

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

# **Beurteilung des Schweregrades von wiederholten Narkosen bei Mäusen durch objektive Ermittlung tierbasierter Indikatoren für Wohlbefinden**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines PhD of Biomedical Sciences  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Katharina Hohlbaum**  
Tierärztin aus Köln

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4077







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

**Beurteilung des Schweregrades von wiederholten Narkosen bei Mäusen  
durch objektive Ermittlung tierbasierter Indikatoren für Wohlbefinden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines PhD of Biomedical Sciences  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Katharina Hohlbaum**  
Tierärztin  
aus Köln

**Berlin 2018**

**Journal-Nr.: 4077**

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Dritter Gutachter:	PD Dr. Bettina Bert

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, animal welfare, stress, anaesthesia, isoflurane, ketamine, xylazine

**Tag der Promotion:** 28.11.2018

Gewidmet den Labortieren,  
deren Leben zum Schutz von Mensch, Tier und Umwelt eingesetzt werden.





# Inhalt

---

Inhalt .....	I
Abkürzungen .....	III
Definitionen .....	V
1. Einleitung.....	1
2. Literatur .....	3
2.1. Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere im EU- und deutschen Recht.....	3
2.2. 3R-Prinzip.....	3
2.3. Begriffsdefinitionen .....	5
2.3.1. Wohlbefinden .....	5
2.3.2. Leiden .....	5
2.3.3. Schmerzen.....	6
2.3.4. Ängste.....	6
2.3.5. Stress und Distress .....	7
2.3.6. Schäden.....	8
2.4. Belastungsbeurteilung von tierexperimentellen Verfahren .....	9
2.4.1. Belastungsbeurteilung gemäß Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU .....	9
2.4.2. Belastungsbeurteilung in der versuchstierkundlichen Praxis .....	10
2.4.3. Belastungsbeurteilung von wiederholten Interventionen.....	11
2.4.4. Tools zur Belastungsbeurteilung von Mäusen .....	12
2.5. Allgemeinnarkosen bei Mäusen .....	15
2.5.1. Narkoseregime mit wiederholten Narkosen bei Bildgebungsstudien.....	16
2.5.2. Inhalationsnarkose mit Isofluran .....	16
2.5.3. Injektionsnarkose mit der Kombination von Ketamin und Xylazin .....	18
2.5.3.1. Ketamin.....	18
2.5.3.2. $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist Xylazin.....	19
2.5.3.3. Anwendung der Kombination von Ketamin und Xylazin.....	20
2.6. Ziel der Untersuchung .....	21
3. Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia .....	22
4. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice— Assessing the degree of distress .....	38
5. Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice .....	60
6. Diskussion .....	85
6.1. Belastungsbeurteilung von wiederholten Inhalationsnarkosen mit Isofluran .....	85

## Inhalt

6.2.	Belastungsbeurteilung von wiederholten Injektionsnarkosen mit der Kombination von Ketamin und Xylazin .....	88
6.3.	Belastung wiederholter Inhalations- und Injektionsnarkosen im Vergleich .....	90
6.4.	Eignung des Protokolls zur Belastungsbeurteilung von tierexperimentellen Verfahren mit Narkosen .....	94
6.5.	Limitationen .....	95
6.6.	Ausblick .....	96
7.	Zusammenfassung .....	98
8.	Summary .....	100
9.	Literaturverzeichnis.....	102
9.1.	Wissenschaftliche Literater .....	102
9.2.	Verordnungen, Gesetze und Rechtsurteile .....	117
10.	Publikationen .....	VII
10.1.	Originalartikel.....	VII
10.1.1.	Beteiligung der Autoren an den Originalartikeln .....	VII
10.2.	Kongressbeiträge .....	VII
10.2.1.	Vorträge.....	VII
10.2.2.	Poster .....	VIII
11.	Danksagung .....	X
12.	Selbstständigkeitserklärung .....	XI

