

Aus dem Department für biologische Wissenschaften und Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Zentrum für biologische Wissenschaften
(Leitung: Univ.-Prof. Dr. Mathias Müller)

Stressbewertung in einem murinen Modell der chronischen Nierenerkrankung

Diplomarbeit zur
Erreichung des akademischen Grades Magister Medicinae Veterinariae (Dipl. Tzt.)
an der
Veterinärmedizinische Universität Wien

Vorgelegt von
Elisabeth Brandl
Wien, im Februar 2025

Externer Betreuerin: Judith Radloff, PhD

Zentrum für biomedizinische Forschung und translationale Chirurgie
AKH Wien

Betreuer: Ao.Univ.-Prof. Dr.med.vet. Rupert Palme

Experimentelle Endokrinologie
Zentrum für Biologische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

Gutachter: Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.sc. agr. Thomas Kolbe

Institut für In-vivo und In-vitro-Modelle
Zentrum für biologische Wissenschaften
Veterinärmedizinische Universität Wien

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Tierwohl	2
1.2 Physiologisches Verhalten der Maus	3
1.3 Mouse Grimace Scale	5
1.4 Beurteilung des Schweregrades von Tierversuchen	7
1.5 5/6 Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz	8
1.6 Stressbeurteilung	8
1.7 Zielsetzung und Hypothesen.....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Versuchstiere	11
2.2 Material	12
2.2.1 Instrumente	12
2.2.2 Medikamente	12
2.3 Methoden	12
2.3.1 Untersuchungsablauf.....	12
2.3.2 Operationsmethode	15
2.4 Ethogramm	16
2.6 Statistik	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Gewichtsdaten	19
3.2 Analyse der Ethogramm-Parameter.....	20
3.3 Bewegungsmuster	24
4 Diskussion.....	26
5 Zusammenfassung.....	32
6 Summary	33
7 Abkürzungsverzeichnis	34
8 Abbildungsverzeichnis.....	35
9 Tabellenverzeichnis.....	36
10 Literaturverzeichnis	37

1 Einleitung

Tiere finden in der medizinischen Forschung häufig Verwendung, um die Biologie des Menschen besser zu verstehen oder neue Medikamente und Therapien zu erforschen. Tiermodelle haben bereits zu großen Durchbrüchen in der Grundlagenforschung und angewandten medizinischen Forschung geführt, jedoch können die Ergebnisse von Tierstudien nicht immer direkt auf den Menschen übertragen werden. Im Jahr 1959 schlugen die britischen Wissenschaftler William Russel und Rex Burch einen Rahmen zur Reduzierung, Verfeinerung oder Ersetzung der Verwendung von Tieren in der Toxikologie und anderen Formen biomedizinischer Experimente vor, der als 3R-Ansatz bekannt ist (1). Die drei R's dienen als ethischer Rahmen, um das Leiden von Tieren in der Forschung zu minimieren und alternative Ansätze zu fördern, während gleichzeitig wissenschaftlicher Fortschritt ermöglicht wird. Einige Organisationen wie zum Beispiel das National Center for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), eine in Großbritannien ansässige Organisation, fördern die 3Rs und bieten Mittel und Ressourcen zur Unterstützung (2). Eine vergleichbare Organisation in Österreich ist die RepRefRed-Society. Genauer umschrieben lauten die 3Rs:

1. Replacement (Ersatz): Das Ziel besteht darin, Tierversuche zu vermeiden oder sie durch alternative Methoden zu ersetzen, wann immer dies möglich ist. Dies kann beispielsweise durch den Einsatz von Computermodellen oder *in-vitro*-Tests erreicht werden. Indem man auf Tierversuche verzichtet oder sie reduziert, wird das Leiden von Tieren minimiert (3).
2. Reduction (Reduzierung): Hierbei geht es darum, die Anzahl der verwendeten Tiere zu minimieren. Die Umsetzung des Prinzips der Reduktion erfordert eine präzise Planung, innovative Methoden, wie zum Beispiel die Verwendung von EDA- Tools (Experimental Design Assistent) und eine kontinuierliche Evaluierung von Forschungsverfahren, um sicherzustellen, dass die Anzahl der verwendeten Tiere auf das notwendige Minimum begrenzt wird (4).
3. Refinement (Verbesserung): Dies bezieht sich auf die Verbesserung der Lebensbedingungen und des Wohlergehens der Tiere, die in Experimenten eingesetzt werden. Durch die Optimierung von Haltungsbedingungen, die Verwendung von Schmerzlinderung und Anästhesie, sowie die Verbesserung der experimentellen Methoden und Verfahren wird das Leiden von Tieren minimiert. Ziel ist es, die Auswirkungen auf das Wohlbefinden der Tiere zu reduzieren und ihre Lebensqualität zu verbessern (5).

Es ist besonders wichtig, ethische Prinzipien wie die 3Rs anzuwenden, um Tierversuche so zu gestalten, dass die Belastung minimiert und das Wohlergehen der Tiere sichergestellt wird. Tiermodelle sind weiterhin für Entdeckungen, Hypothesentests und Validierungen von Daten bei komplexen Krankheiten entscheidend. Dabei ist es wichtig, dass der Tierschutz und die hochwertige Wissenschaft Hand in Hand gehen (6). Tierversuche betreffen lebende Wesen, die Schmerzempfinden, Emotionen und Bedürfnisse haben. Daher kommt dem Tierschutz eine ethische und moralische Verantwortung zu, die mit dem Streben nach wissenschaftlichem Fortschritt einhergeht. Im Sinne eines respektvollen Umgangs mit anderen Lebewesen sollte dieser Aspekt immer bedacht werden (7). Diese Arbeit beschäftigt sich mit einem wichtigen Forschungsmodell, der 5/6-Nephrektomie bei der Maus. Durch experimentelle Untersuchungen wie diesen, können Krankheitsmechanismen detaillierter analysiert und umfassender verstanden werden.

Es ist sehr wichtig, Tierversuche zu verbessern, um die genannten Kriterien zu erfüllen und präzise und aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen.

Ziel dieser Arbeit war es, Arbeitsabläufe im Rahmen dieses Tiermodells zu identifizieren, die verbessert werden können.

1.1 Tierwohl

Tierwohl bezieht sich auf den Schutz und das Wohlergehen von Tieren. Es umfasst verschiedene Aspekte, darunter die artgerechte Haltung, Pflege, Ernährung, Gesundheitsversorgung und Schutz vor Schmerzen, Leiden und Stress (8). Um generell den Tierschutz bei Labortierexperimenten zu gewährleisten, ist es wichtig, den Tieren ein physisches und soziales Umfeld zu bieten, dass ihrem natürlichen Lebensraum so ähnlich wie möglich ist. Dieser Ansatz beinhaltet, die Ethologie der untersuchten Tierart zu verstehen und sie dementsprechend zu halten. Die physische Umgebung sollte so gestaltet sein, dass sie den natürlichen Bedürfnissen der Tiere so weit wie möglich entspricht. Dazu gehören ausreichend Platz gemäß den geltenden Richtlinien und gesetzlichen Standards, wie dem Tierversuchsgesetz von 2012. Außerdem eine angemessene Beleuchtung, Einstreu, Temperatur, Hygiene, Fütterung und Luftqualität. Das soziale Umfeld sollte ebenfalls berücksichtigt werden, um sensorische Deprivation zu verhindern, die das Verhalten verändern kann. Forscher sollten den Tierschutz schon vor Beginn des Versuchs

berücksichtigen und im Verlauf dessen aktiv eingreifen, falls unerwartete Situationen eintreten, um sicherzustellen, dass der Tierschutz gewahrt bleibt (9). Um Schmerzen, Leiden und Stress zu minimieren, werden bei experimentellen Eingriffen Anästhetika und Analgetika verwendet (10). Es werden auch alternative Methoden wie *in-vitro*-Tests, Computersimulationen und Tierversuche mit niedrigerem Belastungsgrad bevorzugt, um die Anzahl der eingesetzten vor allem hoch- und mittelbelasteten Mäuse zu reduzieren (11). Der Tierschutz ist wichtig, da er mit der Qualität der Forschungsdaten von Labortieren, der Anzahl der Tiere, die erforderlich ist um statistische Signifikanz zu erreichen, und der Reproduzierbarkeit von *in-vivo*-Studien zusammenhängt (12). Zum Beispiel können Schmerzen und Verletzungen als Folge von Stress zu Veränderungen physiologischer Parameter führen, somit die Datenvariabilität erhöhen und die statistische Aussagekraft und die externe Validität verringern (13).

Ein guter Tierschutz ist auch aus ethischen Gründen wichtig, da es in unserer Verantwortung liegt, sicherzustellen, dass in der Forschung verwendete Tiere artgerecht und tiergerecht behandelt werden (12).

1.2 Physiologisches Verhalten der Maus

Das physiologische Verhalten von Mäusen umfasst eine Vielfalt von Aktivitäten und Reaktionen, die auf den physiologischen Prozessen in ihrem Körper basieren. Diese Prozesse umfassen verschiedene Aspekte der Ernährung. Mäuse sind der Lage, sowohl pflanzliche als auch tierische Nahrungsmittel zu verzehren. Ihr physiologisches Verhalten in Bezug auf die Nahrungssuche und -aufnahme umfasst komplexe Verhaltensweisen wie die gezielte Erkundung ihrer Umgebung zur Nahrungssuche, das Kauen und Verschlucken von Nahrung, sowie die fein abgestimmte Regulation von Hunger und Sättigung durch interne und externe Signale (14). Mäuse zeigen ausgeprägte Verhaltensweisen im Zusammenhang mit ihrer Fortpflanzung, die durch die Regulation ihrer Fortpflanzungszyklen, die Partnerwahl und das Paarungsverhalten beeinflusst werden. Ihr soziales Verhalten zeigen Mäuse durch dominante Verhaltensweisen wie Territorialität und Rangordnungskämpfen, sowie die Kommunikation mit Artgenossen und den Umgang mit Konflikten (15). Weibliche Mäuse werden vorzugsweise in Gruppen gehalten, um ihr arttypisches Sozialverhalten zu fördern und sozialen Komfort zu bieten. Im Gegensatz dazu führt die Gruppenhaltung männlicher Mäuse manchmal zu erhöhter Aggression aufgrund ihres territorialen Verhaltens. Dies stellt dann ein Problem dar, da es zu

Stress, Verletzungen und Schmerzen führen kann. Einzelhaltung hingegen würde zur sozialen Deprivation führen. Zur Prävention von Aggressionen sind männliche Mäuse bereits vor der Geschlechtsreife zu gruppieren, Neugruppierungen danach zu vermeiden und Nistmaterial während der Käfigreinigung zu übertragen (16). Das Putzverhalten ist eine instinktive Reaktion, die darauf abzielt, Schmutz, Mikroben und Parasiten aus dem Fell und der Haut zu entfernen. Es dient zudem als ein Maß für die allgemeine Gesundheit des Tieres. Laut einer Studie kann chronischer Stress bei Mäusen das Putzen verringern, was zu einer verminderten Fellpflege führt. (17).

Angst und Stress zeigen sie durch Reagieren auf Bedrohungen mit Flucht und Ausschüttung von Stresshormonen (18). Das physiologische Verhalten von Mäusen wird von einer Vielzahl interner und externer Faktoren beeinflusst (19). Beispiele für externe Faktoren sind Umweltbedingungen wie Lichtverhältnisse, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Erschütterungen, Schadgase und Lärm, aber auch die Käfigbedingungen, soziale Interaktionen, verabreichte Substanzen und auch die Ernährung können das Verhalten von Versuchstieren erheblich beeinflussen. Tiere können empfindlich auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren, die sich auf ihre Aktivität, ihre Ruhephasen und ihr Stressniveau auswirken können (20).

1. Soziale Interaktion: Tiere, die soziale Wesen sind, können stark auf die Zusammensetzung ihrer Gruppe und die Art der sozialen Interaktion reagieren. Mangelnde soziale Interaktion oder Konflikte innerhalb der Gruppe können sich auf das Wohlbefinden und das Verhalten der Tiere auswirken (21).

2. Käfiggestaltung: Die Gestaltung des Haltungsbereichs, einschließlich der Käfiggröße, der Einstreu, sowie von Versteckmöglichkeiten, Spielzeug und weiterem Enrichment, kann das Verhalten der Tiere maßgeblich beeinflussen. Eine abwechslungsreiche Umgebung fördert das Wohlbefinden (22).

