

Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Training als angewandtes Refinement bei der Blutentnahme beim Minipig

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Delia Laura Fiderer
Tierärztin aus Baden-Baden

Berlin 2023
Journal-Nr.: 4383

**Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Training als angewandtes Refinement bei der Blutentnahme beim Minipig

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von
Delia Laura Fiderer
Tierärztin
aus Baden-Baden**

Berlin 2023

Journal-Nr.: 4383

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke
Zweiter Gutachter: PD Dr. Roswitha Merle
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Doris Höltig

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

miniature pigs, animal welfare, blood samples, fixation, stress, stress factors, training of animals, veterinary practice, animal experiments

Tag der Promotion: 17.05.2023

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <https://dnb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-96729-213-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2023

Dissertation, Freie Universität Berlin

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2023 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
1. Einleitung	1
2. Literatur	5
2.1 Gesetzlicher Hintergrund	5
2.2 Refinement	7
2.3 Stress	8
2.3.1 Physiologischer Hintergrund – Stress	11
2.4 Stressmessung und Stressparameter beim Schwein	14
2.4.1 Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität	14
2.4.2 Blutdruck	16
2.4.3 Körpertemperatur & Thermographie	17
2.4.4 Biochemische Parameter	17
2.4.5 Verhaltenstests zur Beurteilung von Stress	18
2.5 Opiorphin	19
2.6 Schmerz	21
2.7 Grimace Scales	24
2.7.1 Grimace Scale für Schweine	24
2.8 Operante Konditionierung von Schweinen – Training als Refinement	29
2.8.1 Verstärker bei der operanten Konditionierung von Schweinen	32
2.9 Blutentnahmemethoden Schwein	33
2.10 Speichelprobengewinnung beim Schwein	35
2.11 Zielsetzung und Hypothesen	35

3. Material und Methoden	37
3.1 Tierversuchsantrag	37
3.2 Auswahl der Tiere	37
3.3 Tierhaltung	37
3.4 Versuchsaufbau und untersuchte Parameter	37
3.5 Belastungseinschätzung	38
3.6 Training der Tiere	39
3.6.1 Trainingsplan	41
3.7 Probengewinnung	45
3.7.1 Gewinnung der Speichelproben	45
3.7.2 Gewinnung der Blutproben	46
3.8 Herzfrequenzmessungen	46
3.9 Cortisol- und Opiorphinbestimmung	48
3.9.1 Speichel-Cortisol-ELISA	48
3.9.2 Serum-Cortisol-ELISA	49
3.9.3 Opiorphin-ELISA	50
3.10 Grimace Scale	52
4. Statistische Auswertung	59
4.1 Stichprobengröße	59
4.2 Speichel-Cortisol	59
4.3 Serum-Cortisol	60
4.4 Speichel-Opiorphin	61
4.5 Herzfrequenzmessungen	61
4.5.1 Herzfrequenzvariabilität	61
5. Ergebnisse	63
5.1 Speichel-Cortisol:	63
5.2 Serum-Cortisol	66

5.3 Herzfrequenz	67
5.3.1 Herzfrequenzvariabilität.....	74
5.4 Opiorphin	75
5.5 Grimace Scale	76
5.6 Training der Tiere.....	79
6. Diskussion	81
7. Zusammenfassung.....	99
8. Summary	101
9. Literaturverzeichnis	103
10. Publikationen.....	113
Danksagung.....	114
Finanzierungsquellen	115
Selbstständigkeitserklärung	115

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Refinement Kreislauf nach Lloyd et al., 2008.....	8
Abbildung 2: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse und Sympatho- adrenomedulläre Achse.....	11
Abbildung 3: Cortisolausschüttung und die negativen Feedbackkreisläufe	13
Abbildung 4: Facial Action Units nach Di Giminiani et al., 2016.....	25
Abbildung 5: Piglet Grimace Scale nach Viscardi et al., 2017	27
Abbildung 6: abgeänderte Grimace Scale nach Viscardi et al. für 10 Wochen alte Schweine nach von Vullo et al., 2020.....	29
Abbildung 7: Fixierung eines ausgewachsenen Schweins mittels Oberkieferschlinge zur Blutentnahme	34
Abbildung 8: Ablaufplan: Pobenentnahmen und Training	38
Abbildung 9: Target-Röhre zum befestigen an der Boxentüre mit Apfelstück.....	40
Abbildung 10: Minipig beim ruhigen Stehen mit dem Rüssel in der Target-Röhre.....	40
Abbildung 11: Die vier Stufen des Trainingsplans.....	41
Abbildung 12: Detaillierter Ablauf der Probengewinnung an den Probengewinnungstagen	45
Abbildung 13: Piktogramm eines Schweins mit Herzfrequenzmessgurt	46
Abbildung 14: Regressionskoeffizient der Speichel-Cortisolwerte zu den vier Messzeitpunkten und den Zuständen untrainiert und trainiert	64
Abbildung 15: Serum-Cortisolwerte zum Zeitpunkt der Blutentnahme jeweils im untrainierten Zustand und im trainierten Zustand	67
Abbildung 16: Herzfrequenzmittelwerte der 12 Minipigs in untrainiertem und trainiertem Zustand, gemessen in Ruhe und bei Stress zum Zeitpunkt der Blutentnahme	70
Abbildung 17: Herzfrequenzmesswerte zum Zeitpunkt der Blutentnahme im untrainierten Zustand und im trainierten Zustand	72
Abbildung 18: Korrelation der Serum-Cortisol-Konzentration und der Herzfrequenz.....	73
Abbildung 19: Modell zur Veranschaulichung, der Berechnung der Herzfrequenzvariabilität	74
Abbildung 20: Bland Altman Plot der Opiorphin-Messungen	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhalte und Zwischenziele des Trainingsplans	41
Tabelle 2: Trainierte Blutentnahmemethode dargestellt anhand von sechs Fotos	44
Tabelle 3: Grimace Scale für die Beurteilung der Frontalaufnahmen der Minipigs nach der Blutentnahme	54
Tabelle 4: 25 Fotos von Minipigs, zur Beurteilung mit Hilfe der erstellten Grimace Scale	56
Tabelle 5: Die vier Stufen der Speichelcortisol ANOVA-Varianzanalyse	60
Tabelle 6: Ergebnisse des Tests der Innersubjektkontraste im Rahmen der ANOVA-Varianzanalyse der Speichel-Cortisolmesswerte	63
Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte der Speichel-Cortisolmessungen untrainiert und trainiert	65
Tabelle 8: Serum-Cortisol - Mittelwerte, Standardfehler und Standardabweichung der untrainierten und der trainierten Tiere, sowie p-Wert der beim Vergleich beider Gruppen	66
Tabelle 9: Herzfrequenz – Mittelwerte, Standardabweichung, Standardfehler, Signifikanz ...	67
Tabelle 10: Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Herzfrequenzvariabilität der 12 Minipigs und die Signifikanz des Unterschieds	74
Tabelle 11: Statistische Auswertung Grimace Scale - Krippendorff's alpha	77
Tabelle 12: Grimace Scale Auswertung - Prozentuale Angaben der vergebenen Punktzahlen	78

Abkürzungen

ACTH.....	Adrenocorticotropes Hormon
cAMP.....	cyclisches Adenosinmonophosphat
CRF.....	Corticotropin Releasing Faktor
CRH.....	Corticotropin Releasing Hormon
EDTA.....	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
EKG.....	Elektrokardiogramm
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse
SAM-Achse	Sympatho-adrenomedulläre Achse
V.....	Vena (Vene)
ZNS.....	Zentralnervensystem

1. Einleitung

Es ist die „Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf, dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen“, heißt es im ersten Satz des Tierschutzgesetzes (§ 1 Satz 1 TierSchG). Tierversuche sind ein Ausnahmetatbestand und sind als Eingriffe oder Behandlungen an Tieren zu Versuchszwecken definiert, die mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für diese Tiere verbunden sein können (§ 7 Absatz 2 Satz 1 TierSchG). Die Bestrebungen, Tierversuche so weit wie möglich zu reduzieren, nehmen in den letzten Jahren stetig zu, jedoch kann bisher nicht vollständig auf Tierversuche zu wissenschaftlichen Zwecken verzichtet werden.

Nagetiere, wie Mäuse und Ratten sind die am häufigsten eingesetzten Versuchstiere in Deutschland. Wegen ihrer anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit zum Menschen werden auch Schweine (ähnlich große Organe, ähnlicher Verdauungsapparat, ähnliches kardiovaskuläres System wie der Mensch) regelmäßig in Tierversuchen im Rahmen humanmedizinischer und veterinärmedizinischer Forschung eingesetzt. Das Bundesinstitut für Risikobewertung veröffentlichte Ende 2021 die Zahlen der 2020 in Tierversuchen eingesetzten Tiere – darunter auch 19.048 Schweine (Bericht vom 16.12.2021 über die Zahlen zu den im Jahr 2020 verwendeten Versuchstieren vom Bundesinstitut für Risikobewertung).

Die Versuchstiere werden in Deutschland unter anderem durch den fünften Abschnitt des Tierschutzgesetzes geschützt. Am 18.06.2021 wurde dieser zuletzt geändert und er beinhaltet die Pflicht zur Beschränkung von Tierversuchen auf das unerlässliche Maß und die Pflicht der Verbesserung der Methoden, die in Tierversuchen angewendet werden (§ 7 TierSchG). Wenn Methoden verbessert werden sollen, müssen die Verbesserungen evidenzbasiert sein. Die vorliegende Arbeit widmet sich der Methode der Blutentnahme bei Schweinen, angewandt bei Minipigs, im Rahmen von Tierversuchen.

Die übliche Methode zur Blutentnahme bei erwachsenen Schweinen erfordert eine Fixation der Tiere mittels einer Oberkieferschlinge. Die Schlinge, meist bestehend aus einem Stahlseil und einem Griff, wird in das Maul hinter die Oberkieferzähne eingelegt und über dem Oberkiefer zugezogen. So kann der Kopf mit Hilfe der Schlinge nach oben gezogen werden, um die Vena jugularis externa am Hals für die Blutentnahme zugänglich zu machen und das Tier zu fixieren (Muirhead 1981). Während der Fixation mit der Oberkieferschlinge zur Blutentnahme zeigen die Tiere oft starke Lautäußerungen, versuchen rückwärts aus der Schlinge zu entweichen und der Eingriff wirkt, subjektiv betrachtet, als für das Tier stressig.

Stress ist eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens und zählt zu den in §7 des Tierschutzgesetzes genannten „Leiden“ (Hirt, Maisack, and Moritz 2016), die neben Schmerzen und Schäden, die einem Tier in einem Tierversuch zugefügt werden können, auf ein unerlässliches Maß zu beschränken sind (§ 7 Absatz 1 Satz 1 TierSchG). Stress führt im Körper über die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Hypophysen-Nebennierenachse zu einem Anstieg von Botenstoffen und Hormonen wie Cortisol, Adrenalin und Noradrenalin. Diese führen unter anderem zu einer erhöhten Herzfrequenz, einem größeren Atemzugvolumen und einer verminderten Darmmotorik und ermöglichen so dem Körper eine schnelle Aktionsbereitschaft bei der Bewältigung der Stresssituation. Sie können in Blut, Speichel, Haaren, Geweben und Exkrementen bestimmt werden und als Stressparameter dienen. Ebenfalls können zur Stressmessung die Auswirkungen auf die physiologischen Abläufe im Körper, wie der Herzfrequenzanstieg bestimmt werden.

Während der Blutentnahme beim Schwein mit Fixation mittels Oberkieferschlinge kommt es zu dem beschriebenen Anstieg von Stressparametern wie Cortisol und Adrenalin in Blut und von Cortisol auch im Speichel der Tiere. In einigen Studien wird deshalb die Oberkieferschlinge gezielt als Stressor eingesetzt (Neubert, Gurtler, and Vallentin 1996; Geverink et al. 2002).

Ein bei Schmerzen oder Missempfindungen reduziertes Wohlbefinden spiegelt sich auch in der Mimik von Tieren wider. Für verschiedene Tierarten wurden daher schon sogenannte „Grimace Scales“ entwickelt, bei denen Bereiche des Gesichts, die sich durch Muskelanspannung bei Schmerzen verändern, sogenannte „Facial Action Units“, beobachtet werden und eine Beurteilung des empfundenen Schmerzes möglich machen. Man kann davon ausgehen, dass nicht nur Schmerzen, sondern jegliches Unwohlsein zu Veränderungen der Mimik führt. Auch für Ferkel wurde bereits eine Grimace Scale erstellt (Viscardi et al. 2017).

Bereits 1959 entwarfen Russel und Burch das 3R-Prinzip für Tierversuche bei dem die drei 3R's für die Worte „replace“, „reduce“ und „refine“ stehen. Sie beschreiben bezogen auf Tierversuche die Ziele, diese zu ersetzen, zu reduzieren und die angewandten Methoden zu verbessern (Russell and Burch 1959). In der EU-Richtlinie 2010/63/EU wurde das 3R-Prinzip aufgegriffen und die Verpflichtung zur Reduktion von Stress und Belastungen für Tiere, die zu wissenschaftlichen Zwecken genutzt werden, gesetzlich verankert. Damit einhergehend gewinnt der Begriff „Refinement“ die letzten Jahre zunehmend an Bedeutung. Refinement bei Tierversuchen bedeutet nach der Auffassung von Russel und Burch, dass Verfahren und Methoden in Tierversuchen verfeinert werden sollen mit Blick auf den Stress, den die Tiere im Rahmen des Versuchs erfahren (Russell and Burch 1959).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Refinement der Blutentnahmemethode beim Minipig im Rahmen von Tierversuchen. Untersucht werden soll zunächst, wieviel Stress die Tiere bei der herkömmlichen Blutentnahmemethode mit Hilfe der Oberkieferschlinge zur Fixation tatsächlich erfahren und ob man den Stress für die Tiere während der Blutentnahme durch eine trainierte Methode ohne Fixation reduzieren kann und letztlich, ob eine Blutentnahme ohne Fixierung verlässlich möglich ist.

Mittels Klickertraining, einer Kombination von klassischer und operanter Konditionierung, wurden die Tiere zunächst darauf konditioniert, einen Gegenstand, ein sogenanntes Target, mit der Rüsselscheibe zu berühren und schließlich bis zu einer Minute am Target zu verharren und währenddessen zunächst Berührungen am Hals und schließlich eine Blutentnahme aus der Vena jugularis externa ohne Fixation zuzulassen.

Anhand der Beobachtungen der Herzfrequenz, sowie des Cortisolwerts in Blut- und Speichelproben, wurde die trainierte Methode der Blutentnahme ohne Fixierung verglichen mit der Blutentnahmemethode mit Hilfe der Oberkieferschlinge. Die Speichelproben haben den Vorteil, dass die Probenentnahme nicht-invasiv und einfach in der Handhabung ist und dass die Speichelcortisol-Messwerte mit denen in Serumproben korrelieren und somit eine vergleichbare Aussagekraft haben (Vining et al. 1983).

Darüber hinaus wurden die Speichelproben auch auf das Vorhandensein von Opiorphin, einem endogenen Pentapeptid, untersucht, das 2005 beim Menschen im Speichel entdeckt wurde und vermehrt bei Schmerz und Entzündungsprozessen in der Mundhöhle ausgeschüttet wird. Das Pentapeptid wirkt wie ein körpereigenes Schmerzmittel, indem es Enzyme hemmt, die beim Abbau von Enkephalinen beteiligt sind. Dadurch sind mehr Enkephaline vorhanden, die an Opioid-Rezeptoren des Körpers binden und so die Schmerzwahrnehmung hemmen (Wisner et al. 2006).

Erstmals wurde in der vorgelegten Arbeit untersucht, ob auch Stress, kombiniert mit dem durch die Oberkieferschlinge verursachten akuten Schmerz, ausreicht, um beim Minipigs einen Anstieg des Opiorphins im Speichel zu bewirken und ob es für die Beurteilung von akuten Schmerzen beim Minipig geeignet ist.

Außerdem wurde auch die Mimik der Minipigs in Ruhe und nach der Blutentnahme dokumentiert und verglichen und eine Anwendbarkeit der bereits für Ferkel beschriebenen Grimace Scale bei adulten Minipigs zur Beurteilung von akutem Stress überprüft.

2. Literatur

2.1 Gesetzlicher Hintergrund

Zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere wurde 2010 die Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 durch das EU-Parlament und den Ministerrat beschlossen und daraufhin von den 28 Mitgliedstaaten in nationales Recht umgesetzt. Sie löste die EU-Richtlinie 86/609/EWG ab, die zu große Unterschiede in den Regelungen zu Tierversuchen der einzelnen EU-Mitgliedstaaten zuließ.

Letztendliches Ziel der Richtlinie 2010/63/EU ist das vollständige Ersetzen von Tierversuchen durch Alternativmethoden und die Durchsetzung des 1959 von Russell und Burch entworfenen 3R-Prinzips für Tierversuche (Russell and Burch 1959) auf europäischer Ebene (Richtlinie 2010/63/EU). Die drei R's - „replace“, „reduce“ und „refine“ beschreiben das Anstreben einer reduzierten Tierzahl in Versuchen, für die Tiere optimierte Versuchsmodelle und Haltungsbedingungen und das Ersetzen von Tieren in Tierversuchen durch Alternativen (Russell and Burch 1959) wie tierfreie Modelle, Zellkulturen oder Computersimulationen (Badyal, Modgill, and Kaur 2009). Im vierten Artikel der Richtlinie 2010/63/EU werden diese Punkte explizit aufgegriffen in Form des „Grundsatzes der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung“. Dieser Artikel hält die EU-Mitgliedstaaten dazu an, wann immer es möglich ist, auf lebende Tiere in Versuchen zu verzichten, die Anzahl der Tiere zu minimieren und die Versuchs- und Haltungsbedingungen zu verbessern, um mögliche „Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden“ auf ein Minimum zu reduzieren (Art. 4 RL 2010/63/EU).

Bereits 2002 wurde der Tierschutz als Staatsziel in das Grundgesetz in Paragraph 20a aufgenommen, in dem es seitdem heißt: „Der Staat schützt auch in Verantwortung für die künftigen Generationen die natürlichen Lebensgrundlagen und die Tiere im Rahmen der verfassungsmäßigen Ordnung durch die Gesetzgebung und nach Maßgabe von Gesetz und Recht durch die vollziehende Gewalt und die Rechtsprechung.“ (Art. 20a Satz 2 GG). Umgesetzt wird das Ziel des Tierschutzes in Form des Tierschutzgesetzes und tierartspezifischer Tierschutz-Verordnungen. „Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“ heißt es im ersten Paragraphen des Tierschutzgesetzes (§ 1 Absatz 1 Satz 2 TierSchG). Wann ein Grund vernünftig ist, kann wie folgt beschrieben werden: „Ein Grund ist vernünftig, wenn er triftig, einsichtig und von einem schutzwürdigen Interesse getragen anzuerkennen ist, und wenn er unter den konkreten Umständen schwerer wiegt als das Interesse des Tieres an seiner Unversehrtheit.“ (Hirt, Maisack, and Moritz 2016). Hinter der Frage des vernünftigen Grundes stehen zwei

allgemeine Rechtsgrundsätze – der „Grundsatz der Verhältnismäßigkeit im engeren Sinne“ und der „Grundsatz der Erforderlichkeit“. Der Grundsatz der Erforderlichkeit besagt, dass Belastungen, die nicht erforderlich sind, vermieden werden müssen und nicht zu rechtfertigen sind. Nicht erforderlich sind sie, wenn zum Beispiel Alternativmethoden existieren, die ein gleich verlässliches (oder verlässlicheres) Ergebnis in Bezug auf die Beantwortung einer wissenschaftlichen Frage erwarten lassen. Das bedeutet auch, dass stets das mildeste Mittel, die mildeste Alternative gewählt werden muss, um ein Ziel zu erreichen. Hier fügt sich der Grundsatz der Verhältnismäßigkeit im engeren Sinne an, der ein Abwägen der Vor- und Nachteile der geplanten Handlung sowohl für den Mensch als auch für die Tiere darstellt und deren Verhältnis beschreibt. Wenn die Nachteile die Vorteile überwiegen, ist die Handlung nicht verhältnismäßig und nicht zu rechtfertigen. Die beiden Grundsätze werden vom Bundesverfassungsgericht als Prinzip oder Grundsatz der Verhältnismäßigkeit zusammengefasst (Grabitz 1973). Tierversuche sind nach dem deutschen Tierschutzgesetz ein Ausnahmetatbestand vom Paragraph 1 des Tierschutzgesetzes, bei dem Eingriffe oder Behandlungen an einem Tier zu wissenschaftlichen Zwecken vorgenommen werden dürfen, die mit Schmerzen, Leiden oder Schäden für das Tier verbunden sein können (§ 7 Absatz 2 Satz 1 TierSchG).

Voraussetzung sind unter anderem eine vorher durchgeführte Güterabwägung, bei der der erwartete Nutzen des Versuchs der Belastung der Versuchstiere gegenübergestellt wird, eine ausführliche Planung des Versuchs unter Berücksichtigung der 3 R's, die Wahl der mildesten Mittel und die Genehmigung des Tierversuchs. Im Rahmen von Tierversuchen tritt §7 des Tierschutzgesetzes in Kraft, in dem zunächst in Absatz 1, Satz 1 festgelegt wird, dass „Tierversuche im Hinblick auf die den Tieren zuzufügenden Schmerzen, Leiden und Schäden“, sowie „auf die Zahl der verwendeten Tiere“ und „die artspezifische Fähigkeit der verwendeten Tiere, unter den Versuchseinwirkungen zu leiden, auf das unerlässliche Maß zu beschränken“ sind (§ 7 Absatz 1 Satz 1 TierSchG). Außerdem ist die Haltung der Versuchstiere so zu verbessern, dass die Tiere „nur in dem Umfang belastet werden, der für die Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken unerlässlich ist“ (§ 7 Absatz 1 Satz 2 TierSchG). In Absatz 1 heißt es darüber hinaus, dass es auch Pflicht ist, die Methoden, die in Tierversuchen angewandt werden zu verbessern (§ 7 Absatz 1 TierSchG).

Unter die in §1 und §7 des Tierschutzgesetzes genannten „Schmerzen“ fallen unangenehme Sinnes- und Gefühlserlebnisse, die im Zusammenhang mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung stehen – oder als solche empfunden werden (International Association for the Study of Pain (IASP), 1994). Zu den „Leiden“ gehören alle Beeinträchtigungen des Wohlbefindens, die nicht durch den Begriff „Schmerz“ mit abgedeckt werden. Wohlbefinden wiederum beschreibt den Zustand körperlicher und seelischer Harmonie des Tieres in sich

und mit der Umwelt. Wohlbefinden lässt sich ausmachen an Gesundheit und normalem Verhalten. Zuletzt bleiben die „Schäden“, die jede Beeinträchtigung der physischen oder psychischen Unversehrtheit beschreiben. Stress fällt als Einschränkung des Wohlbefindens unter die im Tierschutzgesetz genannten „Leiden“ (Hirt, Maisack, and Moritz 2016).

Die Blutentnahme beim Schwein mit Fixation mit Hilfe der Oberkieferschlinge ist nach den oben beschriebenen Definitionen verbunden mit Leiden im Sinne von Stress und mit Schmerzen (wegen potenzieller Gewebeschädigung) durch die Fixation mit der Oberkieferschlinge. Die Blutentnahme gilt allgemein allerdings nicht als schmerzhafter Eingriff und die für einen Eingriff notwendigen Fixierungsmaßnahmen werden häufig nicht in die Beurteilung eines Eingriffs miteinbezogen, auch wenn sie mit Schmerzen verbunden sein können.

2.2 Refinement

1959 haben Russel und Burch „The Principles of Humane Experimental Technique“ veröffentlicht. Sie setzten sich mit dem ethischen Dilemma von Tierversuchen auseinander, dass Tiere genutzt und in Versuchen eingesetzt werden, um der Menschheit potenziell Nutzen zu bringen (Tannenbaum and Bennett 2015). Um sich einer möglichen Rechtfertigung von Tierversuchen auf ethischer Ebene zu nähern, erstellten sie 3 Prinzipien – „replacement“, „reduction“ und „refinement“ (Russell and Burch 1959; Tannenbaum and Bennett 2015).

Replacement steht dabei für das Ersetzen von Wirbeltieren in Tierversuchen zum Beispiel durch den Einsatz von isolierten Organen, Zellkulturen oder tierfreien Modellen. Reduction steht für die Reduktion der im Versuch eingesetzten Tiere mit Hilfe statistischer Methoden. Refinement steht für jede Verringerung von Beeinträchtigungen für die Tiere in Tierversuchen (Russell and Burch 1959).

Dazu zählt neben möglichst stressarmen Versuchsbedingungen auch eine optimierte Haltung der Versuchstiere und eine Optimierung aller Eingriffe, die am oder mit dem Tier stattfinden (Flecknell 2002). 1995 definierten Russel und Burch Refinement noch strenger als absolute Minimierung des Stresses für die noch in Tierversuchen eingesetzten Tiere (Russell and Burch 2009). Schmerz und dessen Reduktion nennen Russel und Burch meist nicht extra in ihren Texten, da für sie Schmerz eine Form des Stresses darstellt (Tannenbaum and Bennett 2015).

Lloyd et. al haben einen Refinement-Kreislauf erstellt (siehe Abb. 1), der helfen soll, Refinement in Tierversuchen zu optimieren, Leiden und Schmerzen für die Tiere zu

verringern und der vor allem zeigt, dass es sich um einen fortlaufender Prozess handeln sollte und nicht um einen Vorgang mit Endpunkt. Die wissenschaftlichen Verfahren sollen während eines Versuchs immer wieder in Frage gestellt werden, immer wieder Probleme gesucht, gefunden und anschließend verbessert werden. Bisher unvermeidliche Belastungen sollen stets unter Einbezug neuer Erkenntnisse überdacht werden (Lloyd, Foden, and Wolfensohn 2008).

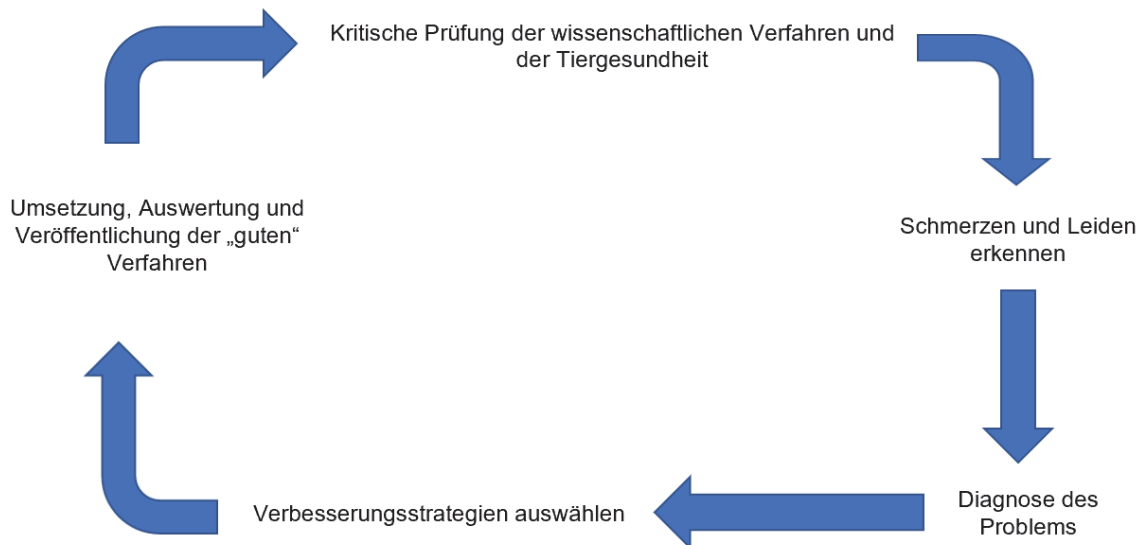


Abbildung 1: Refinement-Kreislauf. Quelle: Eigene Darstellung des Refinement-Keislaufs von Lloyd et. al, 2008, S. 286.

Der Refinement-Gedanke breitet sich nach und nach auch in anderen Formen der Tierhaltung aus. So kommen zum Beispiel in Tierhaltungen, die der Lebensmittelproduktion dienen, zum Teil schon Refinement-Strategien zum Einsatz (Lardy et al. 2021; Meyer-Hamme, Lambertz, and Gauly 2016). Durch Enrichment in Form von Beschäftigungsmaterialien oder mehr Platz wird versucht, den Stress oder die Belastungen in der Tierhaltung zu minimieren und das Wohlbefinden der Tiere zu steigern (Casal et al. 2017). Das Potential der Umsetzung von Refinement-Strategien in der konventionellen Tierhaltung ist noch nicht ausgeschöpft (van de Weerd and Ison 2019).

2.3 Stress

Das Stresskonzept im medizinisch-wissenschaftlichen Sinne weist eine komplexe, geschichtliche Entwicklung durch verschiedene Perspektiven (zum Beispiel die der Medizin,

der Naturwissenschaften oder der Psychologie) auf, weshalb bisher keine allgemeingültige Definition vorliegt (Esch 2002).

Historisch mitgeprägt wurde der Begriff „Stress“ im medizinisch-wissenschaftlichen Sinne von Hans Selye. Er beschrieb Stress als unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche äußeren Einflüsse. Anfang der 1930er Jahre stellte er fest, dass seine Laborratten stets die gleichen körperlichen Veränderungen wie vergrößerte Nebennieren, Thymus- und Lymphknotenatrophie sowie Magengeschwüre zeigten bei anhaltender Exposition mit verschiedenen äußeren schädlichen Reizen wie Kälte, Hitze oder bei Verabreichung von Pharmaka oder toxischen Substanzen (Selye 1946). Diese Symptome stellten eine Reaktion auf chronischen Stress dar und führten Selye zunächst dazu, ein Modell mit drei Phasen, der Alarmphase, der Widerstandsphase und der Erschöpfungsphase zu entwerfen, dessen Auswirkungen im Körper er dann in einer Veröffentlichung als das General Adaption Syndrom zusammenfasste (Masson and Selye 1938). Die erste Phase des General Adaption Syndroms, die Alarmphase, beschreibt den Zeitraum der ersten 24-48 Stunden der Exposition mit schädlichem, äußeren Reiz (Selye 1937). Selye beobachtete in dieser Phase bereits Beeinträchtigungen im Sinne einer Abnahme der Tätigkeit von Thymus, Leber, Milz und lymphatischer Organe, Veränderungen der Nebennierenrinde im Sinne von Fettablagerungen sowie ein Absinken der Körpertemperatur und einen Abfall des Glucosespiegels. Bleibt der auslösende Reiz bestehen, tritt die Widerstandsphase ein, in der der Glucosespiegel sich langsam normalisiert und ansteigt bis zum Höhepunkt der Phase, bei der es zum Abklingen der Symptome der Alarmphase kommt und die Organfunktionen sich normalisieren (Masson and Selye 1938). Diese Phase kann mehrere Tage bis Wochen andauern. Bei weiter anhaltender Exposition des schädlichen Reizes tritt schließlich eine deutlich kürzere Erschöpfungsphase ein. Die Widerstandsreaktion scheitert und es kommt zu ähnlichen, aber stärkeren Symptomen als in der Alarmphase. Schäden wie Magengeschwüre, Nebennierenvergrößerung, Immunsuppression und sinkender Glukosespiegel, der schließlich zum Tod durch Hypoglykämie führen kann, können auftreten (Masson and Selye 1938).

Selye untersuchte nicht nur die langfristigen Auswirkungen von anhaltendem, also chronischem Stress, sondern beschrieb auch detailliert die akuten Stressreaktionen, die zu Beginn der Alarmphase ablaufen mit Stimulation der Nebennieren mit Anstieg der Katecholamine, Gluco- & Mineralocorticoide, sowie den daraus resultierenden Auswirkungen auf das Kreislaufsystem wie den Anstieg der Herzfrequenz aber auch die Erhöhung des Atemzugvolumens oder die Weitstellung der Pupillen (Selye 1946). Walter Cannon, ein Psychologe, prägte den Begriff der fight-and-flight Reaktion, die die akute Stressantwort beschreibt. Er beobachtete die Reaktionen von Labortieren auf Stress und Bedrohungen und

erkannte in den Reaktionen, dass sich die Tiere bei Bedrohung innerhalb kürzester Zeit für Kampf oder Flucht als überlebenssicherndes Verhalten entscheiden, und der Körper hierfür über die akuten Stressreaktionen vorbereitet wird (Cannon 1932).

1950 beschrieb Selye das General Adaption Syndrom als Basis der Stressreaktion auf schädliche äußere Einflüsse (Selye 1950). Trotz der unspezifischen Basis der Stressreaktion erklärte er, dass das Reaktionsbild nicht immer gleich, sondern stark variierend in Kombination mit spezifischen Reaktionen auf den zugrunde liegenden Reiz, den Stressor, ist. Stress ist eine Reaktion, die sich aus der Kombination eines Schadens, der durch einen Stressor verursacht wird, und der Verteidigung des Körpers dagegen zusammensetzt (Selye 1950). Unterschiedliche Stressoren führen zu unterschiedlichen körperlichen Reaktionen. So findet im Körper bei Hitzeeinwirkung zum Beispiel eine Weitstellung der Gefäße statt, während bei großer Kälte eine Kontraktion stattfindet und eine Konzentration des Blutvolumens auf den Körperkern (Krohne 2002).

Selye stellt außerdem klar, dass ein bestimmter Stressor nicht bei allen Individuen die gleichen Reaktionen hervorruft (Selye 1950). Stressempfinden ist subjektiv und wie der Psychologe Lazarus etwas später zusammenfasste, ist die Stressentstehung maßgeblich davon abhängig, wie das Individuum die Situation bewertet (Lazarus and Folkman 1991).

In Bezug auf den auslösenden, immer schädlichen Reiz änderte Selye 1976 seine Stressdefinition folgendermaßen: Stress ist die Anpassungsreaktion auf jegliche äußeren Einflüsse (Selye 1976). Es wurde festgestellt, dass nicht nur schädliche Reize zu den von ihm beschriebenen Veränderungen führen, sondern auch zum Beispiel positive Ereignisse wie die Futteraufnahme, Belohnungen, freudige Aufregung oder Sexualverhalten (Szechtman et al. 1974). In diesem Zug führte Selye dann die Unterteilung von Stress in negativen Distress, mit dem der Körper überfordert ist und der ihm schadet, und positiven Eustress, der angenehm und gesund für den Körper ist, ein (Selye 1975).

Selye beschreibt Stress stets als die Reaktion des Körpers (Selye 1976). Im Laufe der Jahre hat sich dieses Bild verändert: Zu einem Stressgeschehen zählt der Stressor als aktuelle Bedingung oder Situation, die auf das Individuum einwirkt, sowie die Stressreaktion im Sinne von psychischen und physischen Reaktionen des Individuums auf die Situation. Zum anderen zählt auch das Individuum mit persönlichen Erfahrungen und Bewertungen der Situation, die zwischen den Stressoren und den Stressreaktionen vermitteln und entscheidend sind, ob und wie ausgeprägt die Reaktion abläuft zum Stressgeschehen (Plaumann, Busse, and Walter 2006).

2.3.1 Physiologischer Hintergrund – Stress

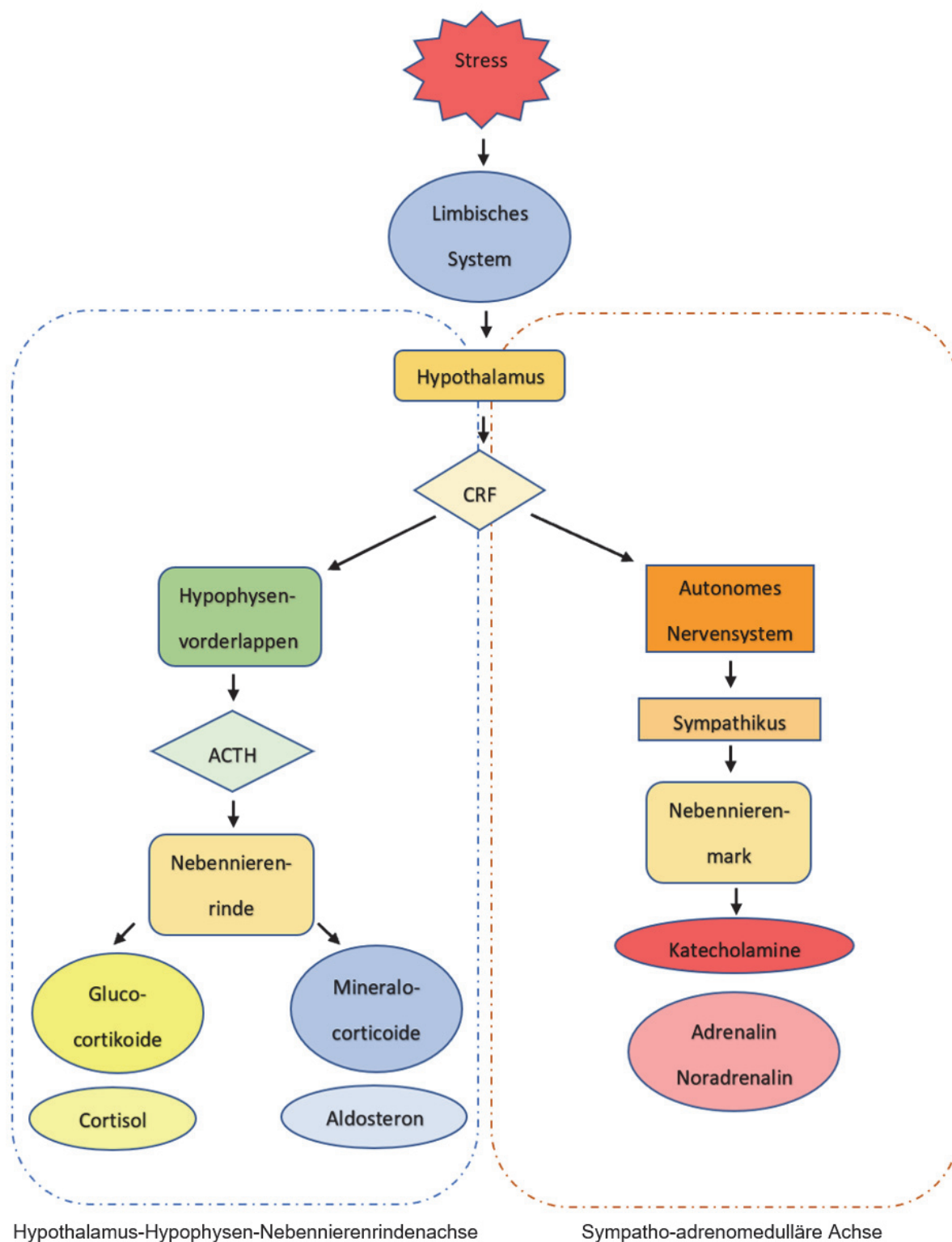


Abbildung 2: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (HHN-Achse) und Sympatho-adrenomedulläre Achse (SAM-Achse). Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und der Sympatho-adrenomedullären Achse durch die Ausschüttung des Corticotropin Releasing Faktors bei Stress. Quelle: Eigene Abbildung anhand folgender Quellen: Ulrich-Lai and Herman, 2009; von Dawans and Heinrichs, 2018

Eine Situation, die in einem Teil des Gehirns, dem limbischen System, als Stress wahrgenommen wird, führt zunächst zu einer Ausschüttung des Corticotropin Releasing Faktors (CRF)(von Dawans and Heinrichs 2018). Der Corticotropin Releasing Faktor, oder auch Corticotropin Releasing Hormon, ist ein Hormon, das im Gehirn, genauer im Hypothalamus, gebildet wird und dann in ein anderes Gehirnareal, den Hypophysenvorderlappen, transportiert wird, wo es die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse (HHN-Achse) und die Sympatho-adrenomedulläre Achse (SAM-Achse) stimuliert (Ulrich-Lai and Herman 2009). Die SAM-Achse kann auch direkt von Kernen im Hirnstamm angesprochen werden, was zum Beispiel bei Verletzungen/Traumata stattfindet und unabhängig von der Stimulation des Hypothalamus oder des Hypophysenvorderlappens direkt zu einer sympathischen Aktivierung des Nebennierenmarks über die Nervi splanchnici mit Katecholaminausschüttung führt (Ulrich-Lai and Herman 2009).