## Abkürzungen

---

3R	Replace, Reduce, Refine
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor Subtyp 1A
5-HT <sub>2</sub> -Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor Subtyp 2
AEUV	Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union
AG	Arbeitsgruppe
ALT	Alaninaminotransferase
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
AST	Aspartataminotransferase
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
BGH	Bundesgerichtshof
BVerwG	Bundesverwaltungsgericht
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CT	Computertomografie
EC	Europäische Kommission
EG	Europäische Gemeinschaft
ETS	European Treaty Series
EU	Europäische Union
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
GABA <sub>A</sub>	γ-Aminobuttersäure Subtyp A
GG	Grundgesetz
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
JRj	Jackson Janvier
KX	Ketamin/Xylazin
MAC <sub>50</sub>	minimale alveoläre Konzentration, bei der 50 % der Tiere keine Reaktion auf Schmerzreize zeigen
MGS	Mouse Grimace Scale
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie

## Abkürzungen

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
PREPARE	Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence
RL	Richtlinie
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computer-Tomografie
TierSchG	Tierschutzgesetz
TierSchVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
TRPA1	Transient Rezeptor Potential Ankirin 1
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
VersTierMeldV	Versuchstiermeldeverordnung
ZNS	zentrales Nervensystem

## Definitionen

---

Die folgenden Begriffe werden in der vorliegenden Arbeit entsprechend der Richtlinie 2010/63/EU definiert und verwendet.

Verfahren: „Jede invasive oder nicht invasive Verwendung eines Tieres zu Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken mit bekanntem oder unbekanntem Ausgang oder zu Ausbildungszwecken, die bei dem Tier Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden in einem Ausmaß verursachen kann, das dem eines Kanüleneinstichs gemäß guter tierärztlicher Praxis gleichkommt oder darüber hinausgeht.“ (Richtlinie 2010/63/EU)

Intervention: Eine invasive oder nicht invasive Maßnahme, die im Rahmen eines Verfahrens durchgeführt wird.



# 1. Einleitung

---

Tierversuche vollständig durch Alternativmethoden zu ersetzen, ist das Ziel der Richtlinie (RL) 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Um dieses Ziel zu erreichen, fordert die Richtlinie, das 3R-Prinzip von Russel und Burch (Replace, Reduce, Refine bzw. Vermeiden, Verringern, Verbessern von Tierversuchen) in allen tierexperimentellen Bereichen konsequent anzuwenden (Russel et al. 1959). Nach dem 3R-Prinzip sollen, wenn immer möglich, Tierversuche durch Alternativmethoden ersetzt werden. Wenn ein Tierversuch nicht durch Alternativmethoden ersetzt werden kann und als unerlässlich gilt, darf nur die notwendige Anzahl an Versuchstieren verwendet werden. Damit der Versuch aussagekräftige Daten liefert und nicht gegebenenfalls wiederholt werden muss, spielt die Planung des Studiendesigns, zum Beispiel entsprechend des PREPARE-Leitfadens (Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence), eine zentrale Rolle (Flecknell 2002; Smith et al. 2017). Um die Tierzahl zu reduzieren, ist eine Möglichkeit, Tiere wiederholt in einem Verfahren zu verwenden. Diese Praxis wird beispielsweise in tierexperimentellen Bildgebungsstudien angewendet. Bildgebende Techniken sind nichtinvasiv und tragen im Sinne der 3R zu Refinement sowie Reduction bei (Heindl et al. 2008; Lauber et al. 2017). Sie ermöglichen, dass longitudinale Verlaufsuntersuchungen am gleichen Tier durchgeführt werden können, anstatt zu jedem Zeitpunkt der Studie ein Tier zu töten, um Krankheits- oder Heilungsprozesse festzustellen (Heindl et al. 2008). Für die Bildgebung müssen die Tiere allerdings mittels Narkose immobilisiert werden (Dittmar et al. 2004; Hildebrandt et al. 2008). Demnach werden sie wiederholt narkotisiert, wenn der Verlauf von beispielsweise Tumorwachstum (Gambhir 2002), Gelenk- und Knochenverletzung (Tremoleda et al. 2011), kardiovaskulären Erkrankungen (Jaffer et al. 2006), Schlaganfall (Wey et al. 2013) oder neurodegenerativen Krankheiten (Strome et al. 2007) über einen längeren Zeitraum beobachtet wird.

