiben. Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Ergebnissen. Jedoch scheinen die mittleren MG-Scores dieser Studie viel geringer als die erhobenen Scores in der vorliegenden Studie. Eine Erklärung hierfür könnte in der Durchführung der Kraniotomie liegen: während Cho und Kollegen (2019) eine Sham-Kraniotomie mit einmaliger Trepanation der Schädeldecke durchführten, umfasste dieses Experiment vier Trepanationen inklusive Elektrodenimplantation und Anbringen von drei Fixationsschrauben. Somit war der vorliegende intrakranielle Eingriff invasiver und die Inhalationsnarkose deutlich länger, was zu Unterschieden in der Höhe des postoperativen Schmerzes geführt haben könnte. Unter oben aufgeführten Limitationen eignet sich der MGS durchaus für die Quantifizierung postoperativer Schmerzen.

Sowohl das **Wühl- als auch das Nestbauverhalten** sind Parameter, welche bei einer Reduktion des Wohlbefindens eingestellt werden und sich somit zur indirekten Erfassung postoperativer Schmerzen im Heimkäfig eignen (JIRKOF et al., 2010; JIRKOF et al., 2013; TAPPE-THEODOR et al., 2019; AULEHNER et al., 2022). In der vorliegenden Studie übten weder das Analgesieregime noch die Anästhesie einen Einfluss auf die Leistung der Substanz-Kontroll-Mäuse im

Vergleich zu den naiven Mäusen aus, sodass Veränderungen bei OP-Mäusen auf den postoperativen Schmerz alleine zurückzuführen sind. Während die Analyse der entfernten Pellets aus der Wühlröhre keine robusten Gruppenunterschiede ergab, zeigte die Analyse der Latenz bis zum Beginn des Wühlverhaltens, dass +NO-OP-Mäuse beider Geschlechter später mit dem Wühlen begannen als entsprechende naive Mäuse. Auffällig war zudem die Varianz der Latenzzeit bis zum Wühlverhalten bei OP-Mäusen, welche auch unter Berücksichtigung der individuellen Baselinewerte bestehen blieb. Dies könnte daran liegen, dass das Wohlergehen der Mäuse nach dem operativen Eingriff und teilweise nach der Anästhesie tatsächlich individuell sehr unterschiedlich ausfiel. In einer multizentrischen Studie zur Evaluierung der Robustheit einiger Parameter zur Belastungseinschätzung, fiel ebenfalls die hohe Varianz des Wühlverhaltens zwischen den einzelnen Laboren auf (JIRKOF et al., 2020b). Aber auch innerhalb eines Labors ist die Varianz dieses Parameters auffällig hoch (JIRKOF et al., 2010; BOLDT et al., 2021; DURST et al., 2021; REIBER et al., 2022b). Somit können mit Hilfe der Latenz bis zum Wühlverhalten wichtige Informationen zum Wohlbefinden individueller Tiere gewonnen werden, jedoch wird ein gruppenübergreifender Vergleich erschwert. Außerdem beobachteten wir, dass sich, obwohl keine Pellets aus der Wühlröhre entfernt wurden, die Form der Pelletansammlung in der Wühlröhre verändert hat. Dies bedeutet, dass Mäuse durchaus Wühlverhalten zeigen, aber durch die reine gravimetrische Erfassung dieses nicht immer erhoben werden kann. Daher stellt die videobasierte Analyse des Wühlverhaltens eine sensitivere Methode dar und eignet sich eher für die postoperative Schmerzerfassung. Die Nestkomplexität war bei OP-Mäusen beider Geschlechter insbesondere am Tag der Operation und bei weiblichen Mäusen auch noch am ersten postoperativen Tag beeinträchtigt. Nester der Männchen des +N-Analgesieregimes wurden durch die Operation nicht beeinträchtigt und Weibchen des +N-Analgesieregimes hatten bereits am ersten postoperativen Tag wieder zu naiven Mäusen vergleichbare Nester. Unsere Ergebnisse ähneln dabei der zweitägigen postoperativen Beeinträchtigung des Nestbauverhaltens, welches für Amygdala- und Hippocampus-Maus-Kindling-Modelle beschrieben wurde (BOLDT et al., 2021). In einer Studie wurde bei identischer, oraler Carprofen Verabreichung eine erhöhte Körpertemperatur der Mäuse festgestellt (GLASENAPP et al., 2023). Ob sich die Erhöhung der Körpertemperatur negativ auf das Nestbauverhalten auswirkt, wurde in der vorliegenden Studie nicht

untersucht. Jedoch ergaben die Nest-Scores der Substanz-Kontroll-Gruppen im Vergleich zu naiven Gruppen keinen Hinweis auf einen kausalen Zusammenhang. Bezüglich der Erhebung der postoperativen Schmerzreduktion durch Analgetika, eignet sich laut eines *Systematic Review* das Wühlverhalten besser als das Nestbauverhalten (AULEHNER et al., 2022).

Die postoperative **Aktivität** der Labormäuse wurde zudem mit Hilfe der Analyse der zurückgelegten Strecke im Heimkäfig und im Laufrad evaluiert. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Strecke im Heimkäfig innerhalb der ersten 20 h nach dem intrakraniellen Eingriff in beiden Geschlechtern unabhängig vom Analgesieregime. Bei weiblichen Mäusen ist die Aktivität in der Dunkelphase von Tag 0 und Tag 1 ebenfalls signifikant beeinträchtigt. Eine reduzierte Aktivität postoperativ wurde auch nach anderen chirurgischen Eingriffen bei Labormäusen beobachtet (ADAMSON et al., 2010; ROUGHAN et al., 2016; DURST et al., 2021). Obwohl in der Literatur beschrieben ist, dass Buprenorphin zu einer Erhöhung der Aktivität führen kann (HEALY et al., 2014; JIRKOF et al., 2015), konnten wir dies in entsprechenden Substanz-Kontroll-Gruppen nicht bestätigen. Auffällig ist zudem, dass die Aktivität in der Dunkelphase an Tag 0 selbst bei naiven Mäusen niedrig erscheint. Dies hängt vermutlich mit dem Studiendesign am Operationstag zusammen, da die Mäuse für die mehrmaligen MGS-Messungen teilweise auch noch in der Dunkelphase wiederholt aus dem Heimkäfig herausgeholt werden mussten. Dafür musste das Arbeitslicht im Tierhaltungsraum eingeschaltet werden, sodass es zu Störungen des Lichtrhythmus gekommen sein könnte. Obwohl die Laufradaktivität beispielsweise in der Belastungsbeurteilung eines murinen akuten Kolitis und kognitiven Depressionsmodells als sensitiver Parameter eingestuft wurde (HÄGER et al., 2018; MALLIEN et al., 2020), konnten wir in unserer Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen operierten und nicht-operierten Mäusen feststellen. Eine Erklärung dafür, dass keine Auswirkungen des postoperativen Schmerzes auf die Aktivität im Laufrad beobachtet wurde, könnte der Beginn der Messung darstellen. Da das Wühlverhalten und die Laufradaktivität, unter anderem aufgrund des begrenzten Platzes im Heimkäfig, nicht gleichzeitig erhoben werden konnten, begannen die Messungen der Laufradaktivität erst mit der Dunkelphase an Tag 1. Aufgrund der Analyse anderer Parameter lässt sich vermuten, dass der postoperative Schmerz zu diesem Zeitpunkt bereits abgeklungen war.

Interessanterweise konnten wir Ergebnisse von Glasenapp und Kollegen (2023), welche feststellten, dass die Laufradaktivität in männlichen Mäusen aufgrund der oralen Administration von Carprofen über das Trinkwasser abnahm, in unseren Substanz-Kontroll-Mäusen nicht bestätigen. Eine Erklärung hierfür könnte auch die Art des Laufrades darstellen: während in dieser Studie horizontale Laufräder verwendet wurden, kamen bei Glasenapp und Kollegen (2023) vertikale Laufräder zum Einsatz. Für die postoperative, kraniotomieassoziierte Schmerzquantifizierung erwies sich die Aktivität im Heimkäfig als wertvoller Parameter, wohingegen die Laufradaktivität aufgrund des Studiendesigns keinen informativen Mehrwert barg.

Anhand der Konzentration der **fäkalen Kortikosteronmetaboliten** konnte der Stresslevel der Mäuse in dieser Studie eingeschätzt werden. Am ersten postoperativen Tag waren die Kortikosteronmetaboliten männlicher +NO sowie weiblicher +NO- und +NLO-OP-Mäuse signifikant erhöht. Da bereits ein Zusammenhang zwischen Opioid-Exposition und der Aktivierung der neuroendokrinen Stressachse beschrieben wurde (IYENGAR et al., 1987), liegt die Vermutung nahe, dass es sich um einen Buprenorphin induzierten Effekt handelt. Bei entsprechenden Substanz-Kontroll-Mäusen, konnte jedoch kein Effekt des Buprenorphins nachgewiesen werden, sodass eine Kombination von Buprenorphin und Stress aufgrund der Operation eher ursächlich zu sein scheint. Da bei akuten Schmerzen die neuroendokrine Stressachse aktiviert wird (TENNANT, 2013), kann über die Messung der Kortikosteronmetaboliten Schmerz indirekt quantifiziert werden. In Kombination mit weiteren Parametern und entsprechenden Kontrollgruppen, um andere stressauslösende Einflüsse wie beispielsweise das *Handling* auszuschließen, kann die Analyse der fäkalen Kortikosteronmetaboliten durchaus zu der postoperative Schmerzquantifizierung beitragen. Ein postoperativer Anstieg der fäkalen Kortikosteronmetaboliten wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben (WRIGHT-WILLIAMS et al., 2007; JIRKOF et al., 2019; BUCHECKER et al., 2022).

Bei der Beurteilung der postoperativen Schmerzen anhand der diskutierten Parameter, müssen Einflüsse der Anästhesie und der Analgetika berücksichtigt werden. Zusammenfassend konnten wir in unserer Studie Einflüsse der Anästhesie und/oder der Analgetika auf den MGS und bestimmte Parameter des Neuro-Scores identifizieren. Die orale Applikation des Carprofens hat Glasenapp und Kollegen (2023) nach, lediglich Auswirkungen auf die Laufradaktivität männlicher Mäuse

und in geringgradigem Umfang auf die Irwin-Parameter, jedoch nicht auf weitere Parameter wie den MGS, das Wühl- und Nestbauverhalten.

Anhand des bioinformatischen Workflows konnten mit Hilfe der Korrelations- und Hauptkomponentenanalyse die wichtigsten Parameter, welche hauptverantwortlich für die Gruppenunterschiede unseres Datensatzes waren, identifiziert werden. Folgende Parameter waren wiederholt unter den ersten vier Positionen bei beiden Geschlechtern: Nestbauverhalten, Körpergewichtsveränderung, MGS, Neuro-Score, zurückgelegte Distanz in der Hellphase und FCM. Jedoch waren alle Parameter inklusive des Wühlverhaltens innerhalb von 20 h und der zurückgelegten Strecke in der Dunkelphase unter den Hauptparametern vertreten und bewiesen damit ihren informativen Mehrwert. Somit sollten zur postoperativen Schmerzquantifizierung bei Mäusen, wie beschrieben für die allgemeine Belastungsbeurteilung bei Mäusen (REIBER et al., 2023), möglichst viele (patho-)physiologische, verhaltensbezogene und biochemische Parameter berücksichtigt werden, um die Multidimensionalität der postoperativen Schmerzen annäherungsweise abbilden zu können.

Zu erwähnen ist außerdem, dass in der vorliegenden Studie Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen nicht statistisch untersucht wurden. Nichtsdestotrotz fallen Hinweise auf mögliche **Geschlechtsunterschiede** in manchen Parametern auf (Körpergewicht, MGS, Latenz bis zum Wühlverhalten, Aktivität im Heimkäfig und Laufrad, FCM). Unabhängig von experimentellen Interventionen sind geschlechtsspezifische Unterschiede für bestimmte Parameter beschrieben worden: beispielsweise legen weibliche Mäuse deutlich mehr Strecke im Laufrad zurück (REIBER et al., 2022b) und haben höhere FCM Baselinekonzentrationen als männliche (TOUMA et al., 2004; REIBER et al., 2022b). Des Weiteren ist zu beachten, dass in den letzten Jahren Forschungsergebnisse zunehmend beweisen, dass sowohl weiblich Mäuse als auch Frauen eine höhere Schmerzsensitivität besitzen, als männliche Mäuse oder Männer (MOGIL, 2020). Dabei bestehen sogar Unterschiede in den physiologischen Prozessen der Nozizeption (SORGE und TOTSCH, 2017). Außerdem gibt es Beweise für eine geschlechtsspezifische Sensitivität gegenüber der Wirkung von Analgetika (SMITH, 2019). Unter Berücksichtigung der genannten Argumente ist es deswegen unerlässlich, *Refinement*-Ansätze des perioperativen Schmerzmanagements für Labormäuse wie auch in der vorliegenden Studie

geschlechtergetrennt zu untersuchen.

Das zweite Ziel der Studie war es die **Verträglichkeit der verabreichten Analgesieregime** zu bestätigen. Unseren Beobachtungen nach, wurden alle Analgesieregime von den Substanz-Kontroll-Mäusen gut toleriert und es wurden keine Auffälligkeiten in den erhobenen Parametern oder in der klinischen Untersuchung ersichtlich. Bei den Vorversuchen fielen jedoch lokale Nebenwirkungen an der subkutanen Injektionsstelle des **Carprofens** auf. Diese Läsionen wurden größtenteils erst nach der Rasur des Fells sichtbar, was bei zukünftigen Verträglichkeitsstudien subkutan applizierter Substanzen berücksichtigt werden sollte. Ob die krustigen Hautläsionen primär durch das Carprofen selbst oder sekundär durch Juckreiz entstanden sind, blieb unklar. Zwei Mäuse präsentierten sich kurz nach der erstmaligen Injektion von Carprofen mit vollständiger Ulzeration der Dermis nahe der Injektionsstelle, sodass Pruritus gefolgt von Automutilation durchaus eine Rolle gespielt haben könnte. Ähnliche subkutane Läsionen sind bisher nur für die Injektion von Meloxicam beschrieben worden (SARFATY et al., 2019; ANTIORIO et al., 2022; KIM et al., 2023). Dabei scheint entweder das kommerziell erhältliche Produkt (ANTIORIO et al., 2022) oder die Konzentration des Meloxicams in der Injektionslösung (SARFATY et al., 2019) ursächlich zu sein. Die Konzentration des Carprofens in der Injektionslösung, könnte auch in unseren Vorversuchen eine Rolle gespielt haben, da das maximale, subkutane Applikationsvolumen von 10 ml pro kg Körpergewicht bei der Herstellung der Verdünnung nicht ausgenutzt wurde. Das mit Carprofen angereicherte Trinkwasser als alternative Applikationsroute, wurde hingegen von den Mäusen gut aufgenommen. Am ersten Tag der oralen Administration nahmen weibliche Mäuse, wie bereits beschrieben (INGRAO et al., 2013; GLASENAPP et al., 2023), sogar mehr als das Zielvolumen auf. Dies könnte hilfreich sein, um zügig therapeutische Plasmaspiegel präoperativ zu erreichen oder die reduzierte Trinkwasseraufnahme postoperativ, wie sie in operierten weiblichen +NO- und +NLO-Mäusen beobachtet wurde, auszugleichen. Die gemessenen Plasmakonzentrationen des Carprofens am Euthanasietag in unserer Studie, überstiegen dabei gemessene Plasmakonzentrationen unseres Kooperationspartners in beiden Geschlechtern bei weitem, obwohl dieselbe Zieldosierung, harmonisierte SOPs und der gleiche Mausstamm eingesetzt wurden (GLASENAPP et al., 2023). Mehrere Erklärungen könnten hierfür aufgeführt werden. Erstens könnte die

gesteigerte Trinkwasseraufnahme am präoperativen Tag zu einer Kumulation des Plasmaspiegels geführt haben. Jedoch beschrieben auch Glasenapp und Kollegen (2023) eine erhöhte Trinkwasseraufnahme am ersten Tag der oralen Carprofen-Verabreichung. Zweitens könnte es durch die gleichzeitige Applikation mehrerer Analgetika zu Arzneimittelwechselwirkungen und damit einer verlangsamten Metabolisierung des Carprofens gekommen sein. Dagegen spricht jedoch, dass die Carprofenplasmakonzentration sowohl in der monotherapeutischen als auch in den multimodalen Analgesieregimegruppen ähnlich hoch war. Drittens könnte die Kontamination der gespülten Trinkflaschen in unserer Tierhaltungen die tatsächlich verabreichte Dosierung erhöht haben. Ob dies jedoch die sechs- bis elffache Erhöhung des Carprofenplasmaspiegels erklärt, ist äußerst fragwürdig. Weitere Einflussfaktoren, die eine verlangsamte Metabolisierung des Carprofens und damit eine Kumulation verursacht haben könnten, sind die Anästhesie mit Isofluran oder der operative Eingriff. Des Weiteren bestand ein fünfwöchiger Unterschied im Alter der Mäuse unserer Studie und der Studie von Glasenapp und Kollegen (2023). Obwohl keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Carprofenplasmaspiegel von Glasenapp und Kollegen (2023) festgestellt wurden, wiesen weibliche Mäuse unserer Studie überraschenderweise deutlich höhere Plasmaspiegel als männliche auf. Andere pharmakokinetische Studien untersuchten die Carprofenplasmakonzentration nur in männlichen (INGRAO et al., 2013; KENDALL et al., 2014) oder weiblichen Mäusen (OLIVER et al., 2018). Ob geschlechtsspezifische Unterschiede in der Metabolisierung von Carprofen bestehen, muss in zukünftigen Studien analysiert werden. Der hohe gemessene Carprofenplasmaspiegel muss zudem im Zusammenhang mit den in 22 % der Mäuse aufgetretenen, gastrointestinalen Läsionen betrachtet werden. Dass diese Läsionen durch die Verabreichung von Carprofen induziert wurden, ist nicht auszuschließen, da es sich dabei um eine klassische NSAID bezogene Nebenwirkung handelt (LÖSCHER und RICHTER, 2016). Des Weiteren wurden keine gastrointestinalen Läsionen in naiven Mäusen beobachtet. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass gastrointestinale Läsionen auch spontan bei Labormäusen vorkommen können (GREAVES, 2012; KENDALL et al., 2022) und der Stichprobenumfang von 16 untersuchten naiven Mäusen, nicht den 132 untersuchten Mäusen mit Carprofen-Applikation entspricht. NSAID induzierte gastrointestinale Ulzerationen sind oft im glandulären Teil der Magenschleimhaut und am Pylorus zu finden (OHYAMA et al., 2012). Die histopathologische

Untersuchung der Mäuse unserer Studie ergaben jedoch, dass die erosiven Läsionen hauptsächlich in der nicht-glandulären oder am Übergang der nicht-glandulären zu der glandulären Schleimhaut lokalisiert waren. Andere Studien konnten keine pathologischen Veränderungen des Gastrointestinaltraktes nach Carprofen-Applikation nachweisen: Kendall und Kollegen (2022) wiesen anhand histopathologischer Untersuchungen des Gastrointestinaltraktes und der Analyse fäkalen, okkulten Blutes bei weiblichen CD1 Mäusen, welchen bis zu sieben Tage 20 mg/kg Caprofen subkutan injiziert wurde, keine bedenklichen Nebenwirkungen nach. Auch Glasenapp und Kollegen (2023) konnten mit derselben Dosierung und Applikationsdauer wie in unserer Studie keine pathologischen Veränderungen des Gastrointestinaltraktes beobachten. Ob in der ersten Studie lediglich die Pylorusregion untersucht wurde, ist der Veröffentlichung nicht eindeutig zu entnehmen (KENDALL et al., 2022). In der zweiten Studie wurden nur 14 von 42 Versuchsmäusen einer pathologischen Untersuchung unterzogen (GLASENAPP et al., 2023), sodass es in beiden Studien möglich sein könnte, entsprechende Läsionen übersehen zu haben. In zukünftigen Studien sollte eine Applikation von 25 mg/kg Carprofen über das Trinkwasser aufgrund einer potentiellen Kumulation des Carprofens im Plasma und einer möglichen Limitierung der gastrointestinalen Verträglichkeit bedacht eingesetzt werden. Jedoch muss betont werden, dass sich die beobachteten milden, gastrointestinale Läsionen auf die histopathologische Analyse begrenzten und sich nicht klinisch im Allgemeinbefinden der Mäuse äußerten. Da sowohl das Carprofen angereicherte Trinkwasser von den Mäusen gut aufgenommen wurde, als auch die extrapolierte, therapeutische Plasmakonzentration bei weitem übertroffen wurde, scheint die orale Verabreichung des Carprofens eine gute Option für das postoperative Schmerzmanagement darzustellen. Dadurch kann wiederholtes *Handling* und die Fixation im Nacken, was insbesondere in der postoperativen Erholungsphase zusätzlichen Stress auslöst (MEIJER et al., 2007; SENSINI et al., 2020) und je nach Lokalisation des Operationsgebietes mit Schmerzen verbunden sein könnte, für die subkutane Applikation von Analgetika vermieden werden. Je nach Invasivität des operativen Eingriffs und der zu erwartenden postoperativen Schmerzen, sollte das Auftreten reduzierten Trinkverhaltens bedacht werden und Durchbruchschmerzen, beispielsweise durch eine einmalige, intraoperative Injektion des Caprofen, vorgebeugt werden.

Da lokale Nebenwirkungen für in den USA kommerziell erhältliche Buprenorphin-Formulierungen mit verzögertem Wirkeintritt beobachtet wurden (CARBONE et al., 2012; CLARK et al., 2014), ließen wir die Injektionsstelle des **BUP-Depots** ebenfalls histopathologisch untersuchen. Hierbei wurde bei ca. 70 % der Mäuse eine milde Panniculitis diagnostiziert. In entsprechenden Hautproben der naiven Mäuse wurden keine pathologischen Befunde erhoben. Ob die beobachteten histopathologischen Läsionen dem BUP-Depot zuzuschreiben sind, kann nicht geschlussfolgert werden, da wir keine entsprechende Sham-Injektionsgruppe untersuchen konnten. Makroskopisch wurden an der BUP-Depot-Injektionsstelle keine Läsionen beobachtet, sodass die gefundenen histopathologischen Läsionen auch durch die Injektion selbst verursacht sein könnten und eine Anwendung des BUP-Depots unbedenklich erscheint.