Bei Aktivierung der SAM-Achse stimuliert der CRF das autonome Nervensystem und führt zu einer Aktivierung des Sympathikus und Reduktion des parasymphatischen Tonus (Ulrich-Lai and Herman 2009). Die Aktivierung des Sympathikus führt auf neuronalem Weg über das Rückenmark zur Stimulation des Nebennierenmarks und so zur Ausschüttung von dort synthetisierten Katecholaminen (von Dawans and Heinrichs 2018). Dieser Aktivierungsablauf erfolgt innerhalb weniger Sekunden und ist im Vergleich zur Aktivierung der HHN-Achse, deren Wirkung erst nach bis zu einigen Minuten eintritt und bis zu mehreren Stunden anhalten kann, deutlich schneller (Gunnar and Quevedo 2007). Die Aktivierung der SAM-Achse wird auch als erste Welle bezeichnet, während die Aktivierung der HHN-Achse dann die zweite Welle der Stressantwort darstellt (McEwen and Sapolsky 1995). Durch die Veränderung des parasymphatischen Tonus kommt es zum Herunterfahren der Verdauungs- und Fortpflanzungsfunktionen (Ulrich-Lai and Herman 2009).

Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin führen durch Bindung an kardiale Rezeptoren zu einem Anstieg der Herzfrequenz und über eine Vasokonstriktion der Gefäße in der Peripherie zu einem Anstieg des Blutdrucks (Tsigos and Chrousos 2002). Das Blut wird außerdem vornehmlich für Gehirn, Skelettmuskulatur und Herz bereitgestellt, die Nieren- und Magen-Darmdurchblutung wird gesenkt. In der Leber stimulieren sie die Glykogenolyse und führen, so wie die Glukokortikoide, ebenfalls zu einem Blutzuckeranstieg und einer Energiebereitstellung. In der Lunge werden die Bronchien weitgestellt und ein größeres Atemzugvolumen ermöglicht. Die Speichelproduktion wird angeregt und die Pupillen weitgestellt (Tsigos and Chrousos 2002). Diese Reaktionen ermöglichen dem Körper eine hohe Reaktionsbereitschaft im Sinne der von Cannon beschriebenen, überlebenssichernden Kampf-oder-Flucht-Reaktion (Cannon 1932).

Bei der Aktivierung der HHN-Achse durch den CRF wird im Hypophysenvorderlappen die Aktivierung einer cAMP-abhängigen Proteinkinase stimuliert, die wiederum die Ausschüttung von ACTH [Adrenocorticotropes Hormon] anregt. Dieses gelangt dann aus dem Hypophysenvorderlappen über das Blutgefäßsystem zu den Nebennieren. Dort fördert es in der Nebennierenrinde die Synthese und Ausschüttung von Glucocorticoiden aber auch die Ausschüttung von Mineralocorticoiden (Merke and Bornstein 2005).

Glukokortikoide wie Cortisol beeinflussen bei akutem Auftreten den Kohlenhydratstoffwechsel und fördern die Glukoneogenese sowie einhergehend damit die Lipolyse, also die Bereitstellung von Energie in Form von Fettsäuren und Glucose für den Körper (McMahon, Gerich, and Rizza 1988). Die Mineralokortikoide mit dem Hauptvertreter Aldosteron, führen in den Nieren unter anderem zur Natrium-Retention und folglich zur Wasser-Retention, was wiederum zu einem erhöhten Blutvolumen und gesteigerten Blutdruck führt (Fornara and Schumann 2016).

Cortisol führt außerdem nach akutem Stress zu einer negativen Rückkopplung, das heißt, es hemmt in Hypothalamus und Hypophyse die Freisetzung von CRH und ACTH und damit die weitere Cortisolproduktion (Chrousos and Gold 1992; von Dawans and Heinrichs 2018).

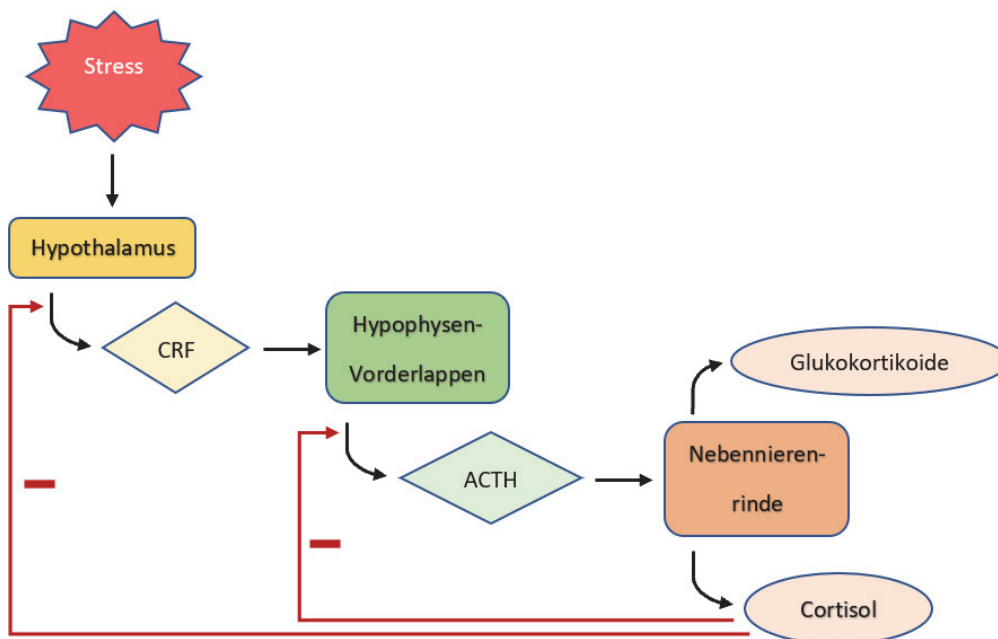


Abbildung 3: Cortisolausschüttung und die negativen Feedbackkreisläufe. Quelle: Eigene Abbildung aufgrund folgender Quellen: Chrousos and Gold, 1992; von Dawans and Heinrichs, 2018.

Bei chronischem Stress kommt es zu immer wieder erhöhten Cortisolspiegeln durch die Stimulation der HHN-Achse, die auf Dauer zu einem Hypercortisolismus führen können, also

einem dauerhaften Überschuss als Cortisol (Schulz et al. 1998). Im Gehirn findet dann eine Down-Regulation der Glucocorticoidrezeptoren statt, dadurch ist die negative Rückkopplung durch Cortisol gestört (Young, Akana, and Dallman 1990). Außerdem wird die CRH-Produktion im Gehirn durch dauerhaft erhöhte Cortisolspiegel sogar noch verstärkt. Der anhaltende Cortisolüberschuss kann zu verschiedensten Veränderungen im Körper führen, wie zum Beispiel Stammfettsucht durch eine Fettstoffwechselstörung und Zunahme der Fettdepots in der Bauchhöhle. Er erhöht, wie beim Mensch festgestellt, aber zum Beispiel auch die Neigung zur Entwicklung von Depressionen und Diabetes (Peeke and Chrousos 1995; Fraser et al. 1999). Außerdem wird die Anzahl der Mineralocorticoidrezeptoren verringert, was wiederum den Blutdruck beeinflussen kann (Herman, Adams, and Prewitt 1995).

Cortisol kann darüber hinaus die Bedeutung oder den Stellenwert bestimmter, angenehmer Aktivitäten beeinflussen und verstärken, wie zum Beispiel die Aufnahme von zucker- oder fetthaltigen Nahrungsmitteln beim Mensch. Akut führt Cortisol wie oben beschrieben zwar zu einer Lipolyse, dennoch führt es chronisch nicht zum Fettabbau, sondern dann oft sogar zur Gewichtszunahme (Dallman et al. 2003).

2.4 Stressmessung und Stressparameter beim Schwein

Um Stress bei Schweinen einschätzen oder messen zu können, können verschiedene Biomarker und Veränderungen am Körper oder dem Verhalten bestimmt werden, die sich durch die Aktivierung der Sympatho-adrenomedullären Achse und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei Stress verändern (Martínez-Miró et al. 2016).

2.4.1 Herzfrequenz und Herzfrequenzvariabilität

Zu den physiologischen Stressparametern gehört die Herzfrequenz, die aufgrund der oben beschriebenen Sympathikus-Aktivierung ansteigt (Berntson et al. 1997; Tsigos and Chrousos 2002).

Die Herzfrequenz ist für die Messung von akutem Stress geeignet, kann bei mehrmaligen Messungen aber auch zur Beurteilung von chronischem Stress verwendet werden (Schubert et al. 2009). Sie ist nicht-invasiv zum Beispiel über Herzfrequenzmesssensoren an Brustgurten messbar (Marchant-Forde and Marchant-Forde 2004; Reimert et al. 2014). Alternativ kann die Herzfrequenz bei Schweinen auch über ein Holter-EKG bestimmt werden, dessen Elektroden vorher aber am Brustkorb des Schweins fixiert und dann mit einer Jacke am Schwein fixiert und geschützt werden müssen (Marchant-Forde and Marchant-Forde 2004).

Auch eine invasive Messung der Herzfrequenz ist möglich, jedoch muss zunächst unter Anästhesie ein intraarterieller Katheter platziert werden (Molinari et al. 2002).

Die Herzfrequenz wird aus den Kammerkontraktionen in einem bestimmten Zeitintervall bestimmt. Das Herz hat ein eigenes Schrittmachersystem. Primärer Schrittmacher ist der Sinusknoten, gebildet aus Muskelzellen im rechten Vorhof (Bruder 2011). Von ihm aus werden in regelmäßigen kurzen Abständen Erregungen gebildet und weitergeleitet. Über den Atrio-Ventrikular-Knoten werden die Erregungen in das His-Bündel geleitet, von dort aus weiter in die Kammerchen bis zur Herzspitze. Dort werden die Erregungen über Purkinjefasern auf die Herzmuskelzellen übertragen und führen zur Kontraktion (Bruder 2011).

Die Ruheherzfrequenz beim adulten Schwein (Alteber, Sauen und Schlachtschweine) liegt zwischen 60 und 90 Schlägen pro Minute, bei Absatzferkeln zwischen 80 und 100 Schlägen pro Minute und bei Saugferkeln zwischen 190 und 210 Schlägen pro Minute (Baumgartner 2009; Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004). Bei Stress, dem Deckakt oder bei Sauen während der Geburt, kann die Herzfrequenz ansteigen auf bis zu über 200 Schläge/Minute (Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004). Beim Einsatz von Oberkieferschlingen beim Schwein tritt der höchste Anstieg der Herzfrequenz bereits während der ersten Minute nach Anlegen der Schlinge auf und kann auch über 200 Schläge/Minute erreichen (Geverink et al. 2002).

Herzfrequenzvariabilität

Die Herzfrequenz bei Lebewesen ist nicht statisch, sondern weist Frequenzänderungen auf, die situationsabhängig sind und als Herzfrequenzvariabilität bezeichnet werden (Berntson et al. 1997; Löllgen 1999). Die Herzfrequenz wird, wie oben beschrieben, bestimmt durch die Aktionen der Schrittmacher des Herzens, also primär des Sinus-Knotens, aber auch des Atrioventrikularknotens. Die Aktionen der Schrittmacher wiederum werden beeinflusst durch die Stimulation von Sympathikus und Parasympathikus (Berntson et al. 1997; Bruder 2011).

Der Sinusknoten und die Vorhöfe des Herzens sind von parasympathischen Nervenfasern innerviert. Da der Sinusknoten primärer Schrittmacher des Herzens ist, wird die Ruheherzfrequenz also vom Parasympathikus bestimmt. Bei Stimulation des Parasympathikus kommt es bei der Freisetzung von Acetylcholin durch Fasern des N. vagus zur Öffnung von Kaliumkanälen an Sinusknotenzellen, wodurch das Membranpotenzial an den Zellen erhöht wird. Dadurch kommt es zu einer langsameren Depolarisation in der Diastole, der Entspannungs- und Füllungsphase der Herzaktion, somit zu einer langsameren Herzfrequenz (Berntson et al. 1997).

Der Sympathikus innerviert das gesamte Herz. Bei Stimulation des Sympathikus kommt es zur Freisetzung von Noradrenalin. Noradrenalin führt zu einer erhöhten Calciumleitfähigkeit der Zellmembranen und über Stimulierung von Beta1-Rezeptoren zu geöffneten Natriumkanälen, wodurch es wiederum zur Beschleunigung der diastolischen Depolarisation und somit zu einer erhöhten Herzfrequenz kommt (Berntson et al. 1997).

Darüber hinaus kann die Herzfrequenz auch durch die Stimulation von Barorezeptoren in der Lunge, den Vorhöfen und dem arteriellen Gefäßsystem sowie durch die Atmung und humorale Faktoren beeinflusst werden (Esperer 1994; Löllgen 1999).

Die Herzfrequenzvariabilität lässt sich mittels Elektrokardiographie messen (Kuwahara et al. 1999). Dabei werden die Abstände der R-Zacken des Elektrokardiogramms und deren Abweichung gemessen. Bei Schweinen wurde festgestellt, dass chronischer Distress, ausgelöst durch Änderung der Haltungform von paarweiser Haltung zu Einzelhaltung, zu einer verminderten Anpassungsfähigkeit des Herzens an die Reize, also zu einer verminderten Herzfrequenzvariabilität, führt. Dieser Zustand legte sich erst nach frühestens 2 Wochen wieder (Kuwahara et al. 2004). Bei Untersuchungen an Hunden konnte zwar ein Zusammenhang zwischen Herzfrequenzvariabilität und Stress festgestellt werden, aber keine Unterscheidung von Eu- und Distress nachvollzogen werden (Lensen et al. 2017).

2.4.2 Blutdruck

Auch der Blutdruck reagiert auf die Aktivierung des Sympathikus (Tsigos and Chrousos 2002; Martínez-Miró et al. 2016) und kann sowohl nicht-invasiv, zum Beispiel über eine Manschette (Werner, Schäffer, and Trautvetter 1977), am Schwanz oder den Gliedmaßen des Tieres, oder invasiv über einen intraarteriellen Katheter unter Anästhesie gemessen werden (Molinari et al. 2002). Da während der nicht-invasiven Blutdruckmessung das Tier möglichst ruhig stehen sollte und die Messung bei Bewegung des Tieres sehr störanfällig und ungenau ist, ist diese Methode ohne Anästhesie nicht üblich und der Blutdruck wird im Vergleich zur invasiven Messung unterschätzt (Reed et al. 2018). Blutdruck wird in Studien bei Schweinen deshalb eher invasiv, unter Anästhesie, über intraarteriell platzierte Sensoren gemessen (Molinari et al. 2002; Linz et al. 2014). Bei Messungen unter Anästhesie muss der Einfluss der Anästhesie auf den Blutdruck beachtet werden (Musk, Costa, and Tuke 2014). Eine weitere Möglichkeit stellt die chronische Instrumentierung dar, die es ermöglicht, den Blutdruck am wachen Tier zu messen, über eine zuvor invasiv unter Anästhesie platzierte intraarterielle Sonde (Hammond et al. 1993).

2.4.3 Körpertemperatur & Thermographie

Die Körpertemperatur kann als physiologischer Parameter auch bei der Beurteilung des Stresslevels mit einbezogen werden als schnell messbare Methode, unter dem Vorbehalt, dass die Körpertemperatur auch durch Faktoren wie den Gesundheitsstatus oder Zyklusstand der Tiere beeinflusst werden kann (Holtz et al. 1968). Die Messung der inneren Körpertemperatur ist bislang der Goldstandard (Jara et al. 2016). Sie kann beim Schwein rektal mit einem Thermometer gemessen werden, dazu ist eine Manipulation des Tiers notwendig (Petry et al. 2017). Nach Fixation mit Oberkieferschlinge konnte bereits eine stress-induzierte Hyperthermie bei Schweinen festgestellt werden (Parrott and Lloyd 1995), nach Transportstress eine Hypothermie (Parrott et al. 1998).

Außerdem gibt es die Möglichkeit der Infrarot-Thermographie. Mit Hilfe von Wärmebildkameras kann nicht-invasiv die Oberflächentemperatur des Tiers gemessen werden. Eine Studie konnte zeigen, dass die mittels Infrarot-Thermographie am Auge gemessene Temperatur bei Schweinen mit deren Rektaltemperatur stark korreliert (Petry et al. 2017). Außerdem kann die Infrarot-Thermographie auch bei Verhaltensbeobachtungen mit einbezogen werden. Hier konnte in einem Versuch mit Schweinen, die Rangkämpfe ausfochten, ein Abfall der Körpertemperatur nach Ende der Auseinandersetzung festgestellt werden und ein größerer Unterschied der Temperatur der Extremitäten im Vergleich zum Körper. Ursächlich wurde eine stressbedingte Vasokonstriktion vermutet (Boileau et al. 2019). Die Infrarot-Thermographie kann auch zur Diagnostik von Erkrankungen, besonders zur Früherkennung von Lahmheiten, genutzt werden, da in entzündeten Gelenken oft eine mit der Wärmebildkamera erfassbar höhere Temperatur zu erkennen ist (Amezcuca et al. 2014).

2.4.4 Biochemische Parameter

Die Hauptvertreter der bestimmaren Botenstoffe sind die Produkte der Nebennierenaktivierung: Glukokortikoide und Katecholamine. Zu den Glukokortikoiden gehört Cortisol, zu den Katecholaminen gehören Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin (Martínez-Miró et al. 2016).

Glukokortikoide – Cortisol

In Blut- oder Speichelproben kann Cortisol zur Messung von akutem Stress eingesetzt werden. Ein Anstieg von Cortisol im Blut (Serum oder Plasma) findet innerhalb von einer Minute nach Stresseinwirkung statt, der Anstieg im Speichel mit einer leichten Verzögerung bis zu 5 Minuten (Geverink et al. 2002). Die Untersuchung von Speichelproben hat den Vorteil, dass die Speichelgewinnung nicht-invasiv möglich ist und die Speichelcortisolwerte mit den Serumcortisolwerten korrelieren und somit dieselbe Aussagekraft besitzen.

Auch in Urin- und Haarproben kann Cortisol bestimmt werden, weitere eignen sich zur Untersuchung von chronischem Stress. In Kotproben können ebenfalls Glucocorticoidmetabolite bestimmt werden und die Probengewinnung kann ohne Manipulation des Tiers ablaufen. Tagesakute Veränderungen können so nach der Dauer der Darmpassage von 10-12 Stunden noch gezeigt werden (Möstl and Palme 2002).

Berücksichtigt werden muss bei der Cortisolbestimmung die circadiane Kinetik. Die Cortisolproduktion wird durch die Ausschüttung des Corticotropin Releasing Faktors bestimmt. CRF wird nicht nur bei Aufregung im Hypothalamus ausgeschüttet, die Produktion unterliegt auch einer zirkadianen Rhythmik mit zwei Peaks innerhalb von 24 Stunden, einem am frühen Morgen und einem am Nachmittag oder Abend (Ruis, Te Brake et al. 1997). Diese zirkadiane Rhythmik lässt sich ebenfalls bei der Messung von Cortisolspiegeln beim Schwein in Speichel- oder Blutproben nachvollziehen. Bei der Ausprägung der Cortisolpeaks und deren Zeitpunkt spielen die Haltungs- und Versuchsbedingungen sowie das Alter und Gewicht der Tiere eine Rolle (Eckel et al. 1996; Ruis, Brake, et al. 1997; Jong et al. 2000; Hillmann et al. 2008).

Katecholamine

Da die Katecholamine nach Aktivierung der Sympatho-adrenomedullären Achse über die Aktivierung des Sympathikus aus dem Nebennierenmark ausgeschüttet werden, erfolgt ihr Anstieg innerhalb von Sekunden nach Stresseinwirkung, messbar in Blutproben (Martínez-Miró et al. 2016). Übliche Vertreter bei der Stressmessung sind zum Beispiel Adrenalin und Noradrenalin. Sie eignen sich zur Beurteilung von akutem Stress (Martínez-Miró et al. 2016). Eine Bestimmung in Speichelproben, die keine invasive Probenentnahme erfordert, ist bei Katecholaminen nicht möglich, kann aber anhand von Urinproben stattfinden (Hay and Mormède 1998). Urinproben können über einen Blasenkatheter gewonnen werden – alternativ muss der Spontanurinabsatz (in der Regel in einem Stoffwechsellkäfig) abgewartet werden (Canh et al. 1997).

2.4.5 Verhaltenstests zur Beurteilung von Stress

Neben den physiologischen Parametern können auch ethologische Parameter erhoben und zur Stressbeurteilung eingesetzt werden (Broom 2003). Dazu gehören das Verhalten und Emotionen der Tiere, die mit Hilfe von Verhaltenstests untersucht werden können (Bracke and Spooler 2008). Ursprünglich wurden die Tests entwickelt zur Untersuchung von Furcht. Die Tiere werden bei den Tests in Situationen gebracht, die für sie bedrohlich sein können, wie eine neue Umgebung, ein neuer Gegenstand oder der Kontakt mit dem Menschen. Dann werden über einen definierten Zeitraum Verhalten, die Vokalisation und ihre Ausscheidungen aufgezeichnet und ausgewertet (Forkman et al. 2007). Da Tiere, die Furcht zeigen, auch

unter Stress stehen, können diese Tests auch für die Untersuchung von Stress angewandt werden (Boissy 1995). Es wurde festgestellt, dass furchtsame Tiere in bedrohlichen Situationen stets ähnlich reagieren. Bekannte Verhaltenstests sind der Open-Field-Test, der Novel-Object-Test und der Human-Approach-Test (Marchant, Whittaker, and Broom 2001; Haigh, Chou, and O'Driscoll 2020).

Beim Open-Field-Test oder Novel-Arena-Test, wird das Tier in eine dem Tier unbekannte Umgebung verbracht und dann die Aktivität, das Verhalten, Lautäußerungen sowie Kot- und Urinabsatzverhalten über einen definierten Zeitraum aufgezeichnet. Entspannte Schweine sind neugierig, erkunden den neuen Raum und legen sich unter Umständen nach kurzer Erkundung sogar in Bauchlage ab und bleiben liegen. Tiere, die gestresst sind von der Situation, kommen nicht zur Ruhe, legen sich nicht ab und wandern unruhig durch den Raum oder bleiben ängstlich in einer Ecke stehen mit dem Rücken zur Wand (Haigh, Chou, and O'Driscoll 2020).

Beim Novel-Object-Test wird in die Box des Tiers oder in einer Testarena, die das Tier vorher erkunden darf, ein neuer Gegenstand verbracht und wieder über einen festgelegten Zeitraum die Reaktion des Tieres auf den Gegenstand aufgezeichnet. Beim entspannten Schwein sollte ein natürliches Interesse vorhanden sein. Das bedeutet, es nähert sich nach kürzester Zeit dem Gegenstand, riecht daran, versucht gegebenenfalls, ihn mit der Rüsselscheibe zu berühren oder hineinzubeißen. Ängstliche Tiere meiden den Kontakt, weichen unter Umständen sogar zurück oder brauchen deutlich länger, bis sie sich nähern (Haigh, Chou, and O'Driscoll 2020).

Beim Human-Approach-Test wird die Reaktion des Tieres auf einen dem Tier unbekanntem Menschen im Testgehege aufgezeichnet und beobachtet, ob das Tier Furcht zeigt, und wie das Mensch-Tier-Verhältnis ist. Dabei kann der Test erweitert werden durch Beobachtung der Reaktionen des Tiers auf Berührung durch den Menschen oder wenn es den Menschen berührt. Auch hier sind gestresste Tiere ängstlich und vermeiden Kontakt mit dem Menschen oder brauchen länger, bis sie sich nähern (Forkman et al. 2007).

2.5 Opiorphin

Opiorphin ist ein beim Menschen und verschiedenen Tierarten vorkommendes endogenes Pentapeptid [Gln–Arg–Phe–Ser–Arg] mit schmerzstillender Wirkung (Wisner et al. 2006). Es hemmt drei Proteasen, die neutrale Ecto-endopeptidase (MME), die Ecto-aminopeptidase N (ANPEP) und eine Dipeptidyl-peptidase (DPP3), die beim Abbau von Endorphinen und Enkephalinen beteiligt sind. Dadurch führt es zum längeren Vorhandensein der genannten Substanzen mit sonst sehr kurzer Halbwertszeit, die an Opioid-Rezeptoren binden und

dadurch schmerzstillend wirken. Im Tierversuch mit Mäusen war die schmerzunterdrückende bzw. schmerzstillende Wirkung des Opiorphins genauso stark und teils stärker als die von Morphin (Wisner et al. 2006).

Opiorphin kommt im Blut und allen Körperflüssigkeiten vor, die Konzentration ist am höchsten in Speichel und Tränenflüssigkeit, da in den Speichel- und Tränendrüsen die Produktion (Genexpression des PRL-1 Gens) und Sekretion am höchsten ist. Auch in der Prostata wird Opiorphin gebildet und es kommt dadurch auch im Sperma vermehrt vor (Dufour et al. 2013). Die Ausschüttung wird stimuliert durch Aktivierung des Sympathikus und den daraus resultierenden Noradrenalin-Anstieg. Salarić et al. haben gezeigt, dass bei dem Burning Mouth Syndrom (Patienten mit chronischen Entzündungen im Mund) das Opiorphinlevel höher ist, als bei einer gesunden Vergleichsgruppe (Salarić, Sabalić, and Alajbeg 2017).

In einer Studie wurde festgestellt, dass der Opiorphingehalt im Speichel bei Patienten mit Zahnschmerzen, verursacht durch eine Pulpitis oder Parodontitis, vor der jeweiligen Therapie signifikant höher war als nach der Therapie, sowie, dass die Patienten mit Pulpitis vor der Therapie signifikant höhere Opiorphinspiegel im Speichel zeigten als die Patienten mit Parodontitis (Ozdogan et al. 2019). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass Patienten mit Schmerzen am Auge, verursacht durch einen kornealen Fremdkörper, eine signifikant höhere Opiorphinkonzentration in der Tränenflüssigkeit aufwiesen, als eine Kontrollgruppe ohne Fremdkörper (Ozdogan et al. 2020).

Die Speicheldrüsen von Mensch und Schwein ähneln sich stark (Wang et al. 2007). Zur Bestimmung von Opiorphin beim Schwein gibt es noch keine Veröffentlichungen, allerdings gibt es ELISA-Kits zu diesem Zweck auf dem Markt und aufgrund der ähnlichen Speichelzusammensetzung von humanem und porcinem Speichel ist es wahrscheinlich, dass auch im Speichel von Schweinen Opiorphin vorhanden ist.

Auch bei einigen anderen Säugetieren konnte bereits Opiorphin nachgewiesen werden oder eng verwandte, funktionell homologe Substanzen wie zum Beispiel das schon früher bei Ratten entdeckte Sialorphin. Sialorphin ist ebenfalls ein Pentapeptid [Gln–His–Asn–Pro–Arg], wird bei akutem äußeren Stress aus den Speicheldrüsen und der Prostata ausgeschüttet und hemmt die neutrale Endopeptidase (Panepinto et al.). Die Sekretion wird stimuliert durch einen Androgen-/ Steroidhormonanstieg (Rougeot et al. 2003). Bei Rindern wurde das Spinorphin entdeckt, ein Opioidpeptid im Rückenmark, das ebenfalls Enzyme hemmt, die Enkephaline abbauen und dadurch auch schmerzstillend wirkt (Yamamoto et al. 2002). Wang et al. haben Opiorphin erstmals in EDTA-Plasma und Urin von Pferden mittels Hydrophilic interaction liquid chromatography [HILIC] bestimmt (Wang et al. 2015).

Bei Ratten wurde, wie oben beschrieben ein Anstieg des Sialorphins bei akutem Stress beobachtet. Generell wurde der Mechanismus der Stress-induzierten-Analgesie [SIA] schon früher untersucht, die durch die Freisetzung von Neurotransmittern (endogene Opiode und nicht-opioide Peptide) als Reaktion auf einen Stressor entsteht. Sie wird nicht in Folge jedes Stressors aktiviert (Amit and Galina 1986). Bei dem auslösenden Stressor kann es sich um Schmerzreize handeln und es kann, muss aber kein Cortisolanstieg vorliegen (Watkins et al. 1982; Rushen and Ladewig 1991).

Beim Schwein wurde der Mechanismus der Stress-induzierten-Analgesie nach 15-minütiger Fixation mittels Oberkieferschlinge bereits beobachtet, aber keine Messung der Opiode oder von Opiorphin durchgeführt (Rushen and Ladewig 1991).

2.6 Schmerz

Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Empfindung, die mit einer tatsächlichen oder potenziellen Schädigung von Gewebe verknüpft ist oder im Sinne einer solchen Schädigung beschrieben wird (International Association for the Study of Pain (IASP), 1994). Schmerzwahrnehmung kann beschrieben werden als Empfindung infolge eines Reizes, der vom Körper über sogenannte Nozizeptoren aufgenommen und im Gehirn weiterverarbeitet und bewertet wird. Nozizeptoren sind Rezeptoren in Form von freien, sensorischen Nervenendigungen (Scholz and Woolf 2002). Zu den Nozizeptoren gehören Mechanorezeptoren zu denen auch Dehnungsrezeptoren zählen, die nur durch mechanische Reize wie Druck oder Dehnung erregt werden. Außerdem gibt es polymodale Nozizeptoren, die zum Beispiel durch chemische und thermische, aber auch durch mechanische Reize erregt werden können (Scholz and Woolf 2002) und stumme Nozizeptoren, die erst nach Sensibilisierung durch zum Beispiel ein entzündliches Geschehen erregbar sind (von Dawans and Heinrichs 2018).

Bei Überschreitung eines Schwellenreizes am Nozizeptor wird dieser in den Nervenendigungen in ein elektrisches Signal umgewandelt (Transduktion), das zunächst über afferente Bahnen zum Rückenmark weitergeleitet wird (Patel 2010). Die Nozizeptoren können verschiedene Nervenfasertypen aufweisen, wie zum Beispiel die schneller leitenden, myelinisierten, A δ -Fasern und die langsamer leitenden, nicht-myelinisierten C-Fasern (von Dawans and Heinrichs 2018). Vom Rückenmark aus werden die Reize umgeschaltet und in das Gehirn weitergeleitet, um dort verarbeitet zu werden (Patel 2010). Im Gehirn läuft dabei ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Hirnareale ab, vor allem des Mittelhirns, des Thalamus sowie des limbischen Systems und kortikaler Strukturen (Tölle and Flor 2006).

Zum Beispiel beim Wegziehen der Hand von einer heißen Herdplatte läuft ein spinaler Reflex ab, bei dem afferente Bahnen direkt in der grauen Substanz des Rückenmarks auf efferente Bahnen umgeschaltet werden und so ein motorischer (Schutz-)reflex ausgelöst wird (von Dawans and Heinrichs 2018). Akuter Schmerz dient als Schutzmechanismus und Frühwarnsystem des Körpers (Zimmermann 1996). Außerdem wird im Gehirn die Ausschüttung von ACTH stimuliert, die zur Aktivierung der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarks führt. Bei offensichtlich schmerzhaften Eingriffen oder Zuständen kommt es dadurch zu ähnlichen Reaktionen wie bei Stress. Dazu zählen Tachykardie, Hypertonie, Hyperventilation und Hemmung der Magen-Darmmotorik. Dies erlaubt den Rückschluss, dass Schmerzen mit Stress verbunden sind (Treede et al. 2019). Das Nebennierenmark wird außerdem direkt durch sympathische Nervenfasern aus dem Rückenmark innerviert, sodass bei Stress und Schmerzen auch eine direkte, schnelle, unbewusste Stimulation des Nebennierenmarks im Sinne eines supraspinalen Reflexes mit Ausschüttung von Katecholaminen stattfindet (von Dawans and Heinrichs 2018).

Bei anhaltendem Reiz oder wiederholtem Auftreten des gleichen Reizes an einer Stelle kann es lokal an den Nozizeptoren zu einer Ausschüttung verschiedener Ionen und Entzündungsmediatoren (z.B. Interleukine, Histamin, Substanz P) kommen, die zu einer Sensibilisierung der verletzten Stelle führen und eine Verstärkung der weiteren Schmerzreize bewirken (Meßlinger 2002; Basbaum et al. 2009).

Schmerzen gelten als chronisch, wenn sie über einen Zeitraum von drei Monaten oder länger wiederholt auftreten oder bestehen bleiben (Treede et al. 2019). Der Schmerz hat dann seine akute Leit- und Warnfunktion verloren, hat meist nicht mehr nur eine Ursache und weist oft eine entzündliche Komponente auf. Bei chronischen Schmerzen verändert sich die Schmerzsignalverarbeitung. Es findet eine periphere und zentrale Sensitivierung durch Entzündungsmediatoren statt und es können anatomische Umstrukturierungen am Nervensystem auftreten (Tölle and Flor 2006). Dadurch reagiert der Körper sensitiver auf Schmerzreize, sodass bereits leichte Reize zu einem starken Schmerzempfinden führen. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielt Glutamat, ein Botenstoff, der im Dorsalhorn des Rückenmarks an den Synapsen ausgeschüttet wird und bei chronischen Schmerzen zu einer Übererregung und Langzeitpotenzierung der Erregung führt (Sandkuhler 2001).

Die Schmerzwahrnehmung wird durch ein endogenes Opioidsystem moduliert (Holden, Jeong, and Forrest 2005). In den 1960ern wurden Opioidrezeptoren in Gehirn und Rückenmark entdeckt, die bei Bindung bestimmter Botenstoffe zu einer Reduktion oder Blockade der Schmerzwahrnehmung führen. Endogen produzierte Mediatoren, die an Opioidrezeptoren binden, sind Enkephaline, Endorphine und Dynorphin (Basbaum and

Fields 1984; Patel 2010). So können absteigende Bahnen aus dem ZNS spinale nozizeptive Neuronen hemmen, indem sie Synapsen mit endorphinhaltigen Interneuronen bilden, die dann über Ausschüttung von Endorphinen, die an Opioidrezeptoren binden, die Schmerzweiterleitung in das Gehirn hemmen (Sann 2005). Basierend auf diesen Mechanismen wurden schmerzhemmende Medikamente entwickelt, die zum Beispiel als Opioidanaloga die endogenen Opioidrezeptoren besetzen und ebenfalls die Schmerzweiterleitung hemmen.

In der anfänglich genannten Definition von Schmerz wird neben der sensorischen Komponente auch die emotionale Komponente des Schmerzempfindens genannt. Schmerz ist eine subjektive Empfindung (Swieboda et al. 2013). Der gleiche Schmerzreiz kann von verschiedenen Individuen unterschiedlich empfunden werden.

Das Säugetiere genauso oder ähnlich wie Menschen Schmerzen empfinden, wurde vielfach mittels verschiedenster Schmerztests untersucht. Bei Schmerztests wird ein Tier einem bestimmten Reiz wie zum Beispiel Hitze, Kälte, einem unangenehmem Untergrund oder gezielten mechanischen Schmerzreizen in steigender Intensität ausgesetzt und die Reaktionen des Tieres werden aufgezeichnet und beurteilt (Rigaud et al. 2011). Die Tests führten zu dem Ergebnis, dass Tiere aufgrund der ähnlichen Anatomie und sehr ähnlichem Aufbau des zentralen und peripheren Nervensystems vermutlich in gleicher Form Schmerz empfinden wie Menschen (Analogieschluss) (Le Bars, Gozariu, and Cadden 2001).

Bei der Messung von Schmerzen, der Algesimetrie, ist es oft schwierig, objektive Parameter zu finden. Für den Menschen wurden von Max von Frey Tests entwickelt, bei denen mit haarfeinen Fasern (ursprünglich Menschenhaare und Tierborsten) sogenannten Filamenten, die in die Haut gestochen werden, die Sensibilität und die Schmerzwahrnehmung getestet werden kann, indem die Intensität des wahrgenommenen Reizes auf einer Skala bewertet wird (Von Frey 1896). Heutzutage werden feine Kunststofffasern definierter Dicke und Biegsamkeit für Berührungsreize auf der Haut eingesetzt (Bell-Krotoski et al. 1995). Auch in Tierversuchen werden diese von-Frey-Filamente als Schmerzreize eingesetzt (Bradman et al. 2015).

Auch Biomarker in Blut oder Speichel können bei der Schmerzmessung zu Hilfe gezogen werden, allerdings handelt es sich hierbei in der Regel um dieselben Parameter, die bei der Stressmessung zum Einsatz kommen. Bei Schweinen, die eine Lahmheit zeigten, wurden unter anderem signifikant höhere Cortisol- und Speichel-alpha-Amylase-Werte festgestellt (Contreras-Aguilar et al. 2019).

2.7 Grimace Scales

Ende der 70er Jahre haben Friesen und Ekman das erste Gesichtsbewegungs-Kodierungssystem (Facial Action Coding System) zur Beschreibung und Messung emotionaler Gesichtsausdrücke beim Menschen entwickelt (Ekman and Friesen 1976). Die Mimik eines Individuums setzt sich aus vielen verschiedenen sogenannten Facial Action Units zusammen, die auch bei vielen Tierarten bereits untersucht worden sind. Für das Erstellen von Schmerz-Grimace-Scales werden dann einige der Facial action units der entsprechenden Tierart herangezogen, die sich bei Schmerzeinwirkung deutlich verändern und in einer Skala zusammengestellt sind (Mota-Rojas et al. 2020). Die Bewertungsskalen für Tiere werden erstellt, um es dem Mensch möglich zu machen, Schmerz objektiv bewerten zu können, indem Punkte für verschiedene Facial Action Units vergeben werden (Mota-Rojas et al. 2020). Zu den Facial Action Units gehören zum Beispiel die Ohrstellung, die Öffnung der Augen oder die Muskelspannung um Mund oder Augen. Je Merkmal werden abhängig von der Ausprägung des Merkmals Punkte vergeben, deren Summe am Ende eine Auskunft über den aktuellen Zustand des Tieres geben kann. Der Schmerz wird umso höher eingestuft, je höher die Punktzahl ist (Mota-Rojas et al. 2020). Im Vergleich mit anderen Messmethoden oder Untersuchungen, wie zum Beispiel Körpergewichtskontrollen oder Messungen der Körpertemperatur, haben Grimace Scales den Vorteil, dass sie schnell und ohne Manipulation des Tiers angewandt werden können. Außerdem können sie auch von Laien (ggf. nach vorheriger Übung) ausgeführt werden (National Centre for Replacement Refinement and Reduction of Animals in Research, United Kingdom).