Gemäß Anhang VIII der RL 2010/63/EU gilt eine Allgemeinnarkose als gering belastend. Bei dieser Einstufung wurde weder die Anzahl der Narkosen noch die Wirkstoffgruppe der verwendeten Allgemeinanästhetika berücksichtigt. Es ist allerdings denkbar, dass wiederholte Narkosen das Wohlbefinden der Tiere stärker beeinträchtigen als eine einmalige Narkose. Jede Narkose ist eine Intervention und kann mit Nebenwirkungen, wie Störungen des Metabolismus (Windeløv et al. 2016), Hypothermie (Gargiulo et al. 2012; Tremoleda et al. 2012) und Atem- sowie Kreislaufdespression (Henke et al. 2012), assoziiert sein. Die Wahl des Narkotikums dürfte für die Belastung eine wichtige Rolle spielen. Wiederholte Injektionsnarkosen könnten das Wohlbefinden stärker beeinflussen als wiederholte Inhalationsnarkosen, da erstere mit zusätzlichem Stress durch Fixierung sowie Einstich der Kanüle verbunden sind und, bedingt durch die Umverteilung der Injektionsanästhetika in die Gewebe, längere Erholungsphasen mit sich bringen (Flecknell 2016a).

Im Sinne des 3R-Prinzips ist eine wiederholte Verwendung von Tieren innerhalb eines Verfahrens nur dann sinnvoll, wenn sich dadurch die Schmerzen, Leiden, Ängsten, Disstress und/oder Schäden für das Einzeltier nicht erhöhen. Die Belastung durch wiederholte Interventionen sollte die Belastung durch eine einzelne Intervention nicht übersteigen, denn die Tierzahl darf nicht zu Ungunsten des Wohlbefindens einzelner Tiere reduziert werden.

Im Hinblick auf Refinement und Reduction wurde daher in der vorliegenden Arbeit der Effekt von wiederholten Narkosen und einer einmaligen Narkose auf das Wohlbefinden von adulten C57BL/6JRj Mäusen verglichen. Ziel war es, die Belastung durch wiederholte Narkosen gemäß der RL 2010/63/EU zu beurteilen. Untersucht wurden die Inhalationsanästhesie mit Isofluran sowie die Injektionsanästhesie mit der Kombination von Ketamin und Xylazin. Diese Anästhetika werden in der tierexperimentellen Praxis, insbesondere in Bildgebungsstudien, häufig verwendet.

## Einleitung

Um das Wohlbefinden der Tiere im postanästhetischen Zeitraum objektiv für jedes Einzeltier zu erfassen, entwickelten wir ein Protokoll zur systematischen Beurteilung des Wohlbefindens von Mäusen nach Allgemeinnarkosen. Das Protokoll beinhaltete die Erfassung des Körpergewichts und der Futteraufnahme, die Messung der motorischen Aktivität, Verhaltenstests zum Luxury Behavior (Nestbau- sowie Wühlverhalten) und zum Angstbezogenen Verhalten sowie die Bestimmung der Mouse Grimace Scale (MGS). Die Analyse von fäkalen Kortikosteronmetaboliten und Kortikosteron im Haar sollte Rückschlüsse auf das akute bzw. chronische Stresslevel geben. Darüber hinaus wurden während der Narkose die Vitalparameter überprüft und die Narkosephasen bestimmt.



## 2. Literatur

---

### 2.1. Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere im EU- und deutschen Recht

Die Diskurse zum Mensch-Tier-Verhältnis führten in den letzten Jahren dazu, dass der Schutz von Versuchstieren in der Öffentlichkeit eine zunehmend wichtigere Rolle einnahm. Dementsprechend änderte sich auch die Rechtslage zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in den Mitgliedsstaaten der Europäischen Union (EU).