Ein Hauptziel der Studie war es die **Effektivität der vier verschiedenen Analgesieregime** zu vergleichen, um evidenzbasierte Empfehlungen für das *Refinement* der perioperativen Analgesie für murine Kraniotomien erarbeiten zu können. Für die Erstellung eines CMS, welcher die Ergebnisse aller Parameter zusammenfasst und einen direkten Gruppenvergleich ermöglicht, wurde der Datensatz männlicher und weiblicher Mäuse am ersten postoperativen Tag einem bioinformatischen Workflow unterzogen. Mit Hilfe der Clusteranalyse konnten die Mäuse verschiedener Analgesieregime vier unterschiedlichen Belastungskategorien zugeordnet werden. Diese Belastungskategorien dürfen jedoch keinesfalls mit den Schweregraden der Belastungseinschätzung, wie sie rechtlich in der RL 2010/63/EU beschrieben sind, gleichgesetzt werden. Sie beziehen sich schließlich nur auf den analysierten Datensatz und bewegen sich innerhalb der im Datensatz erfassten minimalen und maximalen Belastung. Überraschenderweise wurden mehr operierte Mäuse der multimodalen Analgesieregime (+NO > +NLO > +NL) und weniger operierte Mäuse des monotherapeutischen Analgesieregimes (+N) der höchsten Belastungskategorie zugeordnet. Entgegen der Studienhypothese konnten wir die Überlegenheit multimodaler Regime für die Reduktion kraniotomieassoziiertes, postoperativer Schmerzen mit dieser Studie nicht bestätigen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine monotherapeutische NSAID-Applikation für die Reduktion von postoperativen Schmerzen nach intrakraniellen Eingriffen bei der Maus ausreichen könnte. Cho und Kollegen (2019) demonstrierten bereits eine effektive Reduktion

von MG-Scores mit oral und subkutan applizierten hoch-dosiertem Meloxicam und Carprofen. Trotz dieser Ergebnisse gingen wir davon aus, dass eine Kombination von Analgetika und Lokalanästhetikum das Potential hätte, synergistische Wirkung zu entfalten, indem auf verschiedenen Ebenen des nozizeptiven Systems in die Schmerzentstehung eingegriffen wird. Möglicherweise konnten synergistische, analgetische Effekte multimodaler Regime in der vorliegenden Studie die analgetische Wirkung des hochdosierten NSAIDs nicht mehr übertreffen. Direkte Schlussfolgerungen bezüglich der analgetischen Wirkung des hochdosierten NSAIDs sind jedoch begrenzt, da wir uns aus Tierschutzgründen gegen eine operierte Kontrollgruppe ohne analgetische Versorgung entschieden haben. Trotz fehlender moderater oder schwerer Nebenwirkungen, wird anhand der CMS-Analyse deutlich, dass die Belastung der operierten Mäuse multimodaler Analgesieregime höher ist. Auch Substanz-Kontroll-Mäuse multimodaler Analgesieregime wurden in geringem Umfang höheren Belastungskategorien zugeordnet. Eine Erklärung hierfür ist, dass sich die Summe der Wirkstoffe in multimodalen Regimen negativ auf das Wohlbefinden der Labormäuse auswirken kann. In zwei Studien wurde positiv über den Einsatz multimodaler Analgesieregime, welche jeweils aus Buprenorphin und 30 mg/kg Carprofen über das Trinkwasser oder 5 mg/kg Meloxicam zusammengesetzt waren, bei einer Laparotomie berichtet (OLIVER et al., 2018; FURUMOTO et al., 2022). Jedoch beobachteten Oliver und Kollegen (2018) negative Auswirkungen des multimodalen Regimes auf das Körpergewicht von Substanz-Kontroll-Gruppen. Andere Studien konnten trotz des Einsatzes multimodaler Regime bei Mäusen keine analgetische Wirkung im Vergleich zu Kontrollgruppen mit Kochsalzlösung bei einer Vasektomie und der chirurgischen Entfernung des Milchdrüsenfettgewebes feststellen (ADAMSON et al., 2010; MILLER et al., 2012). Hierbei könnte eine zu geringe Dosierung des Meloxicams eine Rolle gespielt haben. Durst und Kollegen (2021) konnten ebenfalls keine Überlegenheit ihres multimodalen Regimes, bestehend aus einer Kombination von hochdosiertem Paracetamol verabreicht über das Trinkwasser und einer Bupivacain-Lidocain-Zubereitung, bei einer Laparotomie demonstrieren.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie sind **Arzneimittelwechselwirkungen**, welche die Wirksamkeit, die Metabolisierung und das Nebenwirkungsprofil verabreichter Substanzen verändern können, zu

berücksichtigen. Eine pharmakodynamische Wechselwirkung ist aufgrund unterschiedlicher Zielstrukturen der angewandten Wirkstoffe unwahrscheinlich. Unseres Wissens nach existieren keine Daten bezüglich einer möglichen pharmakokinetischen Wechselwirkung zwischen Carprofen und Buprenorphin in der Spezies Maus. Die hohe Proteinplasmabindung beider Analgetika könnte zu Interaktionen beitragen (LÖSCHER und RICHTER, 2016), jedoch gibt es auch hierzu keine gesicherten Beweise. Bei der Planung multimodaler Analgesieregime sollten in zukünftigen Studien deshalb zum einen die Gesamtbelastung durch die Summierung der Wirkstoffe und potentielle, negative Auswirkungen auf die Labormaus berücksichtigt und zum anderen Arzneimittelwechselwirkungen in der Labormaus untersucht werden. Auch in der Humanmedizin hat die Erforschung der Arzneimittelwechselwirkungen in den letzten Jahren an Relevanz gewonnen: gerade bei der Behandlung multimorbider, geriatrischer Patienten und Patientinnen ist eine gleichzeitige Anwendung von fünf Arzneimitteln nicht unüblich, wobei basierend auf einer Metaanalyse 7 % der Krankenhausaufenthalte auf Arzneimittelwechselwirkungen zurückzuführen sind (CASCORBI, 2012). Besonders relevant ist das Wissen über Arzneimittelwechselwirkungen in der perioperativen Phase, da insbesondere dann mehrere Substanzen zur Anästhesie und Analgesie verabreicht werden (SILVA et al., 2023).

3. Limitationen, Schlussfolgerung und Ausblick

Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung

Die Teststärke der statistischen Analyse der Parameter, welche im Rahmen der ersten In-vivo-Studie dieser Dissertation erhoben worden sind, ist in Bezug auf die Fallzahlberechnung limitiert, da hier lediglich Ergebnisse einer Arbeitsgruppe präsentiert werden konnten und keine Schlussfolgerung bezüglich des Kluster-Effekts möglich ist. Die übergreifende Analyse der Datensätze aller Arbeitsgruppen wurde noch nicht finalisiert. Eine Limitation des Studiendesigns bestand darin, dass durch die Einteilung in die zwei experimentellen Gruppen direkt nach der Ankunft der Tiere, keine Baselinemessungen vorgenommen werden konnten. Zudem waren durch die Zuordnung zu den experimentellen Gruppen Einzel- und Gruppenhaltung für die Parameter FCM und Nestbauverhalten unterschiedliche experimentelle Einheiten vorgegeben. Da sich die Tiere in ihrem Verhalten innerhalb eines Gruppenkäfigs gegenseitig beeinflussen, wäre auch eine Erhebung aller Parameter

basierend auf einem Gruppenkäfigs anstatt auf einem Einzeltieren möglich gewesen. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reihenfolge, in welcher die Verhaltenstests nacheinander durchgeführt worden sind, einen Einfluss auf die Leistung in nachfolgenden Tests ausübte. Es wurde darauf geachtet, zuerst Verhaltenstests im Heimkäfig und anschließend Verhaltenstests mit zunehmender Belastung durchzuführen. Zwar wurde durch die Aneinanderreihung der Verhaltenstests eine parallele Durchführung umgangen, jedoch sind die Ergebnisse dadurch in einem Zeitraum von vier Wochen erhoben worden, in welchem sich beispielsweise das Aggressionsverhalten innerhalb der Gruppenkäfige verändert hat und dies wiederum Auswirkungen auf die Ergebnisse der Verhaltenstest gehabt haben könnte. Darüber hinaus wurde der zeitliche Verlauf der Belastung in der jeweiligen Haltungform, abgesehen von den Parametern Körpergewicht, Aggressionsverhalten, *Barbering* und Wund-Score, nicht berücksichtigt. Somit kann mit dieser Studie keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Belastung durch die unterschiedliche Haltungformen gleichbleibend war oder sich mit dem Alter der Mäuse oder der Zeit innerhalb einer stabilen Gruppe verändert hat. Eine weitere Limitation bestand in der fehlenden Erhebung der tierindividuellen Rangordnung innerhalb männlicher Gruppenkäfige. Dadurch kann keine Aussage über Unterschiede zwischen unterwürfigen oder dominanten Männchen getroffen werden. Zudem sollte basierend auf unserer Beobachtung, die Methodik zur Erhebung aggressiven Verhaltens für zukünftige Studien erweitert werden. Im Vergleich zu anderen Studien ist das Alter der Tiere, die Dauer der entsprechenden Haltungform, die Jahreszeit sowie der Mausstamm zu beachten.

Unter Berücksichtigung der aufgeführten Limitationen, können die Arbeitshypothesen dieser Studie wie folgt beantwortet werden: weibliche Labormäuse in Einzelhaltung zeigten reduziertes Wühlverhalten, erhöhtes angstassoziiertes Verhalten und eine beeinträchtigte Risikobeurteilung, sodass die Annahme, dass sie sich in Gruppenhaltung wohler fühlen, bestätigt werden kann. Weder männliche Mäuse aus der Gruppen- noch aus der Einzelhaltung wiesen eine reduzierte Fähigkeit zur akuten Stressbewältigung auf, sodass diese Studienhypothese widerlegt werden muss. Ob sich männliche Labormäuse in der Gruppenhaltung wohler fühlen als in der Einzelhaltung, kann mit unseren Studienergebnissen nicht final beantwortet werden. Zwar zeigten männliche Mäuse in der Einzelhaltung keine Beeinträchtigung der Wohlfühlparameter, jedoch wiesen

sie ebenfalls ein erhöhtes angstassoziiertes Verhalten und eine beeinträchtigte Risikobeurteilung auf. Andererseits erlitten 55 % der männlichen Mäuse in der Gruppenhaltung aggressionsbedingte Verletzungen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung des aggressiven Verhaltens männlicher Labormäuse stark von der Tierhaltung abhängig ist (MALLIEN, 2023). Deswegen kann keine allgemeingültige Empfehlung für die Haltungsform männlicher Labormäuse ausgesprochen werden, sondern es liegt in der Verantwortung jeder Tierhaltung die Prävalenz aggressionsbedingter Verletzungen zu monitoren und Haltungsformen individuell unter Berücksichtigung evidenzbasierter *Refinement*-Ansätze zu optimieren (LIDSTER et al., 2019; THEIL et al., 2020; WEBER et al., 2022). Zusammenfassend bestehen, abgesehen von den mittel- bis hochgradig, verwundeten männlichen Mäusen, nur geringgradige Unterschiede bezüglich der Belastung in unterschiedlichen Haltungsformen. Mit dieser Studie konnte nichtsdestotrotz bestätigt werden, dass die Haltungsform verschiedene Hauptzielgrößen beeinflussen kann. Auswirkungen der Einzelhaltung als auch der Gruppenhaltung wie beispielweise das Phänomen des *social buffering* (LIU et al., 2013), müssen daher bei der Interpretation von Studienergebnissen berücksichtigt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass in wissenschaftlichen Publikationen ausführlich, beispielsweise anhand der ARRIVE-Empfehlungen-2.0 (PERCIE DU SERT et al., 2020), über die Haltungsbedingungen der Versuchstiere informiert wird.

Nicht nur männliche, sondern auch weibliche Mäuse werden häufig zum Beispiel nach operativen Eingriffen oder aufgrund von *Barbering* einzeln gehalten. Im Gegensatz zu Untersuchungen in Männchen, existieren in der Literatur, abgesehen von den Ergebnissen dieser Dissertation, bisher kaum Untersuchungen über die Auswirkungen der Einzelhaltung auf weibliche Mäuse. Die Erforschung des Hierarchiestatus innerhalb männlicher Gruppenhaltungen im Zusammenhang mit der Belastungsbeurteilung sowie des Einflusses auf Hauptzielgrößen, sollte zudem in zukünftigen Studien fokussiert werden. Eine weitere Wissenslücke besteht im evidenzbasierten Einsatz von *Refinement*-Methoden, um (prophylaktisch) *Barbering*-Verhalten reduzieren zu können.

Refinement der Analgesie für murine Kraniotomien

Bei der Übertragung dieser Ergebnisse auf andere Szenarien müssen das Alter der Tiere, die Jahreszeit der Versuchsdurchführung, die Einzelhaltung ab Messbeginn,

das Geschlecht des Experimentators (SORGE et al., 2014), die *Handling*-Methode und tierhaltungsspezifische Gegebenheiten als Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Die Wahrnehmung von Schmerzen und die Sensitivität gegenüber Analgetika sind für jede Mauslinie spezifische (SMITH, 2019), sodass bei einer Übertragung der Ergebnisse dieser Studie insbesondere der Mausstamm beachtet werden muss. Die Durchführung der Experimente wurde aufgrund limitierter Ressourcen auf insgesamt 20 Batches aufgeteilt. Dies könnte zwar zum einen zu einer erhöhten Varianz des Datensatzes, zum anderen aber auch zu einer Erhöhung der Robustheit der Ergebnisse geführt haben. Ein geschlechtsspezifischer Batcheffekt könnte zusätzlich, verursacht durch die Reihenfolge der Durchführung erst männlicher, dann weiblicher Batches in unterschiedlichen Jahreszeiten, die Aussagekraft der Ergebnisse limitieren. Da diese Studie jedoch nicht einen Vergleich der Geschlechter fokussierte, ist diese Limitation vernachlässigbar. Bezüglich des Studiendesigns finden sich Limitationen in den eingesetzten Kontrollgruppen: aufgrund einer fehlenden OP-Gruppe ohne analgetische Versorgung kann nicht geschlussfolgert werden, ob die verabreichte Analgesie überhaupt eine Reduktion der postoperativen Schmerzen verursachte. Wir entschieden uns aus Tierschutzgründen gegen die Integration einer solchen Kontrollgruppe. Es kann jedoch von einer Reduktion der postoperativen Schmerzen ausgegangen werden, da Cho und Kollegen (2019) bei der Verabreichung von hochdosierten NSAIDs bei murinen Kraniotomien bereits eine Reduktion des MGS im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne analgetische Versorgung nachwiesen. Das Fehlen von entsprechenden Sham-Injektionen mit Kochsalzlösung in +N-, +NL- und +NO-Analgesieregimen könnte als Limitation gesehen werden. Unser Ziel in dieser Studie war es jedoch einen realistischen, praxisnahen Eindruck der erfahrenen Belastung unter dem jeweiligen Analgesieregime zu erhalten. Weitere Limitationen finden sich in der parallelen Erhebung verschiedener Verhaltenstests in dem Heimkäfig der Mäuse. Beispielsweise könnte das gleichzeitige Anbieten eines neuen Baumwollnestlets und der gefüllten Wühlröhre zu einer Reduktion der Leistung in den einzelnen Tests geführt haben. Es kam jedoch zu einer parallelen Durchführung der Verhaltenstests sowohl zum Baselinezeitpunkt als auch postoperativ, sodass erhobene Messungen innerhalb dieser Studie vergleichbar sind. Zusätzlich könnte durch eine wiederholte Durchführung der Verhaltenstests, beispielsweise für das Wühl- und Nestbauverhalten sowie die Laufradaktivität, ein Trainingseffekt oder im Falle der MGS-Messungen ein Gewöhnungseffekt an die

aversive Situation in der Plexiglasbox eingetreten sein. Beide Effekte würden jedoch auf die naiven Mäuse ebenfalls zutreffen, sodass Gruppenvergleiche zum gleichen Zeitpunkt davon nicht beeinflusst werden. Eine zusätzliche Limitation stellt die Haltung in unterschiedlichen Käfigen in den verschiedenen Studienphasen aufgrund begrenzter Ressourcen und der Verkürzung des Gesamtversuchszeitraums dar: während die Mäuse für die Akklimatisierung und Baselinemessungen in einem Standardheimkäfig gehalten wurden, wurden sie erst nach dem operativen Eingriff oder der Anästhesie in den PhenoTyper® Heimkäfig transferiert. Die neue Umgebung inklusive frischer Einstreu, könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Belastung der Mäuse sowie auf das Abschneiden in den Verhaltenstests ausgeübt haben. Dadurch waren außerdem keine individuellen Baselinemessungen für die Aktivität im Heimkäfig und im Laufrad möglich. Weiterhin müssen bei der Interpretation der Ergebnisse des Operationstages die unterschiedlichen Messzeitpunkte der paarweise untersuchten OP- und Substanz-Kontroll-Mäuse, abhängig von dem Zeitpunkt des operativen Eingriffs oder der Anästhesie, bedacht werden. Denn abgesehen von den Einflüssen des zirkadianen Rhythmus, bestehen Hinweise, dass postoperative Schmerzen erhoben mittels MGS in der Dunkelphase einen Höchststand erreichen (MATSUMIYA et al., 2012). Um das Verzerrungspotential zu minimieren, wurde die Reihenfolge der Interventionen am Operationstag für jeden Batch randomisiert und die naiven Tiere wurden ebenfalls parallel zu den vier verschiedenen Operationszeitpunkten untersucht. Da erst am Euthanasietag Blutproben für die Bestimmung der Carprofenplasmakonzentration genommen wurden, kann keine Aussage bezüglich des Plasmaspiegels während der postoperativen Phase getroffen werden. Von Interesse für zukünftige Studien wäre insbesondere der Plasmaspiegel am Operationstag und am ersten postoperativen Tag, um potentielle analgetische Lücken aufgrund reduziertem Trinkverhalten aufdecken zu können. Bei der Erhebung der Daten muss zudem darauf hingewiesen werden, dass die Experimentatorin nicht in Bezug auf die Zuordnung zu experimentellen Gruppen verblindet war, da sie sowohl die operativen Eingriffe durchführte als auch die Analgetika applizierte. Bis auf den Neuro-Score wurden jedoch alle anderen Parameter entweder gravimetrisch und durch Softwareanalyse erhoben oder retrospektiv verblindet ausgewertet, sodass das Verzerrungspotential als gering eingeschätzt wird. Bei der Bewertung der MGS-Bilder war die Zuordnung zu der OP-Gruppe aufgrund des Elektrodenimplantats offensichtlich, aber die

Verblindung bezüglich des Analgesieregimes konnte aufrechterhalten werden. Eine weitere Limitation bei der Erstellung des CMS bestand in der Beschränkung auf den ersten postoperativen Tag. Da bei der Analyse für diesen Tag ausgeprägte Veränderungen in verschiedenen Parametern im Vergleich zu folgenden postoperativen Tagen identifiziert wurden, fokussierten wir uns auf den ersten postoperativen Tag. Eine Vergleichbarkeit von CMS-Analysen verschiedener Tage wäre zudem nicht gegeben, denn es würde sich jeweils um vollständig getrennte Analysen handeln. Hätte man eine CMS-Analyse der erhobenen Daten von Tag 2 bis 4 durchgeführt, wären die Mäuse ebenfalls in verschiedene Belastungskategorien eingeteilt worden. Dadurch könnte irrtümlicherweise eine fiktive Belastung suggeriert werden, obwohl die Analyse einzelner Parameter keine robusten Hinweise mehr auf eine postoperative Belastung an Tag 2 bis 4 lieferte. Daher sollte eine vergleichende Belastungsbeurteilung mit einer CMS-Analyse nur bei Datensätzen mit Varianz und Veränderungen in den einzelnen Parametern durchgeführt werden. Abschließend muss hinterfragt werden, ob die angewandten Parameter, welche sich als sensitiv zur Belastungseinschätzung und postoperativen Schmerzquantifizierung erwiesen haben, sensitiv genug sind, um feine Unterschiede des postoperativen Schmerzes inklusive des Einflusses verschiedener Analgesieregime oder -dosierungen messen zu können. Beispielsweise wurde nur eine geringgradige Verbesserung des Nestbauverhaltens bei einer Verabreichung von 50 mg/kg Carprofen subkutan im Vergleich zu 5 mg/kg nach einer Laparotomie bei Mäusen beobachtet, sodass man mit dem Parameter Nestbauverhalten womöglich nicht die Effektivität der Analgesie überprüfen kann (JIRKOF et al., 2013). Hingegen zeigte ein systematisches *Review* aus unserer Arbeitsgruppe, dass der MGS und das Wühlverhalten geeignet sind, um Effekte der Analgesie erheben zu können (AULEHNER et al., 2022).

Unter Berücksichtigung der Limitationen, konnten mit der vorliegenden Studie die Parameter Nestbauverhalten, Körpergewichtsveränderung, MGS, Neuro-Score, zurückgelegte Distanz in der Hellphase und FCM als Parameter mit informativem Mehrwert identifiziert und validiert werden. Dadurch bestätigt unsere Studie die Relevanz der Verwendung multidimensionaler Testbatterien für die postoperative Belastungsbeurteilung bei intrakraniellen Eingriffen an der Labormaus. Die Anwendung des bioinformatischen Workflows resultierte in einem *Composite Measure Scheme*, welches uns zudem erlaubte, individuelle Mäuse verschiedenen

Belastungskategorien zuzuordnen und somit einen direkten Gruppenvergleich zu ermöglichen. Entgegen der Studienhypothese konnten wir damit die Überlegenheit multimodaler Behandlungsansätze im Vergleich zu einer hochdosierten NSAID-Monotherapie nicht bestätigen. Während sich alle Analgesieregime in den Substanz-Kontroll-Gruppen als gut verträglich erwiesen, legen unsere Daten nahe, dass die Summierung der Wirkstoffe in multimodalen Regimen für das perioperative Schmerzmanagement bei Mäusen vorsichtig abgewogen werden muss.