Es gibt bereits Skalen für Ratten (Sotocina et al. 2011), Mäuse (Langford et al. 2010; Sotocina et al. 2011) und Kaninchen (Hampshire and Robertson 2015), aber auch für größere Säugetiere wie zum Beispiel Katzen (Holden et al. 2014), Pferde (Dalla Costa et al. 2014) oder Schweine (Di Giminiani et al. 2016).

2.7.1 Grimace Scale für Schweine

Di Giminiani et al. haben 2016 Facial Action Units von Ferkeln untersucht und für eine Grimace Scale zusammengestellt (Di Giminiani et al. 2016).



Abbildung 4: Facial Action Units nach Di Giminiani et al. (Di Giminiani et al. 2016). Von links oben nach rechts unten die Spannung der Temporalismuskulatur, das Stirnprofil (seitlich), die Anspannung der Orbitalmuskulatur, die Spannung der Wangenmuskulatur, die Spannung oberhalb der Augen (Augenbrauenspannung), das Profil des Unterkiefers (seitlich), die Anspannung der Oberlippe, die Nasenspiegel-Stellung, der Maulwinkel, die Entspannung der Nasenöffnung. Quelle: Di Giminiani et al. 2016, S. 5, Fig. 3.

Viscardi et al. haben 2017 in einer Pilotstudie auch eine Grimace Scale für Ferkel beschrieben und angewandt (Viscardi et al. 2017). Dafür wurden 19 fünf Tage alte Ferkel routinemäßig kastriert und die Schwänze kupiert. Ein Teil der Tiere erhielt verschiedene Kombinationen aus injizierten Schmerzmitteln und lokal aufgetragenen betäubenden Gels und Salben, während die Vergleichsgruppe keine Medikation erhielt. Anschließend wurden postoperative Fotos der Tiere, besonders der Gesichter und der Mimik, gemacht und verglichen (Viscardi et al. 2017). Bewertungskriterien waren die Ohrposition, die Anspannung der Wangenmuskulatur mit Auswirkung auf die Haut des Nasenrückens und die Stirnpartie.

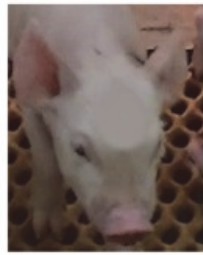
Bei der Ohrposition wurden drei Stadien unterschieden. Beim Tier ohne Schmerzen stehen die Ohren aufrecht und die Öffnung der Ohrmuschel weist nach vorne. Bei Schmerzen legt das Tier die Ohren seitlich am Kopf an, sodass die Spitzen nach hinten weisen. Hier wird unterteilt in mäßige Ausprägung des Merkmals und deutliche Ausprägung, also nur leicht angelegte Ohren, die eher zur Seite weisen und völlig angelegte Ohren, deren Spitzen nach hinten zeigen (Viscardi et al. 2017).

Bei der Wangen- und Nasenrückenspannung wird ein entspannter Zustand unterschieden von einer bei Schmerzen erst leicht und später deutlich ausgeprägten Wulst auf dem Nasenrücken, die durch eine vermehrte Anspannung der Wangenmuskulatur entsteht (Viscardi et al. 2017).

Ear Position



Absent (0)



Moderately present (1)



Obviously present (2)

When the animal is in pain, the ears are drawn back from forward (baseline) position

Cheek Tightening/Nose Bulge



Absent (0)



Moderately present (1)



Obviously present (2)

When the animal is in pain, a bulge of skin is apparent on the snout in response to cheek tightening

Orbital Tightening



Absent (0)



Present (1)

When the animal is in pain, the orbital area is narrowed as the eyelids are squeezed together (scored on a two-point scale)

Abbildung 5: Piglet Grimace Scale nach Viscardi et al.. Quelle: Viscardi et al. 2017, S. 4, Fig. 1.

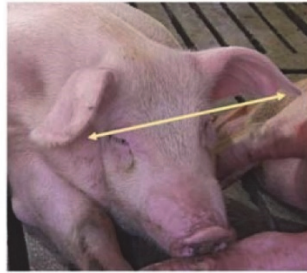
Für ausgewachsene Schweine gibt es bisher keine veröffentlichte Skala. Allerdings wurde die von Viscardi entwickelte Skala bereits bei 10 Wochen alten, männlichen Schweinen mit Kryptorchismus in einer Studie prä und post operationem angewandt und als geeignetes Mittel zur Einschätzung der Schmerzen der Tiere befunden (Vullo et al. 2020). Bei diesen Tieren wurde die Ohrposition anders interpretiert als von Viscardi et al.. Während bei Viscardi et al. die Ohren der Ferkel bei Schmerz angelegt wurden, beobachteten Vullo et al. ein nach vorne Klappen der Ohren, sodass die Ohren nicht mehr aufrechtstehend mit offener Ohrmuschel nach vorne wiesen, sondern dass sie nach vorne klappten, bis über die Augen hängend. Die

andere Ohrstellung lässt sich unter Umständen durch die veränderte Gesichtsmuskulatur und Hautdicke bei älteren Schweinen erklären (Vullo et al. 2020). Auch die Rasse kann die Ohrstellung mit beeinflussen. So haben zum Beispiel Schweine der Rasse Piétrain stehende Ohren im Vergleich zu Schweinen der deutschen Landrasse, die eher hängende Ohren haben (Sambraus 2011).

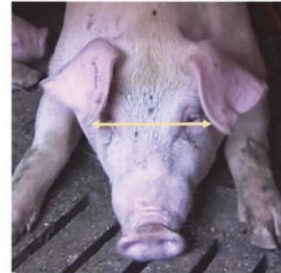
Ear position



Not present (0)
The ears are kept forward



Moderately present (1)
The ears are slightly moved backwards, the distance between the ear tip increase



Obviously present (2)
When the animal is in pain, the ears are drawn back from forward position

Orbital tightening



Not present (0)
The eyes are open, white can be visible



Moderately present (1)
The orbital area is narrowed, eyes are semi-closed and not focused on the environment or closed with eyelids are squeezed together

Cheek tightening / Nose bulge



Not present (0)
No snout bulge neither cheek tension is visible



Moderately present (1)
A bulge of skin is apparent on the snout in response to increased tension in the cheek, wrinkles are not visible



Obviously present (2)
A bulge of skin is apparent on the snout in response to cheek tightening, wrinkles are clearly visible

Abbildung 6: Von Vullo et al., 2020 abgeänderte Grimace Scale nach Viscardi et al. für 10 Wochen alte Schweine. Quelle: Vullo et al, 2020, S. 5, Fig. 1.

2.8 Operante Konditionierung von Schweinen – Training als Refinement

Im Rahmen des Refinements und der Maximierung des Tierwohls kommt bei Versuchstieren bereits Training von Tieren zum Einsatz, um zum Beispiel das Handling der Tiere zu verbessern und Transportvorgänge oder Versuchsabläufe zu optimieren (Wredle,

Munksgaard, and Spörndly 2006). Kognitives Enrichment kann zur Verbesserung des Tierwohls führen (Pomerantz and Terkel 2009). Bei Schweinen, die vor der Fütterung eine operante Aufgabe lösen mussten, konnte eine gesenkte Herzfrequenz und entspannteres Verhalten in einem Verhaltenstest, dem Novel-Object-Test, festgestellt werden (Zebunke, Puppe, and Langbein 2013). Auch die Mensch-Tier-Beziehung wird durch Training verbessert. Außerdem kann Training die psychische Gesundheit von Tieren verbessern, da es Beschäftigung und kognitives Enrichment darstellt (Pomerantz and Terkel 2009). Zuwenig Beschäftigung kann eine der Ursachen für Verhaltensstörungen wie Schwanzbeißen bei Jungschweinen darstellen (Schröder-Petersen and Simonsen 2001; Henry et al. 2021).

Die Grundlagen des Tiertrainings bilden die Modelle der klassischen Konditionierung nach Pawlow sowie der operanten Konditionierung nach Skinner. Gewünschte Verhaltensweisen sollen vermehrt gezeigt, unerwünschte unterlassen werden (Bodenmann et al. 2004).

Die klassische Konditionierung beschreibt ein unbedingtes Verhalten als Folge auf einen Reiz wie zum Beispiel die Speichelproduktion beim Anblick von Nahrung (Bak 2019). Pawlow stellte fest, dass der Hund beim Anblick seines Futters zu speicheln begann. Daraufhin läutete er jedes Mal vor der Fütterung eine Glocke. Das führte dazu, dass der Hund schon bald beim Läuten der Glocke zu speicheln begann, ohne dass es Futter gab oder er es sehen konnte. Das unbedingte Verhalten, das Speicheln, wurde mit dem Reiz, dem Läuten der Glocke, verknüpft und so zu einem konditionierten Verhalten (Pavlov 2010).

Bei der klassischen Konditionierung wird einem unbedingten Verhalten ein neuer Reiz vorgeschaltet, sodass das Verhalten sich dann gezielt auslösen lässt durch den bedingten, vorgeschalteten Reiz (Bak 2019).

Bei der operanten Konditionierung nach Skinner soll die Häufigkeit des Auftretens eines gewünschten Verhaltens beeinflusst werden durch die Konsequenz des Verhaltens (Skinner 1951). Das Prinzip funktioniert dabei so, dass das Tier verschiedene Verhaltensweisen zeigt oder anbietet und dann das gewünschte Verhalten belohnt wird. Die Belohnung stellt den Operant dar. Das Tier zeigt das gewünschte Verhalten daraufhin mit höherer Wahrscheinlichkeit nochmal, in Erwartung auf erneute Belohnung. So lassen sich jegliche Verhaltensweisen konditionieren.

Die operante Konditionierung wird auch instrumentelle Konditionierung genannt. Die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Verhaltens kann erhöht oder verringert werden durch für das Individuum positive oder negative Konsequenzen auf das Verhalten (Skinner 1951; Bodenmann et al. 2004). Der Operant, der hinzugefügt oder entfernt werden kann, um die Häufigkeit des gewünschten Verhaltens zu beeinflussen, kann auch Verstärker (engl.:

reinforcer) genannt werden (Skinner 1951). Verstärker lassen sich in positive und negative Verstärker unterteilen (Bak 2019).

Bei positiven Verstärkern wird etwas hinzugefügt und sie erhöhen die Auftretenswahrscheinlichkeit eines Verhaltens. Bei negativen Verstärkern wird etwas weggenommen oder entzogen und sie verringern die Auftretenswahrscheinlichkeit des Verhaltens (Bak 2019). Hier lassen sich in der Literatur die Begriffe positive und negative Belohnung sowie positive und negative Strafe finden (Theby 2018). Bei einer positiven Belohnung wird etwas Positives, zum Beispiel eine Futterbelohnung, hinzugefügt bei gewünschtem Verhalten. Bei einer negativen Belohnung wird etwas Unangenehmes dem Individuum weggenommen, zum Beispiel kann ein unangenehmes Tonsignal beendet werden. Bei einer positiven Strafe wird etwas Unangenehmes hinzugefügt, zum Beispiel ein Stromschlag oder ein kurzer Luftstoß, während bei der negativen Strafe etwas Positives weggenommen wird. Darüber hinaus gibt es noch den Begriff der „Löschung“. Ein Verhalten kann gelöscht werden, wenn es völlig ignoriert wird, also weder etwas hinzugefügt noch weggenommen wird, sodass keine Konsequenz eintritt (Edelmann and Wittmann 2012). Die Wirksamkeit von Bestrafungen wird viel diskutiert und kann beim Training von Tieren die Tier-Mensch-Beziehung schädigen, zu Angst führen und sich insgesamt nachteilig auswirken. Wenn ein unerwünschtes Verhalten gezeigt wird, wäre es sinnvoller, dieses im Rahmen einer Löschung zu ignorieren (Edelmann and Wittmann 2012).

Die Verstärker lassen sich außerdem in primäre und sekundäre Verstärker unterteilen. Primäre Verstärker sind Dinge, die für das Individuum von sich aus angenehm sind oder lebensnotwendig, wie zum Beispiel Nahrung. Sekundäre Verstärker sind Reize, die für das Individuum zunächst weder positiv noch negativ sind und dann als ein Versprechen bzw. Ankündigung für den primären Verstärker dienen (Theby 2018).

Das bekannteste Beispiel für einen sekundären Verstärker ist der Klicker. Der Klicker ist ein kleines Kästchen mit Metallplättchen und einer Feder, wobei durch Druck auf einen Druckpunkt ein gut hörbares Klickgeräusch im Kästchen erzeugt wird. Das Klicken wird mittels klassischer Konditionierung erst mit einem primären Verstärker verknüpft und kann dann als präzises Hilfsmittel beim Training eingesetzt werden, als Versprechen auf die folgende Belohnung. Während des Klickens werden im Körper des Individuums dieselben Mechanismen ausgelöst, die auch der primäre Verstärker ausgelöst hat (Theby 2018). Geprägt wurde das Klickertraining von Frederic Skinner, der sich intensiv mit der operanten Konditionierung auseinandersetzte. Um ein gewünschtes Verhalten bei einem Tier zu verstärken bzw. dessen Auftretenswahrscheinlichkeit zu erhöhen, muss ein Verstärken des Verhaltens möglichst ohne Zeitverlust, im besten Fall während des gezeigten Verhaltens,

ausgeführt werden (Skinner 1951). Beim Trainingsaufbau ist der zeitliche Effekt wichtig. Um eine präzise Verknüpfung zwischen gewünschtem Verhalten und Reiz herzustellen, muss der Reiz bei der Konditionierung zur selben Zeit wie das Verhalten auftreten (Skinner 1951).

Eine Belohnung mit Futter kann in der Regel nicht schnell und präzise genug erfolgen und gerade Präzision ist laut Skinner entscheidend, um Erfolge zu erzielen. Findet die Verstärkung nicht zum Zeitpunkt des gewünschten Verhaltens oder direkt danach statt, ist es für das Tier nicht mehr klar identifizierbar, welches Verhalten zur Belohnung führt und gegebenenfalls werden andere Verhaltensweisen als gewünscht verstärkt. Deshalb bieten sekundäre Verstärker wie der Klicker, dessen Klickgeräusch mit einer kleinen Bewegung des Daumens, somit sehr präzise, ausgelöst werden kann, eine optimale Möglichkeit, ein gewünschtes Verhalten zum richtigen Zeitpunkt zu belohnen oder zu verstärken (Skinner 1951).

2.8.1 Verstärker bei der operanten Konditionierung von Schweinen

Beim Training von Schweinen lassen sich als primäre Verstärker gut Lebensmittel oder Tierfutter einsetzen. M. Swindle und A. Smith erwähnen in ihrer 3. Ausgabe „Swine in the laboratory“ als besonders gut geeignete Belohnungen beim Training von Schweinen: Hundefutter, Karotten, Süßigkeiten, Kekse und Donuts (Swindle and Smith 2015). In einem Review wurden außerdem Schoko-Erdnüsse, Äpfel, Schokorosinen und Milchaustauscher (bei Ferkeln) genannt (Gielsing, Nordquist, and van der Staay 2011).

Auch Streicheleinheiten können Schweinen gefallen und genutzt werden, um sie dazu zu bringen, länger in einer Position zu verharren. Zum Beispiel wurden Schweine in einer Studie, in der eine Ultraschalluntersuchung des Bauchraums durchgeführt werden sollte, mit Streicheleinheiten oder Striegeln mit einer Bürste dazu bewegt, während der Untersuchung liegen zu bleiben, da sie das Streicheln als angenehm empfanden (Rydén et al. 2020).

Da Schweine soziale Tiere sind, lässt sich als Verstärker auch der Wunsch, zur Gruppe zurückzukehren, einsetzen oder bei Ferkeln das Verlangen, zur Mutter zurück zu gelangen (Rooijen 1982; Siegford, Rucker, and Zanella 2008). Adrian Zeltner von Ellegard schreibt 2013 in seinem Leitfaden zum Handling und Training von Göttinger Minipigs, dass es das Wichtigste ist bei solchen Belohnungen, dass sie stets einem Zweck dienen. Sie sollen nur eingesetzt werden, um ein Verhalten zu belohnen oder Vertrauen aufzubauen, nie ohne Grund, damit nur erwünschte Verhaltensweisen bestärkt werden und die Wirkung des Verstärkers (der Belohnung) nicht verloren geht.

Für präzises Arbeiten lässt sich auch bei Schweinen zum Beispiel der Klicker oder eine Pfeife als sekundärer Verstärker einsetzen (Arblaster 2010).

2.9 Blutentnahmemethoden Schwein

Für Schweine sind je nach Körpergröße bzw. Alter und Gewicht unterschiedliche Blutentnahmemethoden beschrieben. Die Gewinnung von Blutproben erfolgt in der Regel invasiv. Eine nicht-invasive Blutentnahme im eigentlichen Sinn ist nicht möglich, es kann aber zum Beispiel ein Venenverweilkatheter invasiv gelegt werden, über den dann bei guter Fixierung und Pflege des Katheters für einige Tage eine manipulationsarme Blutentnahme möglich ist. So kann zum Beispiel über einen Venenkatheter aus der Ohrvene Blut entnommen werden (Parris-Garcia et al. 2014), oder mit einem Katheter, der von der Ohrvene in die Jugularvene geschoben wird, Blut aus der Jugularvene entnommen werden, um eine Blutkoagelbildung zu minimieren (Niiyama et al. 1985; Rydén et al. 2020). Auch arterielle Blutentnahmen sind möglich über intraarteriell platzierte Katheter (Munk et al. 2001).

Die möglichen Punktionsstellen für eine venöse Blutentnahme, ohne Katheterisierung und ohne Anästhesie sind zum Beispiel an der V. auricularis, V. jugularis externa, V. saphena oder V. cava cranialis beschrieben (Hütten and Preuss 1953; Kowalczyk, Sorensen, and Glättli 1951). Beim wachen Tier ist bei allen Methoden immer eine Fixierung des Tiers erforderlich.

Scollo et al. beschreiben eine fixationslose Blutentnahme bei laktierenden Sauen an der V. mammarica. Verglichen wurde diese Methode mit der mit Oberkieferschlinge fixierten Blutentnahmemethode aus der V. jugularis externa. Es wurden keine Unterschiede im Serumcortisollevel festgestellt, allerdings zeigten die Tiere ohne Fixation weniger Vokalisation (Scollo et al. 2019). Grundsätzlich ist der Nachteil der Blutentnahme an der V. mammarica das erhöhte Infektionsrisiko des Drüsengewebes und die nur bei laktierenden Sauen ausreichend gute Darstellbarkeit der Vene. Von einem erhöhten Verletzungsrisiko für die blutabnehmende Person muss ebenfalls ausgegangen werden. Die Punktion der V. jugularis externa oder V. cava cranialis birgt ein Verletzungsrisiko des in derselben Region am Hals gelegenen Nervus phrenicus, wodurch es zu Störungen der Atemmechanik kommen kann (Sankari 1983), sowie zu Schluckbeschwerden (Gould et al. 2019). Bei beiden Methoden lässt sich die Vene optisch nicht darstellen, da beide Venen tief unter der Haut liegen und es wird blind mehrere Zentimeter tief mit einer Nadel in den Hals gestochen. Palpatorisch kann die Vene vorher in der Regel nicht identifiziert werden, sodass aufgrund der anatomischen Orientierungspunkte eingestochen wird (Bertschinger and Geyer 1975). Gestochen wird von der rechten Seite des Schweins am äußeren Rand der Jugularrinne, am Rande des Musculus brachiocephalicus, auf einer Linie zwischen dem Vorderrand des Buggelenks und der Brustbeinspitze (Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004). Eine Korrektur der Position der Kanüle kann notwendig sein. Vorteil der beiden am Hals

gelegenen Venen ist ihre Größe, die die Entnahme großer Blutvolumina erlaubt (Hütten and Preuss 1953; Kowalczyk, Sorensen, and Glättli 1951). Die V. auricularis am Ohr ist im Gegensatz dazu gut darstellbar und anstaubar und ihre Punktion birgt weniger Risiken, dafür kann es zu stärkeren Abwehrreaktionen des Schweins kommen, da direkt am Kopf an den sensiblen Ohren hantiert wird. Außerdem kann es durch Aufregung des Tieres zu einer schlechteren Blutzirkulation in der Peripherie, also auch in den Ohrgefäßen kommen (Sankari 1983). Darüber hinaus eignet sie sich eher für die Entnahme kleiner Volumina (Bertschinger and Geyer 1975).

Die Methode der Wahl beim erwachsenen Schwein ist die Entnahme über die V. jugularis externa am mittels Oberkieferschlinge fixierten Tier. Das Tier steht, eine Schlinge (verwendetes Material bei Minipigs, Mastschweinen und Jungsauen meist Stahl, bei Altsauen häufig eine Seilschlinge) wird in das Maul eingelegt und über dem Oberkiefer hinter den Canini des Tieres, möglichst über dem knöchernen Teil der Nase, zugezogen. Anschließend wird der Kopf des Tieres mit Hilfe der Schlinge nach vorne und oben (craniodorsal) gezogen. Das Tier versucht sich reflexartig von der Schlinge weg zu stemmen und steht dann, kaum Ausweichbewegungen zeigend, nahezu regungslos, sodass eine zweite Person nun am gut zugänglichen Hals über die V. jugularis externa Blut entnehmen kann (Geverink et al. 2002).



Abbildung 7: Fixierung eines ausgewachsenen Schweins (Deutsche Landrasse) mittels Oberkieferschlinge zur Blutentnahme (Urheber des Fotos: Delia Fiderer).

Für Ferkel oder kleinere Minipigs gibt es die Möglichkeit die Tiere während der Blutentnahme aus der V.jugularis oder V.cava cranialis auf einen Blutentnahmebock, eine feste gerade

Fläche, oder auf dem Schoß auf den Rücken zu legen, oder sie in eine Panepinto-Schlinge zu legen (Panepinto et al. 1983). Die Tiere müssen in die Schlinge gehoben werden. Es gibt Tiere, die nach Gewöhnung und Training sogar einschlafen, während sie in der Panepinto-Schlinge oder einer Variation fixiert liegen (Smith and Swindle 2006).

2.10 Speichelprobengewinnung beim Schwein

Speichel kann bei Schweinen nicht-invasiv mit Hilfe verschiedener saugfähiger Materialien gewonnen werden, die dem Tier ins Maul eingeführt werden oder dem Tier zum freiwilligen Kauen angeboten werden. Als saugfähige Materialien wurden bereits Kunststofffaserrollen eingesetzt (Thomsson et al. 2014), sowie zum Beispiel kleine Schwämme oder Kaustricke (Escribano et al. 2015).

2.11 Zielsetzung und Hypothesen

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, ob durch Training mit positiver Verstärkung die Blutentnahme beim Minipig möglich ist, ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge und ob durch solch eine Methode der Stress bei den Minipigs reduziert werden kann. Hierzu wurden im einzelnen folgende Fragestellungen bearbeitet:

Wie stressig ist die Blutentnahme beim Minipig mittels Fixation in Oberkieferschlinge?

Ist die Blutentnahme beim Minipig mittels Training mit positiver Verstärkung schonender als die Blutentnahme mittels Oberkieferschlinge?

Ist Opiorphin im Speichel von Minipigs mit einem im Handel verfügbaren, porcinen Opiorphin-ELISA bestimmbar und geeignet, um eine Aussage über Schmerzen in der Maulhöhle zu treffen?

Ist die Grimace Scale beim Minipig anwendbar, um etwas über Stresszustände bei der Blutentnahme auszusagen?

Hypothese 1: Durch Training mit positiver Verstärkung ist es möglich, eine Blutentnahme beim Minipig ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge durchzuführen.

Hypothese 2: Die Blutentnahme mittels Fixation in Oberkieferschlinge ist für das Tier stressig und es kommt zu einem deutlichen Anstieg der Herzfrequenz sowie der Speichel- und Serumcortisolwerte.

Hypothese 3: Die Tiere zeigen nach dem Training deutlich niedrigere Serum- und Speichelcortisolwerte sowie eine niedrigere Herzfrequenz bei der Blutentnahme ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge. Es lässt sich somit zeigen, dass Training ein geeignetes Refinement ist, um Stress bei der Blutentnahme zu reduzieren.

Hypothese 4: Das endogene Pentapeptid Opiorphin lässt sich beim Minipig im Speichel bestimmen und ein Anstieg nach mit Oberkieferschlinge fixierter Blutentnahme ist feststellbar, da beim Menschen bereits gezeigt wurde, dass Opiorphin bei Schmerzen in der Mundhöhle ausgeschüttet wird.

Hypothese 5: Minipigs unter Stress zeigen eine ähnliche Mimik wie Ferkel unter Schmerzen und die Grimace Scale ist auch zur Beurteilung von Stress geeignet.

3. Material und Methoden

3.1 Tierversuchsantrag

Das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin hat den Tierversuchsantrag (G 0024/19) genehmigt.

3.2 Auswahl der Tiere

Am Versuch nahmen 12 weibliche Göttinger Minipigs von Ellegaard, Dänemark, teil, die alle im Zeitraum vom 05.01.2019 – 18.06.2019 geboren wurden und zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 14 und 19 Monate alt waren. Die Tiere zeigten zum Start-Zeitpunkt des Versuchs bei einer Adspektion von Haut, Augen, Ohren, Gliedmaßen, Klauen, Körperöffnungen, Fressverhalten und Kotbeschaffenheit keine Anzeichen einer Erkrankung. Sie zeigten einen guten Ernährungs- und Pflegezustand. Das Körpergewicht je Tier lag zwischen 21 kg und 37 kg.

3.3 Tierhaltung

Die Minipigs wurden in einer zentralen Versuchstierhaltung gehalten (Einstellung April 2020), dort schon für Versuche verwendet und anschließend auch weiterverwendet. Die Tiere wurden einzeln oder in Kleingruppen von bis zu drei Tieren gehalten. Sechs Minipigs wurden in zwei Gruppen zu je drei Tieren gehalten, zwei Minipigs standen in Einzelboxen und vier Minipigs wurden je zu zweit gehalten. Jedem Minipig stand eine Box mit einer Grundfläche von 3,25m zur Verfügung. Der Bodenbelag der Boxen war Quarzsand, Stroh und Heu als Einstreu und Beschäftigungsmaterial, sowie Kunststoff- oder Holzspielzeuge in allen Boxen. Alle Tiere hatten stets Blickkontakt zu den Tieren in den gegenüberliegenden Boxen.

Die Tiere wurden einmal pro Tag gefüttert (12 Uhr mittags) mit einem aus Pellets bestehenden Alleinfuttermittel für die Minipig-Haltung, „Minipig-energiereduziert“, der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, DE -59494 Soest Art-Nr.: V4173-000.

3.4 Versuchsaufbau und untersuchte Parameter

Den 12 Minipigs wurde auf die herkömmliche Art und Weise, mittels Fixation der Tiere in Oberkieferschlinge, Blut abgenommen. Anschließend wurden dieselben Tiere drei Wochen mittels Klickertraining und positiver Verstärkung trainiert, sodass sie sich ohne Oberkieferschlinge Blut abnehmen ließen. Nach dem Trainingszeitraum wurde erneut Blut abgenommen mit der antrainierten, unfixierten Methode.



Abbildung 8: Ablaufplan. Auf die erste Blutentnahme mit Hilfe der Oberkieferschlinge zur Fixation folgte der dreiwöchige Trainingszeitraum, mit 12 Trainingstagen, der mit der trainierten Blutentnahme ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge endet.

Der Stress, den die Tiere bei den Blutentnahmen erlebten, wurde gemessen und verglichen mit Hilfe von Cortisolbestimmungen in Speichelproben, die vor und nach den Blutentnahmen gewonnen wurden, sowie in den angefallenen Blut- bzw. Serumproben. In den Speichelproben wurde neben Cortisol auch Opiorphin bestimmt und dessen Eignung als Stressparameter untersucht. Außerdem wurde zur Beurteilung des Stresses die Herzfrequenz vor und während der Blutentnahmen ebenfalls gemessen. Zudem wurden Fotos der Schweine in Ruhe und kurz nach der Blutentnahme mit Fixation in Oberkieferschlinge mit Hilfe einer Grimace Scale von elf Bewertern beurteilt und die Anwendbarkeit der Grimace Scale zur Einschätzung von Stress beim Minipig untersucht.

3.5 Belastungseinschätzung

Gemäß Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU wurde der Schweregrad der Belastung bei dem Versuch als gering eingeschätzt, da es sich um eine Blutentnahmetechnik nach guter tierärztlicher Praxis handelte, die einem Einstich mit einer Kanüle gleichkommt.

Als Belastungen während des Versuchs wurden die zwei Blutentnahmen pro Schwein im Abstand von 17-18 Tagen gezählt.

Bei der ersten Blutentnahme wurde dem Minipig außerdem wie nach guter tierärztlicher Praxis üblich eine Oberkieferschlinge angelegt. Die Fixation mit der Schlinge wurde ebenfalls als insgesamt gering belastend eingestuft. Bei der zweiten Blutentnahme wurde auf die Fixation verzichtet, da die Tiere entsprechend trainiert wurden. Deshalb wurde sie als weniger belastend eingeschätzt. Die Tiere konnten während des ganzen Versuchs in ihren gewohnten Ställen und Boxen bleiben.

Die Speichelprobenentnahme stellte keine Belastung für die Tiere dar, da sie freiwillig aus Neugierde und Spieltrieb auf den Wattestäbchen kauten.

Die Herzfrequenzmessung stellte keine Belastung der Tiere dar, da das Tragen der Messgurte zu keiner Veränderung im Verhalten oder der Vitalparameter der Tiere führte. Eine uneingeschränkte Bewegung war stets möglich.

Weder für das Training noch für die Probenentnahmen mussten die Tiere nüchtern sein.

Während der Trainingseinheiten wurde mit überwiegend positiver Verstärkung mit den Tieren trainiert, in wenigen Fällen wurde bei einzelnen, übereifrigen Tieren das Training im Sinne einer negativen Bestrafung abgebrochen und später fortgesetzt, wenn die Tiere weniger aufgeregt waren. Das Training stellte kognitives Enrichment für die Tiere dar.

Bis zu 12 Minuten pro Trainingstag wurde jedes Tier trainiert, nie länger als 4 Minuten am Stück.

Nach Abschluss des gesamten Versuchsvorhabens blieben die Tiere ohne Einschränkung des Wohlbefindens am Leben und verblieben in der Tierhaltung.

3.6 Training der Tiere

Der Trainingszeitraum umfasste drei Wochen mit insgesamt 12 Trainingstagen, mit je zwei bis vier Trainingseinheiten pro Tag. Eine Trainingseinheit dauerte pro Tier jeweils zwei bis vier Minuten und wurde durch den Start der Stoppuhr durch die Trainerin und folgendem Piepton der Stoppuhr begonnen und beendet. Das Training fand vormittags vor der Fütterung zwischen 9 Uhr und 11 Uhr statt, um eine möglichst hohe Motivation der Tiere sicherzustellen.

Zum Training wurde die Methode der operanten Konditionierung mit Hilfe eines Klickers angewandt (Skinner 1951; Rydén et al. 2020).

3.6.1 Belohnungen

Als Belohnungen, bzw. Verstärker beim Training wurden Äpfel eingesetzt, die sich bei früheren Trainingsmodellen dieser Tierhaltung bereits als gut geeignet bei Minipigs erwiesen hatten. Die Äpfel wurden in kleine, kurze Stifte geschnitten und den Tieren mit einer Kornzange angeboten, um sie nicht auf die Hände zu trainieren.

Target

Als Target wurde eine Kunststoffröhre angefertigt, die an den Gittern der Boxen befestigt werden konnte. Die Röhre wurde so angefertigt, dass sie leicht schräg nach unten in die Box wies, sodass der Kopf des Tiers, wenn es den Rüssel in die Röhre streckte, nach oben wies und der Hals möglichst gestreckt war. Die Röhre war auf beiden Seiten offen und ermöglichte so die Belohnung bzw. Fütterung des Tiers durch die Öffnung der nach außen weisenden Seite der Röhre.

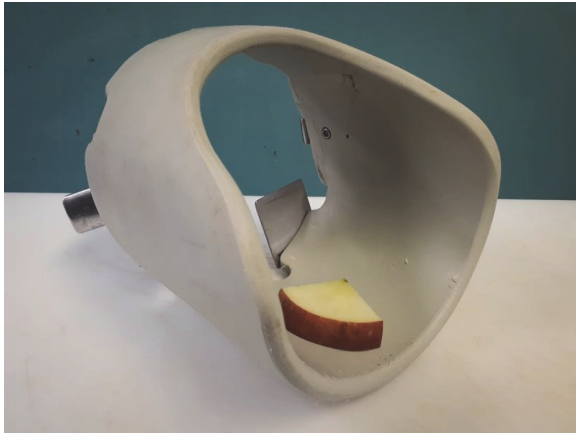


Abbildung 9: Target-Röhre zum Befestigen an der Boxentür mit Apfelstück. (Urheber Fotos: Delia Fiderer)



Abbildung 10: Minipig beim ruhigen Stehen mit dem Rüssel in der Target-Röhre. Man sieht die Rüsselscheibe durch die Aussparung auf der Rückseite der Röhre, durch die auch die Belohnungen mittels einer Kornzange dem Minipig angeboten werden. (Urheber Foto: Delia Fiderer)

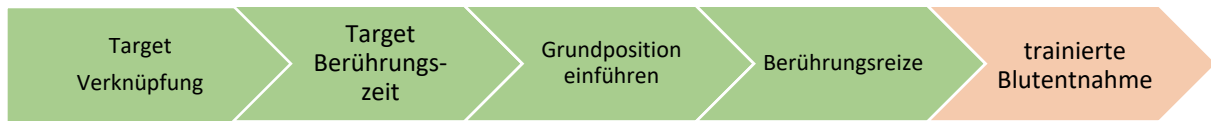
Trainingsplan

Abbildung 11: Die vier Stufen des Trainingsplans (grün hinterlegt).

Tabelle 1: Inhalte und Zwischenziele des Trainingsplans.

Trainingstag	Inhalt des Trainings
1 – 2	Kontakt zum Tier aufbauen. Target Verknüpfung erstellen: Wenn Rüssel in die Target-Röhre bewegt wird → Klick und Belohnung.
3 – 4	Target-Berührungszeit verlängern. Klick und Belohnung erst nach zwei bis vier Sekunden Verweildauer mit dem Rüssel in der Röhre.
5 – 6	Target-Berührung mit Rüssel in Röhre wird Grundposition für das Training. Zweite Handlung = Hals-Berührung einführen durch 2. Person Rüssel muss in Röhre sein, aber erst Klick und Belohnung, wenn Hand der Person in der Box sich Hals nähert. Danach, wenn sie den Hals berührt.
7 – 12	Berührungsreize am Hals verstärken und Ausarbeitung des Stillstehens in Target-Grundposition. Halsberührung während Rüssel am Target ist, ist bereits möglich. Jetzt Reize am Hals intensivieren: erst nur Fingerdruck, dann sachte zwicken, fester zwicken. Wenn beides funktioniert, Beginn mit Zahnstocher auf die Haut am Hals Druck auszuüben. Klicken bei Druck mit Zahnstocher, Belohnung. Wenn Verlassen der Röhre mit dem Rüssel → keine Belohnung, keine weitere Berührung am Hals; erst wenn Rüssel in Targetröhre ist, wird weiter trainiert. Immer wieder Wiederholungen der Grundposition, stillstehen mit möglichst wenig Rüsselbewegungen in der Röhre (bis 30 Sekunden ohne Zwischenbelohnung), erst ohne Halsberührung, dann mit Halsberührung.

Während der ersten zwei Trainingstage wurden die Minipigs an das Target gewöhnt. Auf jede Berührung des Targets mit der Rüsselscheibe wurde sofort mit einem Klick des Klickers

reagiert und anschließend das Tier mit möglichst geringem Zeitverlust mit einem bereitgehaltenen Apfelstückchen belohnt. Die Apfelstücke wurden mit Hilfe einer Kornzange von außen in die Box (und später durch die Target-Röhre) den Minipigs angeboten. Die Trainingseinheit dauerte in der Regel zwei Minuten, konnte nach Bedarf auch angepasst werden und wurde durch das Läuten einer Stoppuhr begonnen und beendet.

Sobald ein Tier selbstständig immer wieder mit dem Rüssel in die Röhre kam, wurde die Zeitdauer des Verweilens in der Röhre in Sekundenschritten verlängert bis zu fünf bis sechs Sekunden.

Ab Tag 3 wurde außer der Person mit dem Klicker und den Belohnungen vor der Box eine weitere Person eingesetzt, die sich in der Box zunächst nur neben das Minipig kniete während des Trainings.

Ab Trainingstag 4 begann die Person in der Box mit langsamen Handbewegungen in Richtung Hals des Minipigs, während dieses mit dem Rüssel in der Target-Röhre verweilte. Das Klickern und die Belohnung erfolgte durch die trainierende Person vor der Box bei Tolerieren der Handbewegung der Person neben dem Minipig in der Box.







In den folgenden Trainingstagen wurde die Hand bis an den Hals des Minipigs schrittweise unter Belohnungen geführt und dann die Halsberührung belohnt. Daraufhin wurde begonnen mit der Hand leichte Reize am Hals zu setzen, durch leichtes Drücken mit dem Finger oder Kniffe unterschiedlicher Intensität in die Haut. Jede Berührung wurde weiterhin belohnt. Parallel wurde die Zeitdauer der Berührungen und Reize am Hals gesteigert, sodass die Minipigs schließlich Manipulationen am Hals bis zu 20 Sekunden ohne Belohnung tolerierten. Täglich wurde auch das Stillstehen der Minipigs mit dem Rüssel in der Röhre gefestigt durch Klicken beim Stillstehen mit möglichst wenigen Rüsselbewegungen, ohne Berührung am Hals. Die Zeitdauer des ruhigen Stehens mit dem Rüssel in der Target-Röhre wurde durch immer weiter herausgezögertes Klicken stetig verlängert bis zu 30 Sekunden (ohne Zwischenbelohnung). Augenmerk lag neben einem ruhigen Stand und wenig Kopfbewegungen des Minipigs auch auf der Körperhaltung und -spannung der Tiere.

Ab Tag 7 wurden neben den durch die Hand ausgelösten Reizen am Hals der Minipigs auch Zahnstocher eingesetzt, um vergleichbar punktuelle Reize zu setzen, wie sie bei der Blutentnahme auftreten würden. Mit den Zahnstochern wurde ein Druck am Hals unterschiedlicher Intensität und Dauer, sowie mehrmaliges „Nachstechen“ trainiert und belohnt.

An Tag 13 fand die zweite Blutentnahme statt.

In der Regel wurde mit positiver Verstärkung gearbeitet (Klicker & Belohnung), bei wenigen Minipigs wurde einige Male aber auch eine negative Bestrafung angewandt. Diese Tiere waren nach einigen Trainingstagen so aufgereggt, wenn das Training beginnen sollte, dass sie kaum stillstanden und mit dem Rüssel versuchten, die Target-Röhre zu bewegen oder hineinzubeißen. In solchen Fällen wurde das Training dann beendet und zu einem späteren Zeitpunkt nochmal angesetzt (negative Bestrafung).