3. Tagesrhythmus und Lichtzyklen: Lichtzyklen und Lichtmenge sind entscheidende Faktoren, die den natürlichen Biorhythmus der Tiere steuern. Störungen wie z.B. durch unregelmäßige Beleuchtung oder falsche Lichtintensität, können das Schlafverhalten, die Aktivitätsmuster und den Stoffwechsel beeinträchtigen (23).

4. Medikamente: Die Verabreichung von Substanzen kann das Verhalten von Tieren erheblich beeinflussen. In vielen experimentellen Versuchen werden Substanzen mit möglichen unbekannten Nebenwirkungen verwendet. Diese könne das Verhalten der Tiere verändern, was die Interpretation der Versuchsergebnisse verzerren kann. Schon die Verabreichung einer Injektion kann durch den induzierten Schmerz kurzfristig Stress verursachen, der zu einer Verhaltensänderung führen kann (24).

Interne Faktoren, die das Verhalten von Labormäusen beeinflussen können, beziehen sich auf biologische Aspekte der Tiere. Ein Beispiel dafür ist die Genetik. Das Verhalten und die Reaktionen von Labormäusen können stark von ihrer genetischen Veranlagung abhängen. Verschiedene Mausstämmen können unterschiedliche Verhaltensweisen und Reaktionen auf Umweltreize zeigen (25). Gleiches zeigen Unterschiede im Alter und Geschlecht. Geschlechtsunterschiede, insbesondere hormonelle Ungleichheiten und altersspezifische Verhaltensweisen sind wichtige Elemente bei der Planung von Studien und der Auswertung von Verhaltensdaten (26).

Es ist wichtig zu beachten, dass diese internen Faktoren in enger Wechselwirkung mit den externen Faktoren in der Umgebung der Labormäuse stehen. Die Berücksichtigung sowohl der genetischen Variablen als auch der Umweltvariablen ist für die Interpretation von Verhaltensstudien und die Gewährleistung des Wohlergehens der Tiere von entscheidender Bedeutung (27).

1.3 Mouse Grimace Scale

Die "Mouse Grimace Scale" (MGS), wurde von Langford et al. als standardisiertes System entwickelt, um anhand von Gesichtsausdrücken die Belastung und das Schmerzempfinden von Mäusen oder unangenehme Situationen zu identifizieren und zu quantifizieren (28). Die MGS basiert auf der Analyse von Einzelbildern, die aus Videomaterial gewonnen wurden. Dabei wird Wert auf die Beobachtung von Veränderungen im Gesichtsausdruck von Mäusen gelegt, wobei der Körper ausgeblendet wird. Hierbei werden verschiedene Gesichtsbereiche, wie die Augen, Ohren, Schnauze und Wangen, auf Anzeichen von Veränderungen wie Verengung, Schrumpfung, Schließung der Augen oder Absenkung der Ohren bewertet. Wobei ein Wert von 0 vergeben wird, wenn das Kriterium abwesend ist, 1, wenn es mäßig vorhanden ist, und 2, wenn es offensichtlich vorhanden ist (29). Damit gibt sie Aufschluss über das äußerlich sichtbare Schmerzerlebnis von Mäusen und kann verwendet werden, um schmerzbezogene Emotionen und die Wirksamkeit analgetischer Behandlungen zu untersuchen. Die Skala unterstützt die Umsetzung grundlegender wissenschaftlicher Erkenntnisse, um die klinischen Anwendungen zur Schmerztherapie zu verbessern (28).



Abbildung 1: Schematische Darstellung der 5 Gesichtsausdrücke mit Score System (28)

1.4 Beurteilung des Schweregrades von Tierversuchen

Die Bewertung der Schwere von Tierversuchen ist von zentraler Bedeutung für die ethische und tierschutzgerechte Durchführung von Experimenten an Tieren und stellt eine EU-weite Pflicht dar. Der Schweregrad dient dazu, die Belastung zu bewerten, die Tiere während eines Experiments erfahren.

Der rechtliche Rahmen bildet die primäre Grundlage und wird seit 2010 durch die EU- Direktive 63/2010/EU europaweit vorgegeben. In Österreich, gemäß dem Tierversuchsgesetz (TVG 2012) wird eine Genehmigung für eine Studie nur erteilt, wenn sie den gesetzlichen Anforderungen entspricht. Dazu gehört die korrekte Bewertung potenzieller Schmerzen, Leiden, Ängste oder bleibender Schäden für die Tiere. Die EU-Richtlinie sowie auch das TVG 2012 legen fest, dass der Schweregrad so gering wie möglich sein muss, während gleichzeitig die wissenschaftlichen Ziele erreicht werden sollen.

Dieser Ansatz trägt dazu bei sicherzustellen, dass Tiere entsprechend den geltenden rechtlichen Vorgaben behandelt und geschützt werden (30). Die Einschätzung des Schweregrads hat den Zweck, die Beanspruchung jedes einzelnen Tieres während eines Versuches zu beurteilen. Die Bewertung basiert auf vorgegebenen Belastungsstufen in Hinblick auf das Allgemeinbefinden der Tiere (31). Die Beurteilung des Schweregrads von Tierversuchen ist europaweit einheitlich geregelt, jedoch kann die Einschätzung je nach Beobachter variieren. Ein Auszug aus dem Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I Nr. 114/2012 listet folgende Kategorien auf:

1. Keine Wiederherstellung der Lebensfunktion: Dies bezieht sich auf Tierversuche, die vollständig unter Vollnarkose durchgeführt werden und bei denen das Tier nicht aus der Narkose aufwacht.
2. Gering: Hierbei handelt es sich um Tierversuche, bei denen kurzfristig geringe Schmerzen, Leiden oder Ängste bei den Tieren erwartet werden. Ebenfalls in diese Kategorie fallen Versuche, die das Wohlbefinden oder den allgemeinen Zustand der Tiere nicht wesentlich beeinträchtigen.
3. Mittel: Diese Kategorie umfasst Tierversuche, bei denen kurzzeitig mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste auftreten können. Ebenso werden Versuche, die eine mittelschwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des allgemeinen Zustands der Tiere erwarten lassen, hier eingeordnet.
4. Schwer: In diese Kategorie fallen Tierversuche, bei denen starke Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste bei den Tieren zu erwarten sind. Ebenso gehören dazu Versuche,

bei denen langanhaltende mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste auftreten, sowie solche, die eine schwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des allgemeinen Zustands der Tiere verursachen.

1.5 5/6 Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz

In den 1980er und 1990er Jahren wurde die 5/6 Nephrektomie hauptsächlich bei Ratten durchgeführt und dient als Modell für chronische Niereninsuffizienz (CDK, Chronic Kidney Disease). Dabei wird die rechte Niere vollständig entfernt, und etwa 2/3 der linken Niere werden nach kurzfristigem Abklemmen der linken Nierenarterie reseziert. Dies führt zu einer reduzierten Nierenmasse, einer Hyperfiltration des verbliebenen Gewebes und dadurch zur chronischen Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems. Im Folgenden entwickelt sich eine generalisierte Hypertonie, welche die Niere weiterhin schädigt. Entzündungsreaktionen und oxidativer Stress resultieren in Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose, Nierenatrophie, Proteinurie und finaler Niereninsuffizienz (ESRD). Hohe Mortalitätsraten und geringes verbleibendes Nierengewebe sind Herausforderungen dieses Ansatzes (32). Die Verwendung der 5/6 Nephrektomie als Tiermodell hat zu zahlreichen wissenschaftlichen Erkenntnissen in Bezug auf die Pathophysiologie der CKD geführt und zur Entwicklung neuer Therapieansätze beigetragen. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass Tiermodelle nicht alle Aspekte der menschlichen Erkrankung widerspiegeln können und dass weitere Forschung und Validierung erforderlich sind, um die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu bestätigen (33).

1.6 Stressbeurteilung

Um die Auswirkungen von Stress auf das Verhalten und das Wohlbefinden zu erforschen, fügt eine Studie von Mallien et al. Mäusen gezielt Stress zu. (34) Zur Beurteilung des Schweregrads und der Auswirkungen auf die Mäuse wurden Behandlungen mit Rückhaltstress und Kortikosteronmessungen verglichen. Die Rückhaltstress-Methode wird

in der Forschung verwendet, um bei Mäusen Stress zu induzieren. Dabei werden die Mäuse auf engstem Raum zurückgehalten, ihre Bewegung eingeschränkt und ein Gefühl der Immobilisierung erzeugt. Beobachtete Verhaltensänderungen bei den Mäusen umfassten anhedonisches Verhalten und verminderte Grabaktivität, was auf eine Abnahme der Aktivität und Motivation für grundlegende Verhaltensweisen wie Erkunden und Nahrungssuche hindeutet. Außerdem wird ein zögerlicheres Verhalten beim Eintragen von Material in das Nest gezeigt, was auf eine Verzögerung des Nistverhaltens hindeutet (34).

Eine weitere Studie zeigt, dass während der Stresserfahrung die Körperoberflächentemperatur ansteigt. Diese Erhöhung wird mittels Infrarotthermografie gemessen, einem nicht-invasiven bildgebenden Verfahren, das es ermöglicht, die Wärmeabstrahlung des Körpers genau zu erfassen und zu quantifizieren (35).

Die Auswirkungen von Stress auf das Fressverhalten von Mäusen sind vielfältig, wobei sowohl eine erhöhte als auch eine verringerte Futteraufnahme beobachtet werden kann. Die genauen Faktoren, die bestimmen, wie Mäuse auf Stress reagieren und wie sich dies auf ihr Futteraufnahmeverhalten auswirkt, sind noch nicht vollständig geklärt, da dieses Thema bei Nagetieren nur selten untersucht wird (36).

Der Novelty-Suppressed Feeding (NSF)-Test wird häufig angewendet, um das angsthafte Verhalten von Mäusen zu beurteilen, obwohl er das Fressverhalten selbst selten direkt misst. In diesem Test zeigen sowohl männliche als auch weibliche Mäuse eine erhöhte Latenz beim Fressen in einer neuen Umgebung, was auf angsthafte Verhalten hindeutet (36).

Die nichtinvasive Messung von Stresshormon-Metaboliten im Kot ist eine etablierte Methode zur Beurteilung von Stress und Schmerzen im Tierversuch. Kortikosteron ist das vorherrschende Glukokortikoid bei Mäusen und wird hauptsächlich über den Kot ausgeschieden, wodurch seine Metaboliten sich als geeigneter Marker für die Stressmessung eignen (37) .

In dieser Arbeit wird ein Ethogramm als Instrument zur Beurteilung von Stress der Tiere eingesetzt. Ethogramme sind detaillierte Verhaltensaufzeichnungen, die das normale Verhaltensspektrum von Tieren, sowie Abweichungen davon dokumentieren und so eine wichtige Grundlage für das Verständnis und die Optimierung des Tierversuches bieten. Ethogramme haben darüber hinaus in vielen anderen Bereichen wie der Wirkstoffforschung und der Untersuchung neurologischer Verhaltensweisen einen hohen Stellenwert, da sie Wissenschaftlern ermöglichen, spezifische Pathologien und psychische Zustände von Tieren zu erforschen. (38)

1.7 Zielsetzung und Hypothesen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Belastung der Tiere im Rahmen einer 5/6 Nephrektomie am Mäusemodell zu untersuchen. Hierbei lag der Fokus auf der Ermittlung der tatsächlichen Belastung der Tiere während und nach dem chirurgischen Eingriff. Das Projekt sollte Erkenntnisse über die Belastung der Versuchstiere liefern und mögliche Faktoren zur Verbesserung des Tierschutzes im Rahmen der 5/6- Nephrektomie aufzeigen.