In zukünftigen Studien sollte deshalb die Reduzierung einzelner Dosierungen bei multimodalen Ansätzen in Erwägung gezogen werden. Wünschenswert wäre es zudem, dass alle Parameter der postoperativen Belastungseinschätzung im Heimkäfig der Mäuse erhoben werden könnten. Insbesondere für den MGS, bei welchem die Mäuse dieser Studie für die Videoaufnahmen in eine Plexiglasbox transferiert werden mussten, wären Videoaufnahmen aus dem Heimkäfig eine wertvolle *Refinement*-Maßnahme. Eine automatische Bewertung gewonnener Bilder, beispielsweise durch künstliche Intelligenz (CHIANG et al., 2022), würde eine Intervention wie die Verabreichung zusätzlicher Analgesie in Echtzeit ermöglichen. Innerhalb unseres Forschungskonsortiums „*Severity Assessment in Animal-Based Research*“ (DFG-FOR2591, 2024) wurde ein Heimkäfigsystem entwickelt, welches erlaubt nicht nur die Aktivität, sondern auch die Herz- und Atemfrequenz von Labormäusen nicht-invasiv zu erheben, wodurch die Implantation von Transmittersendern überflüssig gemacht wird (BREUER et al., 2023; MÖSCH et al., 2023). Weitere Forschung dieser Art ist nötig, um die postoperative Belastungsbeurteilung für die Labormäuse zu optimieren. Des Weiteren sollte auch die Bedeutung nicht-pharmakologischer Maßnahmen, wie beispielsweise die Überwachung der Vitalparameter intraoperativ, die Bereitstellung aufgeweichten Futters und die Kühlung des Wundbereichs postoperativ (NAVARRO et al., 2021), für eine zügige postoperative Erholung der Labormäuse als *Refinement*-Methode in Betracht gezogen werden. Allerdings sollten bezüglich der Analgesie bei Labornagern realistische Ziele angestrebt werden. Eine vollständige Aufhebung der Schmerzen in der frühen postoperativen Phase erscheint unrealistisch. Selbst in der Humanmedizin stellt das Schmerzmanagement, insbesondere bei akuten, chronischen und tumorbedingten Schmerzen, immer noch eine Herausforderung dar (BRENNAN et al., 2007;

FOLEY et al., 2019). Nichtsdestotrotz unterstreicht diese Studie den Bedarf für weitere Forschung, um das perioperative Schmerzmanagement für murinen Kraniotomien zu optimieren und damit das Wohlergehen von Labormäusen als auch die Studienqualität sicherzustellen.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Die Einhaltung der 3R-Prinzipien von Russel und Burch ist gesetzlich in der RL 2010/63/EU verankert und die 3R-Prinzipien müssen bei der Durchführung unerlässlicher Tierversuche berücksichtigt werden. Innerhalb des Forschungskonsortiums „Severity Assessment in Animal-Based Research“ (DFG-FOR2591, 2024) konnten sensitive Parameter zur Belastungseinschätzung bei Versuchstieren identifiziert und validiert werden. Im Rahmen dieser Dissertationsschrift sollten *Refinement*-Ansätze mit Hilfe dieser Parameter in zwei In-vivo-Studien evidenzbasiert untersucht werden.

In konventionellen Tierhaltungen kann die soziale Haltungsform von Labormäusen zu verschiedenen, tierschutzrelevanten Problematiken führen: einerseits birgt die Gruppenhaltung die Gefahr aggressionsbedingter Verletzungen unter männlichen Labormäusen und das Vorkommen von *Barbering* bei beiden Geschlechtern, andererseits kann die Isolation in Einzelhaltung das Wohlbefinden der sozialaktiven Labormäuse reduzieren. Die soziale Haltungsform kann dabei Einfluss auf die Varianz erhobener Daten und damit die Qualität und Aussagekraft tierexperimenteller Studien ausüben. Deswegen sollte mit der ersten In-vivo-Studie dieser Dissertation die Belastung der Einzel- und Gruppenhaltung bei beiden Geschlechtern untersucht werden. Dabei wurden Informationen bezüglich der Belastung bei C57BL/6JRj Mäusen nach einer vierwöchigen Einzel- oder Gruppenhaltung anhand verschiedener (patho-)physiologischer, biochemischer und verhaltensbezogener Parameter erhoben. Das Vorkommen von *Barbering* bei beiden Geschlechtern und von aggressionsbedingten Verletzungen bei männlichen Gruppenhaltungen, konnte unsere Untersuchung bestätigen. Des Weiteren zeigten Mäuse in Einzelhaltung unabhängig vom Geschlecht ein erhöhtes angstassoziiertes Verhalten und mit einer reduzierten Risikobewertung assoziierte Verhaltensmuster in entsprechenden Verhaltenstests. Jedoch konnten wir keinen Einfluss der Haltungsform auf die neuroendokrine Stressachse sowie die Fähigkeit der Bewältigung akuter Stresssituationen feststellen. Bei weiblichen Mäusen wurden geringgradige Auswirkungen der Einzelhaltung beobachtet, die zu einer Reduktion des Körpergewichts und des Wühlverhaltens führten. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Studie daraufhin, dass die Belastung weiblicher Mäuse in Einzelhaltung höher ausfällt und somit die Gruppenhaltungsform bevorzugt werden sollte. Die Ambivalenz der Ergebnisse männlicher Mäuse hingegen lässt

schlussfolgern, dass keine allgemeingültige Empfehlung für die Haltungsförm dieses Geschlechts ausgesprochen werden kann, sondern dies unter Berücksichtigung des Vorkommens aggressionsbedingter Verletzungen in jeder Tierhaltung reevaluiert werden muss.

Intrakranielle, chirurgische Eingriffe bei der Labormaus werden häufig zur Erforschung neurowissenschaftlicher Fragestellungen durchgeführt. Da ein kürzlich veröffentlichtes *Review* die Qualität des perioperativen Schmerzmanagements nach Kraniotomien bei Labornagern in Frage stellt und auf das ungenutzte Potential multimodaler Behandlungsansätze hinweist, sollte im Rahmen der zweiten In-vivo-Studie dieser Dissertation das *Refinement*-Potential vier verschiedener Analgesieregime adressiert werden. Darüber hinaus sollten sensitive Parameter der Belastungseinschätzung für die postoperative Schmerzerfassung validiert werden. Wir nahmen an, dass multimodale Analgesieregime den postoperativen, kraniotomieassoziierten Schmerz bei weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen besser reduzieren als eine NSAID-Monotherapie. Mäuse der OP- und Substanz-Kontroll-Gruppe, welche entweder die NSAID-Monotherapie oder eine von drei Kombinationen aus NSAID, Lokalanästhetikum und Opioid erhielten, wurden mit gleichgeschlechtlichen naiven Mäusen verglichen. Die Verträglichkeit der Analgesieregime und der postoperative Schmerz wurden mit Hilfe von verschiedenen (patho-)physiologischen, biochemischen und verhaltensbezogenen Parametern, den Mouse-Grimace-Scale eingeschlossen, untersucht. Unabhängig des verabreichten Analgesieregimes war in der frühen postoperativen Phase der Grimace-Scale bei Weibchen bis zu einem Tag und bei Männchen bis zu zwei Tagen signifikant erhöht und die Aktivität im Heimkäfig reduziert. Auch die Analyse weiterer Parameter ergab keine übergreifenden, robusten Gruppenunterschiede. Um besonders geeignete Parameter zur postoperativen Belastungseinschätzung zu identifizieren und einen direkten Gruppenvergleich zu ermöglichen, wurde der Datensatz einem bioinformatischen Workflow zum Design eines *Composite Measure Schemes* (CMS) unterzogen. Basierend auf einer Kreuzkorrelations- und Hauptkomponentenanalyse konnten mehrere Parameter mit informativem Mehrwert identifiziert werden, wodurch die Relevanz der Anwendung multidimensionaler Testbatterien zur postoperativen Belastungseinschätzung bestätigt wurde. Die Klusteranalyse ergab Hinweise auf

eine geringere postoperative Belastung bei Mäusen, denen eine NSAID-Monotherapie verabreicht wurde. Somit konnten wir entgegen der Studienhypothese die Überlegenheit der multimodalen Regime im Vergleich zu einer hochdosierten NSAID-Monotherapie in dieser Studie nicht belegen. Obwohl alle Analgesieregime in den Substanz-Kontroll-Gruppen eine hohe Verträglichkeit aufwiesen, zeigte insbesondere der CMS der OP-Gruppen, dass die Summierung der Wirkstoffe in multimodalen Behandlungsansätzen und die damit einhergehenden, negativen Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Labormäuse bedacht werden müssen. Für zukünftige Studien sollte deshalb eine Reduktion der einzelnen Dosierungen für die Erforschung synergistischer Effekte bei multimodalen Ansätzen in Betracht gezogen werden.

Die Ergebnisse beider In-vivo-Studien tragen dazu bei, evidenzbasierte Entscheidungen über *Refinement*-Maßnahmen bezüglich der sozialen Haltungform von Labormäusen und des perioperativen Schmerzmanagements für murine Kraniotomien treffen zu können.

VIII. SUMMARY

Compliance with the 3R principles of Russel and Burch is a legal requirement in the European Union (Directive 2010/63/EU) and the 3R principles must be adhered to when conducting indispensable animal experiments. Within the research consortium "Severity Assessment in Animal-Based Research" (DFG-FOR2591, 2024), sensitive parameters for the assessment of severity in laboratory animals were identified and validated. By applying these parameters *refinement* approaches were to be investigated in two evidence-based *in vivo* studies within the scope of this dissertation.

In conventional animal housing, the social housing system of laboratory mice can lead to various difficulties impacting animal welfare: on the one hand, group housing carries the risk of aggression-related injuries among male laboratory mice and the occurrence of barbering in both sexes; on the other hand, isolation in individual housing can reduce the well-being of socially active laboratory mice. Moreover, the variance of collected data can be influenced by the social housing system, which in consequence compromises the quality and validity of animal-based research. Therefore, the first *in vivo* study of this dissertation aimed to investigate the severity of individual and group housing in both sexes. Information on the severity experienced by C57BL/6JRj mice after four weeks of individual or group housing was collected using various (patho-)physiological, biochemical and behavioral parameters. Our study confirmed the occurrence of barbering in both sexes and of aggression-related injuries in group housed males. Regardless of sex, mice housed individually showed increased anxiety-associated behavior and behavioral patterns associated with reduced risk assessment in corresponding behavioral tests. However, we could not detect any influence of social housing system on the neuroendocrine stress axis and stress-coping behavior. In female mice, minor effects of single housing resulting in reduced body weight and burrowing behavior were observed. In summary, the results of this study indicate that individual housing of female mice is associated with higher distress levels. Thus, group housing should be preferred for females. The ambivalent results of male mice, in contrast, lead to the conclusion that no generally applicable recommendation can be made for an adequate housing system in this sex. Indeed, in each animal facility the occurrence of aggression-related injuries must be taken into account when deciding on the appropriate housing system.

In neurobiological research, intracranial interventions in laboratory mice are frequently applied surgical procedures. Because evidence of a recently published review raises concerns about the quality of perioperative pain management after craniotomies in laboratory rodents and hints at the untapped potential of multimodal approaches, the second *in vivo* study of this dissertation aimed to address the refinement potential of four different analgesic regimens. In addition, sensitive severity assessment parameters were to be validated for their applicability in postoperative pain assessment. We hypothesized that multimodal analgesic regimens are more effective in reducing craniotomy-associated pain in female and male C57BL/6J mice than a NSAID monotherapy. Mice in the surgery and drug-control groups, that received either NSAID monotherapy or a combination of NSAID, local anesthetic and opioid, were compared to naive-control mice of the same sex. The tolerability of the analgesic regimens and the postoperative pain were evaluated with several (patho-)physiological, biochemical and behavioral parameters, including the mouse grimace scale. Regardless of the analgesic regimen, the grimace scale was significantly increased in females for up to one day and in males for up to two days postoperatively, and the activity of mice in their home cage was reduced. The analysis of other parameters did not reveal any robust group differences. In order to select particularly suitable parameters for postoperative severity assessment and to enable a comparative severity assessment of experimental groups, the data set was subjected to a bioinformatic workflow to design a *composite measure scheme* (CMS). Based on cross-correlation and principal component analyses, several parameters with informative value were identified. Thus, our results confirm the relevance of using multidimensional test batteries for postoperative severity assessment in laboratory mice. The cluster analysis revealed evidence of lower severity levels in mice undergoing surgery with the NSAID monotherapy. In contrast to the study hypothesis, we did not demonstrate superiority of multimodal analgesic regimens compared to a high-dose NSAID monotherapy. Although all analgesic regimens were of excellent tolerability in the drug-control groups, the CMS of the surgery groups in particular suggests that the total drug-load in multimodal approaches and the associated detrimental effects on the well-being of the laboratory mice have to be carefully considered. In future studies, it would be interesting to test combinations with lower dosages for synergistic effects in multimodal approaches.

The findings of both *in vivo* studies can contribute to evidence-based decision making on refinement measures regarding the social housing systems of laboratory mice and the perioperative pain management for murine craniotomies.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abelson KS, Jacobsen KR, Sundbom R, Kalliokoski O, Hau J. Voluntary ingestion of nut paste for administration of buprenorphine in rats and mice. *Lab Anim* 2012; 46: 349-51.

Adamson TW, Kendall LV, Goss S, Grayson K, Touma C, Palme R, Chen JQ, Borowsky AD. Assessment of carprofen and buprenorphine on recovery of mice after surgical removal of the mammary fat pad. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2010; 49: 610-6.

Aerts L, Miccoli B, Delahanty A, Witters H, Verstraelen S, De Strooper B, Braeken D, Verstreken P. Do we still need animals? Surveying the role of animal-free models in Alzheimer's and Parkinson's disease research. *The EMBO Journal* 2022; 41: e110002.

Ahmadi-Noorbakhsh S, Farajli Abbasi M, Ghasemi M, Bayat G, Davoodian N, Sharif-Paghaleh E, Poormoosavi SM, Rafizadeh M, Maleki M, Shirzad-Aski H, Kargar Jahromi H, Dadkhah M, Khalvati B, Safari T, Behmanesh MA, Khoshnam SE, Houshmand G, Talaei SA. Anesthesia and analgesia for common research models of adult mice. *Lab Anim Res* 2022; 38: 40.

Akintola T, Raver C, Studlack P, Uddin O, Masri R, Keller A. The grimace scale reliably assesses chronic pain in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. *Neurobiol Pain* 2017; 2: 13-7.

Alfonso J, Frasch AC, Flugge G. Chronic stress, depression and antidepressants: effects on gene transcription in the hippocampus. *Rev Neurosci* 2005; 16: 43-56.

Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* (1985) 2001; 90: 1900-8.

Ambrose N, Morton DB. The Use of Cage Enrichment to Reduce Male Mouse

Aggression. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 2000; 3: 117-25.

Annas A, Bengtsson C, Törnqvist E. Group housing of male CD1 mice: reflections from toxicity studies. *Lab Anim* 2013; 47: 127-9.

Antiorio AT, Alemán-Laporte J, Zanatto DA, Pereira MAA, Gomes MS, Wadt D, Yamamoto PK, Bernardi MM, Mori CM. Mouse Behavior in the Open-field Test after Meloxicam Administration. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61: 270-4.

Arndt SS, Goerlich VC, van der Staay FJ. A dynamic concept of animal welfare: The role of appetitive and adverse internal and external factors and the animal's ability to adapt to them. *Frontiers in Animal Science* 2022; 3

Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res* 2007; 3: 16.

Arras M, Becker K, Bergadano A, Durst M, Eberspächer-Schweda E, Fleischmann T, Haberstroh J, Jirkof P, Sager M, Spadavecchia C. Schmerztherapie bei Versuchstieren: Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT. *Schmerztherapie bei Versuchstieren* 2020;

Aulehner K, Leenaars C, Buchecker V, Stirling H, Schönhoff K, King H, Häger C, Koska I, Jirkof P, Bleich A, Bankstahl M, Potschka H. Grimace scale, burrowing, and nest building for the assessment of post-surgical pain in mice and rats-A systematic review. *Front Vet Sci* 2022; 9: 930005.

Barabas AJ, Soini HA, Novotny MV, Lucas JR, Erasmus MA, Cheng HW, Palme R, Gaskill BN. Assessing the effect of compounds from plantar foot sweat, nesting material, and urine on social behavior in male mice, *Mus musculus*. *PLoS One* 2022; 17: e0276844.

Bartling B, Al-Robaiy S, Lehnich H, Binder L, Hiebl B, Simm A. Sex-related differences in the wheel-running activity of mice decline with increasing age. *Exp Gerontol* 2017; 87: 139-47.

Basterfield L, Lumley LK, Mathers JC. Wheel running in female C57BL/6J mice: impact of oestrus and dietary fat and effects on sleep and body mass. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33: 212-8.

Batty J. Acute changes in plasma testosterone levels and their relation to measures of sexual behaviour in the male house mouse (*Mus musculus*). *Anim Behav* 1978; 26: 349-57.

Bayram HL, Franco C, Brownridge P, Claydon AJ, Koch N, Hurst JL, Beynon RJ, Stockley P. Social status and ejaculate composition in the house mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2020; 375: 20200083.

Bechard A, Meagher R, Mason G. Environmental enrichment reduces the likelihood of alopecia in adult C57BL/6J mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011; 50: 171-4.

Bedford NL, Weber JN, Tong W, Baier F, Kam A, Greenberg RA, Hoekstra HE. Interspecific variation in cooperative burrowing behavior by *Peromyscus* mice. *Evol Lett* 2022; 6: 330-40.

Bello C, Anderegg L, Luedi MM, Beilstein CM. Postcraniotomy Headache: Etiologies and Treatments. *Curr Pain Headache Rep* 2022; 26: 357-64.

Benedetti F, Fresi F, Maccioni P, Smeraldi E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behav Brain Res* 2008; 187: 221-7.

Benfato ID, Quintanilha ACS, Henrique JS, Souza MA, Rosário BDA, Beserra Filho JIA, Santos RLO, Ribeiro AM, Le Sueur Maluf L, de Oliveira CAM. Effects of long-term social isolation on central, behavioural and metabolic parameters in

middle-aged mice. *Behav Brain Res* 2022; 417: 113630.

Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, van Oortmerssen GA. Behavioural strategies of aggressive and non-aggressive male mice in active shock avoidance. *Behav Processes* 1989; 20: 1-12.

Berry A, Bellisario V, Capoccia S, Tirassa P, Calza A, Alleva E, Cirulli F. Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* 2012; 37: 762-72.

Berry RJ. The natural History of the house mouse. *Field Study* 1970; 3: 219-62.

BfR BfR. Bundesinstitut für Risikobewertung: Verwendung von Versuchstieren im Berichtsjahr 2022. 2022: https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_berichtsjahr_2022-313306.html. 15.12.2023.

Bleich A, Tolba RH. How can we assess their suffering? German research consortium aims at defining a severity assessment framework for laboratory animals. *Lab Anim* 2017; 51: 667.

BMEL BfEuL. Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: statistische Auswertung zur Anzahl der Viehbestände 2022. 2022: <https://www.bmel-statistik.de/landwirtschaft/tierhaltung>. 15.12.2023.

Bodden C, Siestrup S, Palme R, Kaiser S, Sachser N, Richter SH. Evidence-based severity assessment: Impact of repeated versus single open-field testing on welfare in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 2018; 336: 261-8.

Boldt L, Koska I, Maarten van Dijk R, Talbot SR, Miljanovic N, Palme R, Bleich A, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsy Behav* 2021; 115: 107689.

Bourin M, Petit-Demoulière B, Dhonnchadha BN, Hascöet M. Animal models of anxiety in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 567-74.

Braga VA, Burmeister MA. Applications of telemetry in small laboratory animals for studying cardiovascular diseases. *Modern Telemetry* 2011; 1: 183-96.

Brambell F. Report of the technical committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock husbandry systems. (No Title) 1965;

Brennan F, Carr DB, Cousins M. Pain management: a fundamental human right. *Anesth Analg* 2007; 105: 205-21.

Breuer L, Mösch L, Kunczik J, Buchecker V, Potschka H, Czaplík M, Pereira CB. Camera-Based Respiration Monitoring of Unconstrained Rodents. *Animals (Basel)* 2023; 13

Brill SA, Guerrero-Martin SM, Metcalf Pate KA. The Symbiotic Relationship Between Scientific Quality and Animal Research Ethics. *Ilar j* 2021; 60: 334-40.

Bronson FH. The reproductive ecology of the house mouse. *Q Rev Biol* 1979; 54: 265-99.

Buch T, Moos K, Ferreira FM, Fröhlich H, Gebhard C, Tresch A. Benefits of a factorial design focusing on inclusion of female and male animals in one experiment. *J Mol Med (Berl)* 2019; 97: 871-7.

Buchecker V, Waldron AM, van Dijk RM, Koska I, Brendel M, von Ungern-Sternberg B, Lindner S, Gildehaus FJ, Ziegler S, Bartenstein P, Potschka H. [(18)F]MPPF and [(18)F]FDG μ PET imaging in rats: impact of transport and restraint stress. *EJNMMI Res* 2020; 10: 112.

Buchecker V, Koska I, Pace C, Talbot SR, Palme R, Bleich A, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: (II.)

Impact of surgery and intrahippocampal kainate. *Eur Surg Res* 2022; 64: 30-48.

Carbone ET, Lindstrom KE, Diep S, Carbone L. Duration of action of sustained-release buprenorphine in 2 strains of mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 815-9.

Carbone L, Austin J. Pain and Laboratory Animals: Publication Practices for Better Data Reproducibility and Better Animal Welfare. *PLoS One* 2016; 11: e0155001.

Cascorbi I. Drug interactions--principles, examples and clinical consequences. *Dtsch Arztebl Int* 2012; 109: 546-55; quiz 56.

Challa SR, Fornal CA, Wang BC, Boyineni J, DeVera RE, Unnam P, Song Y, Soares MB, Malchenko S, Gyarmati P, Veeravalli KK. The Impact of Social Isolation and Environmental Deprivation on Blood Pressure and Depression-Like Behavior in Young Male and Female Mice. *Chronic Stress* 2023; 7: 24705470231207010.

Chan G, Si C, Nichols MR, Kennedy L. Assessment of the Safety and Efficacy of Pre-emptive Use of Extended-release Buprenorphine for Mouse Laparotomy. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61: 381-7.

Chiang CY, Chen YP, Tzeng HR, Chang MH, Chiou LC, Pei YC. Deep Learning-Based Grimace Scoring Is Comparable to Human Scoring in a Mouse Migraine Model. *J Pers Med* 2022; 12

Cho C, Michailidis V, Lecker I, Collymore C, Hanwell D, Loka M, Danesh M, Pham C, Urban P, Bonin RP, Martin LJ. Evaluating analgesic efficacy and administration route following craniotomy in mice using the grimace scale. *Sci Rep* 2019; 9: 359.

Chowdhury T, Garg R, Sheshadri V, Venkatraghavan L, Bergese SD, Cappellani RB, Schaller B. Perioperative Factors Contributing the Post-Craniotomy Pain: A

Synthesis of Concepts. *Front Med (Lausanne)* 2017; 4: 23.