Tabelle 2: Trainierte Blutentnahmemethode dargestellt anhand von sechs Fotos

	
<p>1) Kontaktaufnahme und Palpation der anatomischen Strukturen am Hals zur Lokalisation der Punktionsstelle. Währenddessen wird für das ruhig Stehen mit dem Klicker geklickt und belohnt.</p>	<p>2) Bei ruhig stehendem Minipig wird die Kanüle dem Hals genähert.</p>
	
<p>3) Mit der zweiten Hand wird die Position der Kanüle am Hals stabilisiert. Die Vene wird punktiert und die Blutentnahme durchgeführt. Währenddessen steht das Minipig still, es wird noch nicht belohnt.</p>	<p>4) Nach erfolgter Blutentnahme wird die Kanüle (samt Spritze) entfernt und das Minipig durch die Target-Röhre belohnt. Es bleibt weiterhin mit dem Rüssel in der Target-Röhre. Es wird geklickt und belohnt.</p>
	
<p>5) Auf die Punktionsstelle wird manuell Druck ausgeübt, um die Entstehung eines Hämatoms zu reduzieren.</p>	<p>6) Das Minipig bleibt mit dem Rüssel in der Targetröhre und erwartet weitere Belohnungen.</p>

3.7 Probengewinnung

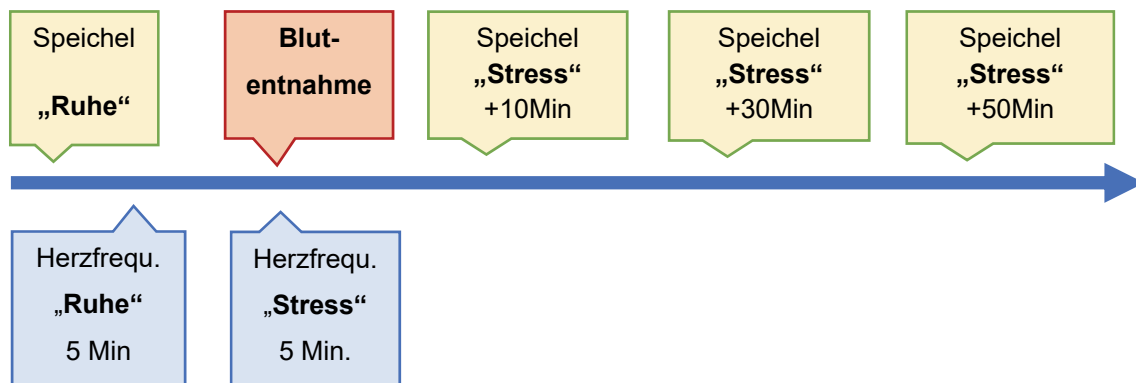


Abbildung 12: Detaillierter Ablauf der Probengewinnung an den Probengewinnungstagen, aufgetragen auf einem Zeitstrahl. Gelb hinterlegt sind die Speichelprobeentnahmen in Ruhe, sowie 10, 30, und 50 Minuten nach der Blutentnahme als „Stress“ bezeichnet. Blau hinterlegt sind die beiden Herzfrequenzmessungen in Ruhe vor der Blutentnahme und während der Blutentnahme über je 5 Minuten. Rot hinterlegt ist die Blutentnahme.

Die Blutentnahmen der Minipigs wurden auf je zwei aufeinanderfolgende Tage vor und nach der Trainingsphase aufgeteilt. So konnte die Probengewinnung bei allen Minipigs möglichst zur selben Tageszeit stattfinden, sodass die circadiane Kinetik des Cortisols nicht zu großen Unterschieden zwischen den Tieren führte. Die Haltung (Aufstallung, Beschäftigungsangebot, Fütterung, Säuberung der Ställe) der Minipigs blieb während des Trainingszeitraums aus dem selben Grund unverändert. Zu Beginn des Versuchs waren die Tiere bereits Menschenkontakt und Handling, sowie den in der Haltung üblichen Tagesablauf gewöhnt, sie mussten für den Versuch nicht umgestellt werden.

3.7.1 Gewinnung der Speichelproben

Zur Speichelprobenentnahme wurden die Salivetten Cortisol® (Art.- Nr. 51.1534.500, SARSTEDT AG & Co, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), die besonders gut für die Speichelprobengewinnung mit anschließender Cortisol-Bestimmung geeignet sind, verwendet. Die Salivetten®, bestehend aus Kunststofffaserrollen, wurden dann auf einer Kornzange nach GROSS, 200mm, den Tieren ins Maul eingeführt und dort vorsichtig in der Wange und am Gaumen bewegt. Aus natürlicher Neugierde fangen die meisten Tiere an, kauend die Kunststofffaserrolle zu erkunden. Jedes Tier kaute ca. 30 Sekunden auf der Salivette®, sodass sie ausreichend mit Speichel getränkt war. Vorheriges Training zur Akzeptanz der Kunstfaserrollen war nicht erforderlich, die Tiere zeigten Neugierde und Interesse an den Kunstfaserrollen und begannen auch selbstständig, diese sofort ins Maul zu nehmen und darauf zu kauen. Als Anreiz konnte bei Bedarf zusätzlich ein Apfelstück vor den Rüssel gehalten werden.

Es wurden je Blutentnahme vier Speichelproben pro Minipig genommen – eine Ruhespeichelprobe 30 - 60 Minuten vor der Blutentnahme und je eine Probe 10, 30 und 50 Minuten nach der Blutentnahme. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme auf Eis gekühlt und noch am selben Tag bei 1000 x g für zwei Minuten in einer Thermo Scientific Heraeus® Labofuge® 400R (ThermoScientific, West Sussex, United Kingdom) Zentrifuge zentrifugiert und in Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5ml, Eppendorf Quality™ pipettiert und bei - 20°C tiefgefroren und bis zur Messung im Labor gelagert.

3.7.2 Gewinnung der Blutproben

Bei den Blutprobenentnahmen der Minipigs wurden mit sterilen Einmalkanülen (20Gx2 4/5 0,9 x 70 mm, Sterican, B.Braun AG, Melsungen) und Sarstedt Monovetten® 2-3 ml Blut aus der Vena jugularis externa entnommen. Die Person, die die Blutentnahme ausführte, kniete dabei schräg rechts vor dem Minipig und hatte freien Zugang zum Hals des Tieres. Die Oberkieferschlinge wurde nach Absetzen der Kanüle vom Hals des Tiers wieder entfernt. Die Blutproben wurden, wie die Speichelproben, direkt nach der Entnahme auf Eis gekühlt und noch am selben Tag bei 2000 x g für 10 Minuten (Blutproben) zentrifugiert (Thermo Scientific Heraeus® Labofuge® 400R Zentrifuge (ThermoScientific, West Sussex, United Kingdom)). Das Serum wurde in Eppendorftubes® (Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5ml, Eppendorf Quality™, Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert und bei - 20°C eingelagert.

Die Blutentnahme der trainierten Minipigs wurde auf die gleiche Art und Weise und mit den gleichen Materialien durchgeführt.

3.8 Herzfrequenzmessungen

Die Herzfrequenz wurde nicht-invasiv gemessen mit Herzfrequenz-Sensoren, die an Brustgurten befestigt den Minipigs angelegt wurden.

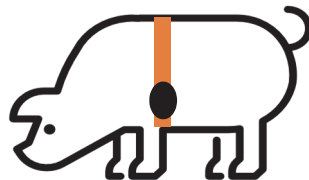


Abbildung 13: Piktogramm eines Schweins mit Herzfrequenzmessgurt. Die Position des Gurtes ist orange markiert, die Position des Sensors am Gurt ist schwarz und oval.

Verwendet wurden die Polar H10 Herzfrequenz-Sensoren® (Polar Electro Oy, Kempele, Finnland) und Messgurte. Diese haben sich in anderen Studien bereits zur Messung der Herzfrequenz beim Schwein bewährt (Reimert et al. 2014; Marchant-Forde and Marchant-Forde 2004). Sie messen die Herzfrequenz pro Sekunde, sodass auch feine Schwankungen wahrgenommen werden können. Über Apps für Mobiltelefon und Computer des Herstellers der Sensoren (Polar Beat® und Polar Flow® (Polar Electro Oy, Kempele, Finnland)) können die Messungen gestartet, aufgezeichnet, und beendet sowie auf andere Geräte übertragen werden.

Die Herzfrequenzmessung fand an beiden Blutentnahmetagen gleich statt. Die elastischen Brustgurte wurden den Minipigs morgens nach der Ruhe-Speichelprobenentnahme um den Brustkorb angelegt und die Herzfrequenzsensoren über je zwei Druckknöpfe am Gurt auf Höhe des Herzens, caudal des linken Ellenbogens, befestigt. Die Haut der Minipigs auf Höhe des Herzens an der linken Brustwand, der Position des Messsensors, sowie der Messsensor selbst wurden mit Gleitgel angefeuchtet, um einen optimalen Kontakt und eine möglichst lückenlose Aufzeichnung zu gewährleisten. Stark behaarte Tiere wurden bereits vor dem Versuch im Bereich des Messsensors hinter dem linken Ellenbogen am Brustkorb rasiert. Außerdem wurden während der Messungen die Minipigs innerhalb ihrer ansonsten zum Teil miteinander verbundenen Heimatkäfige mit Hilfe von Falltüren zwischen den Boxen voneinander separiert, damit sie nicht untereinander den Sitz des Gurtes am Brustkorb verändern konnten. Diese Trennung waren die Minipigs von den Trainingseinheiten und den Fütterungen gewöhnt. Während dieser Zeit hatten die Tiere aber jederzeit Sicht-, Geruch- und Hörkontakt mit anderen Tieren in demselben Raum.

Das Anlegen der Gurte wurde bei den Minipigs vorher bereits zweimal geübt. Da sie keine Abwehrreaktionen oder starke Aufregung nach Anlegen der Gurte zeigten, war kein weiteres Training für den Einsatz der Messgurte nötig.

Bei jedem Minipig wurde ca. 30 Minuten vor jeder Blutentnahme für einen Zeitraum von fünf Minuten eine Ruheherzfrequenz gemessen. Anschließend wurde nochmal während der Blutentnahme über einen Zeitraum von mindestens fünf Minuten die Herzfrequenz gemessen. Für die statistische Auswertung wurde der Messbereich um die Blutentnahme so festgelegt, dass 2,5 Minuten vor und nach der Blutentnahme mit einbezogen wurden.

Die Messungen wurden über ein Mobiltelefon mit der zu den Sensoren gehörenden App (Polar Beat®) gestartet und beendet und anschließend über eine zweite App (Polar Flow®) auf einem Computer als Excel-Datei gespeichert.

3.9 Cortisol- und Opiorphinbestimmung

Der Cortisolgehalt in den Speichel- und Serumproben sowie der Opiorphinspiegel in den Speichelproben wurde mit Hilfe von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) bestimmt.

Die ELISAs wurden im Labor des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Verwendet wurden der Cortisol Salivary ELISA und der Cortisol ELISA für Serum und Plasmavon IBL International, Hamburg. Die verwendeten humanen Cortisol-ELISAs wurden bereits für den Einsatz beim Schwein validiert (Thomsson et al. 2014)

Für die Opiorphinbestimmung wurde der porcine Opiorphin-ELISA von myBioSource (Porcine Opiorphin ELISA Kit, MyBioSource, San Diego, USA) verwendet.

ELISA- Durchführung:

3.9.1 Speichel-Cortisol-ELISA

Zunächst wurden der ELISA und die Speichelproben bei Raumtemperatur 45 Minuten aufgetaut. Der im ELISA-Kit enthaltene Waschpuffer wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Anschließend wurden je 52 µl der bereits seitens des Herstellers verdünnten Standards A-F sowie der Positiv- und Negativkontrollen und der Proben zunächst in Verdünnungsröhrchen pipettiert. Einige Proben wurden im Rahmen von Mehrfachbestimmungen im Verhältnis 1:2 oder 1:3 mit dem Standard A verdünnt, da nicht ausreichend Material für unverdünnte Mehrfachbestimmung vorhanden war. Anschließend wurden die Proben (je 50 µl) mit Hilfe einer Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg) in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert.

Das Enzymkonjugat wurde in eine dafür vorgesehene Wanne gegeben. Danach wurde in alle Wells jeweils 100 µl des Enzymkonjugats mit der oben genannten 8-Kanal-Pipette, dem gleichen Pipettierschema folgend, hinzugefügt, die Platte abgedeckt und kurz vorsichtig per Hand, auf der Arbeitsfläche stehend, gerüttelt. Beim Pipettieren eventuell entstandene Luftbläschen konnten so noch aufgelöst werden. Dann wurde die Platte bei 23°C 120 Minuten inkubiert im mikrobiologischen Inkubator Thermo Scientific™HeraTherm™ compact 50125882 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Inkubationslösung aus den Wells geschüttet und dann wurden alle Wells viermal mit dem verdünnten Waschpuffer (1:10) ausgewaschen.

Anschließend wurde die Platte auf einem Zellstoff ausgeklopft, um Flüssigkeitsrückstände in den Wells zu eliminieren.

Dann wurden in die Wells, nach gleichem Pipettierschema wie bei den ersten Schritten, je 100 µl der Substrat-Lösung pipettiert (Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb) und dann die Platte abgedeckt für weitere 30 Minuten bei 23°C inkubiert. Die Substratreaktion wurde anschließend durch Hinzufügen von je 100 µl der Stop-Lösung in alle Wells gestoppt, erkennbar durch einen Farbumschlag in den Wells von blau zu gelb.

Bei 450 nm wurde dann innerhalb von 10 Minuten die optische Dichte gemessen und die Cortisolkonzentration der Proben anhand der Standardkurve errechnet. Verwendet wurde der Tecan Mikrotiterplatten-Reader Sunrise™ mit der dazugehörigen Software Magellan™ Version 7.2 von Tecan (Tecan Trading AG, Männerdorf, Schweiz).

Bei dem ELISA handelte es sich um einen kompetitiven Enzymimmunoassay. Die Wells der Mikrotiterplatte waren mit Anti-Cortisol-Antikörpern (gewonnen von Kaninchen) beschichtet. Die unbekannte Menge des Antigens (Cortisol) in den Proben konkurrierte bei diesem Testprinzip mit einer bekannten Menge enzymmarkierten Cortisols (enthalten im Enzymkonjugat) um die Bindungsstellen der Antikörper in den Wells. Nach der Inkubation wurde das nicht gebundene enzymmarkierte Antigen ausgewaschen. Die Farbintensität nach der Substratreaktion (gelb) war umgekehrt proportional zur Antigen-Konzentration in den Proben (Makarananda and Neal 1992). Die Intra-Assay-Präzision lag laut Hersteller des ELISAs bei einem mittleren Variationskoeffizient von 4.3% in einen Bereich von 3.2 % - 6.1 %. Die Inter-Assay-Präzision zeigte einen mittleren Variationskoeffizient von 13.2 % in einen Bereich zwischen 10.1 % und 19.5 %. Die Standardabweichung Inter-Assay lag gemittelt bei 0,017 µg/dl. Die Nachweisgrenze des Blanks lag bei 0.003 µg/dl, der Messbereich zwischen 0.005 µg/dl und 3 µg/dl.

3.9.2 Serum-Cortisol-ELISA

Die Durchführung ähnelt der des Speichel-Cortisol-Elisas. Zunächst wurden auch der ELISA, sowie die Serumproben bei Raumtemperatur aufgetaut. Der im ELISA-Kit enthaltene Waschpuffer wurde mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 entsprechend der Anleitung verdünnt.

Anschließend wurden je 22 µl der bereits verdünnten Standards A-G sowie der Positiv- und Negativkontrolle und der Proben in Verdünnungsröhrchen pipettiert. Anschließend wurden je 20 µl in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert mit der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg).

Danach wurden jeweils 200 µl des Enzymkonjugats hinzugefügt, dem gleichen Pipettierschema folgend. Verwendet wurde die Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb, Eppendorf AG, Hamburg, die Platte abgedeckt und kurz vorsichtig manuell geschüttelt. Beim Pipettieren entstandene Luftbläschen konnten so noch aufgelöst werden. Dann wurde die Platte bei 23°C 60 Minuten inkubiert im mikrobiologischen Inkubator Thermo Scientific™ HeraTherm™ compact 50125882 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurde die Inkubationslösung aus den Wells verworfen und dann alle Wells dreimal mit je 300 µl des verdünnten Waschpuffers (1:10) ausgewaschen. Anschließend wurde die Platte auf einem Zellstoff ausgeklopft, um Flüssigkeitsrückstände in den Wells zu vermeiden.

Die Substratlösung wurde in eine Wanne gegeben und mit der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb, Eppendorf AG, Hamburg, wurde in die Wells je 100 µl der Substrat-Lösung pipettiert. Die Platte wurde dann für weitere 15 Minuten bei 23°C inkubiert. Die Substratreaktion wurde im Anschluss durch Hinzufügen von je 100 µl der Stop-Lösung gestoppt und die Platte kurz erneut geschüttelt. Der Farbumschlag von blau zu gelb war direkt erkennbar.

Bei 450 nm wurde dann innerhalb von 5 Minuten die optische Dichte gemessen und die Cortisolkonzentration der Proben errechnet. Verwendet wurde der Tecan Mikrotiterplatten-Reader Sunrise™ mit der dazugehörigen Software Magellan™ Version 7.2 von Tecan (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz).

Bei dem ELISA handelte es sich um einen kompetitiven ELISA. Die Mikrotiterplatte war, wie auch beim Saliva-Cortisol-ELISA, mit Anti-Cortisol-Antikörpern beschichtet. Das Antigen war Cortisol - in den Proben unbekannter Konzentration und das enzymmarkierte Cortisol aus dem Enzymkonjugat. Der Hersteller gab eine Intra-Assay-Präzision mit einem mittleren Variationskoeffizient von 3.0 % in einen Bereich von 2.9 % - 3.5 % an. Die Standardabweichung Intra-Assay lag gemittelt bei 7,0 ng/ml. Die Inter-Assay-Präzision zeigte einen mittleren VK von 4.1 % in einen Bereich zwischen 2.1 % - 5.2 %. Die Standardabweichung Inter-Assay lag gemittelt bei 7,92 ng/ml. Nachweisgrenze des Blanks lag bei 2.46 ng/ml, offizieller Messbereich zwischen 20 ng/ml und 800 ng/ml.

3.9.3 Opiorphin-ELISA

Auch beim Einsatz des Opiorphin-ELISAs wurden zunächst die Proben und der ELISA 45 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut.

Anschließend wurden 102 µl der Standards A-F und aller Proben in Probenröhrchen übertragen, entsprechend der geplanten Plattenbelegung der ELISA-Mikrotiterplatte (Reihe A: Standards und 2 Blanks [je 102 µl PBS-Puffer], Reihe B - H: Proben je doppelt bestimmt). Im Anschluss wurde die Platte auf dem Tisch stehend kurz mit der Hand gerüttelt zur Durchmischung der Proben. Nach dieser Vorbereitung wurde mit der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg), je exakt 100 µl der Standards, Blanks und Proben zügig in die Wells der Mikrotiterplatte übertragen.

Anschließend wurde allen Wells, die Proben enthielten 10 µl Balance Solution hinzugefügt mit Hilfe der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg). Im Anschluss wurde die Platte kurz, per Hand, auf dem Tisch stehend, geschüttelt zur Durchmischung der Proben mit der Balance Solution. Die Balance Solution wurde seitens Hersteller des ELISA-Kits für den Einsatz von Körperflüssigkeiten oder Sekreten, die nicht Serum oder Plasma sind, empfohlen. Anschließend wurde allen Standards und Proben [nicht den Blanks] mit der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg), 50 µl Enzymkonjugat hinzugefügt. Die Platte wurde daraufhin nochmals per Hand leicht geschüttelt, dann abgedeckt und für 60 Minuten bei 37°C im mikrobiologischen Inkubator Thermo Scientific™ HeraTherm™ compact 50125882 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA).

Während der Inkubationszeit wurde der im Kit enthaltene Waschpuffer im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt. Nach Ablauf der 60 Minuten wurde dann die Mikrotiterplatte ausgekippt und mit der Waschlösung alle Wells in 5 Waschgängen je gefüllt und ausgekippt. Nach dem fünften Waschgang wurde die Platte auf einem Zellstoff ausgeklopft, um Flüssigkeitsrückstände in den Wells zu vermeiden. Dann wurde direkt aufeinander folgend erst Substrat A, dann Substrat B (je 50 µl) mit der Eppendorf Research® plus (IVD), 8-Kanal-Pipette, 10 - 100 µl, gelb (Eppendorf AG, Hamburg), 50 µl in alle Wells pipettiert.

Anschließend wurde die Platte nochmals bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit 50 µl der Stop-Lösung je Well die Reaktion gestoppt, ein Farbumschlag von blau zu gelb stellte sich sofort ein. Innerhalb der nächsten 10 Minuten wurde die optische Dichte bei 450 nm Wellenlänge gemessen und die Opiorphinkonzentration der Proben errechnet. Verwendet wurde der Tecan Mikrotiterplatten-Reader Sunrise™ mit der dazugehörigen Software Magellan™ Version 7.2 von Tecan (Tecan Trading AG, Schweiz).

Bei diesem kompetitiven ELISA waren die Wells der Mikrotiterplatte beschichtet mit Anti-Opiorphin-Antikörpern. Das Antigen war porcines Opiorphin, was in den Speichelproben in unbekannter Konzentration zugefügt wurde und enzymmarkiert im Enzymkonjugat enthalten war. Der Hersteller gab eine Intra-Assay-Präzision mit einem mittleren Variationskoeffizient

von <10% an. Die Inter-Assay-Präzision zeigte einen mittleren Variationskoeffizient von <12%.

Die Sensitivität lag bei 0,1 ng/ml. Standardabweichungen wurden vom Hersteller nicht angegeben






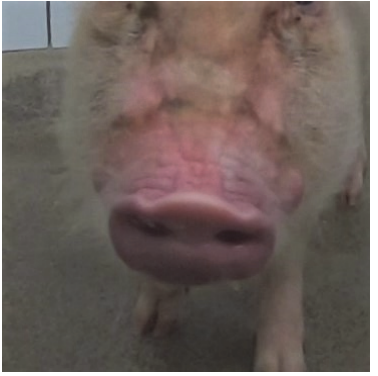
3.10 Grimace Scale

Von den Minipigs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Trainingszeitraums in Ruhe Frontalaufnahmen des Kopfes gemacht mit einer GoPro HERO8 (GoPro Inc, San Mateo, USA). Diese Aufnahmen stellen die Ruheaufnahmen dar. Außerdem wurden direkt nach der Blutentnahme mit Oberkieferschlinge ebenfalls Frontalaufnahmen gemacht, um diese mit den Ruheaufnahmen zu vergleichen.

Ein Auswertungsbogen zur Beurteilung der Mimik der Minipigs wurde auf Grundlage der Veröffentlichungen von Viscardi et al. und Vullo et al. erstellt. Da die ursprünglich von Viscardi et al. für Ferkel entwickelte Grimace Scale auch erfolgreich von Vullo et al. bei Läufern mit ca. 30kg Körpergewicht eingesetzt wurde, wurde angenommen, dass sich die Grimace Scale auch für die Beurteilung der Mimik adulter Minipigs mit ähnlicher Körpergröße und ähnlichem Gewicht eignet. 4 Facial action units wurden als Beurteilungskriterien eingesetzt – die Ohrposition, die Spannung des Nasenrückens, der Nasenspiegel, sowie die Augenpartie/Orbita. Die 25 Fotos der Minipigs wurden in einer Exceltabelle aufgeführt mit Spalten zum Eintragen der vergebenen Punktzahlen. So konnten zum Beispiel bei der Ohrposition der Minipigs drei Merkmalsausprägungen (Ohren weisen nach vorne, Ohren sind leicht angelegt oder deutlich nach hinten angelegt) unterschieden und je nach Merkmalsausprägung 0-2 Punkte vergeben werden. Jedes Minipig hat für jedes Merkmal eine Punktzahl zwischen 0 und 2 erhalten und eine Gesamtpunktzahl zwischen 0 und 6, die die Summe der Punkte der einzelnen Merkmale bzw. Facial action units darstellt. Diese Tabelle wurde mit dem Auswertungsbogen der Grimace Scale verblindet an 11 unabhängige Auswerter gegeben. Anhand der Gesamtpunktzahl sollte eine Aussage zum Stresslevel getroffen werden. Die Grimace Scale wurde erfolgreich zur Beurteilung der Mimik von Schweinen mit Schmerzen eingesetzt und da Schmerzen auch Stress für den Körper darstellen, sollte untersucht werden, ob die Mimik der Minipigs unter Stress sich ähnlich verändert wie die der Tiere aus den Studien von Vullo et al. Und Viscardi et al. unter Schmerzen. Bei der Auswertung der Gesamtpunktzahlen der Grimace Scale bedeuteten null Punkte, dass das Minipig keine stressbedingten facial action units zeigte, ein bis sechs Punkte, dass das Minipig facial action units zeigte, die auf unterschiedliche Stressintensität hinwiesen.

Zur Berechnung der Übereinstimmung der Bewerter wurde Krippendorff's alpha eingesetzt, das die Übereinstimmung der Bewertungen mit einem Wert zwischen 0 und 1 angibt. Dabei bedeutet der Wert 0, dass keine oder eine zufällige Übereinstimmung vorliegt und 1, dass eine perfekte Übereinstimmung vorliegt (Hayes and Krippendorff 2007). Nach Landis und Koch wird ab Werten von 0,61 eine substantielle, also gute Übereinstimmung erreicht (Landis and Koch 1977).

Tabelle 3: Grimace Scale für die Beurteilung der Frontalaufnahmen der Minipigs nach der Blutentnahme.

Ohrposition (bei Schmerz Anlegen der Ohren)		
Nicht vorhanden [0 Punkte]	Geringgradig vorhanden [1 Punkt]	Offensichtlich vorhanden [2 Punkte]
Ohren zeigen nach vorne	Ohren sind leicht angelegt	Ohren sind deutlich angelegt
		
Nasenrücken (bei Schmerz wird die Wangenmuskulatur angespannt und auf dem Nasenrücken ist eine oder mehrere Falten/Wulstbildung erkennbar)		
Nicht vorhanden [0 Punkte]	Geringgradig vorhanden [1 Punkt]	Offensichtlich vorhanden [2 Punkte]
Wangenmuskulatur ist entspannt, Nasenrücken ist glatt	Wangenmuskulatur ist leicht angespannt, leichte Wulst auf Nasenrücken erkennbar	Wulst auf Nasenrücken deutlich erkennbar
		

Nasenspiegel/Rüsselscheibe

(bei Schmerz wird die Rüsselscheibe angespannt, die Form der Rüsselscheibe ist deutlich oval, die Spitze der Rüsselscheibe weist nach vorne, die Seitenränder nach außen)

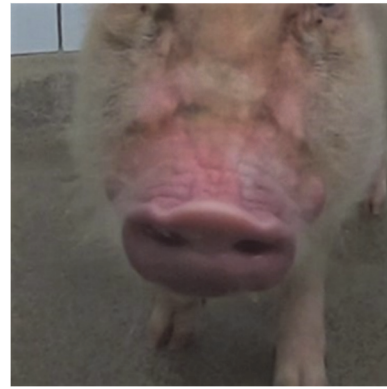
Nicht vorhanden
[0 Punkte]

Rüsselscheibe ist glatt



Vorhanden
[1 Punkt]

Rüsselscheibe ist gewölbt, angespannt, von ovaler Form, Seitenränder sind nach außen gezogen, obere Spitze kann nach vorne weisen.



Augenpartie/Orbita

(bei Schmerz wirkt die Partie um die Augen verengt, Augenlider werden zusammengekniffen)

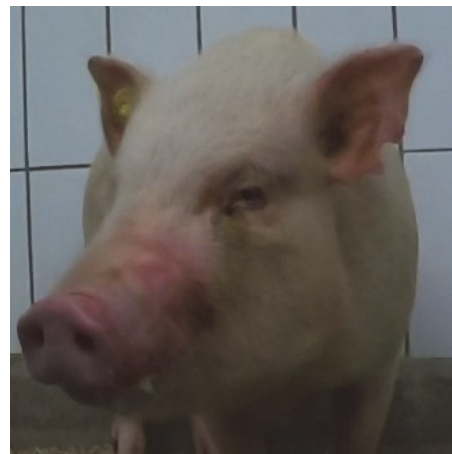
Nicht vorhanden [0 Punkte]

Augen sind geöffnet



Vorhanden [1 Punkt]

Augenlider werden zusammengekniffen

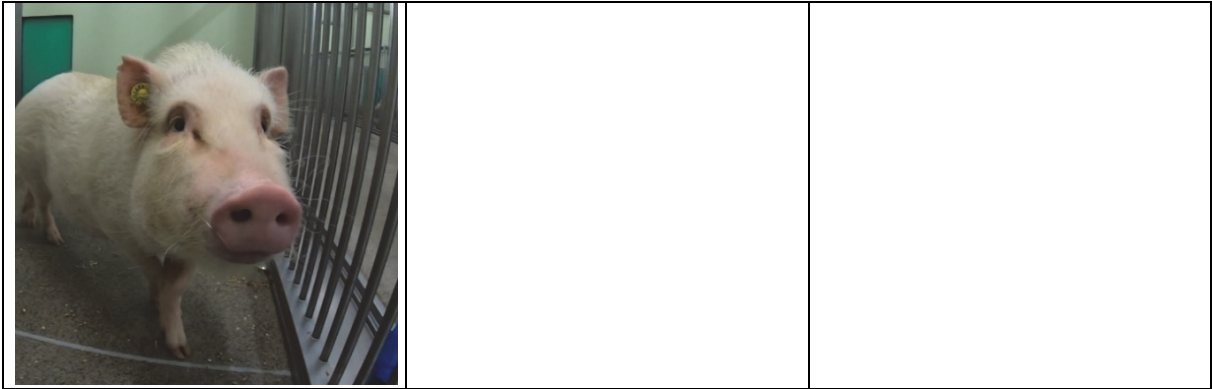


Material und Methoden

Tabelle 4: 25 Fotos von Minipigs, die den verblindeten Auswertern zur Beurteilung mit Hilfe der erstellten Grimace Scale vorgelegt wurden.







4. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm IBM® SPSS® Statistics (IBM®, New York, USA), sowie Microsoft® Excel verwendet.

4.1 Stichprobengröße

Vor Beginn des Versuchs wurde der Stichprobenumfang aufgrund von anderen Studien, in denen eine Stressmessung mittels Cortisolbestimmung beim Schwein durchgeführt wurde, berechnet.

Angenommen wurde, dass die Cortisolwerte nach Logarithmierung normalverteilt sind. Außerdem wurde angenommen, dass die Differenzen (Speichelcortisol trainiert vs. untrainiert) sich um $\log 0,18$ unterscheiden (entspricht einem Unterschied von 30 %).

Bei einer angenommenen Standardabweichung von 0,18 sowie den akzeptierten Fehlern von $\alpha = 5\%$ und $\beta = 10\%$ beträgt die Stichprobengröße 12 Tiere bei einer Power von 0,88 (88%). In Tierstudien wird eine Power von mindestens 0,8 angestrebt. Damit befindet sich ein Versuchsaufbau mit 12 Minipigs in einem aussagefähigen, validen Bereich. Auch mit elf Minipigs hätte noch eine Power von 0,8 erreicht werden können, da jedoch in der Planungsphase noch unklar war, ob alle Minipigs das Training erfolgreich absolvieren würden und auch zum Beispiel durch Krankheit ein Tier während der Versuchsphase hätte ausfallen können, wurden 12 Minipigs in den Versuch aufgenommen.

In der Arbeit wurde der Effekt von Training an 12 Minipigs untersucht. Sie stellten ihre eigene Kontrolle dar. Die Minipigs werden im Folgenden als „trainierte“ und „untrainierte“ Minipigs, sowie als „Minipigs im trainierten/untrainierten Zustand“ bezeichnet, je nachdem ob es sich um die Tiere bei der Blutentnahme vor oder nach der Trainingsphase handelt.

4.2 Speichel-Cortisol

Die Speichel-Cortisolmesswerte wurden zunächst einer Varianzanalyse (ANOVA mit Messwiederholung) unterzogen. Die Messwiederholung hat in diesem Fall 4 Stufen: die Ruhemessung, die Messung 10 Minuten nach der Blutentnahme, sowie 30 und 50 Minuten nach der Blutentnahme. Die Zwischensubjektfaktoren wurden als „trainiert“ und „untrainiert“ festgelegt.

Tabelle 5: Die vier Stufen, die für die Speichelcortisol ANOVA-Varianzanalyse festgelegt wurden.

(Urheber: Delia Fiderer)

Stufe 1	Stufe 2	Stufe 3	Stufe 4
Ruhemessung	10 Min. nach Blutentnahme	30 Min. nach Blutentnahme	50 Min. nach Blutentnahme

Es wurde der Mauchly-Test auf Sphärizität angewandt und als Korrekturverfahren der Greenhouse-Geisser-Test gewählt, um die Signifikanz der Unterschiede der verschiedenen Stufen darzustellen.

Mit Hilfe des Tests der Innersubjektskontraste wurden die Änderungen zwischen je zwei aufeinanderfolgenden der 4 Stufen verglichen (zwischen Stufe 1 und 2, Stufe 2 und 3 und Stufe 3 und 4) und die Signifikanz bestimmt. Außerdem wurde so eine Wechselwirkung zwischen den Innersubjektfaktoren mit den Messzeitpunkten untersucht.

Der Test der Zwischensubjekteffekte stellt den Unterschied zwischen den zwei Gruppen (trainiert und untrainiert) dar.

Mit den Parameterschätzern wurden die zwei Gruppen zu jedem der 4 Messpunkte verglichen und Signifikanzen berechnet.

Die Residuen für jeden der vier Zeitpunkte wurden auf Normalverteilung überprüft.

Da alle Werte mehrfach bestimmt wurden, wurde um die Übereinstimmung und die korrekte Ausführung der ELISAs darzustellen, der Konkordanz-Korrelations-Koeffizient nach Lin Inter-Assay und Intra-Assay bestimmt (Lawrence 1989).

4.3 Serum-Cortisol

Die Serum-Cortisolwerte der trainierten und untrainierten Minipigs wurden ebenfalls in einem t-Test für verbundene Stichproben miteinander verglichen.

Auch die Serum-Cortisolwerte wurden Intra- und Inter-Assay doppelt bestimmt und um die Übereinstimmung darzustellen der Konkordanz-Korrelations-Koeffizient nach Lin von allen Proben bestimmt (Lawrence 1989).

4.4 Speichel-Opiorphin

Die Speichel-Opiorphinwerte wurden Intra-Assay mehrfach bestimmt. Ein Bland Altman Plot (Bland and Altman 1986) wurde erstellt und eine Übereinstimmungsmessung durchgeführt, Hierfür wurde der Konkordanz-Korrelations-Koeffizient nach Lin bestimmt (Lawrence 1989).

4.5 Herzfrequenzmessungen

Die Herzfrequenzen wurden je Minipig 5 Minuten in Ruhe und nochmal mindestens 5 Minuten während der Blutentnahme gemessen. Für die Auswertung wurde von den Messungen während der Blutentnahmen der Messzeitraum 2,5 Minuten vor bis 2,5 Minuten nach der Blutentnahme ausgewählt, sowie die 5 minütige Messung in Ruhe. Die Mittelwerte dieser 5-minütigen Messungen wurden von den trainierten und untrainierten Tieren im t-Test verbundener Stichproben miteinander verglichen sowie Standardabweichung, Standardfehler und p-Wert bestimmt.

Außerdem wurden auch die Mittelwerte der Herzfrequenzen über 60 Sekunden nach Beginn der Blutentnahme (Einstich Kanüle in den Hals) der trainierten und der untrainierten Tiere einem t-Test verbundener Stichproben unterzogen.

Anschließend wurde noch ein Vergleich der Herzfrequenzmittelwerte der ersten 60 Messsekunden mit den Werten 60 Sekunden nach Blutentnahme bzw. dem Einstich mit der Kanüle am Hals mit dem gleichen Testverfahren innerhalb der Gruppen trainiert und untrainiert durchgeführt. Dieser Vergleich sollte Unterschiede der Herzfrequenzmittelwerte vor und nach der Blutentnahme innerhalb des fünfminütigen Messzeitraums untersuchen.

Standardabweichung und Standardfehler wurden bei allen Messungen bestimmt.

Außerdem wurde die Korrelation der Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit der Serum-Cortisol-Konzentration untersucht.

4.5.1 Herzfrequenzvariabilität

Um die Herzfrequenzvariabilität zu untersuchen wurden je Minipig in untrainiertem und trainiertem Zustand aus der höchsten und der niedrigsten Herzfrequenz der Ruhe-Messung und der Blutentnahme-Messung je ein Delta-Wert erstellt. Aus dem Delta-Wert der Ruhe-Messung und der Blutentnahme-Messung je Zustand (untrainiert und trainiert) wurde erneut die Differenz berechnet, sodass jedes Tier eine Differenz für den untrainierten und eine für den trainierten Zustand erhielt. Diese wurden dann von allen Tieren im t-Test gepaarter Stichproben miteinander verglichen und erneut Standardabweichung und Standardfehler, sowie die Signifikanz berechnet.

4.6 Grimace Scale

25 Fotos von den Minipigs wurden von 11 Personen, „Bewertern/Ratern“, unabhängig voneinander und verblindet mit Hilfe der Grimace Scale bewertet. Die Interraterreliabilität wurde mit Hilfe von Krippendorff's alpha berechnet. Die Berechnung wurde mit einer Gewichtung für ordinal skalierte Daten durchgeführt. Beurteilt wurde die Übereinstimmung der vergebenen Gesamtpunktzahlen pro Foto zwischen den Ratern sowie die Punktzahlen der einzelnen Kriterien.

Anschließend wurde berechnet, wieviele Bewerber Fotos von Minipigs ohne vorausgegangene Blutentnahme mit 0 Punkten bewertet haben und wieviele Bewerber Fotos von Minipigs mit vorausgegangener Blutentnahme mit mehr als 0 Punkten bewertet haben. Die Annahme für die Auswertung der vergebenen Gesamtpunktzahlen war, dass Minipigs in Ruhe keine Anzeichen von Stress in der Mimik zeigen und Minipigs nach der Blutentnahme mit Fixation in Oberkieferschlinge Anzeichen von Stress in ihrer Mimik zeigen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass die Fotos, die Minipigs ohne vorausgegangene Blutentnahme, Minipigs in Ruhe zeigten. Hierfür wurde die Gesamtpunktzahl 0 festgelegt als gleichbedeutend mit „kein Anzeichen von Stress liegt bei dem beurteilten Tier vor“ und die Punktzahlen 1, 2, 3, 4, 5 und 6 festgelegt als „es liegen Anzeichen von Stress bei dem beurteilten Tier vor“. Diese Einschätzung wurde dann mit dem Zustand der Tiere zum Zeitpunkt der Aufnahme verglichen. Wurde eine Aufnahme eines Minipigs in Ruhe bzw. ohne vorausgegangene Blutentnahme mit 0 Punkten bewertet, galt diese Bewertung als korrekt. Ebenso wurde mit Fotos von Minipigs nach der Blutentnahme verfahren, die mit mehr als 0 Punkten bewertet wurden. Die „Trefferquoten“ wurden in Prozent angegeben und die Konfidenzgrenzen für den Schätzwert der Prävalenz wurden berechnet.

5. Ergebnisse

5.1 Speichel-Cortisol

Der für die Speichel-Cortisolwerte angewandte Mauchly-Test auf Sphärizität fällt mit einem p-Wert von $< 0,001$ signifikant aus, was bedeutet, dass die Varianz zwischen den Stufen sich unterscheidet. Dieser p-Wert belegt, dass es Unterschiede zwischen den Zeitpunkten, also den Stufen gibt.