Aufgrund der verschiedenen Operationsmethoden wird angenommen, dass unterschiedliche Belastungen auftreten. Die eigentliche 5/6-Nephrektomie stellt einen schweren chirurgischen Eingriff dar und führt zu deutlich schwereren Folgeschäden im Vergleich zur Scheinoperation. Dies sollte sich in veränderten Verhaltensmustern äußern. Nephrektomie-Tiere weisen größere körperliche Einschränkungen auf, die sich in abnormen Körperhaltungen, verminderter Aktivität und anderen Verhaltensweisen äußern sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die im Versuch verwendeten Tiere wurden in einer eigenen Einrichtung der Veterinärmedizinischen Universität Wien gezüchtet und waren Mäuse des Inzucht -Stammes C57BL/6. Es handelte sich dabei ausschließlich um männliche Tiere. Zu Versuchsbeginn hatten diese ein Körpergewicht von 24,6 bis 32,7g. Über den Zeitraum des Versuches wurden mehrmals die Gewichtsdaten erhoben, die im weiteren Verlauf der Arbeit detailliert aufgeführt werden. Die Mäuse wurden in einem Makrolonkäfig (Käfig Typ II, Tecniplast S.p.A., Buguggiate, Italien) mit Gitterdeckel in offener Haltung gehalten. Diese hatten eine Fläche von 370 cm². Die Käfige enthielten Einstreu (LASbedding PG2 10kg Papiersack, LASvendi GmbH, Deutschland) und Nistmaterial (ABEDD Paper Nest Pads NPP E-011, ABEDD SIA, Lettland). Zudem hatten die Tiere ad libitum Zugang zu Wasser (nicht autoklaviertes Leitungswasser) und Futter. Verwendet wurde hierbei ein pelletiertes Alleinfuttermittel (V1124-000) (Ssniff, Soest, Deutschland), sowie zum späteren Zeitpunkt auch Nassfutter (in Wasser gelöste Futterpellets). Die Haltungstemperatur lag bei $20 \pm 1^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit bei ca. 50%. Ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Zyklus (12 Stunden Licht / 12 Stunden Dunkelheit) wurde verwendet, wobei das Licht um 7:00 Uhr morgens eingeschaltet und um 19:00 Uhr abends ausgeschaltet wurde.



Abbildung 2: Käfig von der Seite



Abbildung 3: Käfig von oben

2.2 Material

2.2.1 Instrumente

Kleines Operationsbesteck bestehend aus: Pinzetten, Scheren, Arterienclip, Arterienklemme, (Es wurde ausschließlich chirurgisches Instrumentarium der Firma Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland verwendet) Elektro kauter (Surtron 160W, LED Spa, Italien), Mikroskop zur OP (Opmi Pico, Zeiss, Deutschland), Hämostyptika (SMI Spon Gelatineschwamm Standard, SIM AG, Schweiz) , Nahtmaterial: Vicryl 5.0 und 6.0, Seide 4.0, Rasierer (Aesculap Isis Pfotenschermaschine GT421, Aesculap Schermaschinen GmbH, Deutschland) , Spritze 1ml (Injekt®-F 1 ml, ohne Kanüle, B. Braun, Österreich) Feinwaage (FC-100, Waagenet AF GmbH, Berlin, Deutschland) . Das gesamte Nahtmaterial wurde von der Firma, Ethicon by J&J in Georgia hergestellt.

2.2.2 Medikamente

Als Anästhesieeinleitung wurde Ketamin (Ketamidol, Girovet., Girona, Spanien) und Medetomidin (Domitor, Vetoquinol S.A., Lure, Frankreich) ($17/0.08 \text{ mg/kg} \pm 100 \text{ µl Volumen}$) intraperitoneal injiziert. Während der OP wurde Isofluran (2%) (Isofluran, Piramal, Mumbai, Indien) als Narkosemittel verwendet. Um die Augen während der OP vor dem Austrocknen zu schützen, wurde den Versuchstieren eine Augensalbe (Vit-A- Vision®, OmniVision, Puchheim, Deutschland) verabreicht. Als Schmerzmanagement wurde präoperativ eine subkutane Injektion bestehend aus Buprenorphin ($0,1 \text{ mg/kg} \pm 100 \text{ µl Volumen}$) (Bupaq®, Vetviva Richter GmbH, Wels, Österreich) und Metamizol ($200 \text{ mg/kg} \pm 100 \text{ µl Volumen}$) (Novaminsulfon-ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) verabreicht. Die postoperative Schmerztherapie war drei Tage lang Metamizol, und je nach Schmerzevaluierung auch eine Kombination mit Buprenorphin.

2.3 Methoden

2.3.1 Untersuchungsablauf

Für den Versuch wurden 36 männliche Mäuse im Alter von 12-14 Wochen herangezogen. In einem Zeitraum von zwei Wochen wurden die Versuchstiere insgesamt zwei Mal operiert. Dabei wurden die Mäuse in zwei Gruppen aufgeteilt. Um eine ausgeglichene Gewichtsverteilung zwischen den Gruppen sicherzustellen, wurden zunächst alle Mäuse gewogen. Anschließend erfolgte die Zuordnung der Tiere nach einem abwechselnden Verfahren: Die Maus mit dem geringsten Gewicht wurde der NX-Gruppe zugeteilt, die

nächstleichteste der SH-Gruppe, gefolgt von der drittleichtesten in der NX -Gruppe, und so fort, bis alle Tiere auf die Gruppen verteilt waren. Eine Gruppe bestand aus 5/6 - nephrektomierten Mäusen (NX-Gruppe), die andere aus schein-operierten Mäusen (SH-Gruppe). Begleitend wurden fünfminütige Videoaufnahmen der Versuchsgruppen angefertigt. Diese wurden als Baseline 1 (BL1) vor der ersten Operation, 24 und 48 Stunden post OP 1, sowie Baseline 2 (BL2) unmittelbar vor dem zweiten Eingriff, 24 und 48 Stunden nach der zweiten OP und jeweils eine und zwei Wochen nach der zweiten Operation gemacht. Dabei wurde mit einer digitalen Videokamera in den Käfig der Maus gefilmt. Die Videoaufnahmen wurden in Folge als Ethogramm ausgewertet. Abbildung 4 stellt den Untersuchungsablauf vereinfacht dar.

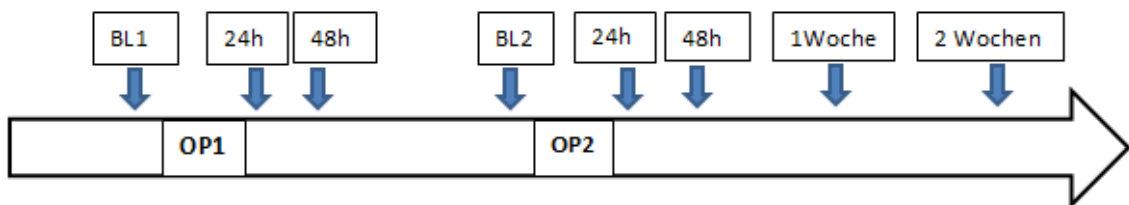


Abbildung 4: Zeitstrahl zur Veranschaulichung der Videoaufnahmen

Zur Überwachung wurden die Versuchstiere drei Tage lang intensiv beobachtet und auf einer Wärmematte gehalten. Sechs Stunden nach der Operation erhielten sie eine weitere Dosis Buprenorphin. Am darauffolgenden Morgen wurde erneut ein Analgetikum verabreicht, und die Tiere wurden gewogen. Diese Gewichtskontrolle fand auch am nächsten Tag statt. Nach Ablauf der drei Tage wurden die Tiere aus dem intensiven Monitoring entlassen und in eine Phase mit regulärer Betreuung überführt. Dort standen ihnen aufgeweichtes Futter zur Verfügung, und ihr Gesundheitszustand wurde täglich durch geschultes Tierpflegepersonal kontrolliert.

Außerdem wurden die Gewichtsdaten der Versuchstiere unmittelbar vor den beiden Operationen, sowie eine, zwei, drei und vier Wochen nach dem zweiten Eingriff erhoben. Um das Bewegungsmuster der Mäuse zu beurteilen, wurde eine Heatmap angefertigt. Dazu wurden die Käfige in 4 Quadranten eingeteilt. In den Quadranten I und II war ausschließlich Einstreu und Materialien für den Nestbau positioniert, wobei insbesondere im Quadranten II

eine bevorzugte Verwendung für den Nestbau festzustellen war. Das Futter sowie die Wasserflasche wurden im dritten und vierten Quadranten platziert. (siehe Abb.5)

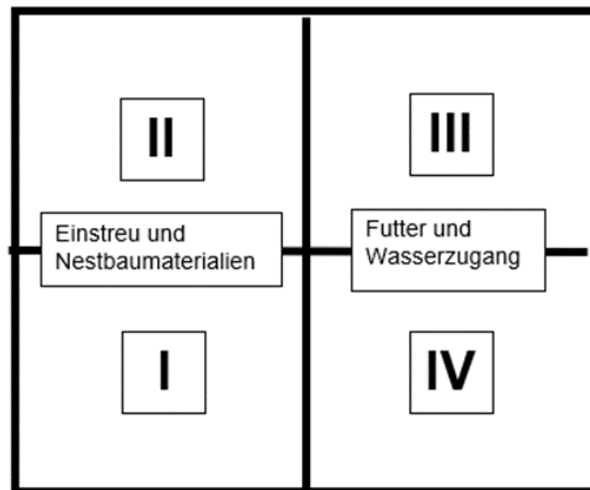


Abbildung 5: schematische Darstellung der Aufteilung des Käfigs in vier Quadranten

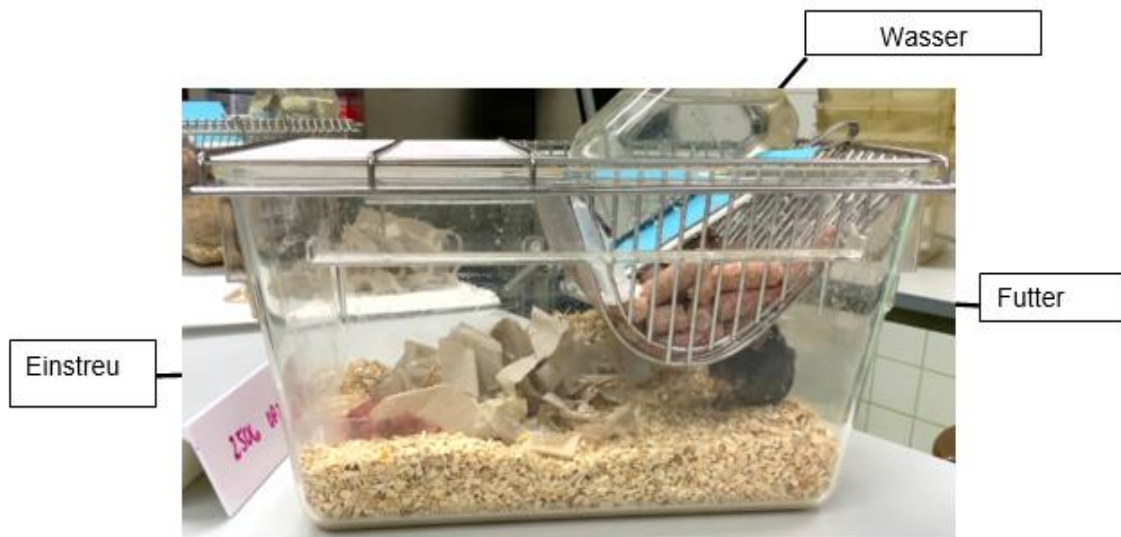


Abbildung 6: Foto eines Käfigs mit Kennzeichnung der Areale

2.3.2 Operationsmethode

Es gab zwei Varianten: Die 5/6 Nephrektomie und die Scheinoperation als Kontrolle.

2.3.2.1 5/6 Nephrektomie

Die Anästhesie wurde mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin und Medetomidin eingeleitet. Außerdem erhielten die Tiere vor dem Eingriff eine präoperative Schmerzlinderung. Daraufhin wurde der Operationsbereich rasiert und mit Braunol (B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) desinfiziert. Nach der Durchführung der Inhalationsnarkose wurde das Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes zur Beurteilung der Narkosetiefe herangezogen. Zunächst wurde ein Hautschnitt an der linken Flanke vorgenommen, gefolgt von der Durchtrennung der Muskulatur, um die Bauchhöhle zu öffnen. Die linke Niere wurde vorgelagert, wobei die Nierenkapsel und das retroperitoneale Fettgewebe mithilfe einer Schere unter dem OP-Mikroskop entfernt wurden. Die Gefäße wurden mittels eines Arterienclips abgeklemmt, um starke Blutungen während des Eingriffs zu verhindern. Anschließend wurde jeweils ein Drittel der linken Niere an dem vorderen und hinteren Nierenpol mittels Schere entfernt und die Schnittfläche gekautert. Blutstillende Schwämmchen wurden auf die Schnittflächen aufgetragen. Der Arterienclip wurde entfernt, wobei darauf geachtet wurde, dass dieser nicht länger als 90 Sekunden verwendet wurde, um akute Nierenschäden zu vermeiden. Sobald die Blutung gestoppt war, wurde die Niere wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht. Das Peritoneum und die Bauchmuskulatur wurde mit Nahtmaterial der Stärke 5.0 und die Haut mit 6.0 vernäht. Eine Woche später wurde die rechte Niere vollständig entfernt. Dafür wurde die rechte Flanke rasiert und desinfiziert, ein Hautschnitt gemacht und die Muskulatur wie zuvor durchtrennt. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und die rechte Niere vorgelagert. Die Gefäße am Nierenhilus wurden mit Arterienclips abgeklemmt und mit Seide 4.0 ligiert. Die Niere wurde mit einer Schere abgetrennt und der Gefäßstumpf reponiert. Das Peritoneum wurde wie zuvor mit Vicryl 5.0 und die Haut mit 6.0 vernäht.