Clark JA, Jr., Myers PH, Goelz MF, Thigpen JE, Forsythe DB. Pica behavior associated with buprenorphine administration in the rat. *Lab Anim Sci* 1997; 47: 300-3.

Clark TS, Clark DD, Hoyt RF, Jr. Pharmacokinetic comparison of sustained-release and standard buprenorphine in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014; 53: 387-91.

Clayton JA, Collins FS. Policy: NIH to balance sex in cell and animal studies. *Nature* 2014; 509: 282-3.

Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, Ehlinger DG. The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci* 2017; 8: 955-60.

Contreras KM, Caillaud M, Neddenriep B, Bagdas D, Roberts JL, Ulker E, White AB, Aboulhosn R, Toma W, Khalefa T, Adel A, Mann JA, Damaj MI. Deficit in voluntary wheel running in chronic inflammatory and neuropathic pain models in mice: Impact of sex and genotype. *Behav Brain Res* 2021; 399: 113009.

Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2367-72.

Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775-90.

Cunningham C, Deacon RM, Chan K, Boche D, Rawlins JN, Perry VH. Neuropathologically distinct prion strains give rise to similar temporal profiles of behavioral deficits. *Neurobiol Dis* 2005; 18: 258-69.

D'Amato FR, Pavone F. Reunion of separated sibling mice: neurobiological and behavioral aspects. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 65: 9-16.

Dalla Costa E, Minero M, Lebelt D, Stucke D, Canali E, Leach MC. Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. *PLoS One* 2014; 9: e92281.

Dammann P, Gerold S, Haemisch A, Jirkof P, Oehlert P, Osterkamp A, Ott S, Peters S, Spekl K, Tsai PP (2021) Zur Einzelhaltung von Mäusen zu Versuchszwecken. In: Gesellschaft für Versuchstierkunde/Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS)

Darwin C (1873) *The expression of the emotions in Man and animals... With... illustrations.* Murray

Dawson WD, Lake CE, Schumpert SS. Inheritance of burrow building in *Peromyscus*. *Behavior Genetics* 1988; 18: 371-82.

de Almeida AS, Rigo FK, De Prá SD-T, Milioli AM, Pereira GC, Lückemeyer DD, Antoniazzi CT, Kudsi SQ, Araújo DMPA, Oliveira SM, Ferreira J, Trevisan G. Role of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) on nociception caused by a murine model of breast carcinoma. *Pharmacological Research* 2020; 152: 104576.

De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, Channon KM. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: R926-34.

de Gray LC, Matta BF. Acute and chronic pain following craniotomy: a review. *Anaesthesia* 2005; 60: 693-704.

Deacon RM, Raley JM, Perry VH, Rawlins JN. Burrowing into prion disease. *Neuroreport* 2001; 12: 2053-7.

Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006a; 1: 1117-9.

Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral

dysfunction. Nat Protoc 2006b; 1: 118-21.

Deacon RM. Assessing hoarding in mice. Nat Protoc 2006c; 1: 2828-30.

Deacon RM. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. Nat Protoc 2006d; 1: 122-4.

Deacon RM. Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents. Behav Brain Res 2009; 200: 128-33.

Defensor EB, Corley MJ, Blanchard RJ, Blanchard DC. Facial expressions of mice in aggressive and fearful contexts. Physiol Behav 2012; 107: 680-5.

DeMarco GJ, Nunamaker EA. A Review of the Effects of Pain and Analgesia on Immune System Function and Inflammation: Relevance for Preclinical Studies. Comp Med 2019; 69: 520-34.

Desjardins C, Maruniak JA, Bronson FH. Social rank in house mice: differentiation revealed by ultraviolet visualization of urinary marking patterns. Science 1973; 182: 939-41.

DFG-FOR2591. The DFG research unit 2591 – a research consortium aims at defining a severity assessment framework for laboratory animals. Bleich, A.

Tolba, R.

2024: <https://severity-assessment.de>. 24.01.2024.

Drickamer LC. Responses to Odors of Dominant and Subordinate House Mice (*Mus domesticus*) in Live Traps and Responses to Odors in Live Traps by Dominant and Subordinate Males. Journal of Chemical Ecology 1997; 23: 2493-506.

Dudley ES, Johnson RA, French DC, Boivin GP. Effects of Topical Anesthetics on Behavior, Plasma Corticosterone, and Blood Glucose Levels after Tail Biopsy of C57BL/6NHSD Mice (*Mus musculus*). J Am Assoc Lab Anim Sci 2016; 55: 443-

50.

Dufour BD, Garner JP. Neurobiology of Grooming Behavior: An ethological analysis of barbering behavior. 2010;

Dülsner A, Hack R, Krüger C, Manthey T, Paulin N, Pils M, Scherer K, Schmelting B, Schmidt M, Siegeler K. Möglichkeiten der Belastungsbeurteilung im Tierversuch. View Article 2020;

Dunn LK, Naik BI, Nemergut EC, Durieux ME. Post-Craniotomy Pain Management: Beyond Opioids. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016; 16: 93.

Durst MS, Arras M, Palme R, Talbot SR, Jirkof P. Lidocaine and bupivacaine as part of multimodal pain management in a C57BL/6J laparotomy mouse model. *Sci Rep* 2021; 11: 10918.

Dwivedi DJ, Grin PM, Khan M, Prat A, Zhou J, Fox-Robichaud AE, Seidah NG, Liaw PC. Differential Expression of PCSK9 Modulates Infection, Inflammation, and Coagulation in a Murine Model of Sepsis. *Shock* 2016; 46: 672-80.

Ekman P, Friesen WV. Facial action coding system consulting psychologists press. Palo Alto, CA 1978;

Ernst L, Kopaczka M, Schulz M, Talbot SR, Zieglowski L, Meyer M, Bruch S, Merhof D, Tolba RH. Improvement of the Mouse Grimace Scale set-up for implementing a semi-automated Mouse Grimace Scale scoring (Part 1). *Lab Anim* 2020a; 54: 83-91.

Ernst L, Kopaczka M, Schulz M, Talbot SR, Struve B, Häger C, Bleich A, Durst M, Jirkof P, Arras M, van Dijk RM, Miljanovic N, Potschka H, Merhof D, Tolba RH. Semi-automated generation of pictures for the Mouse Grimace Scale: A multi-laboratory analysis (Part 2). *Lab Anim* 2020b; 54: 92-8.

Estep DQ, Lanier DL, Dewsbury DA. Copulatory behavior and nest building behavior of wild house mice (*Mus musculus*). *Anim Learn Behav* 1975; 3: 329-36.

Evangelista-Vaz R, Bergadano A, Arras M, Jirkof PD. Analgesic Efficacy of Subcutaneous-Oral Dosage of Tramadol after Surgery in C57BL/6J Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2018; 57: 368-75.

Evangelista MC, Monteiro BP, Steagall PV. Measurement properties of grimace scales for pain assessment in nonhuman mammals: a systematic review. *Pain* 2022; 163: e697-e714.

Fernández-de Thomas RJ, Munakomi S, De Jesus O. Craniotomy. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*
Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC. 2023:

Fernández-Dueñas V, Poveda R, Fernández A, Sánchez S, Planas E, Ciruela F. Fentanyl-trazodone-paracetamol triple drug combination: multimodal analgesia in a mouse model of visceral pain. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 98: 331-6.

Filali M, Lalonde R. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APPswe/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2009; 1292: 93-9.

Filipkowski RK. Inducing gene expression in barrel cortex--focus on immediate early genes. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2000; 60: 411-8.

Fitchett AE, Collins SA, Barnard CJ, Cassaday HJ. Subordinate male mice show long-lasting differences in spatial learning that persist when housed alone. *Neurobiol Learn Mem* 2005; 84: 247-51.

Flecknell P. Rodent analgesia: Assessment and therapeutics. *Vet J* 2018; 232: 70-7.

Flecknell PA. Analgesia of small mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*

2001; 4: 47-56, vi.

Foley PL, Kendall LV, Turner PV. Clinical Management of Pain in Rodents. *Comp Med* 2019; 69: 468-89.

Fonck C, Easter A, Pietras MR, Bialecki RA. CNS Adverse Effects: From Functional Observation Battery/Irwin Tests to Electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol* 2015; 229: 83-113.

Francois M, Canal Delgado I, Shargorodsky N, Leu CS, Zeltser L. Assessing the effects of stress on feeding behaviors in laboratory mice. *Elife* 2022; 11

Frynta D, Slabova M, Vachova H, Volfova R, Munclinger P. Aggression and commensalism in house mouse: a comparative study across Europe and the Near East. *Aggressive Behavior* 2005; 31: 283-93.

Funabashi D, Wakiyama Y, Muto N, Kita I, Nishijima T. Social isolation is a direct determinant of decreased home-cage activity in mice: A within-subjects study using a body-implantable actimeter. *Exp Physiol* 2022; 107: 133-46.

Furumoto K, Sasaki Y, Nohara M, Takenaka N, Maeta N, Kanda T. Effects of a Multimodal Approach Using Buprenorphine with/without Meloxicam on Food Intake, Body Weight, Nest Consolidating Behavior, Burrowing Behavior, and Gastrointestinal Tissues in Postoperative Male Mice. *Vet Sci* 2022; 9

Ganea K, Liebl C, Sterlemann V, Müller MB, Schmidt MV. Pharmacological validation of a novel home cage activity counter in mice. *J Neurosci Methods* 2007; 162: 180-6.

Garner JP, Weisker SM, Dufour B, Mench JA. Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. *Comp Med* 2004; 54: 216-24.

Garner JP, Gaskill BN, Rodda C, Dufour B, Prater A, Klein J, Würbel H, Mason G, Olsson A, Weber E, Geronimo J, May C. <https://mousebehavior.org/>. Stanford University 2024: 21.01.2024.

Gaskill BN, Stottler AM, Garner JP, Winnicker CW, Mulder GB, Pritchett-Corning KR. The effect of early life experience, environment, and genetic factors on spontaneous home-cage aggression-related wounding in male C57BL/6 mice. *Lab Anim (NY)* 2017; 46: 176-84.

Gebhart GF, Basbaum AI, Bird SJ, Flecknell P, Goodly L, Karas AZ, Kelley ST, Lacher J, Mason G, Sneddon LU, Soriano SG. Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. In: Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright © 2009, National Academy of Sciences. 2009:

Genewsky A, Heinz DE, Kaplick PM, Kilonzo K, Wotjak CT. A simplified microwave-based motion detector for home cage activity monitoring in mice. *J Biol Eng* 2017; 11: 36.

Gilbert CA, Lilley CM, Craig KD, McGrath PJ, Court CA, Bennett SM, Montgomery CJ. Postoperative pain expression in preschool children: validation of the child facial coding system. *Clin J Pain* 1999; 15: 192-200.

Glasenapp A, Bankstahl JP, Bähre H, Glage S, Bankstahl M. Subcutaneous and orally self-administered high-dose carprofen in male and female mice: pharmacokinetics, tolerability and impact on cage-side pain indicators. *bioRxiv* 2023: 2023.06.03.543582.

Goh J, Ladiges W. Voluntary Wheel Running in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2015; 5: 283-90.

Gottschalk A, Berkow LC, Stevens RD, Mirski M, Thompson RE, White ED, Weingart JD, Long DM, Yaster M. Prospective evaluation of pain and analgesic

use following major elective intracranial surgery. *J Neurosurg* 2007; 106: 210-6.

Gray S, Hurst JL. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal Behaviour* 1995; 49: 821-6.

Greaves P. Chapter 8 - Digestive System. In: *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies (Fourth Edition)*. Greaves P, ed. Boston: Academic Press 2012: 325-431.

Green TC, Mellor DJ. Extending ideas about animal welfare assessment to include 'quality of life' and related concepts. *N Z Vet J* 2011; 59: 263-71.

Grieco F, Bernstein BJ, Biemans B, Bikovski L, Burnett CJ, Cushman JD, van Dam EA, Fry SA, Richmond-Hacham B, Homberg JR, Kas MJH, Kessels HW, Koopmans B, Krashes MJ, Krishnan V, Logan S, Loos M, McCann KE, Parduzi Q, Pick CG, Prevot TD, Riedel G, Robinson L, Sadighi M, Smit AB, Sonntag W, Roelofs RF, Tegelenbosch RAJ, Noldus L. Measuring Behavior in the Home Cage: Study Design, Applications, Challenges, and Perspectives. *Front Behav Neurosci* 2021; 15: 735387.

Gross D, Tolba RH. Ethics in Animal-Based Research. *Eur Surg Res* 2015; 55: 43-57.

Häger C, Biernot S, Buettner M, Glage S, Keubler LM, Held N, Bleich EM, Otto K, Müller CW, Decker S, Talbot SR, Bleich A. The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLoS One* 2017; 12: e0175839.

Häger C, Keubler LM, Talbot SR, Biernot S, Weegh N, Buchheister S, Buettner M, Glage S, Bleich A. Running in the wheel: Defining individual severity levels in mice. *PLoS Biol* 2018; 16: e2006159.

Hall C, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. University of California Publications in

Psychology 1932;

Hampshire V, Robertson S. Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring. *Lab Anim (NY)* 2015; 44: 259-60.

Hassan AM, Jain P, Mayerhofer R, Fröhlich EE, Farzi A, Reichmann F, Herzog H, Holzer P. Visceral hyperalgesia caused by peptide YY deletion and Y2 receptor antagonism. *Sci Rep* 2017; 7: 40968.

Healy JR, Tonkin JL, Kamarec SR, Saludes MA, Ibrahim SY, Matsumoto RR, Wimsatt JH. Evaluation of an improved sustained-release buprenorphine formulation for use in mice. *Am J Vet Res* 2014; 75: 619-25.

Helgers SOA, Talbot SR, Riedesel AK, Wassermann L, Wu Z, Krauss JK, Häger C, Bleich A, Schwabe K. Body weight algorithm predicts humane endpoint in an intracranial rat glioma model. *Sci Rep* 2020; 10: 9020.

Herrmann K, Flecknell P. Retrospective review of anesthetic and analgesic regimens used in animal research proposals. *Altex* 2019; 36: 65-80.

Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice-Assessing the degree of distress. *PLoS One* 2017; 12: e0179588.

Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C. Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice. *PLoS One* 2018; 13: e0203559.

Hohlbaum K, Frahm S, Rex A, Palme R, Thöne-Reineke C, Ullmann K. Social enrichment by separated pair housing of male C57BL/6JRj mice. *Sci Rep* 2020; 10: 11165.

Hovard A, Teilmann A, Hau J, Abelson K. The applicability of a gel delivery

system for self-administration of buprenorphine to laboratory mice. *Lab Anim* 2015; 49: 40-5.

Howerton CL, Garner JP, Mench JA. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. *Applied Animal Behaviour Science* 2008; 115: 90-103.

Hunt JR, Dean RS, Davis GN, Murrell JC. An analysis of the relative frequencies of reported adverse events associated with NSAID administration in dogs and cats in the United Kingdom. *Vet J* 2015; 206: 183-90.

Hurst JL, Beynon RJ. Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *Bioessays* 2004; 26: 1288-98.

Huss MK, Pacharinsak C. A Review of Long-acting Parenteral Analgesics for Mice and Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61: 595-602.

Ingrao JC, Johnson R, Tor E, Gu Y, Litman M, Turner PV. Aqueous stability and oral pharmacokinetics of meloxicam and carprofen in male C57BL/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013; 52: 553-9.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13: 222-57.

Iyengar S, Kim HS, Wood PL. Mu-, delta-, kappa- and epsilon-opioid receptor modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis: subchronic tolerance studies of endogenous opioid peptides. *Brain Res* 1987; 435: 220-6.

Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, Arras M. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 165.

Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Fleischmann T, Arras M. Individual housing of female mice: influence on postsurgical behaviour and recovery. *Lab Anim* 2012; 46: 325-34.

Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim* 2013; 47: 153-61.

Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 2014; 234: 139-46.

Jirkof P, Tourvieille A, Cinelli P, Arras M. Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Lab Anim* 2015; 49: 177-87.

Jirkof P, Durst M, Klopffleisch R, Palme R, Thöne-Reineke C, Buttgerit F, Schmidt-Bleek K, Lang A. Administration of Tramadol or Buprenorphine via the drinking water for post-operative analgesia in a mouse-osteotomy model. *Sci Rep* 2019; 9: 10749.

Jirkof P, Bratcher N, Medina L, Strasburg D, Ebert P, Gaskill BN. The effect of group size, age and handling frequency on inter-male aggression in CD 1 mice. *Sci Rep* 2020a; 10: 2253.

Jirkof P, Abdelrahman A, Bleich A, Durst M, Keubler L, Potschka H, Struve B, Talbot SR, Vollmar B, Zechner D, Häger C. A safe bet? Inter-laboratory variability in behaviour-based severity assessment. *Lab Anim* 2020b; 54: 73-82.

Jirkof P, Potschka H (2021) Effects of Untreated Pain, Anesthesia, and Analgesia in Animal Experimentation

Kahnau P, Habedank A, Diederich K, Lewejohann L. Behavioral Methods for Severity Assessment. *Animals (Basel)* 2020; 10

Kahnau P, Jaap A, Hobbiesiefken U, Mieske P, Diederich K, Thöne-Reineke C, Lewejohann L, Hohlbaum K. A preliminary survey on the occurrence of barbering in laboratory mice in Germany. *Animal Welfare* 2022; 31: 433-6.

Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P. Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav Processes* 2006; 71: 8-15.

Kamakura R, Kovalainen M, Leppäluoto J, Herzig KH, Mäkelä KA. The effects of group and single housing and automated animal monitoring on urinary corticosterone levels in male C57BL/6 mice. *Physiol Rep* 2016; 4

Kappel S, Hawkins P, Mendl MT. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals (Basel)* 2017; 7

Karolewicz B, Paul IA. Group housing of mice increases immobility and antidepressant sensitivity in the forced swim and tail suspension tests. *Eur J Pharmacol* 2001; 415: 197-201.

Kendall LV, Hansen RJ, Dorsey K, Kang S, Lunghofer PJ, Gustafson DL. Pharmacokinetics of sustained-release analgesics in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014; 53: 478-84.

Kendall LV, Bailey AL, Singh B, McGee W. Toxic Effects of High-dose Meloxicam and Carprofen on Female CD1 Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61: 75-80.

Keubler LM, Hoppe N, Potschka H, Talbot SR, Vollmar B, Zechner D, Häger C, Bleich A. Where are we heading? Challenges in evidence-based severity assessment. *Lab Anim* 2020; 54: 50-62.

Kiani AK, Pheby D, Henehan G, Brown R, Sieving P, Sykora P, Marks R, Falsini B, Capodicasa N, Miertus S, Lorusso L, Dondossola D, Tartaglia GM, Ergoren MC, Dundar M, Michelini S, Malacarne D, Bonetti G, Dautaj A, Donato K, Medori MC,

Beccari T, Samaja M, Connelly ST, Martin D, Morresi A, Bacu A, Herbst KL, Kapustin M, Stuppia L, Lumer L, Farronato G, Bertelli M. Ethical considerations regarding animal experimentation. *J Prev Med Hyg* 2022; 63: E255-e66.

Kikusui T, Winslow JT, Mori Y. Social buffering: relief from stress and anxiety. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006; 361: 2215-28.

Kim J, Cannon BA, Freeman LE, Tan S, Knych HK, Kendall LV. High-dose Meloxicam Provides Improved Analgesia in Female CD1 Mice: A Pharmacokinetic and Efficacy Study. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2023; 62: 74-80.

King H, Reiber M, Philippi V, Stirling H, Aulehner K, Bankstahl M, Bleich A, Buchecker V, Glasenapp A, Jirkof P, Miljanovic N, Schönhoff K, von Schumann L, Leenaars C, Potschka H. Anesthesia and analgesia for experimental craniotomy in mice and rats: a systematic scoping review comparing the years 2009 and 2019. *Front Neurosci* 2023; 17: 1143109.

Kinsley C, Svare B. Prenatal stress reduces intermale aggression in mice. *Physiol Behav* 1986; 36: 783-6.

Kohn DF, Martin TE, Foley PL, Morris TH, Swindle MM, Vogler GA, Wixson SK. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2007; 46: 97-108.

Kolbe T, Palme R, Tichy A, Rüllicke T. Lifetime Dependent Variation of Stress Hormone Metabolites in Feces of Two Laboratory Mouse Strains. *PLoS One* 2015; 10: e0136112.

König B. Maternal investment of communally nursing female house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behav Processes* 1993; 30: 61-73.

Koska I, van Dijk RM, Seiffert I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with

repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 2114-27.

Kudryavtseva NN, Smagin DA, Kovalenko IL, Vishnivetskaya GB. Repeated positive fighting experience in male inbred mice. *Nat Protoc* 2014; 9: 2705-17.

Kulkarni SK, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2007; 29: 343-8.

Kwiatkowski CC, Akaeze H, Ndlebe I, Goodwin N, Eagle AL, Moon K, Bender AR, Golden SA, Robison AJ. Quantitative standardization of resident mouse behavior for studies of aggression and social defeat. *Neuropsychopharmacology* 2021; 46: 1584-93.

LaChapelle DL, Hadjistavropoulos T, Craig KD. Pain measurement in persons with intellectual disabilities. *Clin J Pain* 1999; 15: 13-23.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML, Matsumiya L, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wong D, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Craig KD, Mogil JS. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010; 7: 447-9.

Larson CM, Wilcox GL, Fairbanks CA. The Study of Pain in Rats and Mice. *Comp Med* 2019; 69: 555-70.

Larson CM, Peterson CD, Kitto KF, Wilcox GL, Fairbanks CA. Sustained-release buprenorphine induces acute opioid tolerance in the mouse. *Eur J Pharmacol* 2020; 885: 173330.

Lascelles BDX, Kirkby Shaw K. An extended release local anaesthetic: potential for future use in veterinary surgical patients? *Vet Med Sci* 2016; 2: 229-38.

Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science* 2004; 86: 261-89.

Lawson GW. Etiopathogenesis of mandibulofacial and maxillofacial abscesses in mice. *Comp Med* 2010; 60: 200-4.

Leach MC, Klaus K, Miller AL, Scotto di Perrotolo M, Sotocinal SG, Flecknell PA. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One* 2012; 7: e35656.

Lee KH, Lee DW, Kang BC. The 'R' principles in laboratory animal experiments. *Lab Anim Res* 2020; 36: 45.

Lees P, Landoni MF, Giraudel J, Toutain PL. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. *J Vet Pharmacol Ther* 2004; 27: 479-90.