Der Test der Innersubjektskontraste zeigt, dass es zwischen allen Messzeitpunkten (Ruhe, 10, 30 und 50 Minuten nach Blutentnahme), außer zwischen Messzeitpunkt 2 und 3 (10 und 30 Minuten nach Blutentnahme), signifikante Unterschiede der Werte gibt. Außerdem lässt sich eine signifikante Wechselwirkung zwischen dem trainierten Zustand und den Unterschieden zwischen den 4 Messzeitpunkten zeigen.

Tabelle 6: Ergebnisse des Tests der Innersubjektskontraste im Rahmen der ANOVA-Varianzanalyse der Speichel-Cortisolmesswerte. Dargestellt werden die Signifikanzen. Verglichen wurden zunächst die Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten, ohne den Zustand Training mit einzubeziehen (mittlere Spalte). Die rechte Spalte der Tabelle zeigt den Vergleich der Stufen mit Einbeziehung der Wechselwirkung zwischen Zeitpunkt und Training. Signifikante Werte nach Bonferroni-Holm Adjustierung sind grün markiert. (Urheber: Delia Fiderer)

Test der Innersubjektskontraste	Vergleich „Zeitpunkte“ Signifikanz (p-Wert)	Vergleich „Zeitpunkte x Training“ Signifikanz (p-Wert)
Ruhemessung vs. 10 Min nach Blutentnahme	0,005	0,003
10 Min nach Blutentnahme vs. 30 Min. nach Blutentnahme	0,133	0,037
30 Min nach Blutentnahme vs. 50 Min. nach Blutentnahme	0,017	0,001

Im Test der Innersubjekteffekte zeigt sich außerdem, dass die Wechselwirkung zwischen den Innersubjektfaktoren (trainiert und untrainiert) mit einem p-Wert von 0,007 ebenfalls signifikant ist.

Der Test der Zwischensubjekteffekte zeigt mit einem p-Wert $< 0,001$, dass es außerdem einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen „trainiert“ und „untrainiert“ gibt. Die Residuen für jeden der vier Zeitpunkte wurden auf Normalverteilung überprüft und ergaben eine Normalverteilung der Daten.

Bei den Parameterschätzern kann man feststellen, dass der Ruhe-Cortisolwert bei den trainierten Tieren geringer ist, als bei den untrainierten Tieren, der Unterschied mit einem p-Wert von 0,26 allerdings nicht signifikant ist. Die Cortisolwerte der untrainierten Tiere 10, 30 und 50 Minuten nach der Blutentnahme sind jeweils höher als die der trainierten Tiere und die Unterschiede sind mit einem p-Wert von $< 0,001$ (bei 10 und 30 Minuten), sowie einem p-Wert von 0,013 (50 Minuten) signifikant. Die Ergebnisse lassen sich in einer Grafik verdeutlichen:

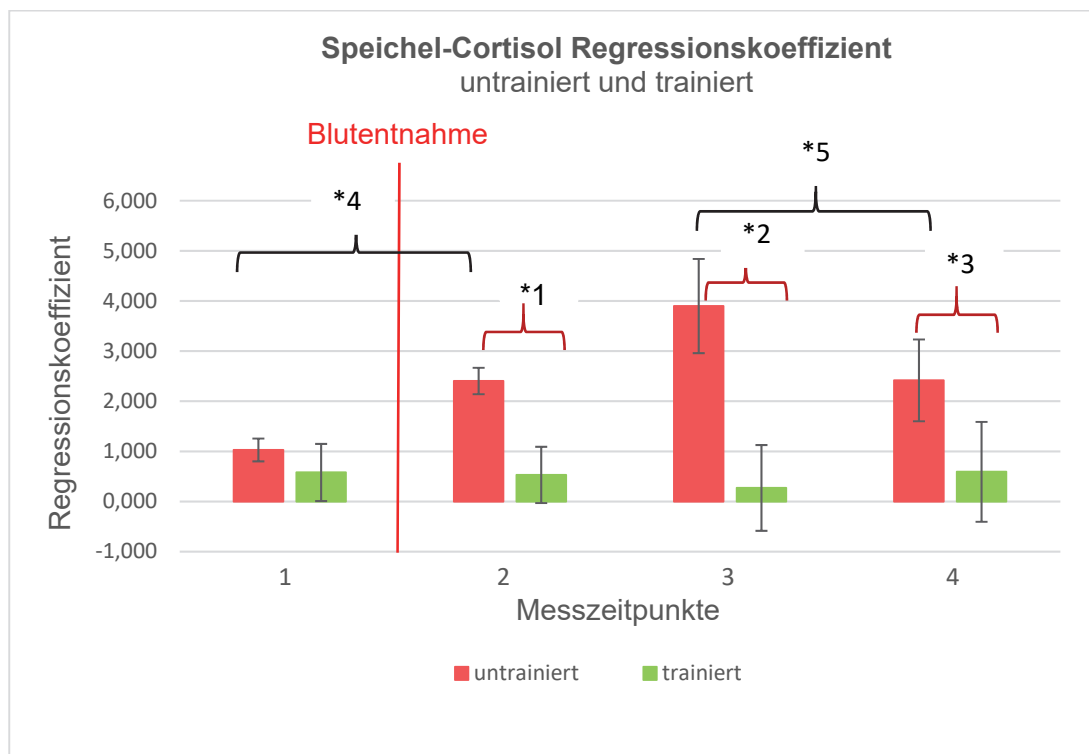


Abbildung 14: Regressionskoeffizient der Speichel-Cortisolwerte zu den vier Messzeitpunkten und den Zuständen untrainiert und trainiert. Die Werte der untrainierten Minipigs sind in roten Balken dargestellt, die der trainierten Minipigs grün. Die vier Messzeitpunkte sind Messzeitpunkt 1 = Ruhemessung, Messzeitpunkt 2 = 10 Minuten nach der Blutentnahme, Messzeitpunkt 3 = 30 Minuten nach der Blutentnahme, Messzeitpunkt 4 = 50 Minuten nach der Blutentnahme. Die Fehlerbalken zeigen das 95% Konfidenzintervall. Die rote, senkrechte Linie zwischen Messzeitpunkt 1 und 2 markiert den Zeitpunkt der Blutentnahme. Signifikanzen: *1 $p = < 0,001$, *2 $p = > 0,001$, *3 $p = 0,013$, *4 = 0,006, *5 = 0,006.

Tabelle 7: Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Mittelwerte der Speichel-Cortisolmessungen untrainiert und trainiert.

Zeitpunkt der Speichelprobenentnahme	Mittelwert Speichel-Cortisol in ng/ml	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwerts
Untrainiert Ruhe	1,03	1,30	0,37
Untrainiert 10 Min. nach Blutentnahme	2,40	1,28	0,37
Untrainiert 30 Min. nach Blutentnahme	3,90	2,00	0,58
Untrainiert 50 Min. nach Blutentnahme	2,42	2,29	0,66
Trainiert Ruhe	0,58	0,35	0,10
Trainiert 10 Min. nach Blutentnahme	0,53	0,34	0,10
Trainiert 30 Min. nach Blutentnahme	0,27	0,28	0,08
Trainiert 50 Min. nach Blutentnahme	0,59	0,54	0,16

Um die Übereinstimmung der Mehrfachbestimmungen und die Genauigkeit der Werte zu belegen, wurde der Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin bestimmt. Alle gemessenen Werte (vier Speichel-Cortisolmesswerte je Minipig (12), je Blutentnahme (2) = 96 Werte) wurden Inter-Assay doppelt bestimmt und alle Werte in die Berechnung des Konkordanz-Korrelationskoeffizienten miteinbezogen. Für die Inter-Assay Doppelbestimmungen zeigte der Koeffizient einen Wert von 0,96 mit einem 95% Konfidenzintervall zwischen 0,906 und 0,957. Nach McBride ist die Korrelation substantiell (McBride 2005), das bedeutet die Übereinstimmung der Doppelbestimmungen ist sehr hoch. Im Bland Altman Plot wird

deutlich, dass die Differenz zwischen den verschiedenen Messungen größer wird, je höher der Speichel-Cortisol-Messwert ist.

Auch den Informationen des Herstellers ist zu entnehmen, dass im Bereich niedriger Messwerte geringere Standardabweichungen auftreten. Intra-Assay wurden sieben Proben doppelt bestimmt und bei diesen ein Konkordanz-Korrelationskoeffizient von 0,99 erzielt mit einem 95% Konfidenzintervall zwischen 0,946 und 0,998. Nach McBride ist die Korrelation substantiell (McBride 2005), auch hier war die Übereinstimmung der Doppelbestimmungen also sehr hoch.

5.2 Serum-Cortisol

Der Vergleich der Serum-Cortisolmittelwerte der untrainierten und trainierten Minipigs, ergab keinen signifikanten Unterschied $t(9) = 2,052$, $p = 0,07$.

Tabelle 8: Serum-Cortisol - Mittelwerte, Standardfehler und Standardabweichung der untrainierten und der trainierten Tiere, sowie p-Wert der beim Vergleich beider Gruppen im t-Test verbundener Stichproben berechnet wurde.

Serum-Cortisol	Mittelwert Serum-Cortisol (ng/ml)	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwerts	p-Wert
untrainiert	79,15	50,54	15,98	0,07
trainiert	45,01	10,65	3,37	

In dem Test wurden die Werte von 10 Tieren miteinander verglichen, da nur bei 10 von 12 der trainierten Tiere eine für die Analyse ausreichende Menge Blut abgenommen werden konnte.

In der grafischen Darstellung der Serum-Cortisolwerte im untrainierten und trainierten Zustand ist deutlich zu erkennen, dass bei 7 von 10 Tieren der Serum-Cortisolwert nach dem Training niedriger ist, als vor dem Training. Außerdem fällt auch auf, dass besonders bei den untrainierten Minipigs mit einem sehr hohen Serum-Cortisolwert ein deutliches Absinken des Werts im trainierten Zustand erfolgt ist. Bei 3 Minipigs, die untrainiert bereits einen eher niedrigen Serum-Cortisolwert hatten, zeigt sich trainiert ein geringer Anstieg des Serum-Cortisols [gestrichelte Linien].

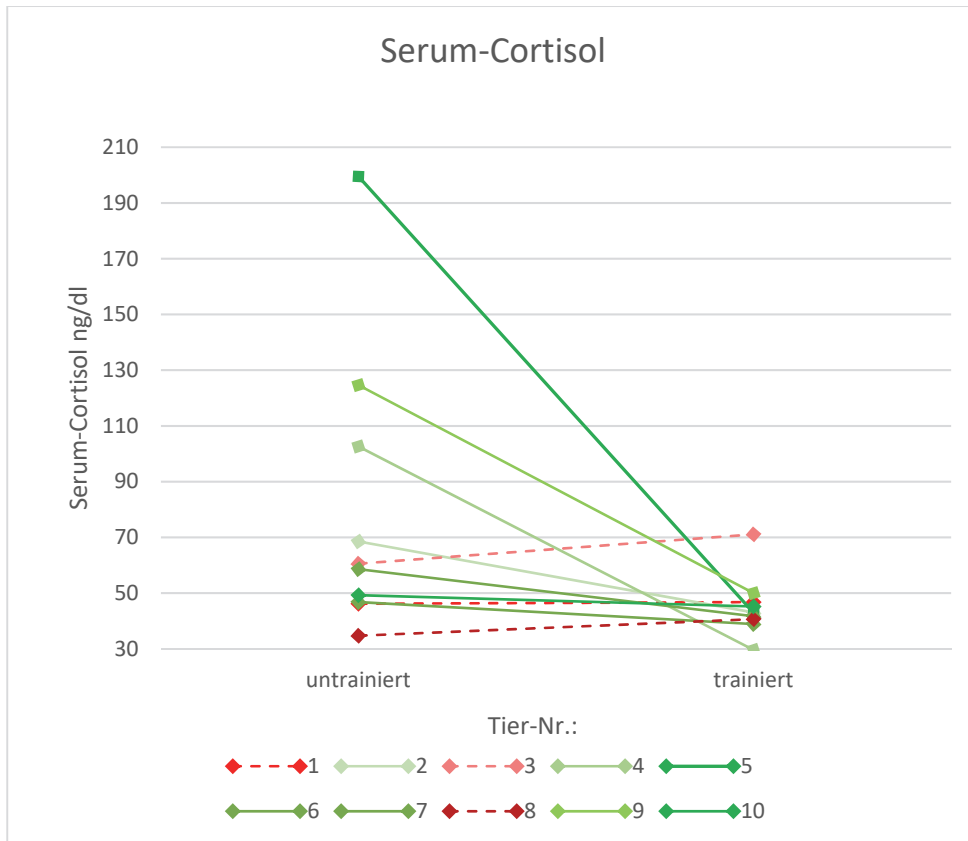


Abbildung 15: Vergleich des Serum-Cortisolwerts (in ng/dl) zum Zeitpunkt der Blutentnahme (Einstich mit Kanüle am Hals) im untrainierten Zustand und im trainierten Zustand. Die Werte der einzelnen Minipigs sind jeweils miteinander verbunden. Die grünen Linien markieren dabei die Minipigs, die nach dem Training einen niedrigeren Serum-Cortisolwert hatten, als vor dem Training und die roten, gestrichelten Linien zeigen drei der zehn Minipigs, bei denen die Serum-Cortisol-Konzentration trainiert höher als im untrainierten Zustand war.

Für die Intra-Assay Doppelbestimmungen zeigte der Koeffizient einen Wert von 0,99 mit einem 95% Konfidenzintervall zwischen 0,973 und 0,995.

Für diesen Korrelationskoeffizienten nach Lin, der die Inter-Assay-Übereinstimmung darstellt, ergab sich ein Wert von 0,96 mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 0,917 und 0,983.

Nach Mc Bride ist die Übereinstimmung der Messungen Intra-Assay und Inter-Assay substantiell (McBride 2005), also sehr hoch.

5.3 Herzfrequenz

Tabelle 9: Herzfrequenz – Mittelwerte, Standardabweichung, Standardfehler, Signifikanz. In der ersten Spalte werden die Messzeiträume dargestellt, die miteinander im t-Test verbundener Stichproben verglichen wurden. In der zweiten Spalte die Ergebnisse der Mittelwerte der Herzfrequenzmessungen der entsprechenden Zeiträume. In der dritten Spalte sind die Standardabweichungen dargestellt, in der vierten Spalte die Standardfehler. In der fünften Spalte sind die p-Werte, bzw. die Signifikanzen dargestellt der zwei im t-Test verbundener Stichproben

Ergebnisse

verglichenen Messzeiträume. Rot hinterlegte Felder markieren die untrainierten Minipigs, grüne Felder die trainierten Minipigs. Signifikanzen sind in der fünften Spalte grün markiert.

Herzfrequenz-messdauer- abschnitt	Mittelwert Herzfrequ. (Schläge/Min.)	Standard- abweichung	Standardfehler	p-Wert (Signifikanz)
Erste 60 Sek. des Blutentnahme- Messzeitraums untrainiert	95	19,06	5,62	<0,000
60 Sek. ab Blutentnahme (Kanülenstich) untrainiert	160	25,18	7,27	
Erste 60 Sek. des Blutentnahme- Messzeitraums trainiert	118	17,10	4,94	0,243
60 Sek. ab Blutentnahme (Kanülenstich) trainiert	123	17,29	4,99	
60 Sek. Ab Blutentnahme (Kanülenstich) untrainiert	160	25,18	7,27	0,001
60 Sek. Ab Blutentnahme (Kanülenstich) trainiert	123	17,29	4,99	
5 Min Ruhe-Messung untrainiert	67	14,60	4,21	0,021
5 Min. Ruhe-Messung trainiert	79	8,86	2,56	
5 Min. Blutentnahme- Messung untrainiert	123	16,38	4,75	0,462
5 Min. Blutentnahme- Messung trainiert	118	15,03	4,34	

Vergleich des Herzfrequenzmesszeitraums 60 Sekunden nach Blutentnahme:

Der Mittelwert der über 60 Sekunden nach Blutentnahme gemessenen Herzfrequenz lag bei den untrainierten Minipigs bei 160 Schlägen/Minute und bei den trainierten Minipigs bei 123 Schlägen/Minute. Das Ergebnis des t-Tests verbundener Stichproben zeigt, dass die Herzfrequenzen der untrainierten Minipigs innerhalb der ersten 60 Sekunden nach Blutentnahme sich von denen der trainierten Minipigs signifikant unterscheiden ($t(11) = 4,678$, $p = 0,001$). In der Grafik lässt sich verdeutlichen, dass die Herzfrequenz der trainierten Minipigs während der Blutentnahme-Messung zwar konstant erhöht ist, im Vergleich zur Ruhemessung, aber mit geringeren Schwankungen als bei den untrainierten Minipigs. Bei den untrainierten Minipigs ist ein deutlicher Peak zum Zeitpunkt der Blutentnahme (bei 0:00 Min.) zu erkennen.

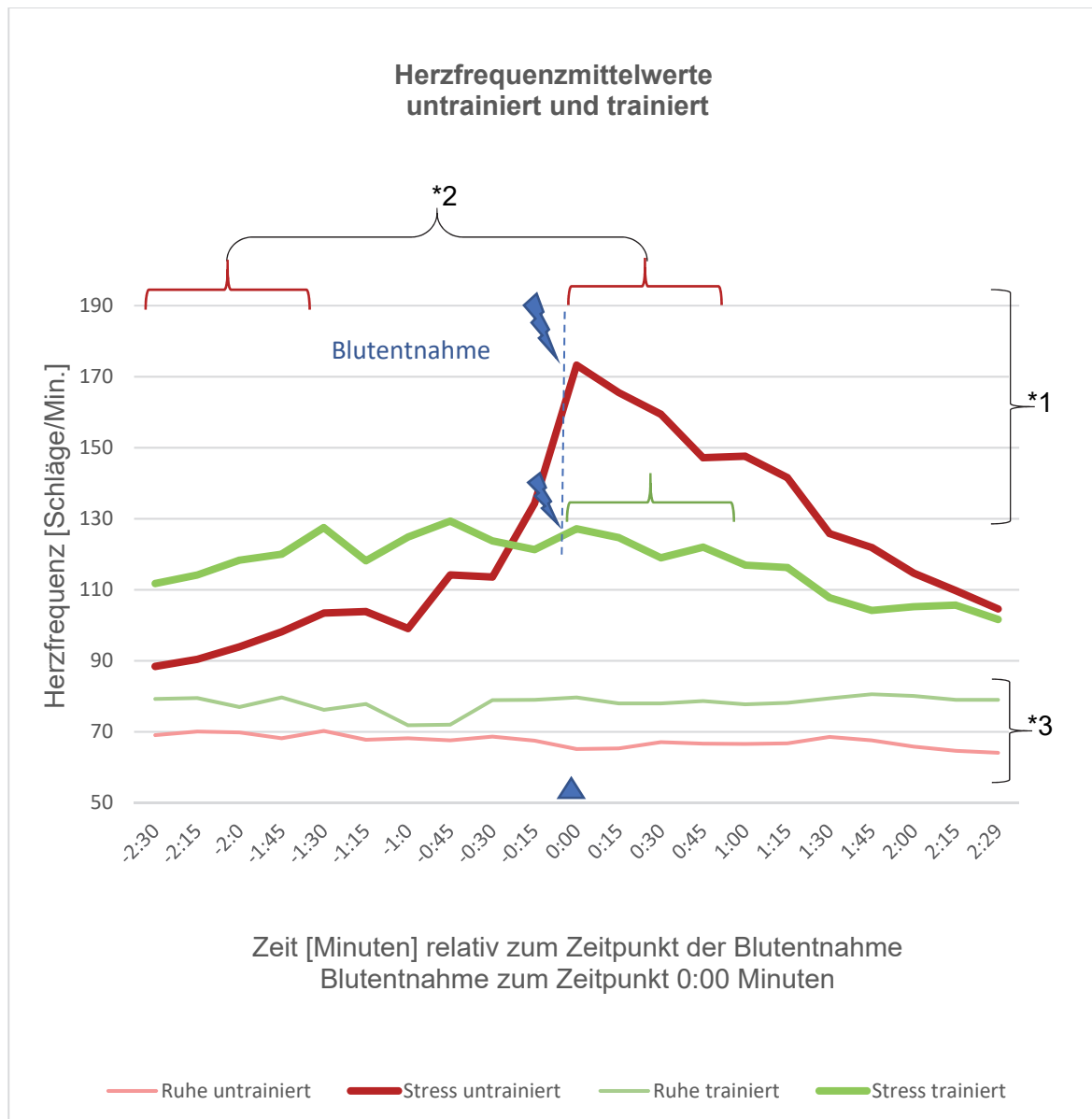


Abbildung 16: Herzfrequenzmittelwerte der 12 Minipigs in untrainiertem und trainiertem Zustand, über 5 Minuten gemessen, in Ruhe und bei Stress um den Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Ruhemessungen vor der Blutentnahme sind als dünne Linien dargestellt, die Messungen während der Blutentnahme sind als dicke Linien hervorgehoben. Der untrainierte Zustand ist jeweils in Rot dargestellt, der trainierte Zustand in grün. Der Zeitpunkt der Blutentnahme wurde als Zeitpunkt 0:00 festgelegt. Das Anlegen der Oberkieferschlinge fand innerhalb der 20-30 Sekunden vor dem Einstich mit der Kanüle in den Hals statt. Signifikanzen: *1 $p = 0,001$, *2 $p = <0,001$, *3 $p = 0,021$.

Vergleich der Herzfrequenzmittelwerte ausgewählter Messzeiträume:

Beim Vergleich der Herzfrequenzmittelwerte ausgewählter Messzeiträume ließ sich ein signifikanter Unterschied der Herzfrequenzmittelwerte bei den Minipigs in untrainiertem Zustand feststellen $t(11) = 6,021$, $p = <0,001$. Bei den Minipigs in trainiertem Zustand gibt es bei den Herzfrequenzmittelwerten zwischen beiden Messzeiträumen keinen signifikanten Unterschied $t(11) = 0,375$, $p = 0,715$.

Vergleich der Herzfrequenzmittelwerte gemessen über 5 Minuten:

Der Mittelwert der Ruheherzfrequenzen der Minipigs (gemessen über 5 Minuten) in untrainiertem Zustand lag mit 67 Schlägen/Minute unter dem der Minipigs in trainiertem Zustand mit 81 Schlägen/Minute. Die Mittelwerte der Ruheherzfrequenzen, gemessen über 5 Minuten, unterschieden sich signifikant, $t(11) = -2,64$, $p = 0,023$.

Bei den Herzfrequenzmessungen während der Blutentnahme gab es bei den Messungen über 5 Minuten keine signifikanten Unterschiede ($t(11) = 0,459$, $p = 0,655$).

Die Betrachtung der Werte einzelner Minipigs zeigt, dass besonders die Tiere, die untrainiert eine sehr hohe Herzfrequenz während der Blutentnahme gezeigt haben, trainiert eine deutlich niedrigere Frequenz zeigten (Vgl. Abb. 18).

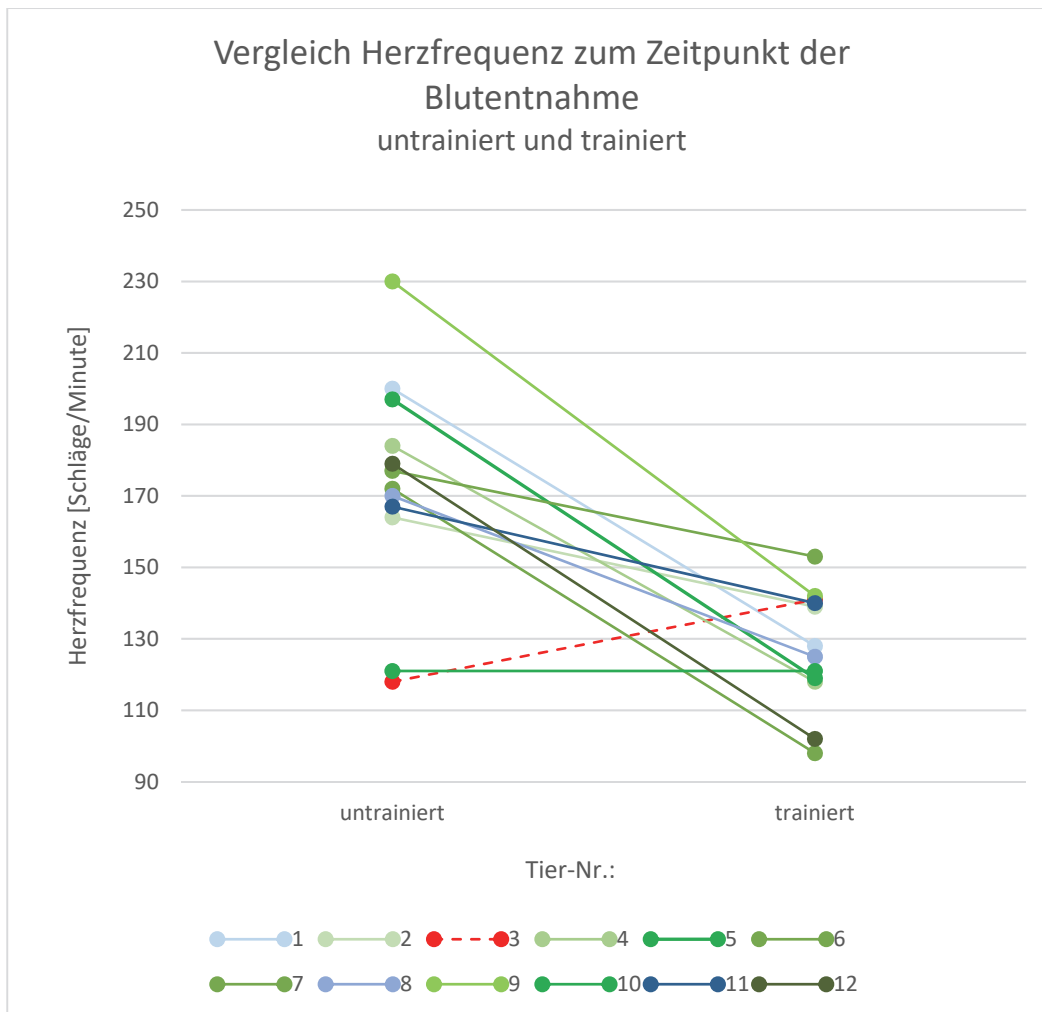


Abbildung 17: Vergleich der Herzfrequenz (in Schläge/Minute) zum Zeitpunkt der Blutentnahme (Einstich mit Kanüle am Hals) im untrainierten Zustand und im trainierten Zustand. Die Werte der einzelnen Minipigs sind jeweils miteinander verbunden, um tierindividuelle Unterschiede zwischen den beiden Zuständen darzustellen. Die grünen und blauen Linien markieren dabei die Minipigs, die nach dem Training eine niedrigere Herzfrequenz hatten als vor dem Training und die rote, gestrichelte Linie zeigt eins der zwölf Minipigs, bei dem die Herzfrequenz trainiert höher als im untrainierten Zustand war.

Darüber hinaus wurde die Korrelation der Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Blutentnahme mit der Serum-Cortisol-Konzentration untersucht (Vgl. Abb. 19). Untersucht wurde die Korrelation aller erhobener Serum-Cortisol-Konzentrationen (12 Serumproben untrainiert, 10 Serumproben trainiert), also 22 Cortisol-Konzentrationen mit den zum Zeitpunkt der Blutentnahme (Einstich Kanüle in die Haut) gemessenen Herzfrequenzen.

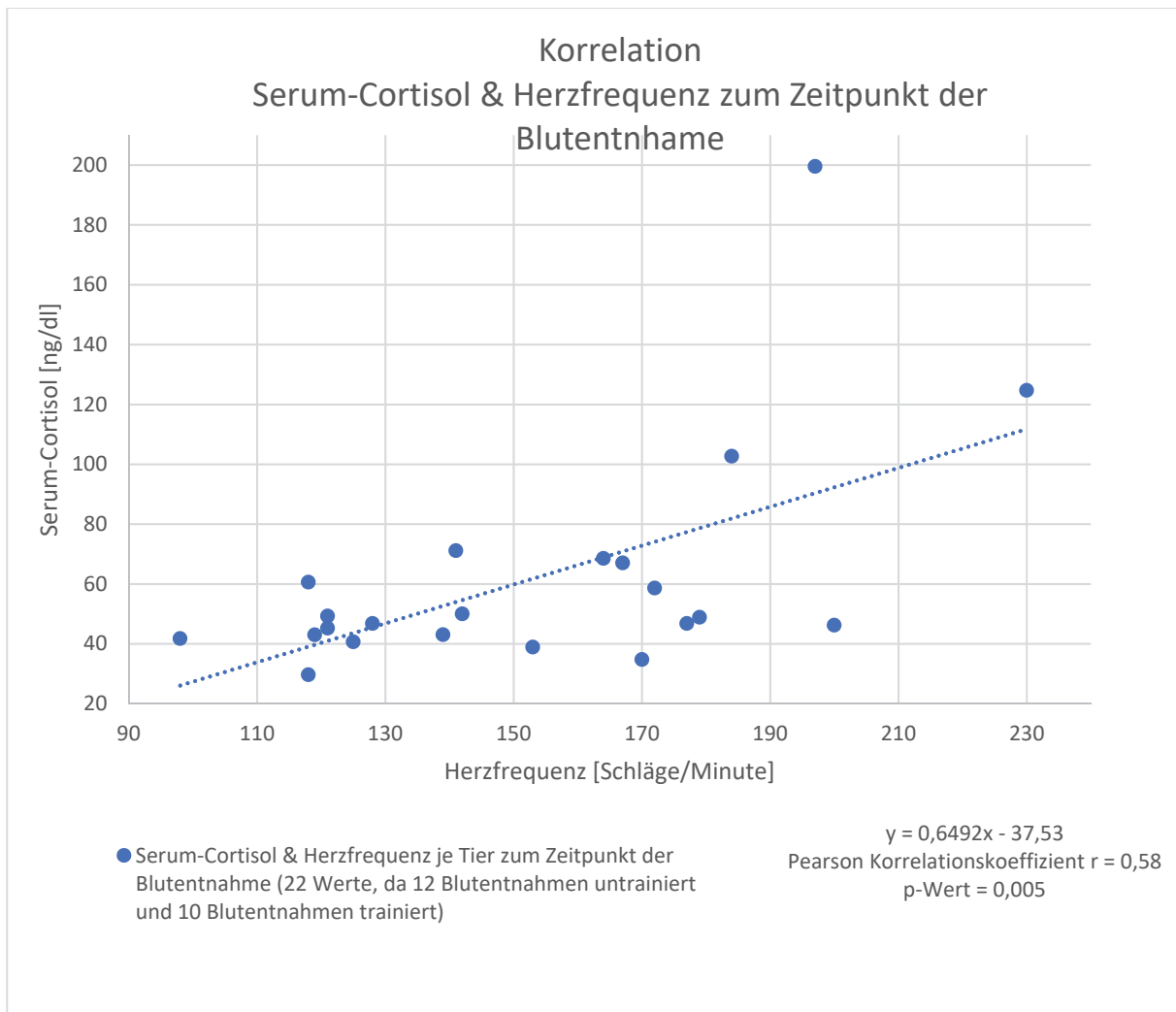


Abbildung 18: Korrelation der Serum-Cortisol-Konzentration in ng/dl aufgetragen auf der y-Achse und der Herzfrequenz in Schlägen/Minute auf der X-Achse. Pearson Korrelationskoeffizient $r = 0,58$ und p -Wert = $0,005$ (signifikant).

Die Korrelation nach Pearson zeigt einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der Serum-Cortisol-Konzentration und der Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Blutentnahme ($r = 0,58$; $p = 0,005$; $N = 22$). Ist der Korrelationskoeffizient größer als null liegt ein positiver Zusammenhang vor. Der p -Wert bestätigt mit einem Wert von $0,005$, dass der Koeffizient sich signifikant von null unterscheidet – wäre der Koeffizient gleich null, läge keine Korrelation vor. Interpretiert wird das Ergebnis als starke Korrelation nach den Richtlinien von Cohen, nach denen ein Korrelationskoeffizient ab einem Wert von $0,5$ eine starke/große Korrelation darstellt (Cohen 1988).

5.3.1 Herzfrequenzvariabilität

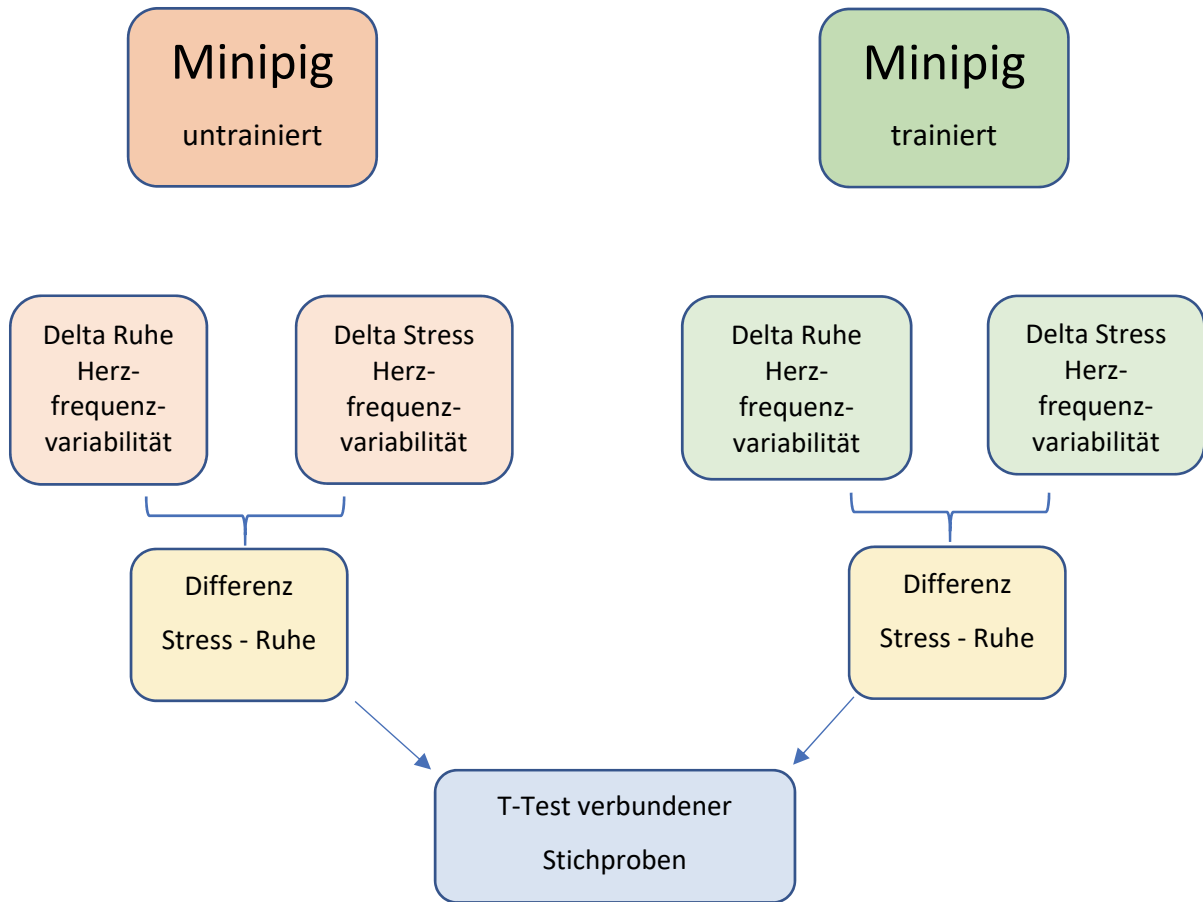


Abbildung 129: Modell zur Veranschaulichung, der Berechnung der Herzfrequenzvariabilität.

Tabelle 10: Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Herzfrequenzvariabilität der 12 Minipigs und die Signifikanz des Unterschieds, bestimmt im t-Test verbundener Stichproben. Signifikanz ist grün markiert.

	Mittelwert	N	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwerts	Signifikanz
Herzfrequenzvariabilität Delta (Stress-Ruhe) untrainiert	93,83	12	45,583	13,159	0,003
Herzfrequenzvariabilität Delta (Stress-Ruhe) trainiert	44,17	12	31,694	9,149	

Beim Vergleich der Herzfrequenzvariabilität zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,003$) zwischen den untrainierten und trainierten Minipigs ($t(11) = 3,704$, $p = 0,003$). Die Herzfrequenzvariabilität der untrainierten Minipigs ist mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu der, der trainierten Minipigs. Das bedeutet, dass die Herzfrequenz der Minipigs in untrainiertem Zustand signifikant höhere Ausschläge/Schwankungen zeigte, als die der Minipigs in trainiertem Zustand.

5.4 Opiorphin

Die Standardkurve bei beiden durchgeführten Opiorphin-ELISAs spiegelte die vom Hersteller für die Standards erwarteten Opiorphin-Konzentrationen wieder (Messbereich anhand der Standardkurve zwischen 0 ng/ml und 10 ng/ml). Auch in den Speichelproben konnte Opiorphin nachgewiesen (bei allen Proben wurden Opiorphin-Werte zwischen 0,24 ng/ml und 4,8 ng/ml gemessen), jedoch nicht verlässlich reproduziert werden. Die Opiorphin-Konzentration in den Speichel-Proben wurde mehrfach bestimmt, die Ergebnisse waren bereits auf einer Platte wiederholt gemessen (Intra-Assay), wie auch auf verschiedenen Platten (Inter-Assay), nicht reproduzierbar. Bei der statistischen Auswertung ergab sich ein Wert von 0,546 für den Konkordanz-Korrelationskoeffizient nach Lin. Dieser Wert spricht nach McBride für eine sehr schwache Korrelation (McBride 2005). Der Bland Altman Plot verdeutlicht die Streuung der Daten (Bland and Altman 1986).