2.3.2.2 Schein- Operation (Sham)

Die operative Technik bis zum Vorlagern der Niere auf beiden Seiten entspricht der zuvor beschriebenen Methode der 5/6 Nephrektomie. Anstatt jedoch Teile bzw. die ganze Niere zu entfernen, wurde die Niere wieder in ihre ursprüngliche Position gebracht und das Peritoneum,

sowie die Haut wie zuvor beschrieben vernäht. Dieser Schritt wurde auf beiden Seiten gleich durchgeführt.

2.4 Ethogramm

Das Ethogramm umfasst eine Liste von Verhaltenskategorien, die während der Beobachtungen der Versuchstiere im Labor tagsüber aufgezeichnet wurden. Diese Verhaltensweisen wurden operational definiert, das heißt, sie werden auf spezifische, messbare Weise beschrieben, um eine einheitliche Erfassung zu gewährleisten. Es ermöglichte, das Verhalten der Tiere systematisch zu erfassen und zu analysieren. Darüber hinaus konnten Veränderungen im Verhalten über die Zeit hinweg, aber auch als Reaktion auf Manipulation, erfasst werden. Die Erstellung eines Ethogramms erforderte eine gründliche Beobachtung und Dokumentation des Verhaltens der Tiere. Um bestmöglich das Verhalten der Mäuse protokollieren zu können, wurden fünfminütige Videos zu festgelegten Zeitpunkten gemacht (siehe Abbildung 4). Dabei wurde statisch in den Käfig der Mäuse gefilmt.

Die Auswertung des Videomaterials erfolgte nach folgenden Punkten: Harn- und Kotabgabe, Wasser- und Futteraufnahme, Bewegungsverhalten wie Putzen, Klettern, Graben und Aufrichten, sowie wie handscheu das Tier ist. Um die Parameter genauer zu definieren wurde folgende Tabelle angefertigt.

Tabelle 1: Definition der einzelnen Parameter

Parameter	Abkürzung	Definition
Harn	H	Das Ausscheiden von Harn.
Kot	K	Das Ausscheiden von Kot.
Futter	Fu	Das Aufnehmen von Trocken- oder Nassfutter.
Wasser	W	Das Trinken aus der Tränke.

Putzen	Pu	Das Putzen mit den Vorderpfoten oder Lecken des Fells.
Klettern	Kl	Das Klettern des Tiers an den Seitenwänden oder dem Gitter des Käfigs.
Graben	Gr	Das Graben oder Wühlen des Tiers im Nest oder in der Einstreu.
Aufrichten	Au	Das Aufrichten des Oberkörpers des Tiers, wobei es nur auf den Hinterbeinen steht.
Handscheu	Hs	Wenn das Tier auf die Annäherung einer Hand im Käfig reagiert, indem es ausweicht (positiv) oder nicht reagiert und in der Nähe der Hand bleibt (negativ).

Die Bewertung des Bewegungsmusters wurde wie folgt analysiert. Es wurde gewertet, wie oft die Maus einen Quadranten betritt. Mit den Daten wurden Heatmaps erstellt. Zusätzlich wurde die Körperhaltung der Maus in den Videos einmalig beurteilt. Hierbei werden drei diskrete Kategorien zur Beurteilung der Haltung differenziert. Die physiologische Haltung wird mit einem Wert von 3 bewertet, während einem gerundeten Rücken ein Wert von 2 zugeordnet wird. Ein gerundeter Rücken in Verbindung mit Zittern wird mit einem Wert von 1 quantifiziert. Für den Handscheutest wurde eine Hand in den Käfig geführt und die Reaktion der Maus darauf beurteilt. Dabei entspricht der Score 0 keiner Reaktion auf die Hand und der Wert 1 einem deutlichen Ausweichen der Hand.

2.6 Statistik

Die Daten wurden mittels einer Two-Way ANOVA mit anschließendem Tukey-Test für multiple Vergleiche analysiert. Die statistische Berechnung erfolgte mit Graphpad Prism Version 9 (GraphPad Software, USA). Im traditionellen Modell der zweifachen Varianzanalyse (ANOVA) können die statistischen Signifikanzen der Haupteffekte sowie ihrer Wechselwirkung durch die p-Werte identifiziert werden (39). Der Tukey Test vergleicht die Unterschiede zwischen jedem Paar von Mittelwerten unter Berücksichtigung der geeigneten Anpassung für multiple Tests. Die Ergebnisse werden in Form einer Matrix präsentiert (40).

3 Ergebnisse

Während des Versuchs verstarben vier Tiere aufgrund von Blutungen oder Anästhesiekomplikationen während der ersten Operation. Ein weiteres Tier wurde drei Tage nach der zweiten Operation aufgrund einer eingestellten Futteraufnahme euthanasiert.

3.1 Gewichtsdaten

Im folgenden Teil werden die Gewichtsdaten der Versuchstiere über den gesamten Zeitraum dargestellt.

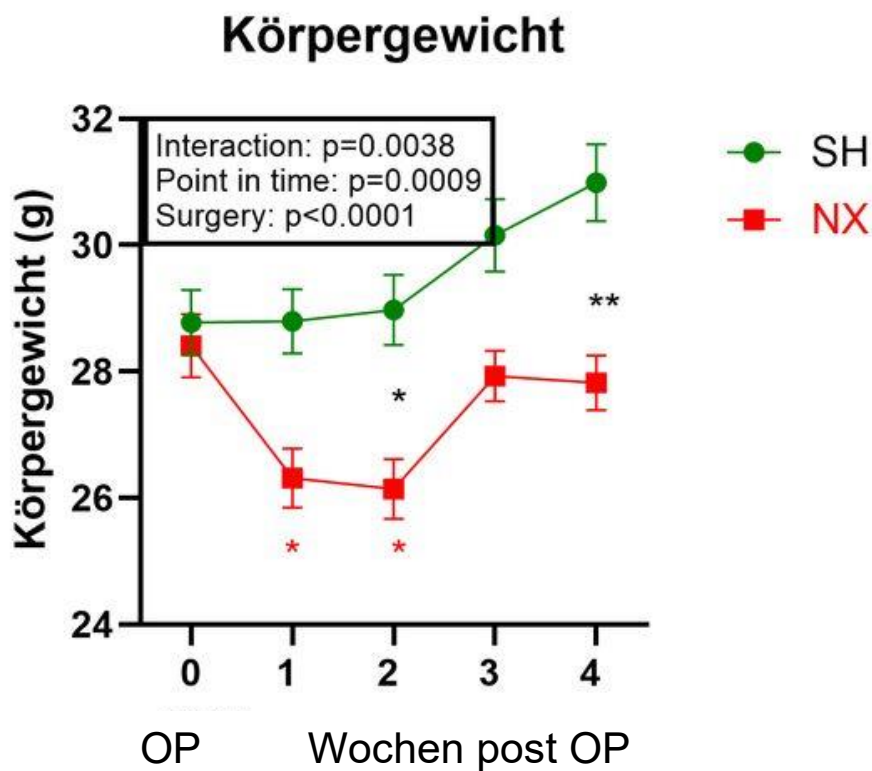


Abbildung 7: Mittlere Gewichtsdaten beider Gruppen mit Standardabweichung

Abbildung 7 zeigt dabei die Gewichtsdaten beider Gruppen als arithmetisches Mittel mit den Standardabweichungen über den gesamten Versuchszeitraum. Dabei zeigte sich nach der ersten Operation ein Verlust des Körpergewichts bei der NX- Gruppe. Zwischen der zweiten

Operation und dem Zeitpunkt 1W pOP2 wurde eine Zunahme vermerkt. Hingegen bei der SH-Gruppe wurden bis zum Zeitpunkt der zweiten Operation konstante Gewichtsdaten vermerkt. Darauf folgend bis zum Ende des Versuchs zeigte sich ein Anstieg des Körpergewichts. In der SH-Gruppe wurden größere Varianz-Unterschiede als in der NX-Gruppe vermerkt. Die Abweichung nahm mit Ausnahme des Zeitpunktes 1W pOP1 kontinuierlich zu und erreichte am Ende des Versuches ihr Maximum mit über 2,6 g Abweichung. In der Grafik markieren rote Sterne signifikante Unterschiede zum Ausgangswert bei OP1, während schwarze Sterne die Signifikanzen zwischen der Sham- und NX-Gruppe zu einzelnen Zeitpunkten anzeigen. Innerhalb der Sham-Gruppe wurden über die vier Wochen hinweg keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

3.2 Analyse der Ethogramm-Parameter

Um das Schmerzempfinden und somit die Stressbeurteilung der Mäuse besser zu verstehen, wurden folgende Ethogramm-Parameter analysiert. Kot- und Harnabsatz, sowie Futter- und Wasseraufnahme. Verhaltensweisen wie Putzen, Klettern, Graben, Ruhen und das Aufstellen. Es wurde die Körperhaltung beurteilt, und auch ein Handscheutest durchgeführt. Die erhobenen Daten zeigen, dass die gewählte Operationsmethode keine signifikante Auswirkung auf die Körperhaltung hatte (Abb. 8 links). Allerdings zeigt sich, dass der Zeitpunkt der Beobachtung eine bedeutende Rolle spielte. Während des gesamten Untersuchungszeitraums wurde lediglich eine Woche nach der zweiten OP (1W pOP2) ein deutlicher Unterschied zwischen der SH- und NX-Gruppe festgestellt. Dabei zeigte die SH-Gruppe höhere Werte als die NX-Gruppe. Mit steigendem Wert korrelierte die Körperhaltung zunehmend ihrer physiologischen Form, der typischen, gesunden Haltung von Labormäusen entspricht. Beide Versuchsgruppen wiesen einen Rückgang des Haltungs-Werts um den Zeitpunkt der Operationen auf. Die höchsten Haltungs-Werte wurden vor der ersten Operation und am Ende des Versuchs verzeichnet. Die Analyse des Aufrichtens ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abb. 8 rechts). Unmittelbar nach den Operationen wurde in beiden Gruppen eine verringerte Häufigkeit des Aufrichtens beobachtet.

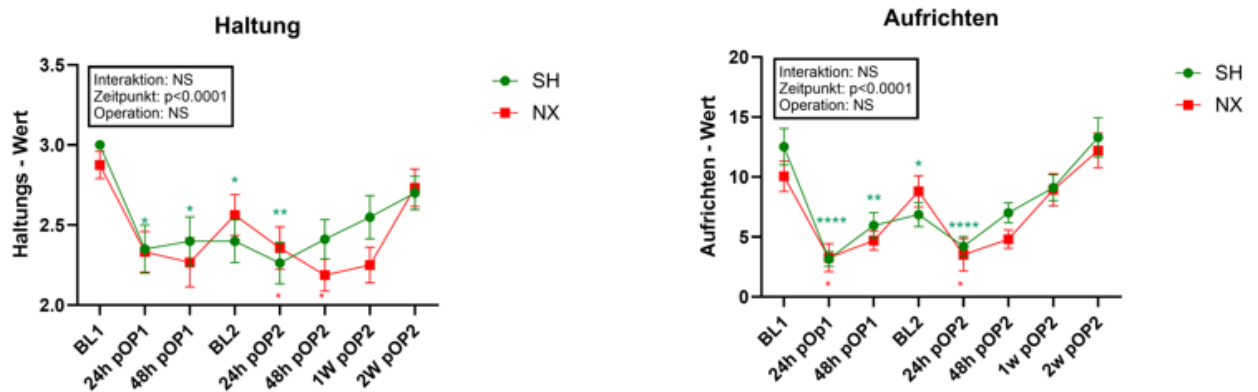


Abbildung 8: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Körperhaltung und Aufrichten zu den verschiedenen Messzeitpunkten

Die Evaluierung der kletterbezogenen Verhaltensmuster zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der SH -Gruppe und der NX -Gruppe (Abb.9 links). Allerdings wurde ab den Zeitpunkt 24 Stunden nach der ersten Operation (24h pOP1) eine verminderte Kletteraktivität wahrgenommen. Erst gegen Ende des Versuches zum Zeitpunkt zwei Wochen nach der zweiten Operation (2W pOP2) wurde vermehrtes Klettern aufgezeichnet. Dabei zeigten beide Operationen einen ähnlichen Einfluss auf die Versuchstiere und hemmten ihre Aktivität.