Lees P, Toutain PL, Elliott J, Giraudel JM, Pelligand L, King JN. Pharmacology, safety, efficacy and clinical uses of the COX-2 inhibitor robenacoxib. *J Vet Pharmacol Ther* 2022; 45: 325-51.

Lidster K, Owen K, Browne WJ, Prescott MJ. Cage aggression in group-housed laboratory male mice: an international data crowdsourcing project. *Sci Rep* 2019; 9: 15211.

Liebsch M, Grune B, Seiler A, Butzke D, Oelgeschläger M, Pirow R, Adler S, Riebeling C, Luch A. Alternatives to animal testing: current status and future perspectives. *Arch Toxicol* 2011; 85: 841-58.

Lisk RD, Pretlow RA, 3rd, Friedman SM. Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). *Anim Behav* 1969; 17: 730-7.

Liu X, Wu R, Tai F, Ma L, Wei B, Yang X, Zhang X, Jia R. Effects of group housing on stress induced emotional and neuroendocrine alterations. *Brain Res* 2013; 1502: 71-80.

Lockworth CR, Kim SJ, Liu J, Palla SL, Craig SL. Effect of Enrichment Devices on Aggression in Manipulated Nude Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015; 54: 731-6.

Long SY. Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Animal Behaviour* 1972; 20: 10-2.

Löscher W, Richter A, Potschka H (2014) *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren: Begründet von W. Löscher, FR Ungemach und R. Kroker.* Georg Thieme Verlag

Löscher W, Richter A (2016) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: Begründet von Hans-Hasso Frey und Wolfgang Löscher.* Enke Verlag in Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart

Lucki I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav Pharmacol* 1997; 8: 523-32.

Lutman B, Bloom J, Nussenblatt B, Romo V. A Contemporary Perspective on the Management of Post-Craniotomy Headache and Pain. *Curr Pain Headache Rep* 2018; 22: 69.

Maher RL, Barbash SM, Lynch DV, Swoap SJ. Group housing and nest building only slightly ameliorate the cold stress of typical housing in female C57BL/6J mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015; 308: R1070-9.

Mallien A (2023) Group versus individual housing in male and female laboratory mice: A multicenter study reveals only subtle differences in severity 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, 27.08.2023. Niagara

Falls, Canada. 284-5

Mallien AS, Häger C, Palme R, Talbot SR, Vogt MA, Pfeiffer N, Brandwein C, Struve B, Inta D, Chourbaji S, Hellweg R, Vollmayr B, Bleich A, Gass P. Systematic analysis of severity in a widely used cognitive depression model for mice. *Lab Anim* 2020; 54: 40-9.

Mallien AS, Pfeiffer N, Brandwein C, Inta D, Sprengel R, Palme R, Talbot SR, Gass P. Comparative Severity Assessment of Genetic, Stress-Based, and Pharmacological Mouse Models of Depression. *Front Behav Neurosci* 2022; 16: 908366.

Manzanares G, Brito-da-Silva G, Gandra PG. Voluntary wheel running: patterns and physiological effects in mice. *Braz J Med Biol Res* 2018; 52: e7830.

Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 2003; 43: 281-92.

Marx JO, Brice AK, Boston RC, Smith AL. Incidence rates of spontaneous disease in laboratory mice used at a large biomedical research institution. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2013; 52: 782-91.

Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wieskopf JS, Zaloum A, King OD, Mogil JS. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2012; 51: 42-9.

McMullan RC, Kelly SA, Hua K, Buckley BK, Faber JE, Pardo-Manuel de Villena F, Pomp D. Long-term exercise in mice has sex-dependent benefits on body composition and metabolism during aging. *Physiol Rep* 2016; 4

Meijer JH, Robbers Y. Wheel running in the wild. *Proc Biol Sci* 2014; 281

Meijer MK, Sommer R, Spruijt BM, van Zutphen LF, Baumans V. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim* 2007; 41: 161-73.

Meikle D, Westberg M. Social dominance rank and accessory sex glands in wild adult male house mice born to food-deprived mothers. *Physiol Behav* 2001; 72: 359-64.

Mellor DJ, Reid C. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. 1994;

Mendl M, Paul, E. Litter composition affects parental care, offspring growth and the development of aggressive behaviour in wild house mice. *Behaviour* 1991b; 116: 90-108.

Mertens S, Vogt MA, Gass P, Palme R, Hiebl B, Chourbaji S. Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrl mice. *PLoS One* 2019; 14: e0215367.

Miczek KA, Maxson SC, Fish EW, Faccidomo S. Aggressive behavioral phenotypes in mice. *Behav Brain Res* 2001; 125: 167-81.

Miller A, Kitson G, Skalkoyannis B, Leach M. The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. *Appl Anim Behav Sci* 2015; 172: 58-62.

Miller AL, Wright-Williams SL, Flecknell PA, Roughan JV. A comparison of abdominal and scrotal approach methods of vasectomy and the influence of analgesic treatment in laboratory mice. *Lab Anim* 2012; 46: 304-10.

Miller AL, Leach MC. Using the mouse grimace scale to assess pain associated with routine ear notching and the effect of analgesia in laboratory mice. *Lab Anim*

2015; 49: 117-20.

Miller CH, Hillock MF, Yang J, Carlson-Clarke B, Haxhillari K, Lee AY, Warden MR, Sheehan MJ. Dynamic changes to signal allocation rules in response to variable social environments in house mice. *Communications Biology* 2023; 6: 297.

Miranda HF, Romero MA, Puig MM. Antinociceptive and anti-exudative synergism between dexketoprofen and tramadol in a model of inflammatory pain in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2012; 26: 373-82.

Miranda HF, Sierralta F, Aranda N, Poblete P, Noriega V, Prieto JC. Synergism between gabapentin-tramadol in experimental diabetic neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol* 2018; 32: 581-8.

Mogil JS. Qualitative sex differences in pain processing: emerging evidence of a biased literature. *Nat Rev Neurosci* 2020; 21: 353-65.

Möller C, van Dijk RM, Wolf F, Keck M, Schönhoff K, Bierling V, Potschka H. Impact of repeated kindled seizures on heart rate rhythms, heart rate variability, and locomotor activity in rats. *Epilepsy Behav* 2019; 92: 36-44.

Moody CM, Paterson EA, Leroux-Petersen D, Turner PV. Using Paper Nest Pucks to Prevent Barbering in C57BL/6 Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2021; 60: 133-8.

Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R, Champeroux P, Richard S. An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodents. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2007; 56: 239-55.

Mösch L, Kunczik J, Breuer L, Merhof D, Gass P, Potschka H, Zechner D, Vollmar B, Tolba R, Häger C, Bleich A, Czaplík M, Pereira CB. Towards substitution of invasive telemetry: An integrated home cage concept for unobtrusive monitoring of objective physiological parameters in rodents. *PLoS One* 2023; 18: e0286230.

Mota-Rojas D, Olmos-Hernández A, Verduzco-Mendoza A, Hernández E, Martínez-Burnes J, Whittaker AL. The Utility of Grimace Scales for Practical Pain Assessment in Laboratory Animals. *Animals (Basel)* 2020; 10

Mountain RV, Langlais AL, Hu D, Baron R, Lary CW, Motyl KJ. Social isolation through single housing negatively affects trabecular and cortical bone in adult male, but not female, C57BL/6J mice. *Bone* 2023; 172: 116762.

Muralidharan A, Sotocinal SG, Austin JS, Mogil JS. The influence of aging and duration of nerve injury on the antiallodynic efficacy of analgesics in laboratory mice. *Pain Rep* 2020; 5: e824.

Muta O, Odaka M, Fujii Y, Fushimi T, Sato H, Osakabe N. Difference in endocrine and behavior between short-term single- and paired-housing mice in metabolic cage. *Neurosci Lett* 2023; 806: 137246.

Nagy TR, Krzywanski D, Li J, Meleth S, Desmond R. Effect of group vs. single housing on phenotypic variance in C57BL/6J mice. *Obes Res* 2002; 10: 412-5.

Navarro KL, Huss M, Smith JC, Sharp P, Marx JO, Pacharinsak C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. *Ilar j* 2021; 62: 238-73.

Ohyama K, Shiokawa A, Ito K, Masuyama R, Ichibangase T, Kishikawa N, Imai K, Kuroda N. Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 420: 210-5.

Oliver VL, Thurston SE, Lofgren JL. Using Cageside Measures to Evaluate Analgesic Efficacy in Mice (*Mus musculus*) after Surgery. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2018; 57: 186-201.

Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim* 2002; 36: 243-70.

Oortmerssen GA, TH. G. M. BAKKER Artificial selection for high and low attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behavior Genetics* 1981; 11: 115-26.

Orr PM, Shank BC, Black AC. The Role of Pain Classification Systems in Pain Management. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2017; 29: 407-18.

Ortega-Saez I, Díez-Solinska A, Grífols R, Martí C, Zamora C, Muñoz-Culla M, Vegas O, Azkona G. Individualized Housing Modifies the Immune-Endocrine System in CD1 Adult Male Mice. *Animals (Basel)* 2023; 13

Padmanabhan P, Grosse J, Asad ABMA, Radda GK, Golay X. Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI research* 2013; 3: 1-8.

Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail M. Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Animal Reproduction Science* 1996; 43: 43-63.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *J Cereb Blood Flow Metab* 2020; 40: 1769-77.

Pereira C, Kunczik J, Bleich A, Haeger C, Kiessling F, Thum T, Tolba R, Lindauer U, Treue S, Czaplak M. Perspective review of optical imaging in welfare assessment in animal-based research. *J Biomed Opt* 2019; 24: 1-11.

Pereira CB, Kunczik J, Zieglowski L, Tolba R, Abdelrahman A, Zechner D, Vollmar B, Janssen H, Thum T, Czaplak M. Remote Welfare Monitoring of Rodents Using Thermal Imaging. *Sensors (Basel)* 2018; 18

Pernold K, Rullman E, Ulfhake B. Major oscillations in spontaneous home-cage activity in C57BL/6 mice housed under constant conditions. *Sci Rep* 2021; 11: 4961.

Pluta SR, Lyall EH, Telian GI, Ryapolova-Webb E, Adesnik H. Surround Integration Organizes a Spatial Map during Active Sensation. *Neuron* 2017; 94: 1220-33.e5.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977a; 266: 730-2.

Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1977b; 229: 327-36.

Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 40: 1-5.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.

R Core Team (2022) R: A Language and Environment for Statistical Computing R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

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

Reiber M, Stirling H, Sprengel R, Gass P, Palme R, Potschka H. Phenotyping Young GluA1 Deficient Mice - A Behavioral Characterization in a Genetic Loss-of-Function Model. *Front Behav Neurosci* 2022a; 16: 877094.

Reiber M, Koska I, Pace C, Schönhoff K, von Schumann L, Palme R, Potschka H.

Development of behavioral patterns in young C57BL/6J mice: a home cage-based study. *Sci Rep* 2022b; 12: 2550.

Reiber M, Miljanovic N, Schönhoff K, Palme R, Potschka H. Behavioral phenotyping of young *Scn1a* haploinsufficient mice. *Epilepsy Behav* 2022c; 136: 108903.

Reiber M, von Schumann L, Buchecker V, Boldt L, Gass P, Bleich A, Talbot SR, Potschka H. Evidence-based comparative severity assessment in young and adult mice. *PLoS One* 2023; 18: e0285429.

Rivat C, Ballantyne J. The dark side of opioids in pain management: basic science explains clinical observation. *Pain Rep* 2016; 1: e570.

Roberts SA, Prescott MC, Davidson AJ, McLean L, Beynon RJ, Hurst JL. Individual odour signatures that mice learn are shaped by involatile major urinary proteins (MUPs). *BMC Biol* 2018; 16: 48.

Rossi HL, See LP, Foster W, Pitake S, Gibbs J, Schmidt B, Mitchell CH, Abdus-Saboor I. Evoked and spontaneous pain assessment during tooth pulp injury. *Sci Rep* 2020; 10: 2759.

Roughan JV, Wright-Williams SL, Flecknell PA. Automated analysis of postoperative behaviour: assessment of HomeCageScan as a novel method to rapidly identify pain and analgesic effects in mice. *Lab Anim* 2009; 43: 17-26.

Roughan JV, Coulter CA, Flecknell PA, Thomas HD, Sufka KJ. The conditioned place preference test for assessing welfare consequences and potential refinements in a mouse bladder cancer model. *PLoS One* 2014; 9: e103362.

Roughan JV, Bertrand HG, Isles HM. Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. *Eur J Pain* 2016; 20: 231-40.

Roughan JV, Sevenoaks T. Welfare and Scientific Considerations of Tattooing and Ear Tagging for Mouse Identification. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2019; 58: 142-53.

Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen

Ryan V, Wehmer F. Effect of postnatal litter size on adult aggression in the laboratory mouse. *Dev Psychobiol* 1975; 8: 363-70.

Saenz M, Bloom-Saldana EA, Synold T, Ermel RW, Fueger PT, Finlay JB. Pharmacokinetics of Sustained-release and Extended-release Buprenorphine in Mice after Surgical Catheterization. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2022; 61: 468-74.

Sarfaty AE, Zeiss CJ, Willis AD, Harris JM, Smith PC. Concentration-dependent Toxicity after Subcutaneous Administration of Meloxicam to C57BL/6N Mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2019; 58: 802-9.

Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res* 2000; 108: 39-45.

Schmeisser S, Miccoli A, von Bergen M, Berggren E, Braeuning A, Busch W, Desaintes C, Gourmelon A, Grafström R, Harrill J, Hartung T, Herzler M, Kass GEN, Kleinstreuer N, Leist M, Luijten M, Marx-Stoelting P, Poetz O, van Ravenzwaay B, Roggeband R, Rogiers V, Roth A, Sanders P, Thomas RS, Marie Vinggaard A, Vinken M, van de Water B, Luch A, Tralau T. New approach methodologies in human regulatory toxicology - Not if, but how and when! *Environ Int* 2023; 178: 108082.

Schreiner V, Durst M, Arras M, Detampel P, Jirkof P, Huwyler J. Design and in vivo evaluation of a microparticulate depot formulation of buprenorphine for veterinary use. *Sci Rep* 2020; 10: 17295.

Seiffert I, van Dijk RM, Koska I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 1539-51.

Sellmeijer J, Mathis V, Hugel S, Li XH, Song Q, Chen QY, Barthas F, Lutz PE, Karatas M, Luthi A, Veinante P, Aertsen A, Barrot M, Zhuo M, Yalcin I. Hyperactivity of Anterior Cingulate Cortex Areas 24a/24b Drives Chronic Pain-Induced Anxiodepressive-like Consequences. *J Neurosci* 2018; 38: 3102-15.

Sensini F, Inta D, Palme R, Brandwein C, Pfeiffer N, Riva MA, Gass P, Mallien AS. The impact of handling technique and handling frequency on laboratory mouse welfare is sex-specific. *Scientific Reports* 2020; 10: 17281.

Shepherd JK, Grewal SS, Fletcher A, Bill DJ, Dourish CT. Behavioural and pharmacological characterisation of the elevated "zero-maze" as an animal model of anxiety. *Psychopharmacology (Berl)* 1994; 116: 56-64.

Sherwin CM. Observations on the prevalence of nest-building in non-breeding TO strain mice and their use of two nesting materials. *Lab Anim* 1997; 31: 125-32.

Shikanov A, Domb AJ, Weiniger CF. Long acting local anesthetic-polymer formulation to prolong the effect of analgesia. *J Control Release* 2007; 117: 97-103.

Silva A, Costa B, Castro I, Mourão J, Vale N. New Perspective for Drug-Drug Interaction in Perioperative Period. *J Clin Med* 2023; 12

Simko TWaV (2021) R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix, Version 0.92 edn

Simon NG, Gray JL, Gandelman R. An empirically derived scoring system for intermale aggression in mice. *Aggressive Behavior* 1983; 9: 157-66.

Smith BJ, Bruner KEP, Hess AM, Kendall LV. Female Urine-induced Ultrasonic Vocalizations in Male C57BL/6J Mice as a Proxy Indicator for Postoperative Pain. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2020; 59: 204-11.

Smith D, Anderson D, Degryse AD, Bol C, Criado A, Ferrara A, Franco NH, Gyertyan I, Orellana JM, Ostergaard G, Varga O, Voipio HM. Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. *Lab Anim* 2018; 52: 5-57.

Smith FL. Regional cutaneous differences in the duration of bupivacaine local anesthesia in mice. *Life Sci* 1997; 60: 1613-21.

Smith JC. A Review of Strain and Sex Differences in Response to Pain and Analgesia in Mice. *Comp Med* 2019; 69: 490-500.

Sokolsky-Papkov M, Golovanevski L, Domb AJ, Weiniger CF. Prolonged local anesthetic action through slow release from poly (lactic acid co castor oil). *Pharm Res* 2009; 26: 32-9.

Sollars PJ, Weiser MJ, Kudwa AE, Bramley JR, Ogilvie MD, Spencer RL, Handa RJ, Pickard GE. Altered entrainment to the day/night cycle attenuates the daily rise in circulating corticosterone in the mouse. *PLoS One* 2014; 9: e111944.

Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, Wieskopf JS, Acland EL, Dokova A, Kadoura B, Leger P, Mapplebeck JC, McPhail M, Delaney A, Wigerblad G, Schumann AP, Quinn T, Frasnelli J, Svensson CI, Sternberg WF, Mogil JS. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods* 2014; 11: 629-32.

Sorge RE, Totsch SK. Sex Differences in Pain. *J Neurosci Res* 2017; 95: 1271-81.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The

Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011; 7: 55.

Spackman DH, Riley V. Corticosterone concentrations in the mouse. *Science* 1978; 200: 87-.

Späni D, Arras M, König B, Rüllicke T. Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Lab Anim* 2003; 37: 54-62.

Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim* 2009; 43: 149-54.

Strech D, Dirnagl U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Sci* 2019; 3

Swan J, Boyer S, Westlund K, Bengtsson C, Nordahl G, Törnqvist E. Decreased levels of discomfort in repeatedly handled mice during experimental procedures, assessed by facial expressions. *Front Behav Neurosci* 2023; 17: 1109886.

Takeda N, Hasegawa S, Morita M, Matsunaga T. Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research. *Pharmacol Biochem Behav* 1993; 45: 817-21.

Talbot SR, Biernot S, Bleich A, van Dijk RM, Ernst L, Häger C, Helgers SOA, Koegel B, Koska I, Kuhla A, Miljanovic N, Müller-Graff FT, Schwabe K, Tolba R, Vollmar B, Weegh N, Wölk T, Wolf F, Wree A, Zieglowski L, Potschka H, Zechner D. Defining body-weight reduction as a humane endpoint: a critical appraisal. *Lab Anim* 2020; 54: 99-110.

Talbot SR, Struve B, Wassermann L, Heider M, Weegh N, Knappe T, Hofmann MCJ, von Knethen A, Jirkof P, Häger C, Bleich A. 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.

Talbot SR (2022) Composite measure schemes (CMS) for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research

Talbot SR, Kumstel S, Schulz B, Tang G, Abdelrahman A, Seume N, Wendt EHU, Eichberg J, Häger C, Bleich A, Vollmar B, Zechner D. Robustness of a multivariate composite score when evaluating distress of animal models for gastrointestinal diseases. *Sci Rep* 2023; 13: 2605.

Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2015; 54: 120-32.

Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and Cons of Clinically Relevant Methods to Assess Pain in Rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 2019; 100: 335-43.

Tappe-Theodor A, Pitzer C, Lewejohann L, Jirkof P, Siegeler K, Segelcke A, Drude N, Pradier B, Pogatzki-Zahn E, Hollinderbäumer B, Segelcke D. The "WWHow" Concept for Prospective Categorization of Post-operative Severity Assessment in Mice and Rats. *Front Vet Sci* 2022; 9: 841431.

Tecott LH, Nestler EJ. Neurobehavioral assessment in the information age. *Nat Neurosci* 2004; 7: 462-6.

Teeling JL, Felton LM, Deacon RM, Cunningham C, Rawlins JN, Perry VH. Subpyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain Behav Immun* 2007; 21: 836-50.

Tennant F. The physiologic effects of pain on the endocrine system. *Pain Ther* 2013; 2: 75-86.

Theil JH, Ahloy-Dallaire J, Weber EM, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Felt SA, Garner JP. The epidemiology of fighting in group-housed laboratory mice. *Sci Rep*

2020; 10: 16649.

Tirado-Muñiz N, Spangler TL, Van Rooyen H, Oakes JB, Doerning BJ, Suckow MA. Evaluation of Cage Mate-induced Postsurgical Trauma in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2023; 62: 170-8.

Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol* 2003; 130: 267-78.

Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav* 2004; 45: 10-22.

Touma C, Palme R. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1046: 54-74.

Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 2008; 11: S133-53.

Trunnell ER, Carvalho C. The forced swim test has poor accuracy for identifying novel antidepressants. *Drug Discov Today* 2021; 26: 2898-904.

Turner PV, Pang DS, Lofgren JL. A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. *Comp Med* 2019; 69: 451-67.

Ulker E, Caillaud M, Koseli E, Contreras K, Alkhlaif Y, Lindley E, Barik M, Ghani S, Bryant CD, Imad Damaj M. Comparison of Pain-Like behaviors in two surgical incision animal models in C57BL/6J mice. *Neurobiol Pain* 2022; 12: 100103.

Vagima Y, Grauer E, Politi B, Maimon S, Yitzhak E, Melamed S, Achdout H, Gur D, Aftalion M, Shemesh A, Hasson A, Yitzhaki S, Shapira SC, Mamroud E. Group activity of mice in communal home cage used as an indicator of disease progression

and rate of recovery: Effects of LPS and influenza virus. *Life Sci* 2020; 258: 118214.

Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim* 1997; 31: 133-43.

van den Broek FA, Omtzigt CM, Beynen AC. Whisker trimming behaviour in A2G mice is not prevented by offering means of withdrawal from it. *Lab Anim* 1993; 27: 270-2.

van Dijk RM, Koska I, Bleich A, Tolba R, Seiffert I, Möller C, Di Liberto V, Talbot SR, Potschka H. Design of composite measure schemes for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research: A case study focussed on rat epilepsy models. *PLoS One* 2020; 15: e0230141.

Van Loo P, Kruitwagen C, Van Zutphen L, Koolhaas J, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of cage cleaning regime and scent marks. *Animal Welfare* 2000; 9: 281-95.

Van Loo PL, de Groot AC, Van Zutphen BF, Baumans V. Do male mice prefer or avoid each other's company? Influence of hierarchy, kinship, and familiarity. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 2001a; 4: 91-103.