Im Jahr 1986 wurde das Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (ETS Nr. 123) verabschiedet und im Jahr 1999 von den 21 Mitgliedstaaten ratifiziert (1999/575/EG). Der Vertrag von Amsterdam mit dem Protokoll über den Tierschutz und das Wohlergehen der Tiere aus dem Jahr 1997 sowie der Vertrag von Lissabon aus dem Jahr 2007 bewirkten eine Änderung des Vertrags über die Arbeitsweise der Europäischen Union (AEUV). Laut Artikel 13 AEUV muss „den Erfordernissen des Wohlergehens der Tiere als fühlende Wesen in vollem Umfang Rechnung“ getragen werden. Aufgrund des gestiegenen Stellenwerts des Tierschutzes wurde die RL 86/609/EWG zum Schutz der für Versuche oder andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere zunächst im Jahr 2003 durch die RL 2003/65/EG geändert und schließlich im Jahr 2010 durch die RL 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere ersetzt. Das Hauptziel der RL 2010/63/EU ist der vollständige Verzicht auf Tierversuche. Bis dieses Ziel erreicht werden kann, gibt die Richtlinie vor, dass hohe Standards für das Wohlergehen von Versuchstieren gewährleistet werden sollen, indem der Fokus auf die gesamten 3R gelegt wird (Binder 2010). Daneben sollen durch die RL 2010/63/EU Wettbewerbsbedingungen innerhalb der europäischen Industrieforschung harmonisiert und die Transparenz von Tierversuchen gegenüber der Öffentlichkeit verbessert werden. Zur Transparenz tragen die nichttechnischen Projektzusammenfassungen von Tierversuchsvorhaben in Deutschland bei, die über das deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren, das Bf3R am Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), in der Datenbank AnimalTestInfo veröffentlicht werden und die Öffentlichkeit über alle genehmigten Tierversuchsvorhaben in Deutschland informiert (Schönfelder 2015; Bert et al. 2017). Auf diesen Bestrebungen basiert auch die Basler Deklaration, die im Jahr 2010 mit den Absichten verabschiedet wurde, die 3R umzusetzen und Vertrauen, Transparenz sowie Kommunikation in der Tierforschung zu verbessern ([de.basel-declaration.org](http://de.basel-declaration.org)).

Auf nationaler Ebene wurde im Jahr 1971 im deutschen Grundgesetz (GG) Artikel 74 Nr. 20 das Wort „Tierschutz“ eingefügt und im Jahr 2002 in Artikel 20a GG der Passus „der Staat schützt [...] die natürlichen Lebensgrundlagen [...]“ um die Wörter „und die Tiere“ ergänzt – damit wurde in Deutschland der Tierschutz erstmals als Staatsziel erklärt. Im Jahr 1990 wurde im Bürgerlichen Gesetzbuch (BGB) ein neuer § 90a eingefügt: „Tiere sind keine Sachen. Sie werden durch besondere Gesetze geschützt“. Die rechtlichen Vorgaben der RL 2010/63/EU wurden 2013 durch die Novellierung des deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) und den Erlass der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) umgesetzt. Dadurch wurde auch auf nationaler Ebene dem 3R-Prinzip erstmals eine zentrale Bedeutung eingeräumt und wichtige Meilensteine auf dem Weg, Tierversuche vollständig durch Alternativen zu ersetzen, gelegt.

### 2.2. 3R-Prinzip

Im Jahr 1959 beschrieben Russel und Burch das 3R-Prinzip in "The Principles of Humane Experimental Technique" (Russel et al. 1959).