Beim Graben kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen, wie auch zu den verschiedenen Zeitpunkten. (Abb. 9 rechts). Die SH -Gruppe verzeichnete eine vermehrte Grabungsaktivität 24 Stunden nach der ersten Operation (24h pOP1), sowie 48 Stunden nach der zweiten Operation (48h pOP2). Somit zeigt die SH -Gruppe um den Zeitraum nach den Operationen vermehrtes Graben. Hingegen zeigte die NX -Gruppe über einen längeren Zeitraum vermehrt Grabaktivität. 24 Stunden nach der ersten Operation (24h pOP1), zum Zeitpunkt der Baseline 2 (BL2) und 2 Wochen nach der zweiten OP (2W pOP2) wird vermehrtes Graben und Nestbauen aufgezeichnet.

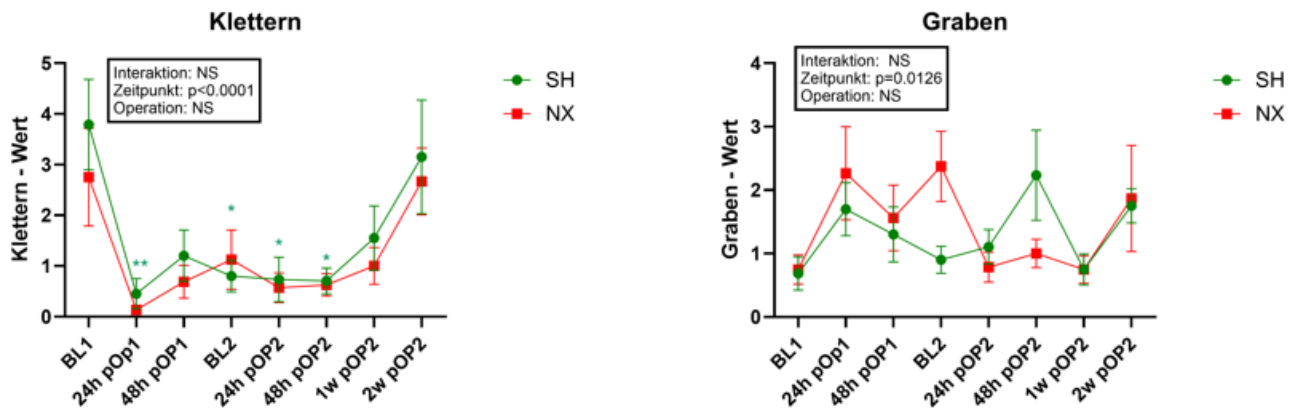


Abbildung 9: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Klettern und Graben zu den verschiedenen Messzeitpunkten

Es wurde in beiden Gruppen im Laufe des Versuches mit zunehmender Zeit häufigeres Putzen als zu Beginn beobachtet (Abb. 10 links). Ein deutlicher Unterschied zwischen den Versuchsgruppen wurde nicht wahrgenommen. Bei der Untersuchung des Ruheverhaltens spielte wieder der Zeitpunkt eine signifikantere Rolle als die Operationsmethode. Beide Gruppen zeigten vermehrtes Ruhen nach den Operationen (Abb. 10 rechts). Zwischen den Eingriffen zum Zeitpunkt der Baseline 2 (BL2), sowie auch gegen Ende (2W pOP2) wurde weniger Ruhen vermerkt. Dabei wurden bei der NX -Gruppe deutlich niedrigere Werte als bei der SH -Gruppe erzielt.

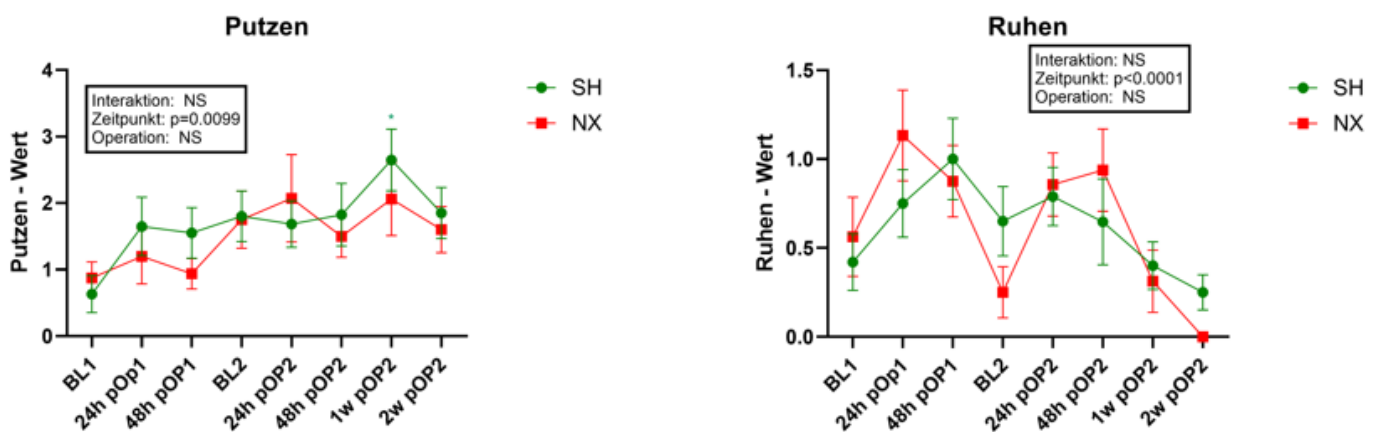


Abbildung 10: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Putzen und Ruheverhalten zu den verschiedenen Messzeitpunkten

Beide Gruppen zeigten ein deutliches Abfallen der Bewegungsaktivität um den Zeitraum der Operationen (Abb. 11 links). Der Unterschied zum Zeitpunkt der Operationen war signifikant. Es wurden nur minimale Unterschiede zwischen den Operationsmethoden vermerkt, allerdings zeigte die SH -Gruppe früher und mehr Bewegung als die NX -Gruppe. Die Analyse des Handscheutests zeigte keine Unterschiede zwischen den OP -Gruppen und Zeitpunkten (Abb. 11 rechts).

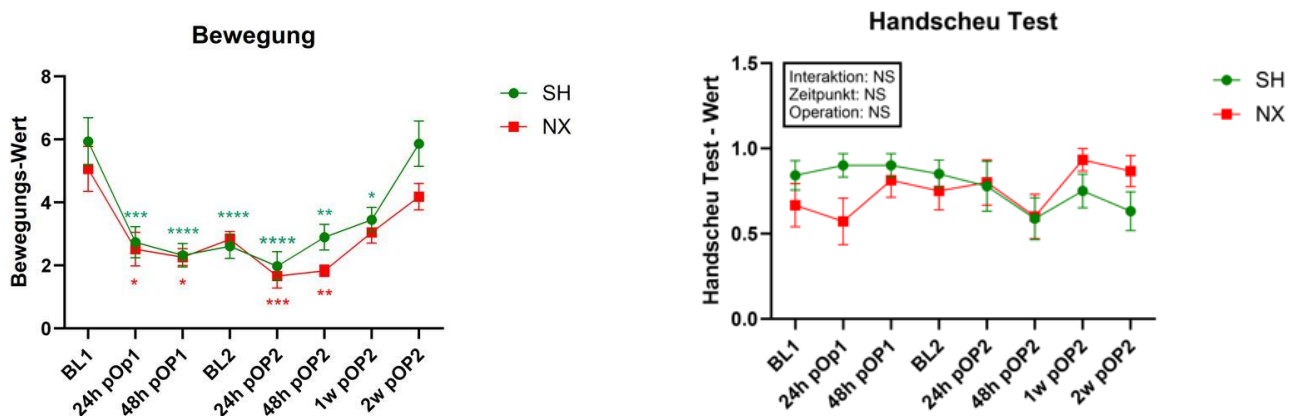


Abbildung 11: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Bewegung und Handscheue zu den verschiedenen Messzeitpunkten

Die Analyse der Wasseraufnahme zeigte, dass sowohl der Zeitpunkt als auch die Operationsmethode einen signifikanten Einfluss hatte (Abb.12 links, oben). Beide Gruppen hatten eine erhöhte Wasseraufnahme zu den Operationszeitpunkten, wobei 48 Stunden nach der zweiten OP (48h pOP2) der größte Peak verzeichnet wurde. Im Schnitt zeigte die NX -Gruppe auch deutlich höhere Werte als die SH -Gruppe.

Im Rahmen der Futteraufnahme stellte sich der Zeitpunkt als relevant heraus. Beide Gruppen zeigten zur Baseline 1 (BL1) und zur Baseline 2 (BL2) niedrige Werte (Abb. 12 rechts, oben). Ein Anstieg erfolgte bei der NX -Gruppe 48 Stunden nach den ersten Operationen (48h pOP1), sowie ab 48 Stunden nach der zweiten OP (48h pOP2). Bei der Sh-Gruppe zeigten sich ähnliche Werte, so kam es zu einem Anstieg 48 Stunden nach der ersten OP (48h pOP1) und 24 Stunden nach der zweiten OP (24h pOP2). Die Beobachtung des Kot- und Urinabsatz ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 12 links und rechts unten).

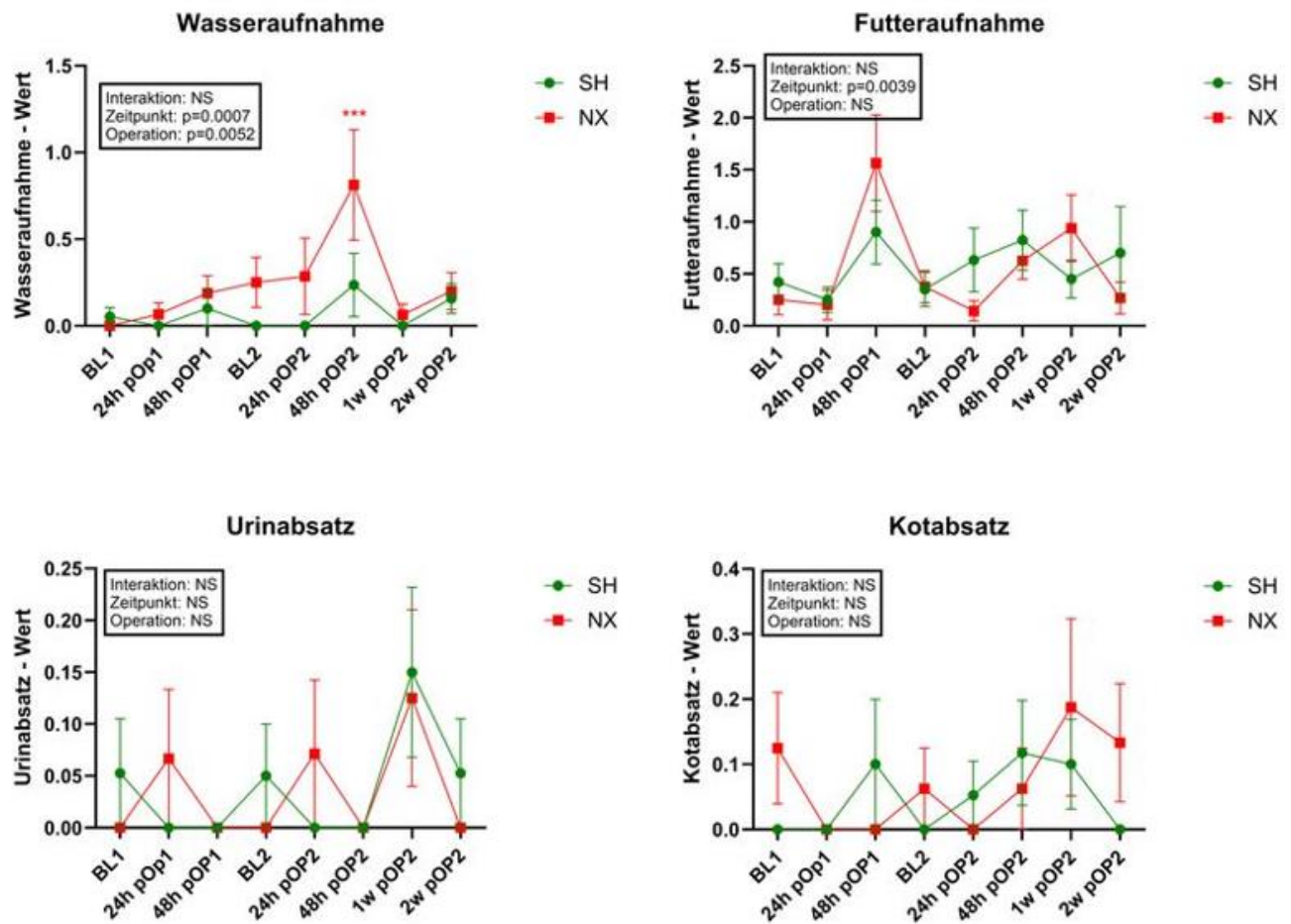


Abbildung 12: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Wasser- und Futtermittelaufnahme und Kot- und Harnabsatz zu den verschiedenen Messzeitpunkten