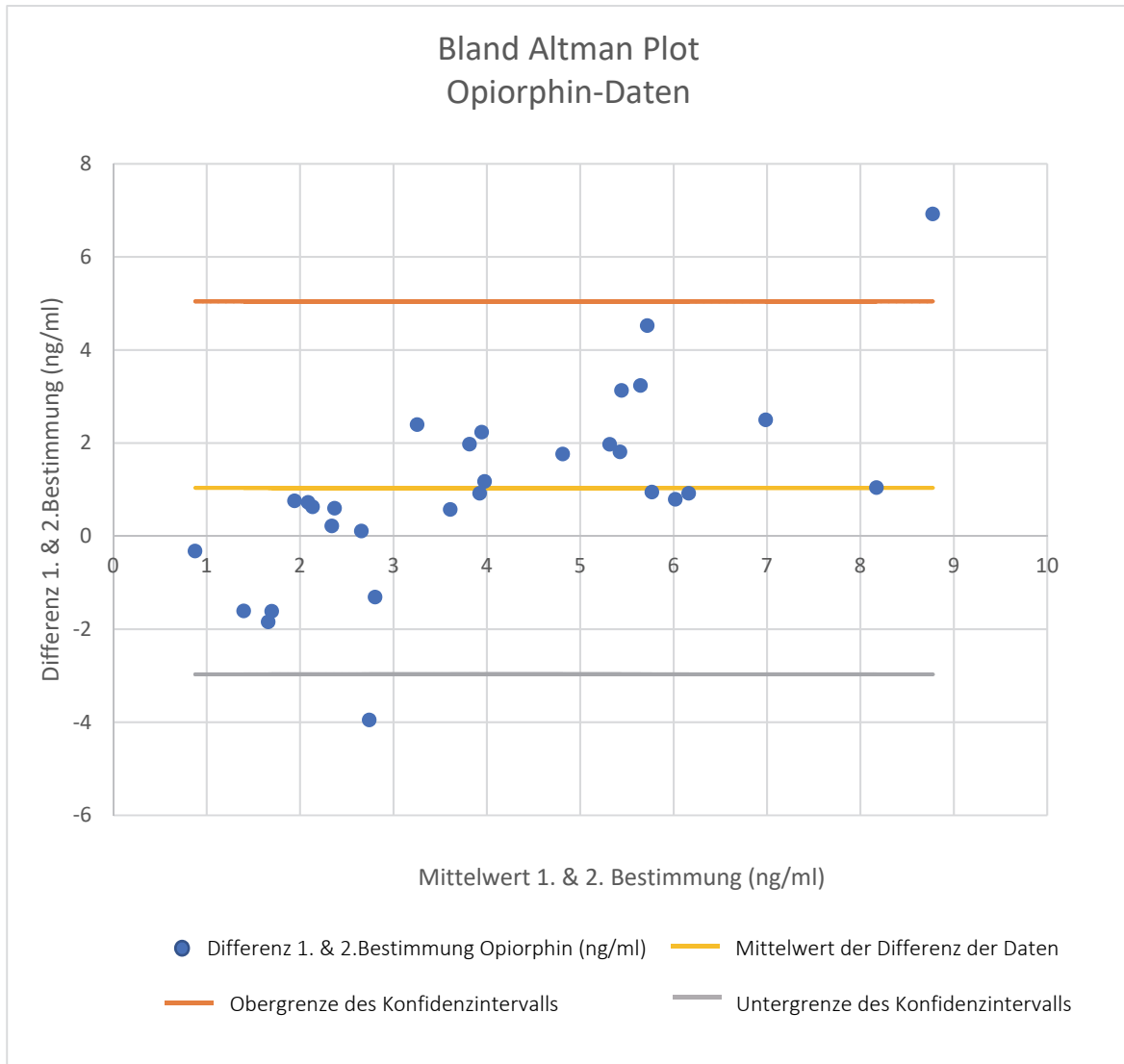


Abbildung 20: Bland Altman Plot der Opiorphin-Messungen. Je zwei Messungen derselben Probe wurden miteinander verglichen. Auf der X-Achse sind die Mittelwerte der zwei Messungen aufgetragen, auf der Y-Achse die Differenz der zwei Messungen. Obergrenze des Konfidenzintervalls = Mittelwert + 1,95 x Standardabweichung der Differenzen. Untergrenze des Konfidenzintervalls = Mittelwert - 1,95 x Standardabweichung der Differenzen. (Urheber: Delia Fiderer)

5.5 Grimace Scale

11 Bewerter (Rater) haben 25 Fotos von Minipigs unabhängig und verblindet ausgewertet. Ein Teil der Minipigs befand sich zum Zeitpunkt der Aufnahme kurz nach der Fixation mit Oberkieferschlinge zur Blutentnahme (15 von 25 Aufnahmen), der Rest ohne vorausgegangenen Stressor (10 Aufnahmen). Die Interraterreliabilität (Übereinstimmung der Bewerter) wurde bestimmt mit Hilfe von Krippendorff's alpha. Verglichen wurde die Übereinstimmung der Bewerter bei der Gesamtpunktzahl, sowie bei den Einzelkriterien.

Tabelle 11: Statistische Auswertung Grimace Scale - Krippendorff's alpha für die vergebenen Gesamtpunktzahlen, sowie für die in den einzelnen Unterkategorien vergebenen Punkte. Das Ergebnis des Kriteriums „Auge“ ist mittels Krippendorff 's alpha nicht berechenbar, da in dem Modell von Krippendorff eine zu geringe Varianz der Daten abgelehnt wird. Beim Kriterium Auge wurden von insgesamt 275 Bewertungen nur 10 mal 1 Punkt vergeben und 265 mal 0 Punkte, hier ist also eine sehr geringe Varianz. Die 275 Bewertungen entstehen, da 11 Personen 25 Bilder bewertet haben. (Urheber: Delia Fiderer)

Kategorie	Krippendorff's alpha
Gesamtpunktzahl	0,63
Ohrposition	0,51
Nasentrücken	0,59
Nasenspiegel	0,52
Auge	0,01*

Krippendorff's alpha für die Gesamtpunktzahl liegt bei 0,63. In mehr als der Hälfte der Fälle haben die Bewerter die gleiche Punktzahl vergeben. Bei der Beurteilung der Einzelkriterien fiel das Kriterium Auge am eindeutigsten aus, auch wenn dieses Kriterium aufgrund der hohen Übereinstimmung nicht mehr mit Krippendorff's alpha beschreibbar ist.

Von den restlichen drei Kriterien war die Übereinstimmung beim Kriterium „Nasentrücken“ am höchsten mit einem alpha von 0,59. Gefolgt wird sie von der Kategorie „Nasenspiegel“ mit alpha = 0,52 und der Kategorie „Ohrposition“ mit alpha = 0,51.

Es sollte untersucht werden, ob die Bewerter mit Hilfe der Grimace Scale erkennen konnten, welche Minipigs gerade Stress hatten.

Bei 48% aller Aufnahmen, also bei 12 der 25 Aufnahmen, lagen 100% der Bewerter mit ihrer vergebenen Gesamtpunktzahl „richtig“ – das bedeutet, dass Fotos von Minipigs in Ruhe mit 0 Punkten bewertet wurden und Fotos von Minipigs nach der Blutentnahme mit mehr als 0 Punkten bewertet wurden. Die Prävalenz, dass 100% der Bewerter mit ihrer Gesamtpunktzahl den Zustand des Minipigs (gestress oder nicht gestresst) „richtig“ bewertet haben, liegt mit 95 % -iger Wahrscheinlichkeit zwischen 27.7 Prozent (Untere Konfidenzgrenze) und 68.7 Prozent (Obere Konfidenzgrenze).

Von den 10 Aufnahmen in Ruhe wurde keine von 100% der Bewerter „richtig“, also als Aufnahme in Ruhe, bewertet. Nur eine der zehn Aufnahmen wurde von 7 der elf Bewerter übereinstimmend mit 0 Punkten („kein Stress“) bewertet. 3 von zehn Aufnahmen wurden von keinem der Rater korrekt, also als Aufnahmen in Ruhe bewertet.

Von den 15 Aufnahmen nach der Blutentnahme, die Minipigs unter Stress zeigen sollten, wurden 80% (zwölf Aufnahmen), von 100% der Rater „korrekt“, also mit einer Gesamtpunktzahl ≥ 1 bewertet. Die Prävalenz liegt mit 95 % -iger Wahrscheinlichkeit zwischen 51.9 Prozent (Untere Konfidenzgrenze) und 95.7 Prozent (Obere Konfidenzgrenze). 65% der Bewerter (7 von 11 Bewertern) lagen bei allen Aufnahmen nach Blutentnahme (15 von 15) korrekt, haben die nach der Blutentnahme gezeigten Minipigs also als gestresst bewertet.

Tabelle 12: Prozentuale Angabe darüber, wie oft je Kriterium null Punkte oder mehr als null Punkte vergeben wurden unterteilt, in die Ruheaufnahmen (mittlere Spalte) und die Stress-Aufnahmen nach der Blutentnahme mit Fixierung in der Schlinge (rechte Spalte).

Kriterium	10 Ruhe-Aufnahmen von je 11 Ratern bewertet = 110 Bewertungen insgesamt	15 Stress-Aufnahmen Von je 11 Ratern bewertet = 165 Bewertungen insgesamt
Ohrposition	37 x 0 Punkte (34%) 73 x > 0 Punkte (66%)	63 x 0 Punkte (38%) 102 x > 0 Punkte (62%)
Nasentrücken	39 x 0 Punkte (35%) 71 x > 0 Punkte (65%)	21 x 0 Punkte (13%) 144 x > 0 Punkte (87%)
Nasenspiegel	87 x 0 Punkte (79%) 23 x 1 Punkt (21%)	98 x 0 Punkte (59%) 67 x 1 Punkt (41%)
Auge	95 x 0 Punkte 15 x 1 Punkt	159 x 0 Punkte 6 x 1 Punkt

Beim Vergleich der Einzelkriterien fällt auf, dass es prozentual bei der Verteilung der Punkte für die Ohrposition fast keinen Unterschied gibt zwischen den Ruhe- und den Stress-Aufnahmen. Fast zu gleichen Teilen wurden jeweils 0 Punkte oder mehr als 0 Punkte

vergeben, unabhängig von einer Stresseinwirkung auf das Minipig vor der Aufnahme. Dieses Kriterium erscheint deshalb nicht optimal geeignet zur Beurteilung des Stresslevels im verwendeten Versuchsmodell. Auch das Kriterium Nasenrücken wurde sowohl bei den Ruhe-, als auch den Stressaufnahmen häufiger als ausgeprägt (> 0 Punkte), als als nicht ausgeprägt (0 Punkte) bewertet. Allerdings zeigt sich hier doch eine häufigere Bewertung mit > 0 Punkten bei den Minipigs kurz nach der Blutentnahme. Bei 87% der Bewertungen der Aufnahmen nach der Blutentnahme wurde mehr als 0 Punkte vergeben, während bei den Ruheaufnahmen in 65% der Fälle > 0 Punkte vergeben wurde.

In der Kategorie „Nasenspiegel“ verhält es sich ähnlich wie in der Kategorie Ohrposition. Allerdings zeigt sich hier durchaus, dass bei den Minipigs in Ruhe etwas häufiger der Nasenspiegel mit 0 Punkten gewertet wurde (79% der Bewertungen), als bei den Minipigs nach der Blutentnahme (59% der Bewertungen mit 0 Punkten).

Die Kategorie Auge wurde von den Ratern mit hoher Übereinstimmung bewertet, die Grimace Scale hat dieses Merkmal also ausreichend beschrieben. Allerdings zeigten fast alle Tiere, egal ob nach der Blutentnahme oder in Ruhe, laut der Rater keine angespannte Orbitalmuskulatur, die zu zusammengekniffenen Augenlidern führt, was für eine schlechte Eignung des Kriteriums spricht.

5.6 Training der Tiere

Das Tragen der Messgurte für die Herzfrequenzmessung wurde im Voraus nicht extra trainiert, zu erwähnen ist allerdings, dass die Minipigs untereinander Interesse an den Messgurten und Sensoren zeigten und teilweise versuchten, den Sensor eines anderen Tieres vom Gurt zu lösen, um darauf herum zu kauen. Deshalb wurden die Minipigs während des Trainings und der Messungen einzeln gestellt, was durch das Schließen von Falltüren zwischen den außerhalb des Trainings miteinander verbundenen Boxen einfach möglich war, da die Tiere auf diese Weise in ihnen bekannter Umgebung verbleiben konnten.

Das Klickertraining und die Ziele des Trainingsplans ließen sich insgesamt sehr gut und innerhalb des Zeitplans umsetzen.

In den ersten sechs Trainingstagen waren 9 von 12 Minipigs sehr aufgeregt und drängten beim Training immer sehr mit dem Rüssel in die Röhre in Erwartung auf die Belohnung, sodass sie sich mit den Hinterläufen auf die Zehenspitzen bzw. Klauenspitzen stellten. Es wurde versucht, diesen angespannten Stand durch gezieltes Klicken bei entspanntem Stehen zu vermeiden. Bis Tag 12 des Trainings ließ sich dies bei den meisten Minipigs optimieren. Ein Tier behielt bis zuletzt eine erhöhte Körperspannung und vermehrt unruhige

Bewegungen des Kopfes während des Stehens mit dem Rüssel in der Röhre. Dieses Minipig war von Anfang an am zurückhaltendsten und unsichersten im Umgang mit Menschen.

Manche Minipigs waren nachdem sie einige Tage trainiert wurden, so aufgeregt zu Beginn einer Trainingseinheit, dass sie mit dem Rüssel versuchten die Target-Röhre zu bewegen oder in diese zu beißen. Bei diesen Tieren wurde erfolgreich mit negativer Bestrafung gearbeitet, indem das Training in diesem Fall sofort abgebrochen wurde, indem die Target-Röhre von der Box entfernt wurde und ein anderes Tier trainiert wurde. Die Minipigs reagierten auf diese Methode sehr gut und waren beim darauffolgenden Trainingsversuch weniger aufgeregt.

Die Stiche mit den Zahnstochern am Hals zum Gewöhnen an den Einstich mit der Kanüle bei der Blutentnahme wurden von den Tieren schnell sehr gut toleriert und es wurden keine Abwehrreaktionen gezeigt.

An Tag 12 waren 11 von 12 Minipigs in der Lage 20 bis 30 Sekunden ohne Unterbrechung, und mit mehrfachen Druckreizen unterschiedlicher Intensität am Hals, am Target zu verweilen und nach kurzer Belohnung im Target weiter mit dem Rüssel in der Target-Röhre zu verweilen, sodass sie mit Belohnungen zwischendurch bis zu zwei Minuten die Target-Röhre nicht mehr verließen. Das zurückhaltendste Minipig der Gruppe stand bis zu 6 Sekunden ohne Zwischenbelohnung in der Röhre, ließ sich mit mehrmaligen Belohnungen in kürzeren Abständen aber auch 30 – 60 Sekunden in der Röhre halten.

6. Diskussion

Tierversuche sind sowohl in der translationalen, biomedizinischen Forschung als auch in der Forschung für die Tiere selbst oft nicht vollständig zu ersetzen. Aber in den letzten Jahren hat das Bestreben, Tierversuche zu reduzieren, Alternativmethoden zu entwickeln und anzuwenden und Versuchsbedingungen für die Tiere im Sinne des von Russel und Burch bereits 1959 entwickelten 3R-Prinzips zu verbessern, deutlich zugenommen. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass das 3R-Prinzip auf Gesetzebene Einzug gehalten hat und sowohl wesentlicher Bestandteil der EU-Richtlinie 2010/63/EU ist, sowie als Grundgedanke auch in das Tierschutzgesetz übernommen wurde (§ 7 Absatz 1 TierSchG). Es besteht die Verpflichtung zur stetigen Verbesserung der Lebens- und Haltungsbedingungen für Versuchstiere, dort wo Tierversuche noch unerlässlich erscheinen. Ein weiterer Aspekt von Refinement bei Tierversuchen ist das Verbessern und Verfeinern von Methoden. Diese Verbesserungen sollen evidenzbasiert sein.

Die übliche Blutentnahmemethode beim Schwein wird seit Jahren mit Fixation des Schweins mit einer Oberkieferschlinge (meist aus Stahl) durchgeführt, die über dem Oberkiefer gezogen und so der Kopf nach vorne und oben gezogen wird. Ein adultes Schwein weicht sobald die Schlinge nach oben gezogen wird reflexartig zurück, fixiert sich so durch weiteres Zuziehen der Schlinge im Prinzip selbst, zeigt dann nur noch wenig Ausweichbewegungen und der Hals ist frei zugänglich für die Blutentnahme über die Vena jugularis externa. Die Methode ist körperlich anstrengend für das Tier, das angespannt steht, gegebenenfalls versucht Ausweichbewegungen zu machen und dabei oft laut vokalisiert, sowie anstrengend für den Menschen, der das Tier fixiert.

Die vorliegende Arbeit untersuchte das Ausmaß der Belastung von Minipigs während der Blutentnahme, sowie, ob ein erfolgreiches Training mit positiver Verstärkung möglich ist, um eine fixationslose Blutentnahme durchzuführen und ob das Training zur Belastungsreduktion beiträgt und somit eine Refinementmaßnahme darstellen kann.

Die in dieser Studie verwendeten Minipigs wurden mittels Klickertraining, einer Kombination aus klassischer und operanter Konditionierung zunächst darauf trainiert, still stehend mit dem Rüssel in der Target-Röhre zu verharren und später in dieser Position die Blutentnahme zu dulden.

In dem Versuchsmodell wurde der Effekt des Trainings untersucht und die Messungen vor und nach dem Training fanden an denselben Tieren statt, sodass keine separate Kontrollgruppe notwendig war. So konnte durch den Verzicht auf eine eigene Kontrollgruppe die Tierzahl im Versuch getreu dem 3R-Prinzip (reduction) so gering wie möglich gehalten

werden, ohne die Aussagekraft der Untersuchungen zu gefährden. Außerdem wurden dadurch intraindividuelle Vergleiche wie zum Beispiel bei den Cortisolwerten möglich. Der Vergleich der Cortisolwerte sowie der Herzfrequenz und die daraus resultierende Beobachtung der Stressreduktion besonders bei sehr aufgeregten Minipigs hätte bei einer separaten Kontroll- und Untersuchungsgruppe nicht erhoben werden können.

Training kann nicht nur das Handling der Tiere erleichtern, sondern stellt Enrichment, also eine Bereicherung für die Tiere dar und ist neben Beschäftigung auch eine kognitive Herausforderung, die das Tierwohl steigern kann (Schapiro et al. 2017). Abgesehen davon erhalten die Tiere durch Training auch eine Art „Kontrolle“ oder Gewissheit, was geschieht, wenn Abläufe immer wieder wiederholt werden und gleich ablaufen, besonders in Verbindung mit Startsignalen beim Training. Außerdem kann durch das Training Stress reduziert werden (Hendriksen and Koëter 1991; Panepinto et al. 1983) und so stellt das Training angewandtes Refinement in Tierversuchen dar.

Im Rahmen der Planung der vorliegenden Arbeit wurden fünf Hypothesen erstellt.

Die erste Hypothese lautete, dass es durch Training mit positiver Verstärkung möglich ist, eine Blutentnahme beim Minipig ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge durchzuführen. Diese Hypothese konnte bestätigt werden. Die Minipigs wurden 12 Tage erfolgreich trainiert, bis zuletzt alle Minipigs ein Trainingsniveau erreicht hatten, bei dem sie mit dem Rüssel still in der Target-Röhre verharrten und mehrmaligen Druck mit einem Zahnstocher am Hals duldeten ohne Ausweichbewegungen zu zeigen. Mit der trainierten Blutentnahmemethode, konnte nach dem 12-tägigen Training bei 10 von 12 Tieren Blut gewonnen werden. Die zwei Minipigs, bei denen kein Blut gewonnen werden konnte, zeigten die Grenzen des Trainings und der Methode auf. Die in der Target-Röhre im Prinzip unfixierten Minipigs zeigten signifikant niedrigere Speichel-Cortisolwerte sowie eine signifikant niedrigere Herzfrequenz auf, was darauf schließen ließ, dass sie deutlich weniger gestresst waren. Jedoch existiert bei jeder trainierten, fixationslosen Blutentnahme ein Risiko, dass ein Tier die Röhre instinktiv verlässt, weil es sich erschreckt oder weil beim Nachjustieren der Kanüle empfindliche Strukturen im Halsbereich gereizt oder verletzt werden oder weil es kurzfristig abgelenkt ist.

Bei der Planung von Medical Training, wie Trainingseinheiten zum Zweck der Blutentnahme oder zu anderen medizinischen Prozeduren, muss neben dem instinktiven Verhalten der zu trainierenden Tiere mit einkalkuliert werden, dass nicht alle Tiere in gleichem Maße kooperativ sind und im gleichen Tempo die gleichen Fortschritte machen bzw. lernfähig sind. Tiere sind Individuen und sie entwickeln sich unterschiedlich (O'Malley et al. 2019; Ruis et al. 2000), weshalb es nicht außergewöhnlich ist, dass nicht alle Tiere die gleichen

Trainingsfortschritte gemacht haben. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme (trainiert) hatten alle Minipigs einen Trainingsstand erreicht, der erwarten ließ, dass bei allen eine erfolgreiche Blutentnahme mit der trainierten Methode möglich wäre.

Darüber hinaus gibt es interindividuelle Unterschiede im Wesen und in der Persönlichkeit (Dingemanse and Réale 2005; O'Malley et al. 2019). Von den zwei Minipigs, bei denen kein Blut gewonnen werden konnte, war ein Tier bereits seit Beginn des Trainings sehr unruhig, aufgeregt und schlecht konzentriert. In einer Studie mit Makaken wurde eine Korrelation des Trainingserfolgs (verschiedene Trainingsziele) mit der Reaktion der Tiere auf neue Gegenstände im Gehege untersucht. Die sehr neugierigen Makaken, die innerhalb weniger Sekunden den neuen Gegenstand im Gehege berührten, waren besser im Training bzw. erreichten die Trainingsziele schneller, als die Artgenossen, die eine längere Zeit brauchten, bis sie den neuen Gegenstand berührten (Coleman, Tully, and McMillan 2005). In unserem Versuch konnte im Training ebenfalls beobachtet werden, dass das im Handling mit dem Menschen nervöseste bzw. unsicherste Minipig, kleinere Trainingsfortschritte machte und mehr Trainingseinheiten benötigte, um denselben Trainingsstand zu erreichen, als ein im Umgang mit dem Menschen ruhigeres bzw. vertrauensvolleres Minipig. Der Trainingsplan der Minipigs wurde in Form von mehreren kürzeren Trainingseinheiten für das sehr unsichere Minipig und andere unruhigere Minipigs individuell angepasst. Es wurde oft vier Mal je zwei Minuten an einem Trainingstag trainiert, während andere Minipigs, die das Training zuverlässiger absolvierten, teils nur zwei Trainingseinheiten je zwei Minuten trainiert wurden.

Die Berührungen am Hals beim Training wurden zum Ende der Trainingsphase auch von dem oben beschriebenen, unsichereren Minipig gut toleriert, auch als die Intensität der Berührungen schrittweise gesteigert wurde bis hin zu mehrmaligem mehrere Sekunden andauerndem Druck mit einem Zahnstocher in die Haut am Hals. Jedoch reagierte dieses Minipig auf den Einstich mit der Kanüle am Probenentnahmetag wesentlich sensibler als die anderen Minipigs und begann zurückzuweichen. Dieses Tier hätte vermutlich eine noch längere Trainingsphase benötigt, um den Trainingserfolg zu festigen. Gegebenenfalls hätte auch der Einsatz von verschiedenen spitzen Gegenständen neben dem eingesetzten Zahnstocher und den Händen zum Druck ausüben am Hals noch mehr Gewöhnung an das Gefühl eines Schmerzreizes am Hals erzeugen können.

Neben einem guten Trainingsplan ist für den Erfolg von Medical Training auch der Verstärker entscheidend - es muss sich für das Tier „lohnen“ das gewünschte Verhalten zu zeigen. Die in der vorliegenden Arbeit als Verstärker eingesetzten Apfel-Stücke wurden von allen Minipigs sehr gut angenommen, sie waren stets während der gesamten Trainingsdauer und

der einzelnen Trainingsschritte sehr interessiert an den Belohnungen und es war nicht notwendig weitere Verstärker einzusetzen. Die Trainingseinheiten wurden immer durch das Tonsignal der Stoppuhr beendet, nie wegen mangelndem Interesse des Minipigs am Training oder den Belohnungen. Einige Minipigs waren teils zu Beginn des Trainings mit Aussicht auf die Apfel-Belohnungen sogar so erregt, dass sie Schwierigkeiten hatten still zu stehen und mit dem Rüssel versuchten aufgeregt die Target-Röhre zu bewegen oder dagegen drückten.

Das zweite Minipig, bei dem die Blutentnahme nicht umsetzbar war, war beim Training unauffällig, sogar oft sehr gut und hatte keine Probleme, eine halbe Minute bis Minute fast bewegungslos mit dem Rüssel in der Target-Röhre zu stehen, ohne währenddessen belohnt zu werden, während mit dem Zahnstocher am Hals manipuliert wurde. Es reagierte auch am Blutentnahmetag zunächst nicht auf den Einstich der Kanüle und verharrte ruhig mit dem Rüssel in der Targetröhre. Jedoch musste die Position der Kanüle nochmals verändert werden (was auch bei anderen Minipigs teils notwendig und möglich war), um die Vene zu punktieren und dabei wurde bei diesem Minipig vermutlich ein Muskelstrang mit der Kanüle gereizt, sodass das Tier erschrak und die Target-Röhre verließ. Es kam innerhalb von Sekunden nach Entfernung der Kanüle, wieder zurück in die Grundposition in der Target-Röhre, nahm die Belohnungen an und ließ sich wieder trainieren wie vor der versuchten Blutentnahme. Allerdings war auch dieses Minipig danach auf den Einstich der Kanüle sensibilisiert und eine erneute Punktion mit erfolgreicher Blutentnahme war wegen Ausweichbewegungen nicht mehr an demselben Tag umsetzbar. Dieses instinktive Verhalten hätte sich vermutlich auch durch längeres Training nicht restlos ausschließen lassen und solche Situationen müssen bei der Planung von Medical Training miteinbezogen werden. Auch aus diesem Grund (sowie dem Risiko, dass ein Tier während der Trainingsphase erkrankt) wurde sich bei der Planung dieses Versuchs dafür entschieden, dass 12 Minipigs am Training teilnehmen, obwohl auch mit elf Tieren bereits die bei Tierstudien mindestens nötige statistische Power von 0,8 hätte erreicht werden können.

Ein Vorteil des Trainings und der trainierten Blutentnahmemethode gegenüber der untrainierten Methode stellte die „Kontrolle“ oder Gewissheit darüber was geschieht für die Minipigs dar, die sie durch das Training erhielten. Training gibt Tieren Kontrolle und die Möglichkeit zu entscheiden (Laule and Desmond 1998). Durch das Tonsignal der Stoppuhr zu Beginn und zum Ende des Trainings waren Anfang und Ende des Trainings, also auch der Manipulation bzw. des Handlings klar definiert. Durch die vielen Wiederholungen fand eine Konditionierung statt, das Minipig „wusste“ beim Hören des Tonsignals, was folgt – und auch, dass nichts passiert, solange dieses akustische Signal nicht erklang. Dies stellt ebenfalls einen Aspekt von Refinement dar. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des

Klickertrainings außerdem zunächst eine Grundposition – das Stillstehen mit dem Rüssel in der Target-Röhre – trainiert. Die weiteren Trainingsziele (Berührungen am Hals) bauten darauf auf – erst wenn das Minipig ruhig mit dem Rüssel in der Target-Röhre stand, wurde der Hals berührt. Das bedeutete im Umkehrschluss auch für das Minipig – solange der Rüssel nicht in der Target-Röhre war, passierte nichts und es gab aber auch keine Belohnung.

Es besteht bei der trainierten Methode, wie auch bei der Blutentnahme mit Hilfe der Fixation in Oberkieferschlinge, eine Gefahr der Verletzung des ebenfalls im Halsbereich verlaufenden N. phrenicus (Sankari 1983), der unter anderem das Zwerchfell innerviert, weshalb es bei Schädigung des Nervs zu schweren Einschränkungen der Atemtätigkeit kommen kann (Moskalenko et al. 2009). Diese Gefahr war durch Verzicht auf Fixation unter Umständen sogar erhöht, da mehr Ausweichbewegungen möglich waren. In einigen Studien wurde als fixationslose Blutentnahme die Blutentnahme mit Hilfe eines Ohrvenenverweilkatheters eingesetzt (Niiyama et al. 1985). Ein Ohrvenenverweilkatheter muss allerdings bei fixiertem Tier geschoben und befestigt werden. Außerdem müssen die Tiere separiert gehalten werden, um eine gegenseitige Manipulation an den Kathetern zu verhindern. Die Katheter können nur wenige Tage in der Vene bleiben wegen des Risikos einer Phlebitis, außerdem müssen die Katheter regelmäßig gespült und deren korrekter Sitz überprüft werden (Berschauer and Oster 1981). Ein Hängenbleiben der Tiere mit dem Katheter am Ohr in ihrer Unterbringung muss verhindert werden. Die von Scollo et al. beschriebene Methode der Blutentnahme über die V. mammarica (Scollo et al. 2019) ist wegen der starken zeitlichen Restriktion säugender Sauen in Kastenständen als eher nicht relevant einzustufen. Als weitere sichtbare Vene zur Blutentnahme wird in der Literatur die am Bauch gelegene V. abdominalis beschrieben, die sich in der Studie bei Schweinen bis 40 kg Körpergewicht leicht anstauen ließ (Hu et al. 1993). Die Tiere in der Studie lagen bei der Blutentnahme auf der Seite und waren anästhesiert. Ein Training zur Blutentnahme in Seitenlage und anschließender Punktion der V. abdominalis wäre denkbar, jedoch besteht bei dieser Methode ein sehr hohes Infektionsrisiko.

Die zweite anfangs gestellte Hypothese lautete, dass die Blutentnahme mittels Fixation in Oberkieferschlinge für das Tier stressig ist und es zu einem deutlichen Anstieg der Herzfrequenz sowie Speichel- und Serumcortisolwerte kommt. Auch diese Hypothese wurde bestätigt. Die Herzfrequenz der untrainierten Minipigs war während der Blutentnahme mittels Fixation in Oberkieferschlinge signifikant höher als in Ruhe (ca. 30-60 Minuten vor der Blutentnahme). Darüber hinaus war die Herzfrequenz zum Zeitpunkt des Einstichs mit der Kanüle in den Hals zur Blutentnahme auch signifikant höher als 2,5 Minuten vor dem Einstich, es kam bei der Blutentnahme mit Fixation in Oberkieferschlinge also zu einem

akuten Anstieg der Herzfrequenz. Die Herzfrequenzmessung fand an beiden Blutentnahmetagen gleich statt. Trotz der im Voraus getroffenen umfassenden Maßnahmen um eine möglichst lückenlose Aufzeichnung der Herzfrequenz zu gewährleisten (Rasur behaarter Tiere, Kontaktgel, Separierung der Tiere) fehlten bei einigen Messungen einzelne Werte. Das Fehlen einzelner Werte kann durch schlechten Kontakt der Messelektroden im Gurt erklärt werden – zum Beispiel durch zu wenig Kontaktgel, durch einen zu locker sitzenden Brustgurt, durch zu starke Behaarung am Brustkorb oder durch zu starke Bewegungen des Tieres. Es fehlten insgesamt nur vereinzelt wenige Werte, die bei der statistischen Auswertung, bei der mit Mittelwerten gerechnet wurde, nicht ins Gewicht fielen und deshalb nicht ersetzt wurden.

Auch die Ergebnisse der Speichelcortisol-Messungen zeigten, dass es bei den untrainierten Tieren nach der Blutentnahme zu einem signifikanten Anstieg des Speichelcortisols gekommen war. Die Cortisol-Konzentration in den Speichelproben der untrainierten Minipigs stieg bei den Messungen 10 und 30 Minuten nach der Blutentnahme signifikant an im Vergleich zur Ruhemessung vor der Blutentnahme. Im Blut steigt Cortisol bei Stress innerhalb von einer bis wenigen Minuten an, im Speichel findet der Anstieg erst nach ca. fünf Minuten statt. Deshalb wurde keine Speichelprobe direkt nach der Blutentnahme, sondern ebenfalls mit Verzögerung gewonnen (erste Speichelprobe 10 Minuten nach Blutentnahme). Der Anstieg des Speichel-Cortisols fand bis zur Messung 30 Minuten nach der Blutentnahme statt, 50 Minuten nach der Blutentnahme war die Cortisol-Konzentration zwar gesunken, aber noch nicht auf das Ausgangsniveau der Ruhemessung und noch nicht auf das Level der Messung 10 Minuten nach Blutentnahme. In einer Studie von Cook et al. wurden Schweine fünf Minuten mit einer Oberkieferschlinge fixiert und währenddessen sowie über einen Zeitraum von 30 Minuten im Anschluss alle fünf Minuten die Speichel- und Serumcortisolkonzentration gemessen. Die höchste Cortisol-Konzentration im Speichel wurde zehn Minuten nach dem Beginn der Fixation in Oberkieferschlinge beobachtet. In der Studie von Cook et al. sank die Speichel- (und Serum-) Cortisol-Konzentration nach fünfminütiger Fixation mit Oberkieferschlinge innerhalb von 30 Minuten wieder bis fast auf das Ausgangsniveau ab (Cook et al. 1996). Diese Ergebnisse konnten bei den Minipigs so nicht reproduziert werden – 30 Minuten nach der Blutentnahme war die Speichel-Cortisol-Konzentration höher als 10 Minuten nach der Blutentnahme mit Fixation in Oberkieferschlinge. Im Vergleich zu der Studie von Cook et al. brauchten die Minipigs in der von uns durchgeführten Studie also länger, um wieder auf das Ausgangsniveau der Cortisol-Konzentration zu gelangen, obwohl die Fixation mit der Oberkieferschlinge weniger als fünf Minuten dauerte. Ebenso verhielt es sich bei Schweinen einer anderen Studie, die ebenfalls fünf Minuten in Oberkieferschlinge fixiert wurden, auch hier war nach 45 Minuten noch nicht

das Ausgangscortisollevel im Blut erreicht (Geverink et al. 2002). Die längere Erholungszeit der Minipigs kann zwar theoretisch durch die Blutentnahme erklärt werden, die bei Cook et al. nicht stattgefunden hat, jedoch sprechen die niedrigen Speichel-Cortisol-Konzentrationen der trainierten Minipigs unserer Studie gegen diese These. Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedliche Reaktion auf die Fixation mit der Oberkieferschlinge oder auf akuten Stress generell ist der Einsatz von unterschiedlichen Schweine-Rassen. Im Versuch von Cook et al. wurden 100 kg schwere Landrasse-Yorkshire-Kreuzungen eingesetzt. Auch bei der Ausprägung der Cortisolpeaks im Rahmen der circadianen Rythmik des Cortisols gibt es deutliche Unterschiede je nach Alter, Geschlecht, Gewicht, Jahreszeit und zwischen verschiedenen Rassen (Janssens, Helmond, and Weigant 1995; Koopmans et al. 2005).

Die infolge des Versuchsprotokolls bei den beiden Blutentnahmen anfallenden Blutproben, wurden genutzt, um die Serum-Cortisol-Konzentration zu bestimmen. Hier gab es also keine Ruhe-Werte zum Vergleich mit den Messwerten der Blutentnahme, deshalb wurden die Messwerte der Tiere in untrainiertem Zustand mit den Messwerten der Tiere in trainiertem Zustand verglichen. Hier ließ sich zeigen, dass die Minipigs die untrainiert besonders hohe Serumcortisol-Messwerte aufwiesen, trainiert deutlich niedrigere Serumcortisol-Messwerte zeigten. Statt mehrere Blutentnahmen durchzuführen, wurde sich in der vorliegenden Arbeit für die Cortisol-Verlaufsmessung anhand von Speichelproben entschieden. Es wurde bereits gezeigt, dass Speichel- und Serum-Cortisolwerte korrelieren (Cook et al. 1996), sodass die Cortisolbestimmung anhand von Speichelproben eine Refinementmaßnahme darstellte, da die Speichelproben nicht-invasiv gewonnen werden konnten. Außerdem war aufgrund der Korrelation eine Beurteilung des Stresslevels anhand des Speichel-Cortisol-Verlaufs in dieser Arbeit völlig ausreichend, eine Beurteilung anhand der Serum-Cortisolwerte (oder mehrerer Serum-Cortisol-Messungen) wäre nicht notwendig gewesen, wurde aber durchgeführt, da die Blutproben versuchsbedingt ohnehin genommen wurden.

Die dritte Hypothese lautete, dass die Tiere nach dem Training eine deutlich niedrigere durchschnittliche Herzfrequenz sowie niedrigere Serum- und Speichelcortisolwerte bei der Blutentnahme ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge zeigen. Dadurch sollte überprüft werden, ob das Training eine geeignetes Refinement darstellen kann, um Stress bei der Blutentnahme zu reduzieren.

Bei der statistischen Auswertung der Herzfrequenzmessungen während der Blutentnahmen konnte gezeigt werden, dass die Herzfrequenz nach dem Einstich mit der Kanüle bei den untrainierten, in Oberkieferschlinge fixierten Minipigs signifikant höher war als bei den trainierten, nicht fixierten Minipigs. Außerdem unterschied sich die Herzfrequenz in den 60 Sekunden nach Einstich mit der Kanüle bei den trainierten Minipigs nicht signifikant von den

ersten 60 Sekunden des Messzeitraums (ohne Kanüle am Hals). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der mehrere Zentimeter tiefe Einstich mit der Kanüle durch die Haut und das darunter liegenden Gewebe der Minipigs nicht entscheidend für den Anstieg der Herzfrequenz war. Die signifikant höhere Herzfrequenz der untrainierten Minipigs zum Zeitpunkt der Blutentnahme kann durch die Fixation mit der Oberkieferschlinge ausgelöst worden sein. Im Verlauf der Herzfrequenzwerte über fünf Minuten ist auch erkennbar, dass der deutliche Anstieg der Herzfrequenz bereits kurz vor dem Einstich mit der Kanüle im Zeitraum in dem die Oberkieferschlinge angelegt wurde, beginnt. Für die Blutentnahme der untrainierten Tiere mussten zwei Personen (eine Person für die Fixation und eine Blutentnahme) zu dem Minipig in die Box. Auch diese für die Tiere etwas ungewohnte Situation kann zu einem Anstieg der Herzfrequenz geführt haben. Allerdings wurden die Minipigs bereits seit ihrer Einstellung in der Tierhaltung an Menschenkontakt gewöhnt und die Tierpfleger, die bei der Blutentnahme auch beteiligt waren, waren den Minipigs bekannt und haben sich im Rahmen der Gewöhnung der Tiere auch früher bereits immer wieder zu den Tieren in die Boxen gesetzt. Aus diesem Grund sowie aufgrund der bei der Fixation der Minipigs einsetzenden sehr lauten Vokalisation der Tiere und ihrer angespannten Körperhaltung sowie ihrer Ausweichversuche, kann angenommen werden, dass die Fixation mit der Oberkieferschlinge hauptsächlich zu dem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz geführt hat und somit belastender als der Einstich mit der Kanüle am Hals war.

Die Ergebnisse der Speichel-Cortisolmessungen bestätigten ebenfalls die Hypothese und zeigten nicht nur, dass die Cortisol-Konzentration in den Speichelproben der untrainierten Minipigs bei den Messungen 10 und 30 Minuten nach der Blutentnahme signifikant angestiegen ist im Vergleich zur Ruhemessung vor der Blutentnahme, sondern auch, dass die Speichel-Cortisolwerte der untrainierten Minipigs signifikant höher waren, als die der trainierten Minipigs zu den Zeitpunkten 10, 30 und 50 Minuten nach der Blutentnahme. Außerdem zeigte die Cortisol-Konzentration im Speichel bei den trainierten Minipigs vor und nach der Blutentnahme wenig Schwankungen - es fand kein signifikanter Anstieg der Speichel-Cortisol-Konzentration 10, 30 und 50 Minuten nach der Blutentnahme im Vergleich zur Ruhemessung statt.

Bei dem Vergleich von Herzfrequenz und Serumcortisol konnte eine Korrelation gezeigt werden. Minipigs mit hoher Herzfrequenz zum Zeitpunkt der Blutentnahme hatten höhere Serumcortisolspiegel als Minipigs mit niedrigerer Herzfrequenz. Die Korrelation kann durch die gemeinsame Ursache, den Stress durch die Blutentnahme mit folgender Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und Adrenomedullären-Achse erklärt werden. Die Herzfrequenz kann natürlich nur zu einem bestimmten Maß mit dem Cortisolspiegel korrelieren, da sie viel größeren Schwankungen unterlegen ist und sich viel

schneller ändert. Sie wird durch die Stimulation des Sympathikus sekundenschnell beeinflusst, während der Cortisolspiegel im Blut von der Stimulation der etwas langsameren Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse bestimmt wird und sowohl deutlich träger zu- als auch abnimmt. Die Herzfrequenz kann wenige Sekunden nach der Blutentnahme bereits wieder deutlich niedriger sein als zum Zeitpunkt der Blutentnahme, während die Änderung der Serumcortisol-Konzentration zeitverzögert ist.