Das 3R-Prinzip verfolgt zum einen das Ziel, Tierversuche durch andere Methoden zu ersetzen (Replacement). Im Bereich der Toxikologie existieren einige wenige validierte und anerkannte Alternativmethoden zum Tierversuch. In anderen Bereichen wie der Grundlagenforschung ist die Validierung weitaus schwerer. Es gibt Bestrebungen, organische Vorgänge in einer künstlichen Umgebung außerhalb des lebenden Organismus (in vitro) oder als Computersimulation (in silico) zu untersuchen (Adler et al. 2011). Wenn für einen Versuchszweck keine Alternativmethode vorliegt und der Tierversuch unerlässlich ist, soll die Zahl der Tiere auf das notwendige Minimum reduziert werden (Reduction). Hier spielen die Planung des Studiendesigns und die biometrische Berechnung der Tierzahl eine wichtige Rolle, damit der Versuch aussagekräftige Daten liefert und nicht gegebenenfalls wiederholt werden muss (Flecknell 2002; Smith et al. 2017). Werden alternative Methoden, beispielsweise In-silico-Methoden, dem Tierversuch vorgeschaltet, kann die Zahl der für den Versuch notwendigen Tiere gesenkt werden (Chapman et al. 2013). Programme zur gemeinsamen Nutzung von Organen und Geweben getöteter Tiere tragen ebenso zur Reduction bei (Lang et al. 2018). Durch eine sorgfältige Zuchtplanung und, vor allem im Hinblick auf genetisch veränderte Linien, durch die Möglichkeit zur Kryokonservierung statt einer Erhaltungszucht kann die Zahl sogenannter „Überschusstiere“ reduziert werden.

Um versuchsbedingte Schmerzen, Leiden, Ängste, Distress und dauerhafte Schäden zu reduzieren (Refinement), sollen tierexperimentelle Interventionen, Haltung, Pflege, Umgang mit den Tieren sowie Anästhesie, Analgesie und postoperative Versorgungsmaßnahmen verbessert werden (Flecknell 2002; Golledge et al. 2016).

Im Laufe der Zeit veränderten sich ethische Normen sowie die Beziehung zwischen Mensch und Tier innerhalb der Gesellschaft (Brucker et al. 2015; Max-Planck-Gesellschaft 2016), so dass die Bedeutung des 3R-Prinzips in den letzten Jahren immer größere Bedeutung erfuhr, nicht zuletzt auch wegen der Implementierung der 3R ins Recht (Erwägungsgrund 11 RL 2010/63/EU). So wurden die ursprünglichen 3R immer wieder um weitere R erweitert: Responsibility, Rigour/Reproducibility, Remembering und Rehoming (Iliff 2002; Klein et al. 2007; NCad 2016; Aske et al. 2017).

Responsibility (Verantwortung) beschreibt die zentrale Rolle der Fürsorge-Kultur (Klein et al. 2007). Wer mit Versuchstieren arbeitet, verpflichtet sich zum Schutz dieser Tiere, würdigt den Beitrag, den sie zum Erkenntnisgewinn leisten, und erweitert sein Wissen, um das Wohlbefinden der Tiere stetig zu verbessern. Darüber hinaus fördert die Aus-, Fort- und Weiterbildung die Kultur der Fürsorge. Zudem ist die Forschergemeinschaft in der Verantwortung, ihr Wissen transparent für die Öffentlichkeit zu präsentieren und in Fragen der Tierethik in einen öffentlichen Diskurs zu gehen (National Animal Ethics Advisory Committee 2002; Johnson 2013; DeGrazia et al. 2015; Max-Planck-Gesellschaft 2016).

Rigour (Sorgfalt) und Reproducibility (Reproduzierbarkeit) haben das Ziel, die Qualität, Reproduzierbarkeit und Transparenz wissenschaftlicher Publikationen, die auf tierexperimentellen Untersuchungen basieren, zu verbessern (Aske et al. 2017). Die ARRIVE- (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) und PREPARE-Leitfäden sollen die Planung, Auswertung und Berichterstattung tierexperimenteller Studien verbessern (Kilkenny et al. 2010; Smith et al. 2017).

Remembering (Gedenken/Erinnern) würdigt durch weltliche und religiöse Gedenkveranstaltungen die Mensch-Tier-Beziehung und den Nutzen von Tieren durch den Menschen (Iliff 2002). Auch im Bereich der Wissenschaft können Gedenkstätten oder -veranstaltungen die Anerkennung der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie der Arbeit derjenigen, die sich um ihre Pflege und Wohlbefinden kümmern, stärken (Iliff 2002). Dies wirkt sich positiv auf die Arbeitsatmosphäre aus, denn das Personal von Einrichtungen und Betrieben, in denen Versuchstiere gezüchtet, gehalten oder verwendet werden, wird dadurch emotional unterstützt (Iliff 2002).