Van Loo PL, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen BF, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav* 2001b; 72: 675-83.

Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim* 2004; 38: 178-88.

Varholick JA, Pontiggia A, Murphy E, Daniele V, Palme R, Voelkl B, Würbel H,

Bailoo JD. Social dominance hierarchy type and rank contribute to phenotypic variation within cages of laboratory mice. *Sci Rep* 2019; 9: 13650.

Viscardi AV, Hunniford M, Lawlis P, Leach M, Turner PV. Development of a Piglet Grimace Scale to Evaluate Piglet Pain Using Facial Expressions Following Castration and Tail Docking: A Pilot Study. *Front Vet Sci* 2017; 4: 51.

von Engelhardt W, Breves G, Diener M, Gäbel G (2015) *Physiologie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag

Walker M, Mason G. A comparison of two types of running wheel in terms of mouse preference, health, and welfare. *Physiol Behav* 2018; 191: 82-90.

Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychological bulletin* 1976; 83: 482.

Weber EM, Dallaire JA, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Garner JP. Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem? *Lab Anim (NY)* 2017; 46: 157-61.

Weber EM, Zidar J, Ewaldsson B, Askevik K, Udén E, Svensk E, Törnqvist E. Aggression in Group-Housed Male Mice: A Systematic Review. *Animals (Basel)* 2022; 13

Weber JN, Peterson BK, Hoekstra HE. Discrete genetic modules are responsible for complex burrow evolution in *Peromyscus* mice. *Nature* 2013; 493: 402-5.

Webster LR, Camilleri M, Finn A. Opioid-induced constipation: rationale for the role of norbuprenorphine in buprenorphine-treated individuals. *Subst Abuse Rehabil* 2016; 7: 81-6.

Weegh N, Zentrich E, Zechner D, Struve B, Wassermann L, Talbot SR, Kumstel S, Heider M, Vollmar B, Bleich A, Häger C. Voluntary wheel running behaviour as a

tool to assess the severity in a mouse pancreatic cancer model. *PLoS One* 2021; 16: e0261662.

Whittaker AL, Liu Y, Barker TH. Methods Used and Application of the Mouse Grimace Scale in Biomedical Research 10 Years on: A Scoping Review. *Animals (Basel)* 2021; 11

Wickham H (2016) *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York

Williams AC. Facial expression of pain: an evolutionary account. *Behav Brain Sci* 2002; 25: 439-55; discussion 55-88.

Wolter A, Bucher CH, Kurmies S, Schreiner V, Konietschke F, Hohlbaum K, Klopffleisch R, Löhning M, Thöne-Reineke C, Buttgereit F, Huwyler J, Jirkof P, Rapp AE, Lang A. A buprenorphine depot formulation provides effective sustained post-surgical analgesia for 72 h in mouse femoral fracture models. *Sci Rep* 2023; 13: 3824.

Wright-Williams SL, Courade JP, Richardson CA, Roughan JV, Flecknell PA. Effects of vasectomy surgery and meloxicam treatment on faecal corticosterone levels and behaviour in two strains of laboratory mouse. *Pain* 2007; 130: 108-18.

Zechner D, Schulz B, Tang G, Abdelrahman A, Kumstel S, Seume N, Palme R, Vollmar B. Generalizability, Robustness and Replicability When Evaluating Wellbeing of Laboratory Mice with Various Methods. *Animals (Basel)* 2022; 12

Zegeren KV. Variation in Aggressiveness and the Regulation of Numbers in House Mouse Populations. *Netherlands Journal of Zoology* 1979; 30: 635-770.

Zelcer S, Kolesnikov Y, Kovalyshyn I, Pasternak DA, Pasternak GW. Selective potentiation of opioid analgesia by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Brain Res* 2005; 1040: 151-6.

X. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Das nozizeptive System.</i>	53
<i>Abbildung 2: Studiendesign Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung.</i>	77
<i>Abbildung 3: Studiendesign Refinement der Analgesie für murine Kraniotomien.</i>	83
<i>Abbildung 4: Körperregionen der Maus.</i>	88
<i>Abbildung 5: Entwicklung des Körpergewichtes.</i>	102
<i>Abbildung 6: Wund-Score.</i>	103
<i>Abbildung 7: Barbering.</i>	104
<i>Abbildung 8: Wühlverhalten.</i>	107
<i>Abbildung 9: Nestbauverhalten.</i>	108
<i>Abbildung 10: Open-Field-Test.</i>	110
<i>Abbildung 11: Elevated-Zero-Maze-Test.</i>	111
<i>Abbildung 12: Forced-Swim-Test.</i>	112
<i>Abbildung 13: FCMs.</i>	113
<i>Abbildung 14: Spearman-Korrelationsanalyse Einzelhaltung.</i>	115
<i>Abbildung 15: Spearman-Korrelationsanalyse Gruppenhaltung.</i>	116
<i>Abbildung 16: Veränderung des Körpergewichts und Neuro-Scores.</i>	119
<i>Abbildung 17: MGS.</i>	121
<i>Abbildung 18: Wühlverhalten.</i>	124
<i>Abbildung 19: Nestbauverhalten.</i>	125
<i>Abbildung 20: Aktivität im Heimkäfig.</i>	127
<i>Abbildung 21: Laufradaktivität.</i>	128
<i>Abbildung 22: FCMs.</i>	130
<i>Abbildung 23: Wasseraufnahme und Carprofenkonzentration im Plasma.</i>	132
<i>Abbildung 24: Histopathologische Untersuchung.</i>	134
<i>Abbildung 25: Composite Measure Scheme.</i>	141
<i>Abbildung 26: Scree-Plot Männchen.</i>	247
<i>Abbildung 27: Scree-Plot Weibchen.</i>	247

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Refinement-Ansätze.</i>	50
<i>Tabelle 2: Schmerzinduzierte Veränderung von Parametern.</i>	58
<i>Tabelle 3: Wund-Score.</i>	88
<i>Tabelle 4: Fell- und Vibrissen-Score.</i>	89
<i>Tabelle 5: Aggressionsbeobachtung.</i>	105
<i>Tabelle 6: Zusammenfassung signifikant veränderter Parameter.</i>	135
<i>Tabelle 7: Übersicht Geräte.</i>	222
<i>Tabelle 8: Übersicht Software.</i>	222
<i>Tabelle 9: Übersicht Medikamente und Substanzen.</i>	225
<i>Tabelle 10: Erklärung der Neuro-Score Einzelparameter.</i>	227
<i>Tabelle 11: Parametererläuterung.</i>	233
<i>Tabelle 12: Spearman-Korrelationsanalyse Gruppenhaltung.</i>	233
<i>Tabelle 13: Spearman-Korrelationsanalyse Einzelhaltung.</i>	233
<i>Tabelle 14: Pilotstudie.</i>	236
<i>Tabelle 15: Weitere signifikante Unterschiede.</i>	236
<i>Tabelle 16: Ergebnisse Neuro-Score.</i>	243
<i>Tabelle 17: Histopathologische Untersuchung.</i>	244
<i>Tabelle 18: Parametererläuterung.</i>	245
<i>Tabelle 19: Spearman-Korrelationsanalyse Männchen.</i>	246
<i>Tabelle 20: Spearman-Korrelationsanalyse Weibchen.</i>	246
<i>Tabelle 21: 30 Hauptparameter Männchen.</i>	248
<i>Tabelle 22: 30 Hauptparameter Weibchen.</i>	249
<i>Tabelle 23: Clusteranalyse Männchen.</i>	250
<i>Tabelle 24: Clusteranalyse Weibchen.</i>	251

3. Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage acculab ATILON	Acculab Corporation, New York, USA
Analysenwaage CPA124 5-0CE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Dentalbohrer	Fischer Goldschmiedebedarf, Pforzheim, Deutschland
FLIR E95 Wärmebildkamera	Teledyne FLIR LLC, Wilsonville, USA
Gekühlte Tisch-Mikrozentrifuge 5418 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Luxmeter (Light meter, MS 1300, Voltcraft)	Conrad Electronic SE, Hirschau, Deutschland
Makrolon-Typ-II und Typ-III-Käfige und Trinkflaschen	Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen, Deutschland
Mikrozentrifuge MIKRO 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Perfusionspumpe	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
PhenoTyper® Käfigsystem	Noldus, Wageningen, Niederlande
Schüttler Stuart SI 50 Orbital Shaking Incubator	Stuart Scientific Co. Ltd, Nottingham, Großbritannien
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Tiefenstimulationselektrode	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Tischwaage FCB 3KO.1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
(Video-)Kameras	Lumix DMC-LF1, Panasonic Corporation, Kadoma, Japan; Spiegelreflexkamera EOS 800D Digitalkamera +EF-S 18-55 mm f/4-5,6 IS STM Objektiv,

	Canon Inc., Tokyo, Japan; GoPro Hero 9, GoPro, San Mateo, USA; CCTV Kamera, Panasonic, Suzhou, China; Axis M1065-L Netzwerk Kamera, Axis Communications AB, Lund, Schweden
Vortexer RapidVap	LABCONCO, Kansas City, MO, USA

Tabelle 7: Übersicht Geräte.**4. Software**

Software	Hersteller
BioRender	BioRender AG, Münchwilen Thurgau, Deutschland; akademische Lizenz
EthoVisionXT 8.5, EthoVision XT 15	Noldus, Wageningen, Niederlande; RRID:SCR_000441
G*Power 3.1.9.2	Universität Düsseldorf
GraphPad Prism Version 10.0.2.	GraphPad Software, Boston, MA, USA; RRID:SCR_002798
MGS Tool für die Bildverarbeitung und das Scoren	Kooperationspartner: Prof. Dr.-Ing. Dorit Merhof, Lehrstuhl für Bildverarbeitung, RWTH Aachen (ERNST et al., 2020b; ERNST et al., 2020a)
R Version 4.1.1	(R CORE TEAM, 2022)
R-packages: 1) <i>corrplot</i> Version 0.92 2) <i>ggplot2</i> 3) <i>cms</i>	1) (SIMKO, 2021) 2) (WICKHAM, 2016) 3) (TALBOT, 2022)

Tabelle 8: Übersicht Software.

5. Lösungen, Medikamente und Substanzen

Lösungen:

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

- 45,43 g/l Na_2HPO_4 (wasserfrei)
- 12,48 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- in Aqua bidest. lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

- 0,4 M Phosphatpuffer (1l) mit deionisiertem H_2O (1l) verdünnen

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

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

Paraformaldehyd (8%ig)

- Aqua dest. auf 60 – 70 °C erhitzen (800 ml)
- 80 g Paraformaldehyd hinzugeben
- Tropfenweise 6 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird
- Lösung abkühlen lassen
- mit Aqua. bidest. auf 1 l auffüllen
- anschließend filtrieren

Paraformaldehyd (4%ig)

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

Saccharin-Lösung (0,2%ig)

- 0,2 g Saccharin $\geq 98\%$
- 100 ml Wasser

Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (30%ig)

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

Medikamente und Substanzen:

Medikamente	Hersteller
Aqua inieciabilia	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Bupivacain 0,5 % mit Epinephrin 0,0005 % (1:200 000) JENAPHARM®, Injektionslösung	Mibe GmbH Arzneimittel, Brehna, Deutschland
Carprofen (Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Isofluran CP® (Isofluran 1 ml/ml)	VP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf, Deutschland
Metamizol (Vetalgin®)	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung, isoton	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Octenisept®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Pentobarbital (Narkodorm®)	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland
Ringer-Laktat-Infusionslösung	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Substanzen	Hersteller
Essigsäure (≥ 99.8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	Besamungsstation München/Grub, Deutschland
Gefriermedium (Tissue-Tek® O.C.T Compound)	Sakura Fintec Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Methanol (100%ig)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	VWR International GmbH, Darmstadt,

(Na ₂ HPO ₄)	Deutschland
Saccharin >98%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Deutschland
Zahnzement (Paladur®)	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland

Tabelle 9: Übersicht Medikamente und Substanzen.

6. Neuro-Score

Parameter	Scoring Bereich	Beschreibung
Beobachtung im Heimkäfig		
Körperlage	[-2] – [2]	flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus / teilweise konservierter Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen / normale Haltung / starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Ophisthotonus) / Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden
Beckenhöhe	[-1] – [1]	Abgeflacht / kaum verändert / etwas erhöht
Schwanzhöhe	[-1] – [2]	Nachschleifen des Schwanzes beim Gehen / normale Schwanzposition / aufgestellter Schwanz (max. 90 ° Winkel) während Ruhe und Aktivitätsperiode, teilweise Schwanzschlagen / Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)
Beinrotation (außen)	[0] – [2]	Nicht vorhanden / leicht / deutlich
Lokomotorische Aktivität	[-2] – [2]	keine Aktivität / verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten / normale Aktivität / erhöhte, kraftvolle, winklige Bewegungen / ruheloser Bewegungstyp
Ptosis (Lidschluss)	[0] – [2]	Augenlider geöffnet / Augenlider partiell geöffnet / Augenlider geschlossen
Exophthalmus	[0] – [2]	kein Exophthalmus / leichter Exophthalmus / ausgeprägter Exophthalmus
Lakrimation	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Hypersalivation	[0] / [1]	Nicht vorhanden / vorhanden
Atemfrequenz	[-2] – [2]	Schnappatmung, akute Atemnot / verminderte, unregelmäßige, angespannte Atmung / normale Atmung / erhöhte Atemfrequenz / erhöhte Atemfrequenz, aber auch während der Ruheperiode
Piloerektion	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Hautdurchblutung	[-2] – [2]	Schwanz und Pfoten bläulich verfärbt: Zyanose / fast weiße Ohrmuschel, Pfoten oder Schwanz mit kaum sichtbaren Gefäßen / normale Hautdurchblutung / Pfoten dunkelrosa, Schwanz stark hellrosa / Pfoten, Ohrmuschel oder Schwanz rot
Ataxie	[0] – [2]	keine Ataxie / Koordinationsprobleme beim Laufen / Verlust der Bewegungskoordination
Stereotypien	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Freezing	[0] – [2]	kein Freezing / leichtes Freezing sichtbar / deutliches, abruptes Freezing
Zittern	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Zuckungen	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Krämpfe	[0] / [2]	Nicht vorhanden / vorhanden
Vokalisation (ohne Handling)	[0] – [2]	keine Vokalisation / zeitweise spontan auftretendes, leises Piepsen / häufiges spontan auftretendes, stärkeres Piepsen
Fäzes	[-1] – [2]	kein oder kaum Kot im Käfig / Kotbeschaffenheit und Menge normal / Kotmenge deutlich erhöht / fast

Implantatbereich	[-2] – [2]	hochgradige nekrotische Veränderungen im Implantatbereich / leichte nekrotische Veränderungen im Implantatbereich / unauffälliger Implantatbereich / kleine Entzündung im Implantatbereich / hochgradige Entzündung im Implantatbereich
Bei abgehobenem Käfigdeckel		
Neugier (auf Zeigen eines Objektes, z.B. Stift)	[-2] – [2]	keine Reaktion / verminderte Neugier / normal, Interesse an präsentiertem Objekt / ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug / Angriffsverhalten
Schreckhaftigkeit (bei Klopfen an Käfigwand)	[-2] – [2]	keine Reaktion / verzögerte oder weniger Reaktion / normal / Flucht / starke Reaktion, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren, Drücken auf dem Boden oder vorübergehendes Einfrieren („freezing“)
Berührungsreaktion	[-2] – [2]	Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion / nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen) / normale Reaktion auf leichte Berührung / Ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung / Flucht über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisierung auf leichte Berührung
Bei Fixation und Handling		
Vokalisation (während der Fixation)	[0] / [1]	Nicht vorhanden / vorhanden
Reizbarkeit	[0] – [2]	keine / leichte / deutlich
Körpertonus	[-2] – [2]	völlig schlaff / reduzierter Tonus / normaler Muskeltonus / erhöhter Tonus / steif
Bauchdeckenspannung	[-1] – [1]	reduzierter Muskeltonus / normal / erhöhte <u>Muskelspannung</u>
Harnabsatz	[0] / [1]	Nicht vorhanden / vorhanden
Kotabsatz	[0] / [1]	Nicht vorhanden / vorhanden

Tabelle 10: Erklärung der Neuro-Score Einzelparameter.

7. R Skripte

Korrelationsanalyse nach Spearman

```
#load packages
library("corrplot")
library("caret")
library("made4")
library("Hmisc")
library("gridExtra")
###data selection###
#remove old data from the environment
rm(list=ls())
#set the working directory
setwd("")
#read the data into R from the csv file located in the folder
C1 <- read.csv("", sep=";", dec=".", check.names = F)
#if you want to select just part of data, eg. only one group use following code
#C1 <- C1[ C1["group"] == "Naive", ]
#to check if all columns are read, use the function names
names(C1)
rownames(C1) <- C1$ID
#select all the columns with parameters of interest for correlation matrix
all_C1 <- C1[,3:NCOL(C1)]
#another option would be to select columns by their numbers as listed bellow
#all_C1 <- C1[,3:20]
###correlation matrix###
#run the function cormat for creating correlation matrix
#select the method, we usually use spearman
#pairwise.complete.obs is function used to prepare correlations for each pair of columns
#using vectors formed by omitting rows with missing values on a pairwise basis
cormat <- round(cor(as.matrix(all_C1), method="spearman", use="pairwise.complete.obs"), 2)
cor <- rcorr(as.matrix(all_C1), type="spearman")
#writes the correlation coefficients as a csv file, significant is <-0.5 and >0.5
write.csv2(round(cor$r,2), "cor_matrix_.csv")
#writes the p values of the correlation as a csv file, significant is <0.05
write.csv2(cor$p, "cor_matrix_p.csv")
#can be left empty if nothing needs to be excluded
cormat <- cormat[, ]
#if you want to select something e.g. lines 1:6, do it this way
cormat <- cormat[1:6, ]
###create the pdf file###
# with "upper" you get half of the graph, values are only once plotted against one another
pdf(file="cor_matrix_upper.pdf", width=10, height=10)
corrplot(cormat, method="color", tl.col="black", tl.cex=0.8, cl.cex = 0.6, type="upper")
dev.off()
```

Hauptkomponentenanalyse für die graphische Illustration

```

rm(list=ls())
#install packages
install.packages("ggplot2")
install.packages("dplyr")
install.packages("factoextra")
#call the library
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(factoextra)
#set the working directory
setwd("")
#load your .csv file
df <- read.csv2("")
#select the columns with relevant parameters
PCA_df <- df[,4:NCOL(df)]
#perform the PCA
PCA_data <- prcomp(PCA_df, center = TRUE, scale = TRUE)
#creates a new data frame to plot the results
PCA_result <- bind_cols(df$animal_id, df$treatment, df$mod, PCA_data$x)
PCA_result <- rename(PCA_result, animal_id = ...1, treatment = ...2, mod = ...3)
#summary for the PCA
#shows the impact of the single principle components:
#first line: standard deviation (SD) per component
#second line: percentage of variance (0.235 = 23.5 %) per principal component
summary(PCA_data)
# Use the window function to create harmonized graphs with the same size
windows(width=25, height=20)
#PCA-plot with points, ellipse and different subgroups:
PCA_result %>%
  ggplot(aes(PC1, PC2))+
  theme_bw()+
  stat_ellipse(aes(fill=treatment, colour=treatment),geom = "polygon", alpha = 0.1)+
  #the subgroup is defined in the "mod"-variable, change here if your columns have a different name
  geom_point(aes(colour = treatment, pch = mod),size = 3)+
  #Change the labeling from X- and Y-axis individually, with the results from the summary
  xlab("PC1 (29.68 %)")+
  ylab("PC2 (15.58 %)")+
  theme(text = element_text(size = 20), legend.text = element_text(size=20))+
  labs (fill = "", colour = "", pch = "")+
  #it is possible to change the labels and the colouring of the dots:
  #colour could be written in HEX also for more variety
  scale_colour_manual(name="",
    labels = c("anesthesia-N","anesthesia-NL","anesthesia-NLO", "anesthesia-NO", "control", "OP-
-N", "OP--NL","OP--NLO", "OP--NO"),
    values = c("transparent", "transparent", "transparent", "transparent", "#3B3B3B", "#FFD700",
"#FF8C00", "#EE0000", "#B3EE3A"))+
  #you can use the same or different colours for the ellipse:
  scale_fill_manual(name="",
    labels=c("anesthesia-N","anesthesia-NL","anesthesia-NLO", "anesthesia-NO", "control", "OP--
N", "OP--NL","OP--NLO", "OP--NO"),
    values = c("transparent", "transparent", "transparent", "transparent", "#3B3B3B", "#FFD700",
"#FF8C00", "#EE0000", "#B3EE3A"))+
  #you can change the label and shape:
  #shape numbers: https://ggplot2.tidyverse.org/articles/ggplot2-specs\_files/figure-html/unnamed-chunk-7-1.png
  scale_shape_manual(name="",
    labels = c("anesthesia", "control", "OP-"),
    values = c(15,1,17))

```

PCA und Scree Plot für Klusteranzahl (*within-cluster sum of squares*)

```

# PCA Script
# 28.06.2023
# talbot.steven@mh-hannover.de
#####
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(factoextra)

### Load (adjust to your path!)
raw <- read.csv2("")
head(raw)

### PCA and recombination with group characteristics
pca.res <- prcomp(raw[,4:NCOL(raw)], center = TRUE, scale = TRUE)
full_res <- cbind(raw[,1:3], pca.res$x)

[...]

### how many dimensions in the PCA?
p3 <- fviz_eig(pca.res) +
  labs(title = "Scree plot - No. of PCA dimensions") +
  theme(text = element_text(size = 14),
        legend.text = element_text(size = 14))
p3

### Determine the number of clusters
set.seed(123)
k.max <- 10 # change for fewer/more clusters on the x-axis
data <- pca.res$x[,1:2] # do NOT use the raw data but the 2D PCA Data! This is the space
# you are looking for clusters!
wss <- sapply(1:k.max,
             function(k)(kmeans(data, k, nstart=50,iter.max = 15 )$tot.withinss))
mywss <- data.frame(x=1:k.max, wss=wss)

p4 <- ggplot(mywss, aes(x=factor(x), y=wss, group=1 )) +
  geom_point(size = 3) +
  geom_line() +
  labs(title = "Scree plot - No. of clusters",
       x = "Number of clusters k",
       y = "Total within-clusters sum of squares") +
  theme_bw() +
  theme(text = element_text(size = 14),
        legend.text = element_text(size = 14))
p4