Die Hypothese, dass Minipigs nach dem Training deutlich niedrigere Serumcortisolwerte bei der Blutentnahme ohne Fixation mittels Oberkieferschlinge zeigen, wurde statistisch nicht bestätigt. Die Serum-Cortisolkonzentrationen vor und nach dem Training unterschieden sich zwar, jedoch mit einem p-Wert von 0,07 knapp nicht mehr signifikant. Allerdings wurden im Gegensatz zu den Speichel-Cortisolmessungen nur von 10 trainierten Minipigs Blut gewonnen und die Ergebnisse miteinander verglichen. Anhand der Standardfehler und Mittelwerte der Serumcortisolwerte wurde die statistische Power berechnet - diese lag bei zehn Minipigs unter 0,8 und damit nicht mehr im Bereich valider Ergebnisse bei Tierstudien. Man kann jedoch dennoch aufgrund der doch deutlichen Unterschiede der Herzfrequenzmittelwerte annehmen, dass bei einer größeren Tierzahl das Ergebnis signifikant ausgefallen wäre. Möglicherweise hätte hier ein längerer Trainingszeitraum auch einen positiven Effekt auf die Verlässlichkeit des Trainingserfolges. Bei den Speichel-Cortisolmessungen wurden alle 12 Minipigs in die statistische Auswertung miteinbezogen, auch wenn nur von 10 der 12 trainierten Minipigs ausreichend Blut gewonnen werden konnte. Da alle Minipigs die gleiche Belastung durchlaufen haben, unabhängig vom Erfolg der Blutentnahme und es nicht Ziel der Arbeit war, zu beweisen, dass nach 12 Trainingstagen definitiv bei allen Minipigs Blut gewonnen werden kann, wurden alle Tiere mit in die statistische Auswertung der Speichelcortisolwerte einbezogen.

Des Weiteren wurde in der oben bereits erwähnten Studie von Cook et al. gezeigt, dass die Cortisol-Konzentration im Serum mit dem Beginn der Fixation in Oberkieferschlinge begann anzusteigen, aber auch nach Ende der Fixation noch weitere 5 Minuten anstieg. Der Zeitpunkt für eine Cortisol-Bestimmung war in der vorliegenden Arbeit kurz nach Beginn der Fixation, also dem Zeitpunkt der Blutentnahme, nicht optimal für einen Vergleich zwischen den Trainingszuständen geeignet, um die höchste Serum-Cortisol-Konzentration abzubilden. Diese wurde erst nach Ende der Blutentnahme erreicht, wie die korrelierenden Speichel-Cortisol-Messungen zeigen. Oben wurde bereits ausgeführt, dass auf Grund der nicht-invasiv gewonnenen Speichelproben keine mehrfachen Blutentnahmen durchgeführt werden mussten, um Aussagen über die Cortisol-Konzentration treffen zu können.

Ein weiterer Grund für den statistisch nicht signifikanten Unterschied der Serumcortisol-Messwerte zwischen den Minipigs vor und nach dem Training könnte Eustress darstellen. Training stellt kognitives Enrichment für die Tiere dar (Westlund 2014), was bedeutet, dass sie eine geistige Herausforderung erleben. In einigen Studien wurde nach Enrichment in Form von Beschäftigungsmaterial eine höhere Cortisol-Konzentration festgestellt (Jong et al. 2000). Enrichment führt oft nicht zu einer Senkung der durchschnittlichen Herzfrequenz oder des Basalcortisolspiegels (de Jong et al. 1998), da Enrichment wie auch freudige Erwartung, Spiel, Sexualverhalten und jegliche Form der Aufregung positiven Stress, Eustress, darstellt. Dies könnte auch die folgenden Beobachtungen erklären: Beim Vergleich der fünfminütigen Messung der Herzfrequenzen in Ruhe vor den Blutentnahmen gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den untrainierten und den trainierten Minipigs. Die trainierten Minipigs hatten eine signifikant höhere durchschnittliche Herzfrequenz als die untrainierten Minipigs. Die Bedingungen an beiden Probeentnahmetagen waren in der vorliegenden Arbeit gleich, die Haltungsform der Minipigs schloss eine andere Einwirkung äußerer Einflüsse, die zu einer erhöhten Herzfrequenz an diesem Tag geführt haben könnten, aus. Sie kann aber auch an der größeren Aufregung der trainierten Minipigs zum Zeitpunkt der Ruhemessung liegen, in freudiger Erwartung auf das gewohnte, morgendliche Klickertraining und das damit verbundene kognitive Enrichment und die Futterbelohnungen. Eine Aktivierung des Sympathikus und Anstieg der Herzfrequenz in positiver emotionaler Erregung aus Erwartung auf Futter wurde bei Schweinen bereits gezeigt (Zebunke, Puppe, and Langbein 2013). In der Arbeit von Zebunke et al. reagierten die Schweine auf ein konditioniertes Futtersignal umgehend mit einem Anstieg der Herzfrequenz. In einer anderen Studie reagierten die Schweine bereits auf das Geräusch des in den Stall geschobenen Futterwagens mit einem Anstieg der Herzfrequenz (Robert et al. 2002). Bei den in unserem Versuch trainierten Minipigs konnte auch beobachtet werden, dass die Aufregung der Tiere stieg sobald der Wagen mit den Trainingsutensilien durch die Stallgasse gefahren wurde (steigende Vokalisation der Minipigs) und spätestens als die Target-Röhre an der Boxentüre befestigt wurde. Einige Minipigs begannen dann aufgeregt mit dem Nasenrücken die Röhre anzustupsen oder bissen teilweise hinein.

Ähnlich kann es sich bei den Ergebnissen der Herzfrequenzmessungen der trainierten Tiere in Ruhe im Vergleich zur Messung rund um die Blutentnahme verhalten haben. Die Herzfrequenz der trainierten Minipigs zeigte während der 5-minütigen Messung um die Blutentnahme keine deutlichen Schwankungen, war aber signifikant höher als während der Ruhemessung. Die trainierten Minipigs wurden rund um die Blutentnahme wiederholt belohnt, wenn sie still in der Target-Röhre standen. Dies führte offensichtlich zu einer freudigen Erwartung und passt zu den Aufzeichnungen von Gevernik et al., die eine konstant

erhöhte Herzfrequenz während der Fütterung von Schweinen gemessen haben (Marchant, Rudd, and Broom 1997; Geverink et al. 2003). Der signifikante Unterschied der Herzfrequenzmessung in Ruhe und während der Blutentnahme bei den trainierten Minipigs kann alleine durch die Erwartung der Futterbelohnung und die damit und mit dem Training verbundene Aufregung verursacht worden sein. Die Blutentnahme an sich spielte dabei als Belastungsursache, wie oben beschrieben, keine Rolle, da der Einstich mit der Kanüle nicht zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz geführt hat.

Zusammenfassend konnte die Hypothese, dass die Tiere nach dem Training deutlich niedrigeren Herzfrequenzen sowie Speichel- und Serumcortisolwerten bei der Blutentnahme zeigen, bestätigt werden. Auch der zweite Teil der Hypothese, dass Training ein geeignetes Refinement darstellt, um Stress bei der Blutentnahme zu reduzieren, konnte somit bestätigt werden.

Durch das Training, die Gewöhnung an die Manipulation am Hals und den Verzicht auf die Fixierung mittels Oberkieferschlinge ließ sich die durchschnittliche Herzfrequenz während der Blutentnahme signifikant senken und gleichzeitig war auch die Herzfrequenzvariabilität der trainierten Minipigs bei der Blutentnahme im Vergleich zu den untrainierten Tieren signifikant geringer. Auch die Ergebnisse der Speichelcortisolmessungen zeigten, dass das Training zu einem signifikant niedrigeren Cortisolspiegel im Speichel bei Minipigs rund um eine Blutentnahme führte. Gegebenenfalls hätte eine Habituation an die Oberkieferschlinge oder an den Stich mit der Kanüle auch schon die Belastung bei den in Oberkieferschlinge fixierten Minipigs reduzieren können. Hier bleibt Raum für ergänzende oder weitergehende Forschungsvorhaben.

Die Untersuchungsbefunde des Serumcortisols zeigten zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen den Minipigs vor und nach dem Training, es konnte aber gezeigt werden, dass besonders die Minipigs, die untrainiert besonders hohe Serumcortisolspiegel gezeigt hatten, nach dem Training deutlich niedrigere Serumcortisolspiegel erzielten. Das zeigte, dass die besonders gestressten Tiere am meisten vom Training profitierten.

Im Versuchstierbereich kann unter diesen Gesichtspunkten das Training von Minipigs zur Blutentnahme eine sinnvolle Anwendung darstellen. Hier muss gegebenenfalls differenziert werden zwischen Langzeitversuchen mit wiederholten Blutentnahmen oder langfristig in verschiedenen Versuchen eingesetzten Minipigs und Versuchen mit nur einer Blutentnahme. Der hohe Zeit- und Personalaufwand erscheint bei kurzen Versuchen unter Umständen unverhältnismäßig im Vergleich zu der kurzfristigen Beeinträchtigung der Tiere durch die Blutentnahmen, jedoch könnte in diesen Fällen auch über Gewöhnungsübungen nachgedacht werden, die ebenfalls eine Stressreduktion bewirken könnten wenn auch

vermutlich nicht in demselben Ausmaß. Bei Langzeitversuchen und Minipigs, die immer wieder in verschiedenen Versuchen mit Blutentnahmen eingesetzt werden, stellt das Training der Blutentnahme ein geeignetes Refinement dar und der Zeitaufwand ist lohnend. Die trainierte, fixationslose Blutentnahme ist für den Mensch, der die Blutentnahme durchführt unter Umständen mit einem etwas höheren Verletzungsrisiko verbunden, da das Minipig die Target-Röhre verlassen und den Menschen verletzen könnte. Jedoch kann dieses Risiko reduziert werden, indem der Mensch, der die Blutentnahme durchführt hinter einem Abtrenngitter kauert und für die Blutentnahme nur die Arme durch das Gitter dem Hals des Tieres nähert. Insgesamt ist die Methode schonender für den Menschen, da zum einen nicht so ein großer Kraftaufwand betrieben werden muss und die Lärmbelastung deutlich geringer ist. Refinement steht für Verringerung der Belastung, aber auch für Verfeinerung der Methoden.

Auch gesundheitlich hat die in dieser Studie trainierte Methode aufgrund der Stressreduktion Vorteile gegenüber der fixierten Blutentnahme. Durch anhaltend erhöhte Cortisolwerte wird die Entstehung einer vasospastischen Angina beim Schwein begünstigt, da diese zu einer Sensibilisierung der Coronargefäße durch deren blutgefäßverengenden Wirkung führen (Hizume et al. 2006). Außerdem besteht beim Schwein das Risiko zur Ausbildung einer Belastungsmiopathie und stressinduzierten Herzinsuffizienz (Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004), weshalb die Ergebnisse auch eine Relevanz für die Anwendung in der Schweinepraxis haben können. Durch Stress kann bei Schweinen eine Laktatazidose durch tetanische Muskelanspannungen mit folgender Herzinsuffizienz ausgelöst werden. Belastungen mit Herzfrequenzen von 200 Schlägen/Minute, wie beim Deckakt oder der Geburt hält das Schweineherz in der Regel zwar kurzzeitig aus, in Kombination mit Stress kann es allerdings schnell zu einer lebensbedrohlichen Krise führen (Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004). Klaus Bickhardt nennt im Lehrbuch der Schweinekrankheiten explizit die Fixation mittels Oberkieferschlinge als mögliche Ursache für eine derartige Kreislaufkrise (Plonait, Waldmann, and Bickhardt 2004). Durch Training kann folglich auch das Risiko der Entstehung solcher Erkrankungen reduziert werden, gerade bei sich wiederholenden geplanten Untersuchungen wie Blutentnahmen, die mit Fixation und Stress für das Tier verbunden sind. In der konventionellen Tierhaltung ist ein individuelles Klickertraining in dem Ausmaß wie bei den Minipigs angewandt, aufgrund des Zeitaufwandes nicht möglich. Jedoch kann auch durch Gewöhnung der Tiere an ihre Umgebung und den Umgang mit dem Menschen eine Stressreduktion erreicht werden. Mit zunehmender Technisierung in der konventionellen Tierhaltung wird die Realisierung jedoch unter Umständen schwieriger. Eventuell bietet die Technisierung durch Vereinfachung von Arbeitsprozessen und Zeitersparnis jedoch auch die Möglichkeit, in Zukunft mehr Zeit für die Gewöhnung der Tiere

an den Mensch einräumen zu können und durch eine Optimierung von Prozessabläufen kann gegebenenfalls auch eine Stressreduktion erzielt werden. In dieser Arbeit wurden Minipigs eingesetzt, jedoch ist die Anwendbarkeit des gleichen Trainings auch bei Hausschweinen denkbar und wünschenswert.

Die vierte Hypothese lautete, dass das endogene Pentapeptid Opiorphin sich beim Minipig im Speichel bestimmen lässt und ein Anstieg nach mit Oberkieferschlinge fixierter Blutentnahme feststellbar ist, da beim Menschen bereits gezeigt wurde, dass Opiorphin bei Schmerzen in der Mundhöhle ausgeschüttet wird. Diese Hypothese ließ sich nicht bestätigen. Die im Speichel bestimmten Opiorphinwerte ließen sich nicht verlässlich reproduzieren. Es wurden Messungen derselben Speichelprobe auf einer ELISA-Platte mehrfach durchgeführt, sowie dieselbe Probe auf verschiedenen Platten gemessen, jedoch waren die Ergebnisse nie zufriedenstellend übereinstimmend reproduzierbar. Der Hersteller empfiehlt den Einsatz von frischen Proben, die innerhalb von 24 Stunden nach Probengewinnung untersucht werden ohne diese vorher einzufrieren. Das war in der vorliegenden Arbeit nicht umsetzbar, unter anderem auch, da die Proben beider Probeentnahmetage am selben Tag unter den gleichen Bedingungen untersucht werden sollten. Deshalb wurden die Proben wie in diesem Fall vom Hersteller empfohlen, nach der Gewinnung und Zentrifugation eingefroren und bei -20°C gelagert, mehrmaliges Auftauen wurde vermieden und der ELISA innerhalb des empfohlenen Zeitfensters von drei Monaten durchgeführt. Eine Verfälschung der Werte durch das Einfrieren kann nicht ganz ausgeschlossen werden. Außerdem sind seitens des Herstellers als für den ELISA geeignete Probenmaterialien Serum, Plasma, Zellkulturüberstände, Körperflüssigkeiten und Gewebehomogenate angegeben. Speichel wird nicht explizit aufgeführt, jedoch als Körperflüssigkeit verstanden. Vergleichend hätte noch eine Bestimmung aus den Serumproben durchgeführt werden können, jedoch wurde in den Serumproben aufgrund der Physiologie und Sekretion von Opiorphin hauptsächlich aus den Speichel- und Tränendrüsen keine nennenswerte Opiorphinkonzentration erwartet.

Die Methode wurde überprüft, der ELISA wurde korrekt durchgeführt, die Standardkurve entsprach der des Herstellers, es traten keine Pipettierfehler auf. Darüber hinaus wurden ELISA-Platten aus verschiedenen Chargen eingesetzt. Damit ist auch ein Produktfehler seitens des Herstellers unwahrscheinlich. Zum Zeitpunkt der Durchführung der ELISAs und des Verfassens dieser Arbeit gab es noch keine Veröffentlichung zur Opiorphinbestimmung in Schweinespeichel oder generell beim Schwein. Der verwendete ELISA von myBioSource wurde zwar deklariert als geeignet für die Anwendung bei porcinem Probenmaterial, allerdings konnte auch der Hersteller auf keine Referenzveröffentlichungen verweisen, in denen der ELISA verlässlich eingesetzt wurde.

Da grundsätzlich messbare Werte erzielt werden konnten, ist das Vorliegen von Opiorphin in Schweinespeichel weiterhin nicht auszuschließen und auch die Messbarkeit mit einem ELISA nicht, jedoch muss erst ein ELISA für den Einsatz beim Schwein hinsichtlich Spezifität validiert werden und die Durchführung mit Hilfe von Verdünnungsreihen und größeren Probenvolumina als sie bei dieser Arbeit verfügbar waren, optimiert werden.

Die letzte Hypothese bezog sich auf die Grimace Scale und lautete, dass Minipigs unter Stress eine ähnliche Mimik wie Ferkel unter Schmerzen zeigen und die Grimace Scale auch zur Beurteilung von Stress geeignet ist. Die Frage die im Voraus gestellt wurde war, ob die Grimace Scale beim Minipig anwendbar ist, um etwas über die Belastung bei der Blutentnahme auszusagen.

Die Grimace Scale beim Minipig als ursprünglich für die Beurteilung von Schmerzen eingesetztes Hilfsmittel, eignete sich bedingt auch für die Beurteilung von Stresszuständen. Der alpha-Wert für die Übereinstimmung der Gesamtpunktzahlen von 0,63 lag zwar unter der von Krippendorff gesetzten Grenze von 0,67 als noch akzeptable Übereinstimmung der Bewerter, aber bei der Interpretation der Werte für Krippendorff's alpha müssen diese immer auch in Beziehung zur Methode und zur Schwierigkeit der Variablen gesetzt werden (Rössler and Geise 2013). Nach Landis und Koch ist die Übereinstimmung ab einem alpha-Wert von 0,61 gut (Landis and Koch 1977). Die Bewerter waren ungeschult, verblindet und unabhängig voneinander und haben sich alle nur an der ausgehändigten Grimace Scale Auswertungsskala orientiert. Bei Werten zwischen 0 und 6, die die Gesamtpunktzahl annehmen konnte, war eine Übereinstimmung ihrer Bewertungen von 63% als insgesamt gut zu bewerten.

Dass bei der Kategorie „Auge“ die Berechnung mit Krippendorff's alpha nicht zufriedenstellend ausfiel, lag an der zu großen Übereinstimmung der Bewerter bzw. an einem unzureichenden Variationsgrad. Krippendorff lehnte Daten ab, die einen so niedrigen Variationsgrad aufweisen und riet die Modelle so zu gestalten, dass mehr Variation in den vergebenen Punkten entsteht. Das Kriterium Auge war zu variationsarm, da nur die Zustände geöffnetes Auge und zusammengekniffenes Auge miteinander verglichen wurden und die Augen der Tiere auf den Fotos fast immer offen waren. Bei Schmerzen kneifen Schweine die Augen zusammen, da die Orbitalmuskulatur um die Augen sich anspannt, bei akut gestressten Minipigs ließ sich das in unserer Studie allerdings nicht reproduzieren. Insgesamt wurde das Kriterium Auge für die Beurteilung von Stress beim Minipig als nicht geeignet beurteilt, da selbst die Tiere, bei denen die Blutentnahme mit Oberkieferschlinge direkt vorausging, die Augen nicht zusammenkniffen. Ob bei chronischem Stress ein anhaltendes Zusammenkneifen der Augen stattfindet, kann untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bewerter bewusst nicht im Voraus geschult, da die Grundüberlegung jene war, dass eine Grimace Scale erstellt wird, die es auch ungeschultem Personal ermöglicht, innerhalb kürzester Zeit anhand einfacher Kriterien zu beurteilen, ob die Minipigs unter Stress stehen oder nicht. Um die Übereinstimmung der Bewerter (Interrater Reliabilität) zu erhöhen, könnten zukünftig vor der Auswertung Schulungen zu den zu erhebenden Kriterien durchgeführt werden. Darüber hinaus könnten noch konkretere Beschreibungen der Einzelkriterien zu einer höheren Übereinstimmung beitragen. Diese könnte dann zukünftig auf Schweine in der landwirtschaftlichen Praxis erweitert werden und auch bei Landwirten Anwendung finden.

Bei der Auswertung der vergebenen Gesamtpunktzahlen mit dem Zeitpunkt der Aufnahme des Minipigs in Ruhe oder kurz nach der Blutentnahme, also bei Stress, zeigte sich, dass bei 48% der Fotos 100% der Bewerter korrekt lagen. Korrekt bedeute, dass Minipigs in Ruhe mit null Punkten bewertet wurden und Minipigs kurz nach der Blutentnahme mit mehr als null Punkten. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Fotos der Minipigs direkt nach der Blutentnahme gestresste Tiere zeigen (dies bestätigten die Herzfrequenz- und Speichelcortisolmessungen) und die Fotos der Minipigs ohne vorherige Blutentnahme, Tiere in Ruhe zeigen. Die Konfidenzgrenzen geben ein 95% Konfidenzintervall an, welches aussagt, dass in einer unendlich großen Population mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% die wahre „Treffsicherheit“ der Bewerter mit Hilfe der Grimace Scale von den Grenzen des Intervalls (27.7 % und 68.7 %) umschlossen wird. Das bedeutet, die Grimace Scale hat es den Bewertern ermöglicht, in 48% der Fälle übereinstimmend korrekt einzuschätzen, ob das Tier unter Stress steht oder nicht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bewerter besonders bei der Beurteilung der Minipigs in Ruhe öfter Gesamtpunktzahlen von > 0 vergaben, als 0 Punkte. Keine der zehn Aufnahmen von Minipigs in Ruhe wurde von allen Ratern als solche bewertet (< 1 Gesamtpunktzahl).

Das könnte daran liegen, dass die Unterschiede zwischen den Merkmalsausprägungen der einzelnen Kriterien zu gering gewählt wurden, sodass eventuell zu „großzügig“ Punkte vergeben wurden, weil zum Beispiel unklar war, ob ein Merkmal gering oder gar nicht ausgeprägt ist. Ein weiterer möglicher Grund könnte die Eignung der Kriterien sein. Zum Beispiel wurde die Kategorie Ohrposition sowohl bei den Minipigs in Ruhe und bei den Minipigs nach der Blutentnahme prozentual gleich oft mit null Punkten oder mehr als null Punkten bewertet. Auch Minipigs in Ruhe bewegen ihre Ohrmuscheln und bei einer Momentaufnahme kann nicht unterschieden werden, ob die Ohren nur für einen Sekundenbruchteil oder für einen längeren Zeitraum angelegt wurden. Außerdem waren die Minipigs, die in Ruhe fotografiert wurden zwar ohne vorausgegangene Blutentnahme,

dennoch wurde das Foto von einer Person aufgenommen, die sich in der Stallgasse aufhielt – es war also nicht völlige Ruhe in den Ställen und es ist nicht auszuschließen, dass auch diese Tiere Stress im Sinne von Aufregung ausgesetzt waren. Die Cortisolspiegel und Herzfrequenzen der Minipigs auf den Fotos in Ruhe wurden nicht bestimmt. Die Person, die die Fotos der Minigs aufnahm, war den Tieren durch das Klickertraining bekannt, dies führte genau deshalb aber gegebenenfalls auch zu einer gewissen freudigen Aufregung oder gar (Eu-) stress bei den Minipigs. Hier hätte eine über einen längeren Zeitraum fest installierte Kamera in jeder Box gegebenenfalls eine Alternative dargestellt.

In einer Studie wurden Minipig-Ferkel ohne Analgesie kastriert und die Mimik nach dem Eingriff mit einer Vergleichsgruppe, die dieselbe OP-Vorbereitung durchlaufen hatte, bei der aber keine Kastration durchgeführt wurde, verglichen. In dieser Studie wurde mit Hilfe von elf Kameras aus verschiedenen Winkeln Fotos der Mimik je Minipig erstellt, aus denen dann ein 3D-Modell erstellt wurde. Die 3D-Modelle wurden anhand einer Grimace Scale mit fünf Facial action units von vier Ratern beurteilt, die zuvor zwei Stunden geschult wurden und dennoch war das Ergebnis, dass anhand der Grimace Scale und den 3D-Modellen kein signifikanter Unterschied der Mimik zwischen den kastrierten und nicht kastrierten Minipigs festgestellt werden konnte (Lou et al. 2022). Interessant ist auch, dass die Interrater-Reliabilität, also die Übereinstimmung der Rater in der beschriebenen Studie, trotz zweistündiger Schulung sehr ähnliche Werte annahm (Übereinstimmung lag zwischen 0,28 und 0,68 (Lou et al. 2022)), wie in unserer Studie, ohne vorherige Schulung der Rater (Übereinstimmung bei den Einzelkriterien zwischen 0,52 und 0,63). Die Ergebnisse der Studie von Lou et al. untermauern, dass Schmerzempfinden individuell ist und der gleiche Schmerzreiz von unterschiedlichen Individuen unterschiedlich wahrgenommen werden kann und so auch zu Unterschieden in der Mimik führen kann. Auch Stressempfinden ist individuell und kann die Mimik individuell beeinflussen, was die Beurteilung anhand einer Grimace Scale erschwert.

Kritisch zu hinterfragen bei der Beurteilung der Mimik anhand von Fotos ist generell die Statik einer Momentaufnahme, um die es sich bei einem Foto handelt. Ein Foto stellt nur die Mimik eines Sekundenbruchteils dar, Gesichtszüge, die Sekunden davor oder danach gezeigt werden, fließen nicht in die Bewertung mit ein. Laut Finka et al. sollten Facial Action Units dynamisch dargestellt werden, indem sie die Entwicklung der Muskelanspannung oder -bewegung zeigen und somit sollten auch nur bewegte Bilder ausgewertet werden, die einen Prozess widerspiegeln, sodass die Facetten der Mimik richtig ausgewertet werden können (Finka et al. 2019). Des Weiteren sind die ausgewählten Facial Action Units stressspezifisch und auch bei Schmerzen kann das Tier seine Mimik entsprechend verändern. Das muss

nicht unbedingt ein Problem darstellen, da Tiere unter Schmerzen auch Stress haben, darum muss hier natürlich immer der Kontext mit beurteilt werden.

In unserer Studie konnte keine eindeutige Korrelation der Mimik der Minipigs nach der Blutentnahme mit den von Viscardi et al. und Vullo et al. beschriebenen Veränderungen der Mimik bei Ferkeln und Läufern unter Schmerzen gezeigt werden.

Bei Minipigs während der Fixation in Oberkieferschlinge wird unter Umständen eine deutlichere Mimik gezeigt, als nach Ende der Fixation, was nicht bedeutet, dass die Tiere nach Ende der Fixation nicht mehr gestresst sind. Während die Herzfrequenz und besonders die Speichelcortisol-Konzentrationen einige Zeit nach der stressauslösenden Situation noch erhöht bleiben und den Stress abbilden, verändert sich die Mimik unter Umständen schnell wieder, sobald der Stressor endet.

In dieser Arbeit wurde beim Einsatz der Grimace Scale davon ausgegangen, dass die Mimik der adulten Minipigs insgesamt vergleichbar ist mit der Mimik von den fast drei Monate alten, ca. 30 Kg schweren Schweinen aus der Studie von Vullo et al., die in Größe und Gewicht also den Minipigs in unserer Studie ähnelten. Da es nicht Teil der Fragestellung dieser Arbeit war und um die Belastung der Tiere in Grenzen zu halten, wurde im Voraus keine Validierung für die Grimace Scale zur Beurteilung von Schmerzen bei den adulten Minipigs durchgeführt. Insgesamt ist es also nicht ganz auszuschließen, dass bei adulten Minipigs unter Schmerzen oder auch unter Stress eine Ausprägung anderer Facial Action Units feststellbar ist, als bei den Ferkeln oder Läufern in den Studien von Viscardi et al. und Vullo et al..

Um die Ergebnisse weiter zu verifizieren und zu untersuchen, ob es doch eine eindeutige Korrelation der Mimikveränderungen bei Stress- und Schmerzzuständen gibt, sollten zukünftig Videos vor, während und nach der Fixation in Oberkieferschlinge gemacht und ausgewertet werden.

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht, inwieweit Training durch positive Verstärkung beim Minipig die Blutentnahme ohne Fixierung durch die Oberkieferschlinge ermöglicht und zur Stressreduktion führt. Es ist die Pflicht bei der Planung und Durchführung von Tierversuchen stets zu versuchen, die Belastungen für die Tiere auf das unerlässliche Mindestmaß zu beschränken. Dies erfüllt die Anforderungen des 3R-Prinzips, welches in der EU-Richtlinie 63/2010/EU und im Tierschutzgesetz verankert ist. Dazu gehört auch das stetige in Frage stellen von Methoden, auch wenn diese seit Jahren etabliert oder üblich sind und das Verfeinern und Verbessern dieser Methoden, um Stress und Belastungen für die Tiere zu minimieren. Die vorliegende Arbeit untersucht die Methode der Blutentnahme mit Fixation in Oberkieferschlinge auf ihre Stresshaftigkeit für Minipigs und die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass der Stress, den die Tiere erleben durch Training und positive Verstärkung signifikant reduziert werden kann. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse auch, dass der Einstich mit der Kanüle in den Hals an sich keine nennenswerte Stressbelastung des Minipigs darstellt und lassen vermuten, dass der Stress bei der Blutentnahme zu einem Großteil durch die Fixation mittels Oberkieferschlinge verursacht wird. Sowohl die Speichel-Cortisol-Konzentration als auch die Herzfrequenz, die als Stressparameter dienen, sind bei den Minipigs bei der Blutentnahme nach dem Training signifikant niedriger als vor dem Training. Das Training stellt für die Minipigs kognitives Enrichment sowie Refinement dar. Die Anwendung der trainierten Blutentnahme ist besonders in Versuchstierhaltungen mit Minipigs, die über einen langen Zeitraum in einem oder mehreren Versuchen eingesetzt werden und bei denen wiederholt Blutentnahmen stattfinden als nun evidenzbasiertes Refinement durchaus sinnvoll und denkbar, um den Stress der Tiere zu reduzieren.

Das endogene Pentapeptid Opiorphin lässt sich im Speichel bei Minipigs nachweisen, jedoch lassen sich mit dem verwendeten ELISA keine reproduzierbaren Werte valide bestimmen. Hier sind weitere Etablierungsstudien zur Verbesserung der Spezifität notwendig.

Die Grimace Scale stellte sich aufgrund einer guten Übereinstimmung der Bewerter grundsätzlich als geeignet für den Einsatz zur Beurteilung der Mimik von adulten Minipigs dar, jedoch sollten weitere Untersuchungen zu den Veränderungen der Mimik unter Stress und zur Korrelation mit der Mimik unter Schmerzen stattfinden, um sie für den Einsatz bei Minipigs unter Stress zu validieren.

Außerdem sollte die Grimace Scale noch verfeinert werden im Sinne von deutlicheren Unterschieden der Merkmalsausprägungen zur höheren Übereinstimmung der Bewerter. Außerdem kann die Methode zum Beispiel durch vorherige Schulung der Auswerter verfeinert und optimiert werden.

Zusammenfassend stellte sich das Training von Minipigs als geeignetes Mittel zur Blutentnahme und Stressreduktion im Vergleich zur Fixierung in der Oberkieferschlinge dar. Es ist nicht nur Beschäftigung, sondern auch kognitives Enrichment für die Minipigs und eine geeignete Refinement-Maßnahme.

Die Ergebnisse der Arbeit können als Anreiz gesehen werden, die Blutentnahme beim Minipig oder beim Schwein auch mit Blick auf die Fixation stressärmer zu gestalten – zum Beispiel durch eine Gewöhnung an die Oberkieferschlinge oder eine Polsterung der Schlinge. Hier ist Potenzial für weitere Studien.

8. Summary

Training as an applied refinement measure for blood collection from minipigs

The present study examines the extent to which training through positive reinforcement in the minipig enables blood collection without fixation by the maxillary sling and leads to stress reduction. When planning and carrying out animal experiments, it is our duty to always try to keep the stress on the animals to an indispensable minimum. This meets the requirements of the 3R principle, which is anchored in EU Directive 63/2010/EU and in the Animal Welfare Act. This also includes constantly questioning methods, even if they have been established or common for years, and refining and improving these methods in order to minimize stress and strain on the animals. The present work examines the method of blood collection with fixation in a maxillary sling for its stressfulness for minipigs and the results show that the stress experienced by the animals can be significantly reduced through training and positive reinforcement. In addition, the results also show that the puncture with the cannula in the neck itself does not cause any significant stress to the minipig and that the stress during blood collection is primarily caused by the fixation with the maxillary sling. Both the salivary cortisol concentration and the heart rate, which serve as stress parameters, are significantly lower in the minipigs when blood is taken after training than before training. Training represents cognitive enrichment and refinement for the minipigs. The use of the trained blood sampling is particularly useful and conceivable in laboratory animal facilities with minipigs that are used in one or more experiments over a long period of time and in which repeated blood sampling takes place as an evidence-based refinement to reduce animal stress.

The endogenous pentapeptide opiorphine can be detected in the saliva of minipigs, but no reproducible values can be determined with the ELISA used. Further establishment studies to improve specificity are necessary here.

The Grimace Scale turned out to be generally suitable for assessing stress in minipigs, but the Grimace Scale should still be refined in terms of clearer differences in the characteristic values for greater agreement between the raters. In addition, the method can be refined and optimized, for example, by prior training of the evaluators.

In summary, the training of minipigs turned out to be a suitable method for blood sampling and stress reduction compared to the maxillary sling. It is not only employment, but also cognitive enrichment for the minipigs and a suitable refinement measure.

Summary

The results of this study can be seen as an incentive to make taking blood from the minipig or pig less stressful, also with regard to the fixation - for example by getting used to the maxillary sling or by padding the sling. There is potential for further studies here.

9. Literaturverzeichnis

- Amezcu, R., S. Walsh, P. H. Luimes, and R. M. Friendship. 2014. 'Infrared thermography to evaluate lameness in pregnant sows', *Can Vet J*, 55: 268-72.
- Amit, Z., and Z. H. Galina. 1986. 'Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression', *Physiological Reviews*, 66: 1091-120.
- Arblaster, Finula. 2010. 'Clicker training in minipigs', *Animal Technology and Welfare*, 9: 115-18.
- Badyal, Dinesh K., Vikas Modgill, and Jasleen Kaur. 2009. 'Computer Simulation Models are Implementable as Replacements for Animal Experiments', *Alternatives to Laboratory Animals*, 37: 191-95.
- Bak, Peter Michael. 2019. 'Assoziatives Lernen.' in, *Lernen, Motivation und Emotion : Allgemeine Psychologie II – das Wichtigste, prägnant und anwendungsorientiert* (Springer Berlin Heidelberg): 9-39.
- Basbaum, Allan I, Diana M Bautista, Grégory Scherrer, and David Julius. 2009. 'Cellular and molecular mechanisms of pain', *Cell*, 139: 267-84.
- Basbaum, Allan I, and Howard L Fields. 1984. 'Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry', *Annual Review of Neuroscience*, 7: 309-38.
- Baumgartner, Walter. 2009. *Klinische Propädeutik der Haus-und Heimtiere* (Georg Thieme Verlag): 87.
- Bell-Krotoski, Judith A., Elaine Ewing Fess, John H. Figarola, and Danell Hiltz. 1995. 'Threshold Detection and Semmes-Weinstein Monofilaments', *Journal of Hand Therapy*, 8: 155-62.
- Berntson, G. G., J. T. Bigger, Jr., D. L. Eckberg, P. Grossman, P. G. Kaufmann, M. Malik, H. N. Nagaraja, S. W. Porges, J. P. Saul, P. H. Stone, and M. W. van der Molen. 1997. 'Heart rate variability: origins, methods, and interpretive caveats', *Psychophysiology*, 34: 623-48.
- Berschauer, F von, and A Oster. 1981. 'Blutentnahme bei Schweinen mit Hilfe von Venenverweil-kathetern und Stoffwechsellkäfte für Börgen im Gewichtsabschnitt 3–35 kg', *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*, 45: 122-32.
- Bertschinger, H, and H Geyer. 1975. 'Zur Blutentnahme und intravenösen Injektion beim Schwein', *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 117: 701-11.
- Bland, J Martin, and DouglasG Altman. 1986. 'Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement', *The lancet*, 327: 307-10.
- Bodenmann, Guy, Meinrad Perrez, Marcel Schär, and Andrea Trepp. 2004. *Klassische Lerntheorien. Grundlagen und Anwendungen in Erziehung und Psychotherapie. 1. Aufl* (Huber: Bern u.a.): 44-46, 103-118.
- Boileau, A., M. Farish, S. P. Turner, and I. Camerlink. 2019. 'Infrared thermography of agonistic behaviour in pigs', *Physiol Behav*, 210: 112637.
- Boissy, Alain. 1995. 'Fear and Fearfulness in Animals', *The Quarterly Review of Biology*, 70: 165-91.
- Bracke, Marc B. M., and Hans A. M. Spoolder. 2008. 'Novel object test can detect marginal differences in environmental enrichment in pigs', *Applied Animal Behaviour Science*, 109: 39-48.
- Bradman, Matthew JG, Francesco Ferrini, Chiara Salio, and Adalberto Merighi. 2015. 'Practical mechanical threshold estimation in rodents using von Frey hairs/Semmes-Weinstein monofilaments: Towards a rational method', *Journal of neuroscience methods*, 255: 92-103.
- Broom, Donald M. 2003. 'Transport stress in cattle and sheep with details of physiological, ethological and other indicators', *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 110: 83-88.
- Bruder, Annette. 2011. *VetBASICS Kardiologie bei Hund und Katze* (Elsevier Health Sciences): 1-11.