3.3 Bewegungsmuster

Gezählt wurde, wie oft die Maus einen Quadranten betritt. Dies wird auch in folgender Abbildung (Abb. 13) mittels Heatmaps dargestellt. Diese dienen dazu die Daten in visuelle Farbcodes umzuwandeln, um so die Verteilung der Daten grafisch darzustellen. Die Farbe Schwarz kennzeichnet dabei die am wenigsten frequentierte Zone, während heller werdende Farbtöne eine zunehmende Häufigkeit des Betretens der jeweiligen Zone anzeigen.

Durchschnittlich zeigten die Versuchstiere in unmittelbarer Nähe des Operationszeitraums eine erhöhte Aktivität in den ersten beiden Quadranten, die hauptsächlich Einstreu und Materialien zum Nestbau enthielten. Die unterschiedlichen Werte der Gruppen könnten auf

individuelle Unterschiede, Anpassung an die Umgebung, variierendes Stresslevel, zirkadiane Schwankungen oder präexperimentelle Faktoren zurückzuführen sein. Eine direkte Beeinflussung des Versuchs ist zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben. Ebenso wurde im Schnitt der dritte und vierte Quadrant im Verlauf des Experiments weniger häufig betreten. Dieses Verhaltensmuster wurde bei beiden Operationsmethoden beobachtet.

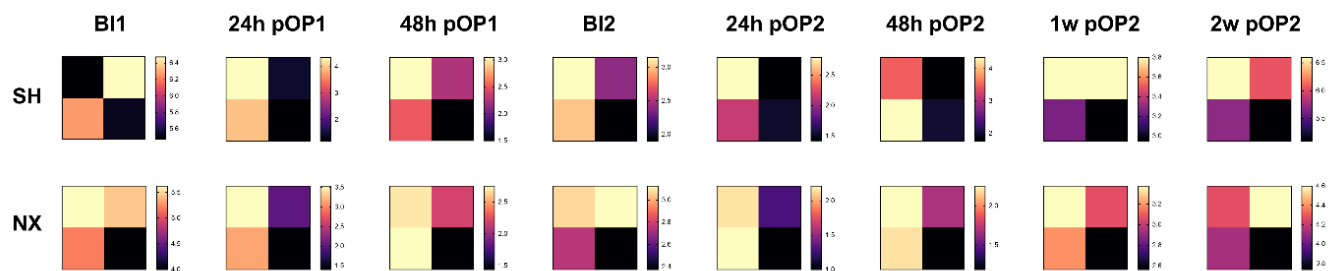


Abbildung 13: Heatmap zur Darstellung der Bewegungsmuster der Tiere

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Belastungsbewertung der Versuchstiere während der 5/6 Nephrektomie zu erstellen, sowie mögliche Verbesserungsvorschläge zu identifizieren. Als Hilfsmittel zur Beurteilung wurde ein Ethogramm erstellt und dessen Daten ausgewertet. Die Bewertung der Körperhaltung zeigte, wie erwartet, niedrigere Werte um die Zeitpunkte der Operationen, was auf eine unnatürliche Haltung hinwies. Auffällig waren dabei vermehrtes Zittern und ein gerundeter Rücken, die auf postoperative Belastungen der Tiere hinwiesen.

Die Operation steht trotz Analgetika mit Schmerzen in Verbindung. Ein gerundeter Rücken und gegebenenfalls Zittern sind ein häufiges Anzeichen dafür. Schmerzen können sich durch Verhaltens- und Haltungsänderungen manifestieren, wie zum Beispiel bei Meerschweinchen in einer Studie gezeigt wurde (41). Dabei wurde eine Veränderung der Körperhaltung vom Stehen zum Liegen, gelegentlich mit einem ausgestreckten Hinterbein, entweder seitlich oder hinter dem Körper, vermerkt. Abnorme Verhaltensweisen wie ungewöhnliche Positionierung der Hinterbeine, Anheben der Hinterbeine, Verdrehungen und Zuckungen können ebenfalls auf Schmerzen bei Meerschweinchen hinweisen (41).

Dabei kann Schmerz durch renale mechanosensorische und chemosensorischen Nerven ausgelöst werden. Dies geschieht zusätzlich zu den allgemeinen Schmerzmechanismen im Zusammenhang mit Laparotomien (24).

Schmerzen und Stress sind oft miteinander verbunden. Die Verbindung beruht auf zugrunde liegenden Mechanismen, die das autonome Nervensystem und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse umfassen, beide sind an der Stressreaktion beteiligt (42).

Dabei kann langfristiger Stress die Symptome von Schmerz und Angst modulieren (43).

Stress spielt eine Rolle bei der Entstehung akuter Schmerzen und bei der Aufrechterhaltung ihrer Chronizität. Die verschiedenen Stressmodelle in der Schmerzpathogenese werden von psychologischen Faktoren beeinflusst. Physiologische Reaktionen auf Stress und Schmerz sind unspezifisch und werden von verschiedenen Faktoren wie körperlicher Verfassung, früheren Erfahrungen, emotionalen und kognitiven Faktoren beeinflusst. Das Stress-Schmerz-Modell verdeutlicht die Zusammenhänge und möglichen Wechselwirkungen zwischen beiden (42).

In diesem Versuch wurde präoperativ Buprenorphin und Metamizol als Analgesie verabreicht und postoperativ drei Tage lang Metamizol und je nach Schmerzevaluierung zusätzlich Buprenorphin verabreicht. Wobei die Schmerzen hauptsächlich anhand eines aufgezogenen Abdomens und sehr gekrümmten Rücken beurteilt wurden. Buprenorphin ist das gängigste

Analgetikum und wird auch für Laparotomien und Operationen an den Nieren empfohlen (24). In Kombination mit Metamizol stellt es die passende Analgesie dar. Eine Studie ergab, dass die multimodale Analgesie bei Mäusen die größte analgetische Wirkung während der postoperativen Phase aufwies, verglichen mit den getesteten Einzelanalgetika, einschließlich Buprenorphin. Bei der multimodalen Analgesie werden verschiedene Klassen von Analgetika eingesetzt beispielsweise Opiode, nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Lokalanästhetika und adjuvante Medikamente. Durch die Kombination dieser verschiedenen Wirkstoffe zielt die multimodale Analgesie darauf ab, Schmerzen über mehrere Mechanismen zu bekämpfen, wodurch eine umfassendere Schmerzlinderung erreicht wird und möglicherweise der Bedarf an hohen Dosen einzelner Medikamente reduziert wird. Dieser Ansatz kann dazu beitragen, Nebenwirkungen zu minimieren und die allgemeinen Ergebnisse der Schmerzbehandlung zu verbessern (44).

Unter der Annahme, dass das Körpergewicht ein Indikator für den Gesundheitszustand der Versuchstiere ist, kann der Schweregrad der Operation durch den Vergleich von Abbildung sieben beurteilt werden. Bis zwei Wochen nach dem Eingriff des Versuchs zeigten die Scheinoperierten Mäuse ein konstantes Körpergewicht, während die NX -Gruppe einen deutlichen Gewichtsverlust aufwies. Dies bestätigt eine deutlich höhere Belastung des Körpers bei der tatsächlichen 5/6 Nephrektomie als bei der Schein -Operation.

Genauer gesagt zeigte NX -Gruppe nach der zweiten Operation eine signifikante Gewichtsabnahme auf. Das weist auf eine hohe Belastung des Tieres hin, welche sowohl durch Stress, Unwohlsein und Komplikationen während der Operationen, als auch durch postoperative Schmerzen und den Heilungsprozess verursacht wird. Zwei Wochen nach den Operationen war eine Gewichtszunahme festzustellen. Folglich könnte man zu diesem Zeitpunkt bereits auf die Regeneration des Körpers schließen.

Es ist anzumerken, dass sich beide Versuchsgruppen gegen Ende des Versuchs regenerierten, weniger schmerzassoziertes Verhalten zeigen und nahezu die gleichen Werte wie zu Beginn wiedererlangten. Die SH -Gruppe zeigte zum Zeitpunkt der BL1 und BL2 viel weniger Grabverhalten als nach den Operationen. Auch die NX -Gruppe vermerkte nach der ersten Operation nur einen minimalen Abfall der Grabaktivität, erst zum Zeitpunkt nach dem zweiten Eingriff wird ein deutlicher Abfall verzeichnet. Eine Studie von Gjendal et. al., 2020 legt nahe, dass Stressfaktoren wie die Isoflurananästhesie den Nestbau beeinflussen und zu einer verringerten Aktivität führen können. In diesem Versuch wurde keine genaue Differenzierung zwischen dem Nestbauverhalten und dem Graben gemacht, obwohl eine getrennte Betrachtung beider Verhaltensweisen sinnvoll gewesen wäre. Das Grabverhalten

im Vergleich zum Nestbau wurde durch die wiederholte Exposition gegenüber Isofluran nicht signifikant verändert, was darauf hindeutet, dass diese Verhaltensweisen unterschiedlich auf Stress reagieren (45). Zum Zeitpunkt der ersten und zweiten Operationen wurde eine verringerte Kletteraktivität verzeichnet, was erneut auf die Schmerzempfindlichkeit der Versuchstiere in dieser Phase des Experiments hinweist. Ähnlich wie bei der Beurteilung der Körperhaltung zeigte sich auch beim Klettern eine erhöhte Aktivität zu Beginn, vor der ersten Operation, sowie gegen Ende des Versuchs (2W pOP2). Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass die Versuchstiere unmittelbar nach den operativen Eingriffen ein Schmerzniveau erfuhren, dass ihre körperliche Aktivität verringerte. Um den Schmerz zu reduzieren kann die Dosierung oder auch die Häufigkeit der Gabe von Schmerzmitteln im Rahmen der empfohlenen Menge erhöht werden.

Die laut Eberspächer-Schweda (2020) empfohlene postoperative subkutane Dosis von Buprenorphin bei kleinen Nagern beträgt 0,03 – 0,1mg/kg Körpergewicht 4x täglich (46). Im Vergleich dazu erzeugt eine orale Einzeldosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht eine analgetische Wirkung über einen Zeitraum von sechs bis acht Stunden. Jedoch ist die analgetische Wirksamkeit stärker, wenn Buprenorphin in einer subkutanen Dosierung von 0,03 -0,1 mg/kg Körpergewicht verabreicht wird.

Mäuse besitzen eine hohe Stoffwechselrate, wodurch die Medikamente und Anästhetika schneller verarbeitet werden als bei größeren Tieren wie beispielsweise Hunde oder Katzen. Außerdem sind sie sehr stressanfällig gegenüber Umgebungsänderungen und weisen erhebliche Unterschiede in der Anästhetika-Empfindlichkeit auf, abhängig vom Stamm und Geschlecht auf. (47) (46).