```

CMS Skript: 100fache PCA und 100faches k-means based clustering

```

# install.packages("devtools")
devtools::install_github("mytalbot/cms")
library(cms)
library(ggplot2)
library(dplyr)
library(factoextra)
library(cms)
setwd("")
set_AnMu <- read.csv2("")
head(set_AnMu,0)
usecase_AnMu <- cms(raw      = set_AnMu,
                   runs     = 100,
                   idvariable = "animal_id",
                   setsize  = 0.8,
                   variables = c("bwc_day1", "bur_exp_20h",
                                "MGS_day1", "nest_day1",
                                "distance.day1_light", "distance.day1_dark",
                                "FCM_day1", "irwin_day1"),
                   maxPC    = 1:2,
                   clusters = 4,
                   showplot = TRUE)
head(usecase_AnMu$FRQ, 30)
result <- head(usecase_AnMu$FRQ, 30)
write.csv2(result, ".csv")
usecase_AnMu$reportdata$treatment <- factor (usecase_AnMu$reportdata$treatment,
                                             levels=c( "control", "anesthesia-N", "anesthesia-NL",
                                                      "anesthesia-NO", "anesthesia-NLO",
                                                      "OP--N", "OP--NL",
                                                      "OP--NO", "OP--NLO"))
cms_clustering <- plot_cms(cmsresult = usecase_AnMu,
                          rotateX   = 0)
cms_clustering$p

#this part is for changing the colors in the cluster Plot
usecase_test <- usecase_AnMu
usecase_mouse_cms <- usecase_AnMu
for (i in 1:nrow(usecase_mouse_cms$reportdata)) {
  if (usecase_mouse_cms$reportdata[i,19] == 1) {
    usecase_test$reportdata[i,19] <- 4
  }
  if (usecase_mouse_cms$reportdata[i,19] == 4) {
    usecase_test$reportdata[i,19] <- 1
  }
  if (usecase_mouse_cms$reportdata[i,19] == 2) {
    usecase_test$reportdata[i,19] <- 3
  }
  if (usecase_mouse_cms$reportdata[i,19] == 3) {
    usecase_test$reportdata[i,19] <- 2
  }
}
cms_clustering <- plot_cms(cmsresult = usecase_test,
                          rotateX   = 45)
cms_clustering$p
percent_cluster <- usecase_test$reportdata %>% group_by(treatment, mod,
                                                       cluster) %>% summarise(n = n()) %>% mutate(freq = n/sum(n) *
                                                       100) %>% as.data.frame()

write.csv2(percent_cluster, ".csv")

```

8. Korrelationsanalyse der Belastungsbeurteilung der Einzel- und Gruppenhaltung

Bezeichnung	Parameter	Einheit	Erklärung
BWC	<i>Body weight change</i>	%	Veränderung des Körpergewichts (Ankunft bis Versuchsende)
bur-2h-day1	<i>Burrowing</i> , Wühlverhalten	g	Gewicht der entfernten Menge an Pellets aus der Wühlröhre innerhalb zwei Stunden für Tag 29 bis 33 des Wühlverhaltens
bur-2h-day2			
bur-2h-day3			
bur-2h-day4			
bur-2h-day5			
OF-distance-moved	Open-Field-Test	s	zurückgelegte Strecke
OF-velocity		s	Geschwindigkeit
OF-immobility		s	Dauer der Immobilität
OF-inner-zone		s	Aufenthaltsdauer in der inneren Zone
OF-outer-zone		s	Aufenthaltsdauer in der äußeren Zone
EOM-latency	Elevated-Zero-Maze-Test	s	Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in den offenen Quadranten
EOM-open-arm		s	Aufenthaltsdauer im offenen Quadranten
EOM-exits		Anzahl	Anzahl an Eintritten in offene Quadranten
EOM-crosses		Anzahl	Anzahl an Übertritten zwischen geschlossenen Quadranten
nest-day36	Nestbauverhalten	Score 1-6	Beurteilung des Nestbauverhaltens über Nacht an Tag 36/37 und 50/51
nest-day50		Score 1-6	
FST-latency-day43	Forced-Swim-Test	s	Latenzzeit bis zur Immobilität an Tag 43
FST-immobility-day43		s	Dauer der Immobilität an Tag 43
FST-latency-day44		s	Latenzzeit bis zur Immobilität an Tag 44
FST-immobility-day44		s	Dauer der Immobilität an Tag 44
FCM-day45	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	ng/50 mg Kot	FCM Konzentration an Tag 45 und 52
FCM-day52			
sum_whiser-score	<i>Barbering</i>	Score 0-2	Summe der vergebenen Vibrissen-Scores pro Tier im Gesamtversuchszeitraum
sum_Fell-score			Summe der vergebenen Fell-Scores pro Tier im Gesamtversuchszeitraum
sum_Wund-score	Wund-Score	Score 0-4	Summe der vergebenen Wund-Scores pro Tier im Gesamtversuchszeitraum

sum_aggression-attack-number	Aggressionsverhalten	Anzahl	Summe der gezählten Angriffe nach Käfigwechsel im Gesamtversuchszeitraum eines Gruppenkäfigs; verwendet für jedes Individuum der Gruppe
------------------------------	----------------------	--------	---

Tabelle 11: Parametererläuterung.

Erläuterungen zu den Parametern der Studie zur Belastungsbeurteilung von Einzel- und Gruppenhaltung, welche einer Korrelationsanalyse unterzogen wurden.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient r	p -Wert
sum_Wund-score	sum_aggression-attack-number	0,77	2,93E-08
BWC	FST-immobility-day44	0,57	0,0002789
FCM-day45	sum_aggression-attack-number	-0,55	0,00044955
FST-immobility-day43	FCM-day52	0,53	0,00088011
BWC	sum_aggression-attack-number	0,51	0,00155418
FCM-day52	sum_aggression-attack-number	-0,51	0,00131332
BWC	FCM-day52	-0,5	0,00199016

Tabelle 12: Spearman-Korrelationsanalyse Gruppenhaltung.

Auflistung aller Korrelationen mit einem Korrelationskoeffizient von $r \geq 0,5$ oder $r \leq -0,5$ der Spearman-Korrelationsanalyse von Tieren in Gruppenhaltung.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient r	p -Wert
EOM-latency	nest-day36	0,66	0,00045234
EOM-open-arm	nest-day36	-0,65	0,00058387
OF-distance-moved	EOM-exits	0,63	0,00086162
OF-velocity	EOM-exits	0,63	0,00103265
OF-immobility	EOM-crosses	-0,63	0,00099704
OF-immobility	EOM-exits	-0,61	0,00168136
EOM-exits	nest-day36	-0,6	0,00206772
OF-velocity	EOM-crosses	0,59	0,00244077
EOM-crosses	nest-day36	-0,56	0,00466215
OF-distance-moved	EOM-open-arm	0,54	0,00635219
OF-velocity	EOM-open-arm	0,54	0,00698318
OF-immobility	EOM-open-arm	-0,54	0,006557
OF-velocity	nest-day50	-0,53	0,00839403
OF-distance-moved	nest-day50	-0,52	0,00977707
EOM-crosses	nest-day50	-0,5	0,01185822

Tabelle 13: Spearman-Korrelationsanalyse Einzelhaltung.

Auflistung aller Korrelationen mit einem Korrelationskoeffizient von $r \geq 0,5$ oder $r \leq -0,5$ der Spearman-Korrelationsanalyse von Tieren in Gruppenhaltung.

9. Ergebnisse Pilotstudie

		A				B			
		Männchen		Weibchen		Männchen		Weibchen	
Parameter	Zeitpunkt	M	SD	M	SD	M	SD	M	SD
Körpergewicht [g]	BL	27.67	4.15	21.20	0.92	28.23	0.15	21.17	0.65
	BL	27.27	3.98	20.70	1.47	27.90	0.30	21.73	0.61
	Pre-OP	28.00	4.52	21.70	1.57	28.63	0.68	22.07	0.50
	Post-OP	28.17	3.96	21.57	1.62	28.70	0.70	22.53	0.38
	6 h	26.60	4.36	21.17	1.53	27.13	0.51	21.60	0.14
	Tag 1	26.93	4.74	20.47	1.10	26.97	1.47	19.73	0.51
	Tag 2	27.07	4.04	20.53	0.64	27.07	0.40	18.60	0.80
	Tag 3	27.43	3.84	21.40	0.61	28.10	1.10	19.62	1.73
Tag 4	27.83	4.02	21.90	0.56	29.10	0.69	21.60	1.18	
Mittelwert MGS	BL	0.11	0.02	0.09	0.01	0.10	0.04	0.12	0.04
	2 h	1.01	0.21	1.12	0.06	0.96	0.09	0.99	0.11
	4 h	0.99	0.15	0.98	0.07	0.77	0.25	0.99	0.22
	6 h	0.95	0.03	0.77	0.24	0.94	0.09	1.02	0.25
	8 h	0.97	0.22	0.94	0.08	0.86	0.12	0.90	0.04
	Tag 1	0.49	0.00	0.65	0.32	0.62	0.09	0.53	0.14
	Tag 2	0.35	0.10	0.50	0.23	0.44	0.02	0.53	0.07
	Tag 3	0.37	0.11	0.26	0.09	0.36	0.05	0.41	0.12
Tag 4	0.35	0.03	0.43	0.10	0.35	0.11	0.36	0.06	
Wühlverhalten [g]	BL_2h	12.57	20.05	1.93	3.35	0.00	0.20	1.00	1.39
	BL_4h	12.47	19.96	1.97	3.50	1.20	0.95	0.93	1.37
	BL_6h	12.37	20.04	2.63	3.04	1.07	0.93	1.73	3.00
	BL_20h	27.80	28.71	25.70	11.87	18.77	19.91	34.30	19.35
	Exp_2h	0.17	0.21	-0.03	0.06	0.17	0.21	-0.23	0.06
	Exp_4h	-0.07	0.21	-1.10	1.82	0.17	0.47	-0.17	0.06
	Exp_6h	0.13	0.25	-1.13	1.97	0.30	0.53	-0.10	0.17
	Exp_20h	10.47	18.74	21.27	37.72	0.83	0.76	6.23	11.10
Nest Score #	BL_2h	2		1		3		1	
	BL_4h	3		2		3		2	
	BL_6h	3		2		3		2	
	BL_20h	3		3		4		2	
	Exp_2h	1		1		1		1	
	Exp_4h	1		1		1		1	
	Exp_6h	1		1		1		1	
	Tag 1	3		2		1		1	
	Tag 2	4		4		3		2	
	Tag 3	4		5		4		3	
Tag 4	5		5		5		4		
Summe	BL	2		1		5		4	

Neuro-Score #	4 h	3		3		3		5	
	Tag 1	1		2		2		2	
	Tag 2	1		2		2		2	
	Tag 3	1		1		1		1	
	Tag 4	1		1		0		1	
PT zurückgelegte Distanz [cm]	20 h	36321.3	6428.2	41276.5	5253.8	36478.2	1373.7	32492.7	2188.8
	Tag 0 dunkel	19217.8	4695.2	23422.1	6983.5	23437.3	4468.7	18341.6	1851.5
	Tag 1 dunkel	27463.3	368.9	31510.6	8954.1	27550.9	15344.0	74570.5	11499.9
	Tag 2 hell	15167.9	5752.0	10737.6	957.1	10323.4	871.3	23812.6	13155.8
	Tag 2 dunkel	64197.7	41532.0	34870.1	8400.7	41736.4	8948.8	54487.6	17570.3
	Tag 3 hell	12408.1	3925.7	11506.4	658.1	10589.7	1780.2	13715.5	3076.0
	Tag 3 dunkel	52651.8	13932.2	35334.8	9075.9	59775.2	26504.0	45481.4	31934.6
PT VWR [m]	Tag 1 dunkel	296.3	112.5	481.6	681.1	475.7	615.5	2736.5	904.0
	Tag 2 hell	116.2	59.7	52.5	74.3	8.5	0.7	968.2	931.4
	Tag 2 dunkel	2134.4	2462.1	695.5	983.7	1422.0	1454.5	2526.8	1129.3
	Tag 3 hell	208.6	262.7	41.5	58.6	67.9	74.0	186.3	85.9
	Tag 3 dunkel	2481.9	1495.7	620.4	877.4	3096.3	3245.9	2499.9	2594.4
PT Aufenthaltsdauer in Zone Haus [s]	20 h	47285.7	10761.3	25994.4	23901.5	22294.4	9644.0	44118.4	6917.2
	Tag 0 dunkel	28090.0	5261.0	14917.1	14703.4	11899.0	9539.9	27725.8	3962.3
	Tag 1 dunkel	24242.4	5284.7	25970.8	4954.4	25123.4	7904.3	22334.9	3368.7
	Tag 2 hell	32807.3	2016.6	33254.9	1987.6	33839.6	414.4	28653.4	6079.2
	Tag 2 dunkel	18004.9	7677.3	23126.4	6419.3	23638.2	2627.0	27212.5	3064.0
	Tag 3 hell	34797.7	2429.8	35273.3	3247.5	34241.6	1755.6	28210.4	3342.4
	Tag 3 dunkel	16492.7	5248.2	23598.0	5580.3	15270.4	10212.5	27152.5	4222.3
Flüssigkeitsaufnahme [g]	M-BL	5.1	1.3	4.6	0.8	4.6	0.5	5.2	0.2
	Tag -1	4.8	1.8	4.6	1.0				
	Tag 0	2.4	0.6	2.4	2.6	2.6	2.5	1.4	0.6
	Tag 1	3.8	1.3	4.6	2.3	3.9	2.4	1.3	0.2
	Tag 2	4.4	0.8	4.8	1.6	5.2	1.1	2.3	2.7
	Tag 3	2.9	1.0	4.0	1.0	3.8	0.9	3.9	2.7

Histo- patho- logische Unter- suchung	nach Eutha- nasie		n = 1 ulzerative Läsion GIT	n = 1 ulzerative Läsion GIT; n = 1 makroskopisch sichtbare Läsion an Carprofen Injektionsstelle	
---	-------------------------	--	-----------------------------------	--	--

Tabelle 14: Pilotstudie.

Deskriptive Analyse der Parameter der Pilotstudie, angegeben mit Mittelwert (M) und Standardabweichung (SD). Mit Raute (#) gekennzeichnete Parameter sind im Median angegeben. MGS = Mouse-Grimace-Scale; PT = PhenoTyper® Heimkäfig; VWR = *Voluntary Wheel Running*; GIT = Gastrointestinaltrakt.

10. Ergebnisse *Refinement* der Analgesie für murine Kraniotomien

Zeitpunkte	Gruppe 1	Gruppe 2	p-Wert
MGS Männchen: naiv vs. Substanz-Kontroll-Gruppe			
4 h	Substanz-Kontrolle + N	Substanz-Kontrolle + NLO	0.0112
6 h	Substanz-Kontrolle + N	Substanz-Kontrolle + NLO	0.0089
6 h	Substanz-Kontrolle + NL	Substanz-Kontrolle + NLO	0.0268
Körpergewichtsveränderung Männchen: naiv vs. OP-Gruppe			
Tag 0 post-OP	OP + NL	OP + NO	0.0306
Tag 0 6 h	OP + NL	OP + NLO	0.0263
Wühlverhalten Weibchen: naiv vs. Substanz-Kontroll-Gruppe			
20 h	Substanz-Kontrolle + N	Substanz-Kontrolle + NO	0.036
▲ Wühlverhalten Weibchen: naiv vs Substanz-Kontroll-Gruppe			
20 h	Substanz-Kontrolle + N	Substanz-Kontrolle + NO	0.036
PT zurückgelegte Distanz Weibchen: naiv vs. OP-Gruppe			
Tag1_Dunkelphase	OP- + N	OP- + NO	0.0485
Tag2_Dunkelphase	OP- + N	OP- + NL	0.0193
Tag2_Dunkelphase	OP- + NL	OP- + NLO	0.0185
FCM Weibchen: naiv vs. Substanz-Kontrolle			
Tag 1	Substanz-Kontrolle + NL	Substanz-Kontrolle + NLO	0.0189
Flüssigkeitsaufnahme Weibchen: naiv vs. OP-Gruppe			
Tag 0	OP + N	OP + NO	0.0203
Tag 0	OP + N	OP + NLO	0.0160

Tabelle 15: Weitere signifikante Unterschiede.

Diese Tabelle enthält zusätzliche, signifikante Unterschiede zwischen Analgesieregimegruppen. Diese Signifikanzen ergaben sich bei der statistischen Analyse verschiedener Parameter, welche bereits im Ergebnisteil dieser Dissertation beschrieben sind. MGS = Mouse-Grimace-Scale; PT = PhenoTyper® Heimkäfig; FCM = fäkale Kortikosteronmetaboliten; ▲ = delta.

	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bauchdecken- spannung	-1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	7	8	7	8	8	8	6	8	5	7	6	6	7	8
	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	3	1	2	2	1	0
Harnabsatz	0	4	3	4	3	3	1	1	2	0	3	6	1	2	3	4	2	0
	1	4	5	4	5	5	7	7	6	8	5	2	7	6	5	4	6	8
Kotabsatz	0	6	6	3	2	5	6	4	7	6	6	4	3	7	6	6	5	2
	1	2	2	5	6	3	2	4	1	2	2	4	5	1	2	2	3	6
4 h post OP																		
Körperlage	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	7	7	6	8	5	8	8	8	8	8	8	8	7
	1	0	0	0	0	1	1	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beckenhöhe	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	7	8	8	8	8	4	6	1	7	7	8	8	7	6	4	3
	1	0	1	0	0	0	0	3	2	6	1	1	0	0	1	2	4	5
Schwanzhöhe	-1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	0	1	7	8	1	1	8	8	8	1	6	8	8	1
	1	0	0	0	8	7	1	0	6	7	0	0	0	7	2	0	0	7
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beinrotation	0	8	6	8	8	8	8	6	8	8	8	7	7	8	8	5	8	7
	1	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1	1	0	0	3	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Loko- motorische Aktivität	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	1
	0	8	8	8	4	6	7	8	6	7	8	7	8	5	3	5	6	6
	1	0	0	0	4	2	0	0	2	1	0	1	0	3	5	0	0	1
2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Atemfrequenz	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Piloerektion	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Ataxie	0	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Freezing	0	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vokalisation Handling	0	4	4	3	5	4	4	6	7	4	2	5	4	3	2	5	6	5
	1	4	4	5	3	4	4	2	1	4	6	3	4	5	6	3	2	3
Neugier	-2	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	2	0	1	0	2	0
	-1	2	0	0	3	4	0	0	3	1	0	1	1	4	6	2	1	4
	0	6	8	8	4	3	7	8	4	6	8	6	5	4	1	6	5	4
	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schreck- haftigkeit	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	7	8	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Berührungs- reaktion	-2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0
	0	3	3	1	0	0	3	5	4	5	0	4	1	2	0	5	4	3
	1	4	4	7	7	5	3	2	3	3	5	3	5	3	3	1	1	5
	2	1	1	0	1	2	1	0	0	0	3	1	2	3	5	1	1	0
Reizbarkeit	0	7	7	5	7	7	5	7	6	6	6	1	4	5	7	5	5	6
	1	1	1	3	1	1	3	1	2	2	0	5	2	2	1	2	2	0

	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	1	0	1	1	0	0
Körpertonus	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	7	6	8	8	8	6	7	8	6	6	8	8	8	8	7	8
	1	0	0	2	0	0	0	1	1	0	2	2	0	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bauchdecken- spannung	-1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	6	8	8	7	8	8	7	7	8	7	8	8	7	8	8	7
	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1
Harnabsatz	0	0	6	4	3	5	7	3	6	1	3	0	5	5	5	3	4	2
	1	8	2	4	5	3	1	5	2	7	5	8	3	3	3	5	4	6
Kotabsatz	0	4	6	3	2	6	6	6	7	2	4	1	5	3	5	6	6	7
	1	4	2	5	6	2	2	2	1	6	4	7	3	5	3	2	2	1
Tag 1																		
Körperlage	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beckenhöhe	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	7	5	4	7	7	8	8	8	7	5	4	5
	1	0	0	0	0	0	1	3	4	1	1	0	0	0	1	3	4	3
Schwanzhöhe	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Beinrotation	0	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	7	8	8	6	5	5	3
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	2	3	3	5
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Loko- motorische Aktivität	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
	0	8	8	8	8	8	5	6	8	8	7	8	8	8	5	6	6	6
	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atemfrequenz	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	7	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloerektion	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataxie	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Freezing	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vokalisation Handling	0	2	4	2	7	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	3	0	2
	1	6	4	6	1	8	8	7	7	8	8	8	8	7	7	5	8	6
Neugier	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	0	8	8	8	7	7	7	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	7
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Schreck- haftigkeit	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Berührungs- reaktion	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	0	3	2	4	0	3	5	8	5	1	4	1	2	2	6	6	5	0
	1	5	6	4	7	5	3	0	2	4	3	4	3	3	1	2	3	4

Schreckhaftigkeit	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Berührungsreaktion	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	3	2	2	1	5	6	3	7	4	2	5	1	1	0	4	4	3	1
	1	4	6	6	6	3	2	5	1	4	3	2	4	5	6	3	3	4	4
	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1	3	2	2	1	1	1	3
Reizbarkeit	0	7	8	6	8	8	8	8	7	7	7	3	7	7	6	7	7	8	7
	1	1	0	2	0	0	0	0	1	1	1	5	1	1	2	1	1	0	1
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Körpertonus	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bauchdecken- spannung	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	8	8	8	8	8	8	8	8	8	6	8	5	8	8	6	7	8	8
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	0	0	2	1	0	0
Harnabsatz	0	4	7	7	6	4	7	5	2	5	3	1	3	4	4	4	4	3	3
	1	4	1	1	2	4	1	3	6	3	5	7	5	4	4	4	4	5	5
Kotabsatz	0	8	6	7	6	7	6	8	8	7	6	5	5	8	4	4	8	4	6
	1	0	2	1	2	1	2	0	0	1	2	3	3	0	4	4	0	4	2

Tabelle 16: Ergebnisse Neuro-Score.

Anzahl der Tiere, die jeweils mit bestimmten Neuro-Score-Werten in den verschiedenen Einzelparametern pro Gruppe und Zeitpunkt beurteilt wurden. Parameter, welche im Laufe der Studie nie verändert waren, sind nicht in der Tabelle aufgeführt (Ptosis, Exophthalmus, Lakrimation, Hypersalivation, Hautdurchblutung, Stereotypien, Zittern, Zuckungen, Krämpfe, Vokalisation, Fäzes, Implantatbereich). N. = Naiv.

12. Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung

Tiere			Proben (n)		Histopathologische Veränderungen				
Analgesie Regime	Hauptgruppe	Ge- schlecht	Magen + DD	Haut	Magen			DD	Haut
					fokale Entz.	Erosion	Ulzer- ation		
N (n = 32)	OP	m	8 pro Gruppe	0	0	0	1	0	n.a.
		w			2	0	0	0	
	Substanz-Kontrolle	m			0	0	0	0	
		w			0	2	0	0	
NL (n = 32)	OP	m			2	1	0	0	
		w			1	3	0	0	
	Substanz-Kontrolle	m			0	2	0	0	
		w			2	1	0	0	
NO (n = 32)	OP	m		8 pro Gruppe	1	0	0	0	7
		w			4	1	0	0	3
	Substanz-Kontrolle	m			0	0	1	0	6
		w			0	1	0	1	6
NLO (n = 32)	OP	m	1		1	1	0	4	
		w	2		0	0	0	4	
	Substanz-Kontrolle	m	0		1	0	0	7	
		w	0		0	0	1	7	
keines (n = 16)	naiv	m	0	0	0	0	0	n.a.	
		w	5	0	0	0	0	0	

Tabelle 17: Histopathologische Untersuchung.

Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung der Magen-, Duodenum- und Hautinjektionsstellenproben. m = männlich, w = weiblich, DD = Duodenum, Entz. = Entzündung, n.a. = nicht anwendbar.

13. Zwischenergebnisse zum Design eines *Composite Measure Schemes*

Bezeichnung	Parameter	Einheit	Erklärung
bwc_day1	<i>Body weight change</i>	%	Veränderung des Körpergewichts (Baseline im Vergleich zu Tag 1)
bur_exp_20h	<i>Burrowing</i> , Wühlverhalten	g	Gewicht der entfernten Menge an Pellets aus der Wühlröhre innerhalb 20 h (von Tag 0 auf Tag 1)
MGS_day1	Mouse-Grimace-Scale	Score 0-2	Mittelwert des MGS Scores von 10 Bildern zum Zeitpunkt an Tag 1
nest_day1	Nestbauverhalten	Score 1-6	Beurteilung des Nestbauverhaltens morgens an Tag 1
distance-day1_light	<i>Distance moved</i> , zurückgelegte Distanz	cm	Zurückgelegte Distanz gemessen im PhenoTyper, summiert für jeweils 12 h Hell- und Dunkelphase an Tag 1
distance-day1_dark			
velocity-day1_light	<i>velocity</i> , Geschwindigkeit	cm/s	Mittlere Geschwindigkeit gemessen im PhenoTyper, für jeweils 12 h Hell- und Dunkelphase an Tag 1
velocity-day1_dark			
VWR_day1-dark	<i>Voluntary Wheel Running</i> , Laufradaktivität	m	Zurückgelegte Distanz im Laufrad des PhenoTypers, summiert für 12 h Dunkelphase an Tag 1
FCM-day1	Fäkale Kortikosteronmetaboliten	ng/50 mg Kot	FCM Konzentration an Tag 1
irwin_day1	Neuro-Score	Summen-score	Summe des Neuro-Scores abzüglich Parameter Vokalisation bei Fixation, Harn- und Kotabsatz an Tag 1

Tabelle 18: Parametererläuterung.

Erläuterungen zu den Parametern der Studie zum *Refinement* der Analgesie für murinen Kraniotomien, welche einer Korrelationsanalyse für das Design eines CMS unterzogen wurden.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient r	p-Wert
bwc_day1	velocity_day1-dark	0.51	5,66E-06
distance-day1_light	velocity-day1_light	0.91	0
distance-day1_dark	velocity-day1_dark	0.99	0
distance-day1_dark	VWR_day1-dark	0.78	1,33E-15
velocity-day1_dark	VWR_day1-dark	0.81	0
velocity-day1_dark	FCM_day1	0.52	4,19E-06
distance-day1_dark	FCM_day1	0.52	3,49E-06

Tabelle 19: Spearman-Korrelationsanalyse Männchen.

Korrelationskoeffizient und p -Wert aller korrelierender ($r < -0,5$ oder $> 0,5$ in Kombination mit $p < 0,05$) Parameter Paare der Spearman-Korrelationsanalyse des männlichen Datensatzes an Tag 1.

Parameter 1	Parameter 2	Korrelationskoeffizient r	p-Wert
bwc_day1	distance-day1_dark	0.54	1,02E-06
bwc_day1	velocity-day1_dark	0.52	2,78E-06
bwc_day1	FCM_day1	0.57	1,32E-07
distance-day1_light	velocity-day1_light	0.92	0
distance-day1_dark	velocity-day1_dark	0.99	0
distance-day1_dark	VWR_day1-dark	0.8	0
velocity-day1_dark	VWR_day1-dark	0.8	0

Tabelle 20: Spearman-Korrelationsanalyse Weibchen.

Korrelationskoeffizient und p -Wert aller korrelierender ($r < -0,5$ oder $> 0,5$ in Kombination mit $p < 0,05$) Parameter Paare der Spearman-Korrelationsanalyse des weiblichen Datensatzes an Tag 1.

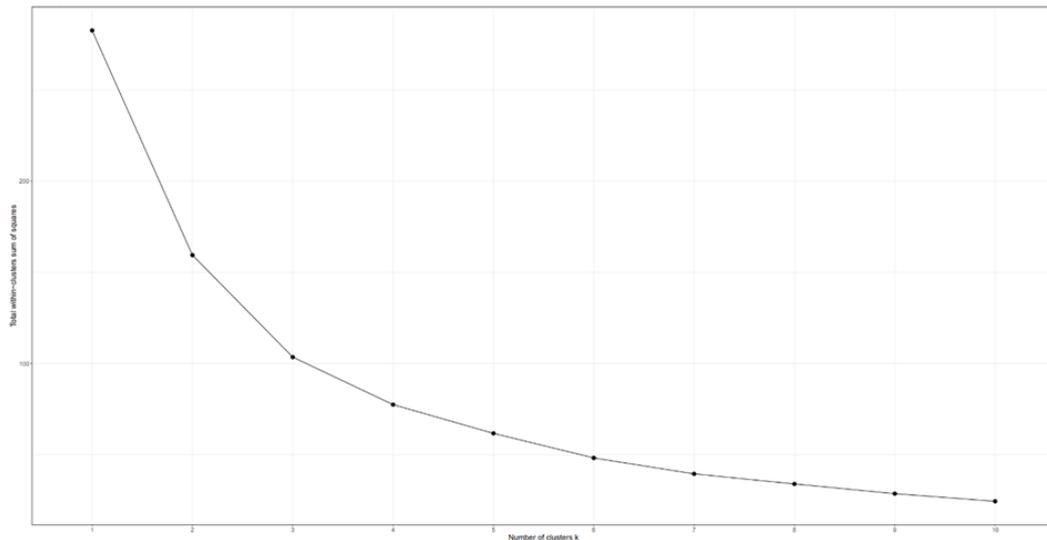


Abbildung 26: Scree-Plot Männchen.

Scree Plot der *within-cluster sum of squares* zur Festlegung der Anzahl der Kluster für den männlichen Datensatz an Tag 1.

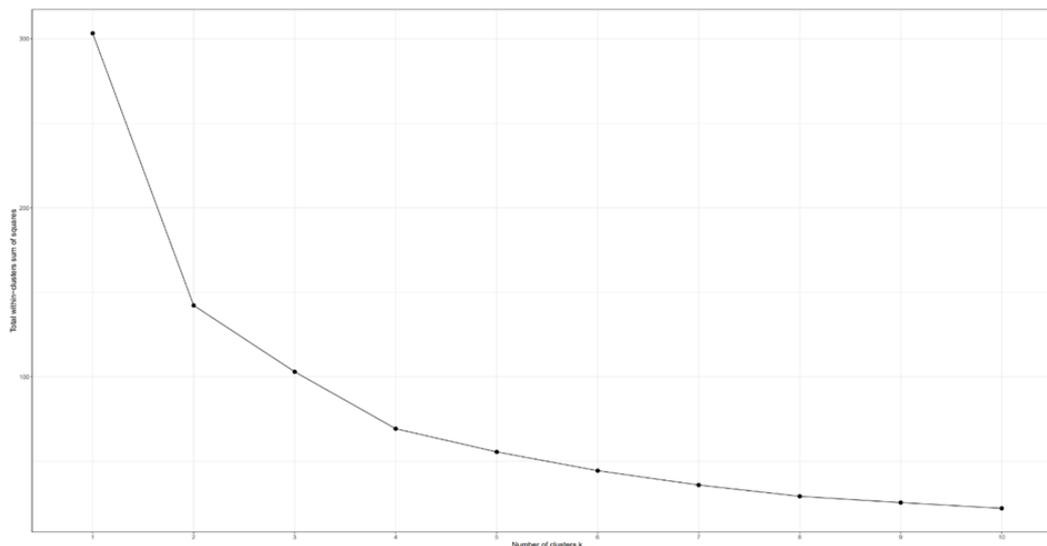


Abbildung 27: Scree-Plot Weibchen.

Scree Plot der *within-cluster sum of squares* zur Festlegung der Anzahl der Kluster für den weiblichen Datensatz an Tag 1.

Position	Parameter	Frequenz	Prozent
1	nest_day1	79	79
	MGS_day1	9	9
	irwin_day1	8	8
	bwc_day1	3	3
	distance.day1_light	1	1
2	bwc_day1	55	55
	distance.day1_light	19	19
	MGS_day1	14	14
	nest_day1	7	7
	bur_exp_20h	3	3
	irwin_day1	2	2
3	MGS_day1	34	34
	bwc_day1	29	29
	distance.day1_light	17	17
	nest_day1	6	6
	bur_exp_20h	4	4
	distance.day1_dark	4	4
	FCM_day1	4	4
	irwin_day1	2	2
4	FCM_day1	41	41
	distance.day1_light	18	18
	bur_exp_20h	13	13
	distance.day1_dark	9	9
	MGS_day1	9	9
	bwc_day1	6	6
	irwin_day1	4	4
5	distance.day1_dark	25	25
	distance.day1_light	14	14
	bur_exp_20h	10	10
	bwc_day1	5	5

Tabelle 21: 30 Hauptparameter Männchen.

Top 30 Parameter des männlichen Datensatzes an Tag 1, welche durch die 100-fache Hauptkomponentenanalyse identifiziert wurden. Die verwendeten Abkürzungen der Parameter werden in Tab. 18 erläutert.

Position	Parameter	Frequenz	Prozent
1	irwin_day1	86	86
	distance.day1_light	13	13
	FCM_day1	1	1
2	distance.day1_light	45	45
	FCM_day1	39	39
	irwin_day1	11	11
	nest_day1	3	3
	bur_exp_20h	1	1
	distance.day1_dark	1	1
3	FCM_day1	48	48
	distance.day1_light	29	29
	nest_day1	8	8
	bwc_day1	7	7
	bur_exp_20h	5	5
	MGS_day1	2	2
	irwin_day1	1	1
4	bwc_day1	39	39
	nest_day1	39	39
	FCM_day1	10	10
	bur_exp_20h	4	4
	MGS_day1	4	4
	distance.day1_light	2	2
	irwin_day1	2	2
5	bwc_day1	49	49
	nest_day1	37	37
	distance.day1_dark	6	6
	bur_exp_20h	3	3
	MGS_day1	3	3
	distance.day1_light	1	1
	FCM_day1	1	1

Tabelle 22: 30 Hauptparameter Weibchen.

Top 30 Parameter des weiblichen Datensatzes an Tag 1, welche durch die 100-fache Hauptkomponentenanalyse identifiziert wurden. Die verwendeten Abkürzungen der Parameter werden in Tab. 18 erläutert.

Gruppe	Analgesieregime	Kluster	n	Frequenz
Naiv	n.a.	4	16	2,49221183800623
		3	64	9,96884735202492
		2	276	42,9906542056075
		1	286	44,5482866043614
Substanz-Kontrolle	N	4	20	3,21543408360129
		3	46	7,39549839228296
		2	254	40,8360128617363
		1	302	48,5530546623794
	NL	4	12	1,9047619047619
		3	120	19,047619047619
		2	317	50,3174603174603
		1	181	28,7301587301587
	NO	4	9	1,42857142857143
		3	309	49,047619047619
		2	301	47,7777777777778
		1	11	1,74603174603175
	NLO	4	78	12,093023255814
		3	175	27,1317829457364
		2	258	40
		1	134	20,7751937984496
OP	N	4	102	16,6394779771615
		3	215	35,0734094616639
		2	222	36,2153344208809
		1	74	12,0717781402936
	NL	4	195	30,0462249614792
		3	306	47,1494607087827
		2	134	20,6471494607088
		1	14	2,15716486902928
	NO	4	397	62,8164556962025
		3	162	25,6329113924051
		2	49	7,75316455696202
		1	24	3,79746835443038
	NLO	4	234	36,734693877551
		3	327	51,3343799058085
		2	70	10,989010989011
		1	6	0,941915227629513

Tabelle 23: Klusteranalyse Männchen.

Zuordnung der Individuen männlicher experimenteller Gruppen an Tag 1 zu den vier verschiedenen Klustern durch *k-means* basierte Klusteranalyse. n.a. = nicht anwendbar.

Gruppe	Analgesieregime	Kluster	n	Frequenz
Naiv	n.a.	4	84	13,0841121495327
		3	110	17,1339563862928
		2	195	30,3738317757009
		1	253	39,4080996884735
Substanz-Kontrolle	N	4	59	9,48553054662379
		3	150	24,1157556270096
		2	236	37,9421221864952
		1	177	28,4565916398714
	NL	4	61	9,68253968253968
		3	158	25,0793650793651
		2	244	38,7301587301587
		1	167	26,5079365079365
	NO	4	19	3,01587301587302
		3	173	27,4603174603175
		2	346	54,9206349206349
		1	92	14,6031746031746
	NLO	4	60	9,30232558139535
		3	182	28,2170542635659
		2	231	35,8139534883721
		1	172	26,6666666666667
OP	N	4	169	27,5693311582382
		3	191	31,1582381729201
		2	163	26,5905383360522
		1	90	14,6818923327896
	NL	4	214	32,9738058551618
		3	205	31,5870570107858
		2	173	26,6563944530046
		1	57	8,78274268104777
	NO	4	284	44,9367088607595
		3	168	26,5822784810127
		2	97	15,3481012658228
		1	83	13,1329113924051
	NLO	4	200	31,3971742543171
		3	250	39,2464678178964
		2	133	20,8791208791209
		1	54	8,47723704866562

Tabelle 24: Klusteranalyse Weibchen.

Zuordnung der Individuen weiblicher experimenteller Gruppen an Tag 1 zu den vier verschiedenen Klustern durch *k-means* basierte Klusteranalyse. n.a. = nicht anwendbar.

XI. PUBLIKATIONSLISTE

Ein Teil dieser Dissertationsschrift wurde in der nachfolgenden Publikation veröffentlicht:

Refining pain management in mice by comparing multimodal analgesia and NSAID monotherapy for neurosurgical procedures.

Munk A., Philippi V., Buchecker V., Bankstahl M., Glasenapp A., Blutke A., Michelakaki E., Talbot S., Huwyler J., Jirkof P., Kopaczka M., Merhof D., Palme R. and Potschka H.

Publiziert in Scientific Reports (August 2024)

Teile dieser Dissertationsschrift wurden auf wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt:

Refinement der perioperativen Analgesie für murine Kraniotomien.

Munk A, Philippi V, Buchecker V, Wagner A, Bankstahl M, Glasenapp A, Blutke A, Michelakaki E, Huwyler J, Jirkof P, Kopaczka M, Merhof D, Potschka H; 28. Internationale DVG-Fachtagung zum Thema Tierschutz; München, Deutschland; 2023; Poster.

Erfahrungsbericht: NSAID bedingte Hautläsionen und gastrointestinale Ulcera in C57BL/6J Mäusen.

Philippi V, **Munk A**, Buchecker V, Bankstahl M, Glasenapp A, Blutke A, Michelakaki E, Potschka H; 28. Internationale DVG-Fachtagung zum Thema Tierschutz; München, Deutschland; 2023; Poster.

Refinement of pain management: Multimodal analgesia for neurosurgical approaches in mice.

Philippi V, **Munk A**, King H, Buchecker V, Leenaars C, Bankstahl M, Glasenapp A, Blutke A, Michelakaki E, Huwyler J, Jirkof P, Kopaczka M, Merhof D, Potschka H; 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences; Niagara Falls, Canada; 2023; Poster.

Group versus individual housing in male and female laboratory mice: A multicenter study reveals only subtle differences in severity.

Mallien A., Talbot S., Becker L., Brandwein C., Pfeiffer N., **Munk A.**, Buchecker V., Rix A., Baier J., Girbig R., Neunecker S., Vogt M., Palme R., Bleich A., Kiessling F., Potschka H., Chourbaji S., GassP.; 12th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences; Niagara Falls, Canada; 2023; Poster.

Refinement of pain management: multimodal analgesia for neurosurgical approaches in mice.

Munk A., Philippi V, Buchecker V, Bankstahl M, Glasenapp A, Blutke A, Michelakaki E, Huwyler J, Jirkof P, Kopaczka M, Merhof D, Potschka H;

32. VetPharm-Symposium; München, Deutschland; 2023; Vortrag.

Multimodale Analgesie als Refinement für murine Kraniotomien: Evaluierung verschiedener Analgesieregime mit Hilfe eines composite measure schemes.

Munk A., Philippi V, Buchecker B, Bankstahl M, Glasenapp A, Blutke A, Michelakaki E, Talbot SR, Huwyler J, Jirkof P, Kopaczka M, Merhof D, Palme R, Potschka H; 29. Internationale Fachtagung zum Thema Tierschutz; München, Deutschland; 2024; Poster.

XII. DANKSAGUNG

An erster Stelle geht mein Dank an meine Doktormutter Prof. Dr. Heidrun Potschka, die diese Dissertation ermöglichte und mir die Durchführung von zwei In-Vivo-Studien anvertraute. Ich bedanke mich herzlich für die zuverlässige Betreuung, die lehrreichen Diskussionen und das lösungsorientierte Arbeiten bei unerwarteten Ereignissen. Insbesondere möchte ich mich auch für die stete Förderung meiner Fort- und Weiterbildung, die Ermöglichung der Teilnahme an internationalen Kongressen sowie das entgegengebrachte Vertrauen auch für die zukünftige Zusammenarbeit bedanken.

Zudem möchte ich die erfolgreiche Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern hervorheben. Bei Prof. Dr. Jörg Huwyler und Dr. Paulin Jirkof möchte ich mich für den Erhalt des BUP-Depots bedanken. Bei Prof. Dr. Marion Bankstahl und Dr. Ayлина Glasenapp möchte ich mich für die essentielle Vorarbeit, den regen Austausch bezüglich der Analgesie bei Labornagern und die Analyse der Serumproben bedanken. Bei Prof. Dr. Andreas Parzefall und Effrosyni Michelakaki bedanke ich mich für die histopathologische Analyse und nachfolgende Einschätzung der Befunde. Bei Steven Talbot möchte ich mich für die geduldige Unterstützung bei statistischen Fragestellungen und bei Marcin Kopaczka und Prof. Dr. Dorit Merhof für die Bereitstellung des MGS-Tools bedanken. Bei Prof. Dr. Rupert Palme bedanke ich mich für die Analyse der Kotproben. Dr. Anne Mallien gilt mein Dank für die aufwendige Organisation und das Management der multizentrischen Haltungsstudie. Des Weiteren danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung der Forschergruppe DFG-2591 und für die Unterstützung des Tierschutzes.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. Vanessa Philippi für die fachliche Unterstützung in der Versuchsplanung und -durchführung sowie die Annahme meiner Weiterbildung in der Versuchstierkunde bedanken: danke für deine zuverlässige Hilfe, deine Loyalität und deine alternativen Denkanstöße. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Verena Buchecker bedanken: danke für dein stets offenes Ohr in sämtlichen Angelegenheiten und deine ausnahmslose Unterstützung. Ausdrücklich möchte ich mich auch bei Dr. Maria Reiber unter anderem für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und die wertvollen Tipps für das wissenschaftliche Schreiben bedanken. Mein Dank gilt zudem Dr. Eva Lotta von

Rüden, M.D. PhD Daniel Pérez-Pérez, Dr. Monika Franz und Dr. Katherina Schönhoff für ihre Unterstützung während meines Dissertationsprojektes.

Ein großes Dankeschön geht an Sarah Glisic: danke für deine zuverlässige, stets aufmerksame und tatkräftige Unterstützung im OP und Labor. Ebenso bedanke ich mich bei Claudia Siegl, Cristina Monio Baca, Leon Fischer, Tamara Lindemann, Lisa Cieslik, Isabella Waclawczyk und Andreas Kutschka für ihre herausragende technische Assistenz im Labor und der Hauswerkstatt. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Selina Becker für die langwierige Selektion der MGS-Bilder. Bei Uwe Roßberg und insbesondere Sabine Vican möchte ich mich für die großartige Versorgung meiner Mäuse und sämtliche Hilfe darüber hinaus bedanken.

Zugleich möchte ich mich bei meinen Mitdoktorandinnen Dr. Katherina Aulehner, Dr. Hannah King, Victoria Stocker, Amelie Wagner und Miriam Lehmann für die gegenseitige Unterstützung und wunderbare Zeit im Doktorandenzimmer bedanken: danke für euren Support auf der emotionalen Achterbahn des Doktoranden-Daseins, den unermüdlichen Kaffeenachschub und euren Humor.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken. Vielen Dank, dass ihr mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht und mich auch darüber hinaus in sämtlichen Belangen unterstützt habt. Meiner Familie danke ich zudem für das unvoreingenommene Interesse an meinem Dissertationsthema. Ausdrücklich möchte ich mich bei meinem Papa Jörg und meinem Freund Daniel für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Bei Daniel möchte ich mich vor allem für die Rücksichtnahme in stressigen Zeiten und das Rücken freihalten bedanken. Meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, ihr offenes Ohr, die willkommene Ablenkung bei gemeinsamen Aktivitäten und das Verständnis, wenn ich weniger Zeit hatte.

Zu betonen ist auch die Bedeutung meiner Versuchsmäuse, die hauptverantwortlich für den Erkenntnisgewinn dieser Dissertationsschrift waren. Zu guter Letzt möchte ich meine Verbundenheit gegenüber unseren vierbeinigen Familienmitgliedern, die mich in meinem Leben begleitet und vieles gelehrt haben, zum Ausdruck bringen.