- Canh, T. T., M.W.A Verstegen, A.J.A Aarnink, and J.W Schrama. 1997. 'Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs', *Journal of Animal Science*, 75: 700-06.
- Cannon, Walter Bradford. 1932. 'Homeostasis', *The wisdom of the body*. Norton, Newyork: 263-286.
- Casal, N., X. Manteca, D. Escribano, J. J. Cerón, and E. Fàbrega. 2017. 'Effect of environmental enrichment and herbal compound supplementation on physiological stress indicators (chromogranin A, cortisol and tumour necrosis factor- α) in growing pigs', *Animal*, 11: 1228-36.
- Chrousos, G. P., and P. W. Gold. 1992. 'The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis', *Jama*, 267: 1244-52.
- Cohen, Jacob. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (L. Erlbaum Associates: Hillsdale, N.J.): 19-66, 109-139.
- Coleman, Kristine, Leigh Ann Tully, and Jennifer L. McMillan. 2005. 'Temperament correlates with training success in adult rhesus macaques', *American Journal of Primatology*, 65: 63-71.
- Contreras-Aguilar, María Dolores, Damián Escribano, Silvia Martínez-Miró, Marina López-Arjona, Camila P. Rubio, Silvia Martínez-Subiela, José J. Cerón, and Fernando Tecles. 2019. 'Application of a score for evaluation of pain, distress and discomfort in pigs with lameness and prolapses: correlation with saliva biomarkers and severity of the disease', *Research in Veterinary Science*, 126: 155-63.
- Cook, NJ, AL Schaefer, P Lepage, and S Morgan Jones. 1996. 'Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine', *Canadian Journal of Animal Science*, 76: 329-35.
- Dalla Costa, Emanuela, Michela Minero, Dirk Lebelt, Diana Stucke, Elisabetta Canali, and Matthew C Leach. 2014. 'Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration', *PLoS one*, 9: e92281.
- Dallman, Mary F., Norman Pecoraro, Susan F. Akana, Susanne E. la Fleur, Francisca Gomez, Hani Houshyar, M. E. Bell, Seema Bhatnagar, Kevin D. Laugero, and Sotara Manalo. 2003. 'Chronic stress and obesity: A new view of "comfort food"', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 11696-701.
- de Jong, Ingrid C., E. Dinand Ekkel, Johan A. van de Burgwal, Elbert Lambooj, S. Mechiel Korte, Marko A. W. Ruis, Jaap M. Koolhaas, and Harry J. Blokhuis. 1998. 'Effects of strawbedding on physiological responses to stressors and behavior in growing pigs', *Physiology & Behavior*, 64: 303-10.
- Di Giminiani, Pierpaolo, Victoria LMH Brierley, Annalisa Scollo, Flaviana Gottardo, Emma M Malcolm, Sandra A Edwards, and Matthew C Leach. 2016. 'The assessment of facial expressions in piglets undergoing tail docking and castration: toward the development of the piglet grimace scale', *Frontiers in veterinary science*, 3: 100.
- Dingemanse, Niels J, and Denis Réale. 2005. 'Natural selection and animal personality', *Behaviour*: 1159-84.
- Dufour, E, S Villard-Saussine, V Mellon, R Leandri, P Jouannet, MN Ungeheuer, and C Rougeot. 2013. 'Opiorphin secretion pattern in healthy volunteers: gender difference and organ specificity', *Biochem Anal Biochem*, 2: 2-11.
- Edelmann, Walter, and Simone Wittmann. 2012. *Lernpsychologie. Mit Online-Materialien. 7., vollst. überarb. Aufl* (Beltz: Weinheim): 73-77.
- Ekkel, E. Dinand, Steph J. Dieleman, Willem G. P. Schouten, Ana Portela, Germaine Cornélissen, Martin J. M. Tielen, and Franz Halberg. 1996. 'The circadian rhythm of cortisol in the saliva of young pigs', *Physiology & Behavior*, 60: 985-89.
- Ekman, Paul, and Wallace V. Friesen. 1976. 'Measuring facial movement', *Environmental psychology and nonverbal behavior*, 1: 56-75.
- Esch, T. 2002. 'Health in stress: change in the stress concept and its significance for prevention, health and life style', *Gesundheitswesen (Bundesverband der Ärzte des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))*, 64: 73-81.

- Escribano, D., A. M. Gutiérrez, F. Tecles, and J. J. Cerón. 2015. 'Changes in saliva biomarkers of stress and immunity in domestic pigs exposed to a psychosocial stressor', *Research in Veterinary Science*, 102: 38-44.
- Esperer, HD. 1994. 'Physiologische Grundlagen und pathophysiologische Aspekte der Herzfrequenzvariabilität beim Menschen', *Herzschr Elektrophys*, 5: 1-10.
- Finka, Lauren R., Stelio P. Luna, Juliana T. Brondani, Yorgos Tzimiropoulos, John McDonagh, Mark J. Farnworth, Marcello Ruta, and Daniel S. Mills. 2019. 'Geometric morphometrics for the study of facial expressions in non-human animals, using the domestic cat as an exemplar', *Scientific Reports*, 9: 9883.
- Flecknell, Paul. 2002. 'Replacement, reduction, refinement', *ALTEX-alternatives to Animal Experimentation*, 19: 73-78.
- Forkman, B., A. Boissy, M. C. Meunier-Salaün, E. Canali, and R. B. Jones. 2007. 'A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses', *Physiology & Behavior*, 92: 340-74.
- Fornara, Paolo, and André Schumann. 2016. 'Entwicklung und Physiologie der Nebennieren.' in Maurice Stephan Michel, Joachim W. Thüroff, Günther Janetschek and Manfred Wirth (eds.), *Die Urologie* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg): 171-172.
- Fraser, Robert, Mary C Ingram, Niall H Anderson, Caroline Morrison, Eleanor Davies, and John MC Connell. 1999. 'Cortisol effects on body mass, blood pressure, and cholesterol in the general population', *Hypertension*, 33: 1364-68.
- Geverink, N. A., W. G. Schouten, G. Gort, and V. M. Wiegant. 2002. 'Individual differences in behavioral and physiological responses to restraint stress in pigs', *Physiol Behav*, 77: 451-7.
- Geverink, N. A., W. G. P. Schouten, G. Gort, and V. M. Wiegant. 2003. 'Individual differences in behaviour, physiology and pathology in breeding gilts housed in groups or stalls', *Applied Animal Behaviour Science*, 81: 29-41.
- Gieling, Elise Titia, Rebecca Elizabeth Nordquist, and Franz Josef van der Staay. 2011. 'Assessing learning and memory in pigs', *Animal Cognition*, 14: 151-73.
- Gould, François DH, Andrew R Lammers, Christopher J Mayerl, and Rebecca Z German. 2019. 'Specific vagus nerve lesion have distinctive physiologic mechanisms of dysphagia', *Frontiers in Neurology*, 10: 1301.
- Grabitz, Eberhard. 1973. 'Der Grundsatz der Verhältnismäßigkeit in der Rechtsprechung des Bundesverfassungsgerichts', *Archiv des öffentlichen Rechts*, 98: 568-616.
- Gunnar, M., and K. Quevedo. 2007. 'The neurobiology of stress and development', *Annu Rev Psychol*, 58: 145-73.
- Haigh, Amy, Jen-Yun Chou, and Keelin O'Driscoll. 2020. 'Variations in the Behavior of Pigs During an Open Field and Novel Object Test', *Frontiers in veterinary science*, 7: 1-10.
- Hammond, H. K., D. A. Roth, M. D. McKirnan, and P. Ping. 1993. 'Regional myocardial downregulation of the inhibitory guanosine triphosphate-binding protein (Gi alpha 2) and beta-adrenergic receptors in a porcine model of chronic episodic myocardial ischemia', *The Journal of Clinical Investigation*, 92: 2644-52.
- Hampshire, Victoria, and Sheilah Robertson. 2015. 'Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring', *Lab Animal*, 44: 259-60.
- Hay, M., and P. Mormède. 1998. 'Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and large white sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity', *Vet Res*, 29: 119-28.
- Hayes, Andrew F, and Klaus Krippendorff. 2007. 'Answering the call for a standard reliability measure for coding data', *Communication methods and measures*, 1: 77-89.
- Hendriksen, Coenraad F. M., and Herman B.W.M. Koëter. 1991. *Animals in Biomedical Research: Present Possibilities and Future Prospects: Replacement, Reduction and Refinement* (Elsevier): 161, 224.

- Henry, Maggie, Hannah Jansen, Maria del Rocio Amezcua, Terri L. O'Sullivan, Lee Niel, Anna Kate Shoveller, and Robert M. Friendship. 2021. 'Tail-Biting in Pigs: A Scoping Review', *Animals*, 11: 2002.
- Herman, J. P., D. Adams, and C. Prewitt. 1995. 'Regulatory Changes in Neuroendocrine Stress-Integrative Circuitry Produced by a Variable Stress Paradigm', *Neuroendocrinology*, 61: 180-90.
- Hillmann, E., L. Schrader, C. Mayer, and L. Gygax. 2008. 'Effects of weight, temperature and behaviour on the circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs', *Animal*, 2: 405-9.
- Hirt, Almuth, Christoph Maisack, and Johanna Moritz. 2016. *Tierschutzgesetz: mit TierSchHundeV, TierSchNutzV, TierSchVersV, TierSchTrV, EU-Tiertransport-VO, TierSchIV, EU-Tierschlacht-VO : Kommentar* (Verlag Franz Vahlen: München): 96-130.
- Hizume, Takatoshi, Keiko Morikawa, Aya Takaki, Kohtaro Abe, Kenji Sunagawa, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, Chiharu Kubo, and Hiroaki Shimokawa. 2006. 'Sustained Elevation of Serum Cortisol Level Causes Sensitization of Coronary Vasoconstricting Responses in Pigs In Vivo', *Circulation Research*, 99: 767-75.
- Holden, E, G Calvo, M Collins, A Bell, J Reid, EM Scott, and AM Nolan. 2014. 'Evaluation of facial expression in acute pain in cats', *Journal of Small Animal Practice*, 55: 615-21.
- Holden, Janean E., Younhee Jeong, and Jeannine M. Forrest. 2005. 'The Endogenous Opioid System and Clinical Pain Management', *AACN Advanced Critical Care*, 16: 291-301.
- Holtz, W, D Smidt, O Thume, and E Weseloh. 1968. 'Veränderungen des Scheiden-pH, der rektal und vaginal gemessenen Körpertemperatur und des Scheidenepithels in Abhängigkeit vom Sexualzyklus beim Göttinger Zwergschwein', *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 15: 329-52.
- Hu, C., A. Cheang, L. Retnam, and E. H. Yap. 1993. 'A simple technique for blood collection in the pig', *Lab Anim*, 27: 364-7.
- Hütten, H, and F Preuss. 1953. 'Blutentnahme beim Schwein', *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr*, 66: 89-90.
- Janssens, C. J. J. G., F. A. Helmond, and V. M. Weigant. 1995. 'The effect of chronic stress on plasma cortisol concentrations in cyclic female pigs depends on the time of day', *Domestic Animal Endocrinology*, 12: 167-77.
- Jara, Amanda L., Jarod M. Hanson, Jon D. Gabbard, Scott K. Johnson, Emery T. Register, Biao He, and S. Mark Tompkins. 2016. 'Comparison of Microchip Transponder and Noncontact Infrared Thermometry with Rectal Thermometry in Domestic Swine (*Sus scrofa domestica*)', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 55: 588-93.
- Jong, I. C. de, I. T. Prella, J. A. van de Burgwal, E. Lambooij, S. M. Korte, H. J. Blokhuis, and J. M. Koolhaas. 2000. 'Effects of rearing conditions on behavioural and physiological responses of pigs to preslaughter handling and mixing at transport', *Canadian Journal of Animal Science*, 80: 451-58.
- Koopmans, Sietse J., Jan van der Meulen, Ruud Dekker, Henk Corbijn, and Zdzislaw Mroz. 2005. 'Diurnal rhythms in plasma cortisol, insulin, glucose, lactate and urea in pigs fed identical meals at 12-hourly intervals', *Physiology & Behavior*, 84: 497-503.
- Kowalczyk, T, DK Sorensen, and HR Glättli. 1951. 'Zur Technik der Entnahme von Blutproben aus der Vena cava cranialis des Schweines', *Schweiz. Arch. Tierheilk*, 93: 628-32.
- Krohne, Heinz Walter. 2002. 'Stress and coping theories', *International Encyclopedia of the Social Behavioral Sciences*, 22: 15163-70.
- Kuwahara, Masayoshi, Atsushi Suzuki, Hideki Tsutsumi, Manabu Tanigawa, Hirokazu Tsubone, and Shigeru Sugano. 1999. 'Power spectral analysis of heart rate variability for assessment of diurnal variation of autonomic nervous activity in miniature swine', *Comparative Medicine*, 49: 202-08.

- Kuwahara, Masayoshi, Yasuhiro Tsujino, Hirokazu Tsubone, Eiji Kumagai, Hideki Tsutsumi, and Manabu Tanigawa. 2004. 'Effects of Pair Housing on Diurnal Rhythms of Heart Rate and Heart Rate Variability in Miniature Swine', *Experimental Animals*, 53: 303-09.
- Landis, J Richard, and Gary G Koch. 1977. 'The measurement of observer agreement for categorical data', *Biometrics*: 159-74.
- Langford, D. J., A. L. Bailey, M. L. Chanda, S. E. Clarke, T. E. Drummond, S. Echols, S. Glick, J. Ingraio, T. Klassen-Ross, M. L. Lacroix-Fralish, L. Matsumiya, R. E. Sorge, S. G. Sotocinal, J. M. Tabaka, D. Wong, A. M. van den Maagdenberg, M. D. Ferrari, K. D. Craig, and J. S. Mogil. 2010. 'Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse', *Nat Methods*, 7: 447-9.
- Lardy, R., A. B. des Roches, J. Capdeville, R. Bastien, L. Mounier, and I. Veissier. 2021. 'Refinement of international recommendations for cubicles, based on the identification of associations between cubicle characteristics and dairy cow welfare measures', *J Dairy Sci*, 104: 2164-84.
- Laule, Gail, and Tim Desmond. 1998. 'Positive reinforcement training as an enrichment strategy', *Second nature: Environmental enrichment for captive animals*: 302-13.
- Lawrence, I. Kuei Lin. 1989. 'A Concordance Correlation Coefficient to Evaluate Reproducibility', *Biometrics*, 45: 255-68.
- Lazarus, Richard S., and Susan Folkman. 1991. '9. The Concept of Coping.' in, *Stress and coping: An anthology* (Columbia University Press): 227.
- Le Bars, D., M. Gozariu, and S. W. Cadden. 2001. 'Animal models of nociception', *Pharmacol Rev*, 53: 597-652.
- Lensen, Rian C. M. M., Cécile Betremieux, Valérie Bavegems, Stanislas U. Sys, Christel P. H. Moons, and Claire Diederich. 2017. 'Validity and reliability of cardiac measures during behavioural tests in pet dogs at home', *Applied Animal Behaviour Science*, 186: 56-63.
- Linz, Dominik, Felix Mahfoud, Benedikt Linz, Mathias Hohl, Stephan H Schirmer, Klaus J Wirth, and Michael Böhm. 2014. 'Effect of obstructive respiratory events on blood pressure and renal perfusion in a pig model for sleep apnea', *American journal of hypertension*, 27: 1293-300.
- Lloyd, M. H., B. W. Foden, and S. E. Wolfensohn. 2008. 'Refinement: promoting the three Rs in practice', *Lab Anim*, 42: 284-93.
- Löllgen, Herbert. 1999. 'Serie: Neue Methoden in der kardialen Funktionsdiagnostik–Herzfrequenzvariabilität', *Dt. Ärztebl.*, 96: A-2029–32.
- Lou, M. E., S. T. Porter, J. S. Massey, B. Ventura, J. Deen, and Y. Li. 2022. 'The Application of 3D Landmark-Based Geometric Morphometrics towards Refinement of the Piglet Grimace Scale', *Animals (Basel)*, 12: 1944.
- Makarananda, Kittu, and Gordon E. Neal. 1992. 'Competitive ELISA.' in Margaret M. Manson (ed.), *Immunochemical Protocols* (Humana Press: Totowa, NJ): 267-272.
- Marchant-Forde, R. M., and J. N. Marchant-Forde. 2004. 'Pregnancy-related changes in behavior and cardiac activity in primiparous pigs', *Physiol Behav*, 82: 815-25.
- Marchant, J. N., X. Whittaker, and D. M. Broom. 2001. 'Vocalisations of the adult female domestic pig during a standard human approach test and their relationships with behavioural and heart rate measures', *Applied Animal Behaviour Science*, 72: 23-39.
- Marchant, Jeremy N., Andrew R. Rudd, and Donald M. Broom. 1997. 'The effects of housing on heart rate of gestating sows during specific behaviours', *Applied Animal Behaviour Science*, 55: 67-78.
- Martínez-Miró, S., F. Tecles, M. Ramón, D. Escribano, F. Hernández, J. Madrid, J. Orengo, S. Martínez-Subiela, X. Manteca, and J. J. Cerón. 2016. 'Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update', *BMC Vet Res*, 12: 171.
- Masson, G., and H. Selye. 1938. 'Réaction générale d'adaptation: Ses indications pratiques', *Can J Comp Med*, 2: 282-5.
- McBride, GB. 2005. 'A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's concordance correlation coefficient', *NIWA client report: HAM2005-062*, 45: 307-10.

- McEwen, Bruce S, and Robert M Sapolsky. 1995. 'Stress and cognitive function', *Current opinion in neurobiology*, 5: 205-16.
- McMahon, M, J Gerich, and P Rizza. 1988. 'Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism', *Diabetes/metabolism reviews*, 4: 17-30.
- Merke, Deborah P, and Stefan R Bornstein. 2005. 'Congenital adrenal hyperplasia', *The lancet*, 365: 2125-36.
- Meßlinger, K. 2002. 'Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung', *Manuelle Medizin*, 40: 13-21.
- Meyer-Hamme, SEK, Christian Lambertz, and Matthias Gauly. 2016. 'Does group size have an impact on welfare indicators in fattening pigs?', *Animal*, 10: 142-49.
- Molinari, C., A. Battaglia, E. Grossini, D. A. S. G. Mary, C. Vassanelli, and G. Vacca. 2002. 'The effect of testosterone on regional blood flow in prepubertal anaesthetized pigs', *The Journal of Physiology*, 543: 365-72.
- Moskalenko, Vasilij, Markus Hüller, Martin Gasser, Yuriy Demidchik, Arnulf Thiede, Stephan Timm, Karin Ulrichs, and Wulf Hamelmann. 2009. 'Investigation of the regeneration potential of the recurrent laryngeal nerve (RLN) after compression injury, using neuromonitoring', *Langenbeck's archives of surgery*, 394: 469-74.
- Möstl, E., and R. Palme. 2002. 'Hormones as indicators of stress', *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 67-74.
- Mota-Rojas, Daniel, Agustín Orihuela, Julio Martínez-Burnes, Jocelyn Gómez, Patricia Mora-Medina, Belen Alavez, Luisa Ramírez, and Miguel González-Lozano. 2020. 'Neurological modulation of facial expressions in pigs and implications for production', *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 8: 232-43.
- Muirhead, M. R. 1981. 'Blood sampling in pigs', *In Practice*, 3: 16-20.
- Munk, Ole L., Ludvik Bass, Klaus Roelsgaard, Dirk Bender, Søren B. Hansen, and Susanne Keiding. 2001. 'Liver Kinetics of Glucose Analogs Measured in Pigs by PET: Importance of Dual-Input Blood Sampling', *Journal of Nuclear Medicine*, 42: 795-801.
- Musk, G. C., R. S. Costa, and J. Tuke. 2014. 'Doppler blood pressure measurement in pigs during anaesthesia', *Res Vet Sci*, 97: 129-31.
- Neubert, E., H. Gurtler, and G. Vallentin. 1996. '[Effect of restraining growth pigs with snare restraints on plasma levels of catecholamines, cortisol, insulin and metabolic parameters]', *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 109: 409-13.
- Niiyama, Masayoshi, Hiromi Yonemichi, Etsumori Harada, Bunei Syuto, and Hiroshi Kitagawa. 1985. 'A simple catheterization from the ear vein into the jugular vein for sequential blood sampling from unrestrained pigs', *Japanese Journal of Veterinary Research*, 33: 1-9.
- O'Malley, Carly I., Simon P. Turner, Richard B. D'Eath, Juan P. Steibel, Ronald O. Bates, Catherine W. Ernst, and Janice M. Siegford. 2019. 'Animal personality in the management and welfare of pigs', *Applied Animal Behaviour Science*, 218: 104821.
- Ozdogan, M. S., M. Gungormus, S. Ince Yusufoglu, S. Y. Ertem, C. Sonmez, and M. Orhan. 2019. 'Salivary opiorphin in dental pain: A potential biomarker for dental disease', *Arch Oral Biol*, 99: 15-21.
- Ozdogan, S., C. Sonmez, D. Yolcu, and M. Gungormus. 2020. 'Tear Opiorphin Levels in Ocular Pain Caused by Corneal Foreign Body', *Cornea*, 39: 1377-80.
- Pairis-Garcia, M. D., A. K. Johnson, J. L. Bates, MI Stock, L. A. Barth, A. S. Brommel, K. J. Stalder, and L. A. Karriker. 2014. 'Development and refinement of a technique for short-term intravascular auricular vein catheter placement in mature sows', *Lab Anim*, 48: 78-81.
- Panepinto, LM, RW Phillips, S Norden, PC Pryor, and R Cox. 1983. 'A comfortable, minimum stress method of restraint for Yucatan miniature swine', *Laboratory animal science*, 33: 95-97.
- Parrott, R. F., R. H. Bradshaw, D. M. Lloyd, and J. A. Goode. 1998. 'Effects of transport and indomethacin on telemetered body temperature and release of cortisol and prolactin in pre-pubertal pigs', *Research in Veterinary Science*, 64: 51-55.

- Parrott, R. F., and D.M. Lloyd. 1995. 'Restraint, but not frustration, induces prostaglandin-mediated hyperthermia in pigs', *Physiol Behav*, 57: 1051-5.
- Patel, Nilesh B. 2010. 'Physiology of pain', *Guide to pain management in low-resource settings*: 13-17.
- Pavlov, P. Ivan. 2010. 'Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex', *Annals of neurosciences*, 17: 136-41.
- Peeke, P. M., and G. P. Chrousos. 1995. 'Hypercortisolism and obesity', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771: 665-76.
- Petry, A., W. McGilvray, A. R. Rakhshandeh, and A. Rakhshandeh. 2017. 'Technical note: Assessment of an alternative technique for measuring body temperature in pigs', *J Anim Sci*, 95: 3270-74.
- Plaumann, Martina, Anja Busse, and Ulla Walter. 2006. 'Grundlagen zu Stress.' in, *Weißbuch Prävention 2005/2006* (Springer): 3012.
- Plonait, H., K.H. Waldmann, and K. Bickhardt. 2004. *Lehrbuch der Schweinekrankheiten: 63 Tabellen* (Parey): 151-152.
- Pomerantz, Ori, and Joseph Terkel. 2009. 'Effects of positive reinforcement training techniques on the psychological welfare of zoo-housed chimpanzees (*Pan troglodytes*)', *American Journal of Primatology*, 71: 687-95.
- Reed, R., M. Barletta, J. Grimes, J. Mumaw, H. J. Park, S. Giguère, M. Azain, X. Fang, and J. Quandt. 2018. 'Accuracy of an oscillometric blood pressure monitor in anesthetized pigs', *Lab Anim*, 52: 490-96.
- Reimert, Inonge, J. Elizabeth Bolhuis, Bas Kemp, and T. Bas Rodenburg. 2014. 'Social support in pigs with different coping styles', *Physiology & Behavior*, 129: 221-29.
- Rigaud, Marcel, Geza Gemes, Stephen E. Abram, Caron Dean, Francis A. Hopp, Cheryl L. Stucky, Daniel Eastwood, Sergey Tarima, Jeanne Seagard, and Quinn H. Hogan. 2011. 'Pain tests provoke modality-specific cardiovascular responses in awake, unrestrained rats', *PAIN®*, 152: 274-84.
- Robert, S., R. Bergeron, C. Farmer, and M. C. Meunier-Salaün. 2002. 'Does the number of daily meals affect feeding motivation and behaviour of gilts fed high-fibre diets?', *Applied Animal Behaviour Science*, 76: 105-17.
- Rooijen, J. van. 1982. 'Operant preference tests with pigs', *Applied Animal Ethology*, 9: 87-88.
- Rössler, Patrick, and Stephanie Geise. 2013. 'Standardisierte Inhaltsanalyse: Grundprinzipien, Einsatz und Anwendung.' in Wiebke Möhring and Daniela Schlütz (eds.), *Handbuch standardisierte Erhebungsverfahren in der Kommunikationswissenschaft* (Springer Fachmedien Wiesbaden: Wiesbaden): 269-287.
- Rougeot, Catherine, Michaël Messaoudi, Véronique Hermitte, Anne Gaëlle Rigault, Thierry Blisnick, Christophe Dugave, Didier Desor, and François Rougeon. 2003. 'Sialorphan, a natural inhibitor of rat membrane-bound neutral endopeptidase that displays analgesic activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 8549-54.
- Ruis, M. A., J. H. Te Brake, B. Engel, E. D. Ekkel, W. G. Buist, H. J. Blokhuis, and J. M. Koolhaas. 1997. 'The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress', *Physiol Behav*, 62: 623-30.
- Ruis, M. A. W., Jhat Brake, B. Engel, E. D. Ekkel, W. G. Buist, H. J. Blokhuis, and J. M. Koolhaas. 1997. 'The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: Effects of age, gender, and stress', *Physiology & Behavior*, 62: 623-30.
- Ruis, Marko A. W., Joop H. A. te Brake, Johan A. van de Burgwal, Ingrid C. de Jong, Harry J. Blokhuis, and Jaap M. Koolhaas. 2000. 'Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications', *Applied Animal Behaviour Science*, 66: 31-47.
- Rushen, J., and J. Ladewig. 1991. 'Stress-induced hypoalgesia and opioid inhibition of pigs' responses to restraint', *Physiol Behav*, 50: 1093-6.

- Russell, William Moy Stratton, and Rex Leonard Burch. 1959. *The principles of humane experimental technique* (Methuen): 69-146.
- Russell, William MS, and Rex L Burch. 2009. 'Prefatory note', *Alternatives to Laboratory Animals*, 37: 267-68.
- Rydén, A., E. Manell, A. Biglarnia, P. Hedenqvist, G. Strandberg, C. Ley, K. Hansson, G. Nyman, and M. Jensen-Waern. 2020. 'Nursing and training of pigs used in renal transplantation studies', *Lab Anim*, 54: 469-78.
- Salarić, Ivan, Maja Sabalić, and Ivan Alajbeg. 2017. 'Opiorphin in burning mouth syndrome patients: a case-control study', *Clinical Oral Investigations*, 21: 2363-70.
- Sambras, H., H. 2016. *Farbatlas Nutztierassen: 263 Rassen in Wort und Bild* (Ulmer Verlag): 304-320.
- Sandkuhler, Jurgen. 2001. 'Schmerzgedächtnis-Entstehung, Vermeidung und Löschung', *Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A*, 98: 2725-29.
- Sankari, Satu. 1983. 'A practical method of taking blood samples from the pig', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 24: 133.
- Sann, H. 2005. 'Sinnesphysiologie', *Physiologie der Haustiere. Enke-Verlag, Stuttgart*, 2: 74-78.
- Schapiro, Steven J, Elizabeth R Magden, Lisa A Reamer, Mary Catherine Mareno, and Susan P Lambeth. 2017. 'Behavioral training as part of the health care program', *Management of Animal Care and Use Programs in Research, Education, and Testing*: 771-92.
- Scholz, J., and C. J. Woolf. 2002. 'Can we conquer pain?', *Nat Neurosci*, 5 Suppl: 1062-7.
- Schröder-Petersen, D. L., and H. B. Simonsen. 2001. 'Tail biting in pigs', *Vet J*, 162: 196-210.
- Schubert, C., M. Lambertz, R. A. Nelesen, W. Bardwell, J. B. Choi, and J. E. Dimsdale. 2009. 'Effects of stress on heart rate complexity—A comparison between short-term and chronic stress', *Biological Psychology*, 80: 325-32.
- Schulz, Peter, Clemens Kirschbaum, Jens Prübner, and Dirk Hellhammer. 1998. 'Increased free cortisol secretion after awakening in chronically stressed individuals due to work overload', *Stress medicine*, 14: 91-97.
- Scollo, A., C. Bresciani, G. Romano, L. Tagliaferri, F. Righi, E. Parmigiani, and C. Mazzoni. 2019. 'A novel blood-sampling technique in lactating sows: The mammary vein route', *The Veterinary Journal*, 254: 105397.
- Selye, H. 1937. 'Studies on Adaption', *Endocrinology*, 21: 169-88.
- Selye, H. 1946. 'The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation', *J Clin Endocrinol Metab*, 6: 117-230.
- Selye, H. 1950. 'Stress and the general adaptation syndrome', *Br Med J*, 1: 1383-92.
- Selye, H. 1975. 'Stress and distress', *Compr Ther*, 1: 9-13.
- Selye, H. 1976. 'Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions', *Canadian Medical Association journal*, 115: 53-56.
- Siegford, Janice M., Gloria Rucker, and Adroaldo J. Zanella. 2008. 'Effects of pre-weaning exposure to a maze on stress responses in pigs at weaning and on subsequent performance in spatial and fear-related tests', *Applied Animal Behaviour Science*, 110: 189-202.
- Skinner, B. F. 1951. 'How to teach animals', *Scientific American*, 185: 26-29.
- Smith, Alison, and M. Swindle. 2006. 'Preparation of Swine for the Laboratory', *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 47: 358-63.
- Sotocina, Susana G, Robert E Sorge, Austin Zaloum, Alexander H Tuttle, Loren J Martin, Jeffrey S Wieskopf, Josiane CS Mapplebeck, Peng Wei, Shu Zhan, and Shuren Zhang. 2011. 'The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions', *Molecular pain*, 7: 1744-8069-7-55.
- Sotocinal, S. G., R. E. Sorge, A. Zaloum, A. H. Tuttle, L. J. Martin, J. S. Wieskopf, J. C. Mapplebeck, P. Wei, S. Zhan, S. Zhang, J. J. McDougall, O. D. King, and J. S. Mogil. 2011. 'The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions', *Mol Pain*, 7: 55.

- Swieboda, P., R. Filip, A. Prystupa, and M. Drozd. 2013. 'Assessment of pain: types, mechanism and treatment', *Ann Agric Environ Med*, Spec no. 1: 2-7.
- Swindle, M. M., and A. C. Smith. 2015. *Swine in the laboratory: surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques* (CRC Press: Boca Raton): 1-39.
- Szechtman, H., P. J. Lambrou, A. R. Caggiula, and E. S. Redgate. 1974. 'Plasma corticosterone levels during sexual behavior in male rats', *Horm Behav*, 5: 191-200.
- Tannenbaum, Jerrold, and B. Taylor Bennett. 2015. 'Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose', *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 54: 120-32.
- Theby, V. 2018. *Verstärker verstehen: Über den Einsatz von Belohnung im Hundetraining* (Kynos Verlag): 45-69, 97-102.
- Thomsson, Ola, Bodil Ström-Holst, Ylva Sjunnesson, and Ann-Sofi Bergqvist. 2014. 'Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay developed for measuring cortisol concentration in human saliva and serum for its applicability to analyze cortisol in pig saliva', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56: 55.
- Tölle, Thomas, and Herta Flor. 2006. 'Schmerz.' in Hans Förstl, Martin Hautzinger and Gerhard Roth (eds.), *Neurobiologie psychischer Störungen* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg): 578-588.
- Treede, Rolf-Detlef, Winfried Rief, Antonia Barke, Qasim Aziz, Michael I. Bennett, Rafael Benoliel, Milton Cohen, Stefan Evers, Nanna B. Finnerup, Michael B. First, Maria Adele Giamberardino, Stein Kaasa, Beatrice Korwisi, Eva Kosek, Patricia Lavand'homme, Michael Nicholas, Serge Perrot, Joachim Scholz, Stephan Schug, Blair H. Smith, Peter Svensson, Johan W.S. Vlaeyen, and Shuu-Jiun Wang. 2019. 'Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11)', *PAIN*, 160: 19-27.
- Tsigos, Constantine, and George P Chrousos. 2002. 'Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress', *Journal of psychosomatic research*, 53: 865-71.
- Ulrich-Lai, Yvonne M., and James P. Herman. 2009. 'Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses', *Nature Reviews Neuroscience*, 10: 397-409.
- van de Weerd, Heleen, and Sarah Ison. 2019. 'Providing Effective Environmental Enrichment to Pigs: How Far Have We Come?', *Animals*, 9: 254.
- Vining, Ross F, Robynne A McGinley, Joseph J Maksvytis, and Kian Y Ho. 1983. 'Salivary Cortisol: A Better Measure of Adrenal Cortical Function than Serum Cortisol', *Annals of Clinical Biochemistry*, 20: 329-35.
- Viscardi, A. V., M. Hunniford, P. Lawlis, M. Leach, and P. V. Turner. 2017. 'Development of a Piglet Grimace Scale to Evaluate Piglet Pain Using Facial Expressions Following Castration and Tail Docking: A Pilot Study', *Front Vet Sci*, 4: 51.
- von Dawans, Bernadette, and Markus Heinrichs. 2018. 'Physiologische Stressreaktionen.' in Reinhard Fuchs and Markus Gerber (eds.), *Handbuch Stressregulation und Sport* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg): 68-73.
- Von Frey, M. 1896. 'Untersuchung über die Sinnesfunktion der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz', *Abhandlungen der mathematisch-physischen Klasse der Königlichen Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften*, 23: 374-377.
- Vullo, C., S. Barbieri, G. Catone, J. M. Graic, M. Magaletti, A. Di Rosa, A. Motta, C. Tremolada, E. Canali, and E. Dalla Costa. 2020. 'Is the Piglet Grimace Scale (PGS) a Useful Welfare Indicator to Assess Pain after Cryptorchidectomy in Growing Pigs?', *Animals (Basel)*, 10: 412.
- Wang, Caroline C, Petra Hartmann-Fischbach, Tim R Krueger, Terry L Wells, Aaron Simonson, and Joanne C Compton. 2015. 'Opiorphin analysis in equine plasma and urine using hydrophilic interaction LC–MS', *Bioanalysis*, 7: 593-603.
- Wang, S, Y Liu, D Fang, and S Shi. 2007. 'The miniature pig: a useful large animal model for dental and orofacial research', *Oral diseases*, 13: 530-37.

- Watkins, Lz R, DA Cobelli, HH Newsome, and DJ Mayer. 1982. 'Footshock induced analgesia in dependent neither on pituitary nor sympathetic activation', *Brain Research*, 245: 81-96.
- Werner, J, E Schäffer, and E Trautvetter. 1977. 'Zur unblutigen Blutdruckmessung an Haustieren: I. Methodik, Gerät, blutige Vergleichsmessungen, Manschettenbreiten und erste Messungen an Ratten und Rhesusaffen', *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe A*, 24: 229-41.
- Westlund, Karolina. 2014. 'Training is enrichment—and beyond', *Applied Animal Behaviour Science*, 152: 1-6.
- Wisner, Anne, Evelyne Dufour, Michaël Messaoudi, Amine Nejdj, Audrey Marcel, Marie-Noelle Ungeheuer, and Catherine Rougeot. 2006. 'Human Opiorphin, a natural antinociceptive modulator of opioid-dependent pathways', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 17979-84.
- Wredle, Ewa, Lene Munksgaard, and Eva Spörndly. 2006. 'Training cows to approach the milking unit in response to acoustic signals in an automatic milking system during the grazing season', *Applied Animal Behaviour Science*, 101: 27-39.
- Yamamoto, Y., H. Ono, A. Ueda, M. Shimamura, K. Nishimura, and T. Hazato. 2002. 'Spinorphin as an endogenous inhibitor of enkephalin-degrading enzymes: roles in pain and inflammation', *Curr Protein Pept Sci*, 3: 587-99.
- Young, E. A., S. Akana, and M. F. Dallman. 1990. 'Decreased Sensitivity to Glucocorticoid Fast Feedback in Chronically Stressed Rats', *Neuroendocrinology*, 51: 536-42.
- Zebunke, Manuela, Birger Puppe, and Jan Langbein. 2013. 'Effects of cognitive enrichment on behavioural and physiological reactions of pigs', *Physiology & Behavior*, 118: 70-79.
- Zimmermann, M. 1996. 'Physiologie von Nozizeption und Schmerz.' in, *Psychologische Schmerztherapie* (Springer): 59-60.

Publikationen

Fiderer, D.; Thöne-Reineke, C.; Wiegard, M. (2021): Anwendung von positiver Verstärkung (Klicker-Training) zur Stressreduktion bei der Blutentnahme beim Schwein.

53. Internationale Arbeitstagung Angewandte Ethologie bei Nutztieren der deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG) 25.11.-26.11.2021.

In: Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 2021 : Vorträge anlässlich der 53.

Internationalen Arbeitstagung Angewandte Ethologie bei Nutztieren der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG), Fachgruppe Ethologie und Tierhaltung, am 25. und 26. November 2021 – Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL), Darmstadt (Hrsg.)

Darmstadt: Kuratorium für Technik und Bauwesen in der Landwirtschaft e.V. (KTBL). KTBL-Schrift; **523**, S. 198. ISBN: 978-3-945088-82-1

Vortrag 29.06.2022: Mechthild Wiegard, Delia Fiderer, Christa Thoene-Reineke
"Training of animals as an applied tool of stress reduction in minipigs and therefore implemented refinement" UFAW International Conference: Advancing Animal Welfare Science. The Royal College of Physicians, Edinburgh, UK 28. - 29.06.2022

Vortrag 14.10.2022 Delia Fiderer, Christa Thoene-Reineke , Mechthild Wiegard.: Anwendung von positiver Verstärkung (Klicker-Training) zur Stressreduktion bei der Blutentnahme beim Schwein. DVG-Vet-Congress (DVG) 13.10.-25.10.2022

Vortrag 22.03.2023: Delia Fiderer, Christa Thoene-Reineke , Mechthild Wiegard: Training als Refinement bei der Blutentnahme bei Minipigs. IGTP-Tagung 22.03.-23.03.2023

Danksagung

Auch wenn mein Herz für das Arbeiten als praktische Tierärztin schlägt und ich meine Zukunft den Kleintieren widme, bin ich sehr dankbar, dass ich in Form dieser Arbeit die Erfahrung sammeln durfte, wissenschaftlich zu arbeiten und noch dazu in einem so wichtigen Gebiet – dem Refinement von Tierversuchen! Schnell habe ich gemerkt, dass bei dem Prozess einer Doktorarbeit viele Menschen beteiligt sind, denen ich rückblickend danken möchte.

Zunächst danke ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Thöne-Reineke – dass Sie trotz Ihrer vielen Aufgaben und Pflichten selbst am Sonntag auf E-Mails antworten, hat mich sehr beeindruckt. Ebenso danke ich besonders Frau Dr. Wiegard für die Idee des Doktorarbeitsthemas und dann die umfassende Betreuung während der gesamten Zeit - ich denke gerne an das gemeinsame Training der Minipigs zurück, bei dem auch viel gelacht wurde!

Darüber hinaus danke ich der Firma Bayer und Herrn Martin Kock, dass wir diese zwölf äußerst motivierten Minipigs für meine Doktorarbeit einsetzen durften, sowie den Tierpflegern Bernd und Justin für die Betreuung rund um das Training.

Bei der Bearbeitung der Proben geht ein großer Dank an das Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin, deren Labor wir für die Ausführung der ELISAs sowie die Lagerung der Proben nutzen durften. Besonders dankbar bin ich Michaela Mann für die stets geduldige und sympathische Unterstützung bei der Ausführung der ELISAs.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mir durch die Betreuung von Frau Merle sehr erleichtert – auch Ihnen einen großen Dank.

Auch dem Team der Kleintierpraxis am Uhlenhorst in Kleinmachnow und besonders den Chefs möchte ich für die Unterstützung und das Vertrauen in den letzten Jahren danken, sodass eine Doktorarbeit neben der Tätigkeit in der Praxis möglich war.

Die seelische Unterstützung durch Familie und Freunde habe ich in manchen Phasen der Arbeit gebraucht und stets erhalten - Danke dafür, speziell meinen Eltern, meinem Partner Max und ganz besonders meiner Freundin Virginia, die jedes Hoch und jedes Tief miterlebt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Der abschließende Dank gebührt den Hauptprotagonisten der Arbeit, den Minipigs. Auch wenn sie diesen Dank oder die Arbeit nie lesen können, danke ich ihnen für die grandiose Mitarbeit und hoffe, dass die Ergebnisse ihnen und vielen Artgenossen zugutekommen.

Finanzierungsquellen

Die Arbeit wurde nicht finanziert, insofern bestehen keine Gewissenskonflikte zu etwaigen Finanzierungspartnern.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Stahnsdorf, 17.05.2023

Delia Fiderer



9 783967 292138

mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-96729-213-8