Die optimale Dosierung von Buprenorphin für Mäuse variiert. Höhere Dosen führen zu verstärkter Schmerzlinderung, jedoch mit möglichen Unterschieden zwischen verschiedenen Mausstämmen. Eine individuelle Dosierungseinstellung ist wichtig, um die Schmerzbehandlung zu optimieren und unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Daher sollte im optimalen Fall die geeignete Dosierung in einer Pilotstudie für den jeweiligen Mausstamm ermittelt werden, um die beste analgetische Wirkung zu erreichen (48).

Buprenorphin erfordert üblicherweise alle vier bis sechs Stunden eine erneute Verabreichung, um eine adäquate Schmerzlinderung zu gewährleisten. Diese wiederholte Verabreichung kann zu Stress führen. Eine kommerziell erhältliche Formulierung namens Buprenorphin SR-LAB wurde entwickelt, um den Buprenorphinspiegel im Serum über einen Zeitraum von 48 bis 72 Stunden auf mehr als 1 ng/ml zu halten. Diese Langzeitformulierung bietet daher eine

geeignete Option für eine kontinuierliche Analgesie über längere Zeiträume im Vergleich zur Standard-Buprenorphin-Formulierung, die eine häufigere Verabreichung erfordert (49).

Die Gabe von Buprenorphin sollte auch in Verbindung mit möglichen Nebenwirkungen gebracht werden. Beobachtete Nebenwirkungen von Buprenorphin sind eine erhöhte Aktivität, gestörter zirkadianer Rhythmus und mehrere abnorme Verhaltensweisen. Es wurde auch eine Tendenz zu verringertem Nahrungs- und Wasserzufuhr sowie Körpergewichtsreduktion beobachtet (50). Für mehr Aussagekraft sollten auch die genannten Parameter, wie zum Beispiel der Schlaf-Wach-Rhythmus berücksichtigt und analysiert werden.

Auch die Dauer der Videoaufnahmen ist zu diskutieren. Die Videoaufnahme sollte ausreichend lang sein, um das Verhalten, das zu analysieren ist, zu erfassen. Einige Verhaltensweisen können kurzzeitig sein und erfordern daher möglicherweise längere Aufnahmen, um eine repräsentative Probe zu erhalten. Zum Beispiel wurde bereits beobachtet, dass Mäuse während eines bestimmten Prozentsatzes des Tages aktiv am Nestbau beteiligt sind, wobei Spitzenwerte in bestimmten Phasen des Hell-Dunkel-Zyklus auftreten. Für die Bewertung der Nestkomplexität in Schmerzbeurteilungsexperimenten wird als optimaler Zeitpunkt 9 Stunden nach Bereitstellung des Nestmaterials und dem Beginn der Lichtphase identifiziert. Somit ist die Beurteilung des Nestbaus mit bestimmten Zeitpunkten gekoppelt, die man berücksichtigen sollte (51). In diesem Versuch wurden die Videoaufnahmen ab zehn Uhr vormittags angefertigt. Das würde nicht den optimalen Bedingungen der Datenerfassung entsprechen. Andere Studien zeigen aber auch, dass der Nestbau eine vielseitige Verhaltensweise ist, die unter verschiedenen Bedingungen und unabhängig von der Dunkelphase beobachtet werden kann (52).

Zusätzlich wäre die Anwendung der Mouse Grimace Scale zu empfehlen. Sie bietet eine objektive Methode zur Beurteilung von Schmerzen bei Mäusen. Anhand spezifischer Gesichtsmerkmale können Forscher Schmerzindikatoren erfassen, anstatt ausschließlich auf subjektiven Beobachtungen oder Verhaltensänderungen zu basieren. Außerdem ermöglicht es eine Differenzierung zwischen verschiedenen Schmerzgraden. Durch die Bewertung spezifischer Gesichtsmerkmale kann man Unterschiede in der Intensität des Schmerzerlebens bei Mäusen feststellen (53).

Um das Schmerzempfinden objektiv quantifizieren zu können, ist die Anwendung einer Schmerzskala ein passendes Instrument. Die Schmerzskala bei Mäusen kann verwendet werden, um Schmerzreaktionen zu vergleichen, die durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden, wie zum Beispiel die optogenetische Aktivierung verschiedener Nozizeptorpopulationen. Dies ermöglicht ein besseres Verständnis der unterschiedlichen

Empfindungen und Reaktionen auf schmerzauslösende Reize bei Mäusen. Dabei können die Ergebnisse sehr genau gemessen und beurteilt werden, was die Untersuchung von Schmerzmechanismen, die Entwicklung neuer Schmerztherapien und die Bewertung der analgetischen Wirksamkeit erleichtert (54).

Dieser Versuch wird gemäß der EU -Richtlinie 2010/63/EU und dem Tierversuchsgesetz 2012 als schwer belastend eingestuft, das heißt es ist ein Experiment, das erhebliche Schmerzen oder Leiden für die Tiere verursachen kann. Eine Alternative als standardisierte objektive Methode zur Einschätzung des Schweregrades ist der RELSA -Score. Durch die Berücksichtigung mehrerer physiologischer und verhaltensbezogener Variablen ermöglicht er eine umfassende Beurteilung des Wohlbefindens der Tiere in Echtzeit während der postoperativen Genesung. Dies ermöglicht Forschern ein rechtzeitiges Eingreifen, um potenzielle Schäden zu minimieren. Er basiert auf physiologischen und verhaltensbezogenen Daten, einschließlich Körpergewicht, Punktwert auf der Grimace Scale, Grabverhalten und von der Telemetrie abgeleiteten Parametern. Der RELSA -Score wird berechnet, indem die quantitativen Eingabedaten auf einen Bereich von 0 bis 100 normalisiert und alle verfügbaren Variablen zu einem einzigen zusammengesetzten Score kombiniert werden. Der Wert spiegelt den relativen Schweregrad wider, dem einzelne Tiere oder Gruppen ausgesetzt sind, wobei höhere Werte auf ein erhöhtes Leiden und eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens hindeuten. Der RELSA -Score wurde als Instrument für die Echtzeitbewertung des Schweregrads validiert und verbessert so den Tierschutz, die Datenqualität und die Reproduzierbarkeit in der biomedizinischen Forschung (56).

Um die Anzahl der Tiere, die in dem Versuch verwendet werden, zu reduzieren, gibt es verschiedene alternative Methoden zu herkömmlichen Tierversuchen. Diese Methoden konzentrieren sich auf *in-vitro*- und *ex-vivo*-Techniken. Eine fortschrittliche Technologie namens "Organ-on-a-Chip" (OoC) simuliert die Funktionsweise von menschlichen Organen in einem mikrofluidischen Chip-System. Das Design des Chips berücksichtigt dabei die spezifischen Anforderungen des zu simulierenden Organs. Der Chip besteht aus mikrofluidischen Kanälen, in denen Zellen kultiviert werden können (57). Dabei hat man eine Methode, die auf Tierversuche verzichtet und die Lücke zwischen tierischer Arbeit *in vivo* und menschlichen Systemen überbrückt (43). Von Nachteil kann die technische sowie konzeptionelle Herausforderung der Implementierung von *in-vitro*- oder *ex-vivo*-Methoden als Ersatz für die 5/6-Nephrektomie bei lebenden Mäusen sein. Die 5/6 -Nephrektomie zielt darauf ab, die physiologischen und pathologischen Veränderungen *in vivo*, zu simulieren. *In-vitro*- und *ex-vivo*-Modelle können tatsächlich nicht die gesamte Komplexität des Modells replizieren.

Die vollständige Nachbildung der menschlichen Physiologie, einschließlich des komplexen Netzwerks des Mikrobioms, Immunsystems und vielfältigen Organsystemen, bleibt eine Herausforderung. Um das Forschungsmodell zu verbessern, sollten neben einer besseren Analgesie und einer schonenderen Versuchstechnik weitere Faktoren berücksichtigt werden. So könnte eine breitere Verhaltensanalyse das Wohlbefinden der Tiere besser widerspiegeln. Es ist von grundlegender Bedeutung, gegenwärtige Herausforderungen wie Standardisierung zu bewältigen, um eine umfassende Verbesserung dieser in die Forschungspraxis zu integrieren. Bei der Standardisierung von Tierversuchen sollten insbesondere die Haltungsbedingungen, Versuchsprotokolle, Tierausswahl und -behandlung, Datenprotokollierung und -analyse und die Validierung von Modellen verbessert werden.

5 Zusammenfassung

Der Belastungsrad der 5/6 -Nephrektomie wird aufgrund der Eingriffe in ein lebenswichtiges Organ und deren chronischen Auswirkungen auf die Tiere als „schwer“ eingestuft. Die Überlebensrate und das Wohlbefinden der Tiere nach dem Eingriff sind wichtige Indikatoren, wobei eine höhere Überlebensrate und geringere Beeinträchtigungen auf eine wenig invasive Methode oder weniger Komplikationen hinweisen.

Für meinen Versuch wurden 36 Versuchstiere in zwei Gruppen unterteilt: die NX -Gruppe, welche einer 5/6 -Nephrektomie unterzogen wurde, und die SH -Gruppe, welche einer Scheinoperation unterzogen wurde und somit als Kontrollgruppe fungierte.

Nach den chirurgischen Eingriffen wurden die Mäuse mittels Videoaufnahmen 5 Minuten lang beobachtet, um ein detailliertes Verhaltensprofil zu erstellen. Darüber hinaus wurden regelmäßig Gewichtsdaten erhoben, um mögliche Auswirkungen der Operation zu dokumentieren.

Die Analyse des Ethogramms ergab Anzeichen von Schmerz bei den Mäusen der NX -Gruppe sowie auch teilweise der SH -Gruppe, was auf eine mögliche Unzulänglichkeit des verwendeten Analgesieschemas hinweist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Anpassung des Analgesieschemas erforderlich gewesen wäre, um eine angemessene Schmerzlinderung und damit eine verbesserte Tiergesundheit und -wohlergehen sicherzustellen. Eine mögliche Anpassung ist die Verabreichung eines Buprenorphin-Depotpräparats, um eine langanhaltende Wirkung zu erzielen.

Eine präzisere postoperative Überwachung ist vorteilhaft, um gezielte Schmerztherapien zu verabreichen. Die Tiere sollten vor allem in den ersten 24 Stunden nach der Operation stündlich überwacht werden. In der anschließenden Genesungsphase sind, je nach Belastungsgrad, mehrere Kontrollen pro Tag notwendig. Allerdings ist die vollständige Eliminierung von Schmerzen in allen experimentellen Szenarien nicht immer möglich. Notwendige Interventionen zum Schutz und Wohlbefinden der Tiere sind gesetzlich vorgeschrieben und müssen stets Priorität haben. Wissenschaftliche Anforderungen müssen sich an diesen Rahmen halten. Eine angemessene Betreuung und Pflege der Tiere kollidiert nicht mit den wissenschaftlichen Zielen, sondern stellt vielmehr eine Voraussetzung für ethische Durchführungen der Versuche dar. Trotz Fortschritten in der Tierschutzforschung bestehen weiterhin Herausforderungen wie die Messung von Schmerz und Stress, individuelle Unterschiede bei Tieren und die Entwicklung von Alternativen.

6 Summary

The burden of the 5/6 nephrectomy is classified as severe due to the impact on a vital organ and its chronic effects on the animals. The survival rate and general well-being of the animals after the procedure are key indicators, with a higher survival rate and minimal impairments suggesting a less invasive method or fewer complications.

For my experiment, 36 animals were divided into two groups: the NX group, which underwent the 5/6 nephrectomy, and the SH group, which underwent a sham surgery and served as the control group.

Following the surgical procedures, the mice were observed for 5 minutes using video recordings to create a detailed behavioral profile. In addition, body weight was regularly measured to document any potential effects of the surgery.

The ethogram analysis showed signs of pain in the NX group and, to some extent, in the SH group, indicating a potential inadequacy of the analgesic protocol used. These findings suggest that adjustments to the analgesic regimen would have been necessary to ensure adequate pain relief and thereby improve animal health and welfare. One possible adjustment would be the administration of a buprenorphine depot formulation to achieve a longer-lasting effect.

More precise postoperative monitoring is beneficial for administering targeted pain therapies. The animals should be monitored hourly, particularly during the first 24 hours after surgery. In the subsequent recovery phase, multiple daily checks are required, depending on the level of stress. However, complete elimination of pain in all experimental scenarios is not always possible.

Necessary interventions to protect and ensure the well-being of the animals are legally mandated and must always take priority. Scientific requirements must adhere to this framework. Adequate care and management of the animals do not conflict with scientific objectives but rather represent a prerequisite for ethically conducted experiments.

Despite advances in animal welfare research, challenges remain, such as measuring pain and stress, addressing individual variability among animals, and developing alternatives.

7 Abkürzungsverzeichnis

MGS	Mouse Grimace Scale
NC3Rs	National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research
CDK	chronische Niereninsuffizienz
ESRD	finale Niereninsuffizienz
BL1	Baseline 1
BL2	Baseline 2
SH-Gruppe	Scheinoperierte Gruppe
NX-Gruppe	5/6- nephrektomierte Gruppe
NSAIDs	nicht steroidale Antiphlogistika
OoC	Organ-on-a-chip
RELSA-Score	Relative Severity Assessment Score

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemahafte Darstellung der 5 Gesichtsausdrücke mit Score System	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Abbildung 2: Käfig von der Seite	11
Abbildung 3: Käfig von oben.....	11
Abbildung 4: Zeitstrahl zur Veranschaulichung der Videoaufnahmen	13
Abbildung 5: schematische Darstellung der Aufteilung des Käfigs in vier Quadranten.....	14
Abbildung 6: Foto eines Käfigs mit Kennzeichnung der Areale	14
Abbildung 7: Mittlere Gewichtsdaten beider Gruppen mit Standardabweichung	19
Abbildung 8: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Körperhaltung und Aufrichten zu den verschiedenen Messzeitpunkten	21
Abbildung 9: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Klettern und Graben zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	22
Abbildung 10: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Putzen und Ruheverhalten zu den verschiedenen Messzeitpunkten	22
Abbildung 11: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Bewegung und Handscheue zu den verschiedenen Messzeitpunkten	23
Abbildung 12: Mittelwert und Standardabweichung der Daten von Wasser- und Futteraufnahme und Kot- und Harnabsatz zu den verschiedenen Messzeitpunkten.....	24
Abbildung 13: Heatmap zur Darstellung der Bewegungsmuster der Tiere	25

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Definition der einzelnen Parameter.....	16
--	----

10 Literaturverzeichnis

1. Stephens ML, Mak NS. History of the 3Rs in toxicity testing: From Russell and Burch to 21st century toxicology. *Issues in Toxicology*. 2014; p.1-43
2. Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Anim (NY)*. 2017 Mar 22;46(4):152–156.
3. Lilley E, Isbrucker R, Ragan I, Holmes A. Integrating 3Rs approaches in WHO guidelines for the batch release testing of biologicals. *Biologicals*. 2021;74,24-27
4. MacArthur Clark J. The 3Rs in research: A contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *British Journal of Nutrition*. 2018;120(s1):S1-S7.
5. Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin DJ, et al. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *British Journal of Cancer*. 2010;102(11):1555-77
6. Calvillo L. Editorial: 3Rs approach (replace, reduce and refine animal models) to improve preclinical research. *Frontiers in Physiology*. 2022;13:1040575
7. Molina Martínez JL, Alonso Villavicencio G, Heredia Ruiz D, García Cruz MN, Sánchez Álvarez C, Castro Gutiérrez M, et al. Bioethics in animal experimentation. *Revista Electronica de Veterinaria*. 2015;16(2):1-19
8. AVMA. American Veterinary Medical Association. 2022. Animal welfare: What is it? 2022, <https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/animal-welfare> (Zugriff: 20.11.2024)
9. Gazzano A, Mariti C. Refinement of laboratory animal welfare. *Biomedical Science and Engineering*. 2019;3(s2):91
10. Jirkof P, Potschka H. Effects of Untreated Pain, Anesthesia, and Analgesia in Animal Experimentation. In: Sánchez Morgado JM, Brønstad A, Editor. *Experimental Design and Reproducibility in Preclinical Animal Studies*. Cham: Springer, 2021. pp. 105–26
11. Kandarova H. Alternative methods to animal experimentation and their role in modern toxicology. In: Tsatsakis AM, Editor. *Toxicological Risk Assessment and Multi-System Health Impacts from Exposure*. Amsterdam: Elsevier; 2021. pp. 13–22.
12. Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: The NC3Rs strategy. *Lab Animal (NY)*. 2017;46(6):152-156
13. Lidster K, Owen K, Browne WJ, Prescott MJ. Cage aggression in group-housed laboratory male mice: an international data crowdsourcing project. *Scientific Reports*. 2019;9(1):15211
14. Ellacott KLJ, Morton GJ, Woods SC, Tso P, Schwartz MW. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metabolism*. 2010;12(1):10-7.
15. Battivelli D, Boldrini L, Jaiswal M, Patil P, Torchia S, Engelen E, Spagnoletti L, Kaspar S, Gross CT. Induction of territorial dominance and subordination behaviors in laboratory mice. *Scientific Reports*. 2024;14(1):28655.
16. Zidar J, Weber EM, Ewaldsson B, Tjäder S, Lilja J, Mount J, et al. Group and single housing of male mice: collected experiences from research facilities in Sweden. *Animals*. 2019;9(12):1010

17. Kulikov A V, Tikhonova MA, Kulikova EA, Kulikov VA, Popova NK. 2010. [Effect of genotype and emotional stress on hygienic grooming in inbred mice] *hurnal Vysshei Nervnoi Deiatel'nosti imeni I.P. Pavlova*. 2010;60(5):632–637.
18. Ayash S, Schmitt U, Lyons DM, Müller MB. Stress inoculation in mice induces global resilience. *Translational Psychiatry*. 2020;10(1):200
19. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Dudek BC. Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. *Science*. 1999;284(5420):1670-2
20. Lee VK, David JM, Huerkamp MJ. Micro- and macroenvironmental conditions and stability of terrestrial models. *ILAR Journal*. 2020;60(2):120-140
21. So N, Franks B, Lim S, Curley JP. A social network approach reveals associations between mouse social dominance and brain gene expression. *PLOS One*. 2015;10(7):e0134509
22. Love CJ, Gubert C, Renoir T, Hannan AJ. Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice. *STAR Protoc*. 2022;3(4): 101689
23. Emmer KM, Russart GKL, Walker WH, Nelson RJ, Courtney DeVries A. Effects of light at night on laboratory animals and research outcomes. *Behavioral Neuroscience*. 2018;132(4):302-314
24. Ahmadi-Noorbakhsh S, Farajli Abbasi M, Ghasemi M, Bayat G, Davoodian N, Sharif-Paghaleh E, et al. Anesthesia and analgesia for common research models of adult mice. Vol. 38, *Laboratory Animal Research*. 2022;38(1):40
25. Sultana R, Ogundele OM, Lee CC. Contrasting characteristic behaviours among common laboratory mouse strains. *Royal Society Open Science*. 2019;6(6):190574
26. Kappel S, Hawkins P, Mendl MT. To group or not to group? Good practice for housing male laboratory mice. *Animals*. 2017;7(12):88
27. Van Meer P, Raber J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochemical Journal*. 2005 Aug 1;389(Pt 3):593-610
28. Langford DJ, Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Chanda ML, Clarke SE, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature Methods*. 2010 Jun;7(6):447-9
29. Faller KME, McAndrew DJ, Schneider JE, Lygate CA. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. *Experimental Physiology*. 2015;100(2):164-72
30. Kahnau P, Habedank A, Diederich K, Lewejohann L. Behavioral methods for severity assessment. *Animals*. 2020;10(7):1136.
31. Rix A, Drude N, Mrugalla A, Mottaghy FM, Tolba RH, Kiessling F. Performance of severity parameters to detect chemotherapy-induced pain and distress in mice. *Laboratory Animals*. 2020;54(5):452-460
32. Bao YW, Yuan Y, Chen JH, Lin WQ. Kidney disease models: tools to identify mechanisms and potential therapeutic targets. *Zoological Research*. 2018;39(2):72-86
33. Adam RJ, Williams AC, Kriegel AJ Comparison of the surgical resection and infarct 5/6 nephrectomy rat models of chronic kidney disease. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 2022;322(6):F639-F654
34. Mallien AS, Pfeiffer N, Brandwein C, Inta D, Sprengel R, Palme R, et al. Comparative Severity Assessment of Genetic, Stress-Based, and

- Pharmacological Mouse Models of Depression. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2022;16:908366
35. Blenkuš U, Gerós AF, Carpinteiro C, Aguiar P de C, Olsson IAS, Franco NH. Non-Invasive Assessment of Mild Stress-Induced Hyperthermia by Infrared Thermography in Laboratory Mice. *Animals*. 2022;12(2):177
 36. Francois M, Delgado IC, Shargorodsky N, Leu CS, Zeltser L. Assessing the effects of stress on feeding behaviors in laboratory mice. *eLife*. 2022;11:e70271
 37. Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology and Behavior*. 2019;199:229-243
 38. Harikrishnan VS. Laboratory animal Behaviour and Its Applications in Biomedical Research. In: Nagarajan P, Gudde R, Srinivasan R, Editor. *Essentials of laboratory animal science: principles and practices*. Singapore: Springer; 2021; pp. 479-495
 39. Vijayaragunathan R, Srinivasan MR. Bayes factors for comparison of two-way ANOVA models. *Journal of Statistical Theory and Applications*. 2020;19(4):540-546
 40. Bland JM, Altman DG. Tukey Multiple Comparison test. *British Medical Journal Journal of Clinical Nursing*. 1995;310(6973):170.
 41. Ellen Y, Flecknell P, Leach M. Evaluation of using behavioural changes to assess post-operative pain in the Guinea pig (*cavia porcellus*). *PLOS One*. 2016;11(9):e0161941
 42. Wu PY, Yang X, Wright DE, Christianson JA. Foot shock stress generates persistent widespread hypersensitivity and anhedonic behavior in an anxiety-prone strain of mice. *Pain*. 2020;161(1):211-219
 43. Lunde CE, Sieberg CB. Walking the Tightrope: A Proposed Model of Chronic Pain and Stress. *Frontiers in Neuroscience*. 2020;14:270
 44. Oliver VL, Thurston SE, Lofgren JL. Using cageside measures to evaluate analgesic efficacy in mice (*Mus Musculus*) after surgery. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2018;57(2):186-201
 45. Gjendal K, Ottesen JL, Olsson IAS, Sørensen DB. Effect of Repeated Exposure to Isoflurane on Nest Building and Burrowing in Mice. *Journal of the American Association Laboratory Animal Science*. 2020;59(1):30-36
 46. Eberspächer-Schweda E. *AnästhesieSkills*. Stuttgart: Thieme; 2020;2: pp. 217-225.
 47. Blake C, Pellett S. Anaesthesia in small rodents. *The Veterinary Nurse*. 2022;13(10):479-484
 48. Rudeck J, Vogl S, Heintz C, Steinfath M, Fritzwanker S, Klieber A, et al. Analgesic treatment with buprenorphine should be adapted to the mouse strain. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2020;191:172877
 49. Myers PH, Goulding DR, Wiltshire RA, McGee CA, Dickerson AB, Comins MM, et al. Serum buprenorphine concentrations and behavioral activity in mice after a single subcutaneous injection of simbadol, buprenorphine sr-lab, or standard buprenorphine. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2021;60(6):661-666

50. Jirkof P, Tourvieille A, Cinelli P, Arras M. Buprenorphine for pain relief in mice: repeated injections vs sustained-release depot formulation. *Lab Animal*. 2015;49(3):177-87
51. 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. *Laboratory Animal*. 2013;47(3):153-61
52. Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *Journal of Visualized Experiments*. 2013;(82):51012
53. 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*. 2021;11(3):673
54. Abdus-Saboor I, Fried NT, Lay M, Burdge J, Swanson K, Fischer R, et al. Development of a Mouse Pain Scale Using Sub-second Behavioral Mapping and Statistical Modeling. *Cell Reports*. 2019;28(6):1623-1634.
56. Talbot SR, Struve B, Wassermann L, Heider M, Weegh N, Knape T, et al. RELSA—A multidimensional procedure for the comparative assessment of well-being and the quantitative determination of severity in experimental procedures. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022;9:937711
57. Paloschi V, Sabater-Lleal M, Middelkamp H, Vivas A, Johansson S, Van Der Meer A, et al. Organ-on-a-chip technology: A novel approach to investigate cardiovascular diseases. *Cardiovascular Research*. 2021;117(14):2742-2754