Rehoming (Vermittlung) betrifft Tiere, die nach dem tierexperimentellen Versuchsvorhaben nicht getötet werden und deren weitere Verwendung nicht vorgesehen ist (NCad 2016). Die Versuchstiere sollen nach Abschluss des Tierexperimentes bei Privatpersonen als Haustiere untergebracht werden. Rechtliche Voraussetzungen dafür sind aber, dass mehr als geringfügige Schmerzen, Leiden oder Schäden für das weitere Leben ausgeschlossen werden und der Gesundheitszustand der Tiere ein Rehoming zulässt. Außerdem darf das Tier weder die Gesundheit von Mensch noch Tiere oder die Umwelt gefährden. Für privat unterzubringende Tiere müssen Sozialisierungsprogramme (Adams et al. 2004) bzw. für Wildfänge Auswilderungsprogramme zur Verfügung stehen (Artikel 19 und Artikel 29 RL 2010/63/EU, § 10 TierSchVersV).

### **2.3. Begriffsdefinitionen**

Um Wohlbefinden bei Tieren auf wissenschaftlich fundierte Weise zu untersuchen und zu bewerten, müssen die im rechtlichen Kontext verwendeten Begriffe Wohlergehen/Wohlbefinden, Leiden, Schmerzen, Ängste, Stress und Distress sowie Schäden definiert werden (RL 2010/63/EU, TierSchG, TierSchVersV). Dementsprechend basieren die folgenden Definitionen vor allem auf Literatur aus der Rechtswissenschaft.

#### **2.3.1. Wohlbefinden**

Der „Zustand körperlicher und seelischer Harmonie des Tieres in sich und mit der Umwelt“ wird als Wohlbefinden bezeichnet (Sambraus 1997; Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008). Voraussetzung ist ein ungestörter, artgemäßer sowie verhaltensgerechter Ablauf der Lebensvorgänge und die Abwesenheit von Schmerzen, Leiden sowie schweren Ängsten (Sambraus 1997; Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008). Wohlbefinden ist gekennzeichnet durch Gesundheit und Normalverhalten (Sambraus 1997; Lorz et al. 2008).

Das Farm Animal Welfare Council im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland beschreibt Wohlbefinden in Form von 5 „Freiheiten“: Freiheit 1) von Hunger und Durst, 2) von Unbehagen, 3) von Schmerz, Verletzung und Krankheit, 4) von Angst und Distress, 5) zum Ausleben normalen Verhaltens (Farm Animal Welfare Council 2009; Morton et al. 2011). Die 5 Freiheiten wurden auch in den europäischen Verhaltenskodex für Tierärzte aufgenommen (Federation of Veterinarians of Europe (FVE) 2008).

#### **2.3.2. Leiden**

Lorz und Metzger definieren Leiden als „alle vom Begriff des Schmerzens nicht erfassten Beeinträchtigungen im Wohlbefinden, die über ein schlichtes Unbehagen hinausgehen und eine nicht ganz unwesentliche Zeitspanne fortauern“ (Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008; Binder 2009). Diese Definition wurde auch 2000 vom Bundesverwaltungsgericht (BVerwG Urteil vom 18.1.2000, 3 C 12/99, NuR 2001, 454, 455) und Bundesgerichtshof (BGH Urteil vom 18.2.1987, 2StR, 159/86, NJW 1987, 1833, 1834) aufgegriffen.

Einwirkungen, die nicht mit der Wesensart, den Instinkten und dem Selbst- sowie Arterhaltungstrieb des Tieres vereinbar sind, lösen Leiden aus (Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008). Leiden setzen sich aus einer psychischen sowie physischen Komponente zusammen (Lorz et al. 2008; Binder 2009; Hendriksen et al. 2011). Der Zustand kann in Intensität und

Dauer variieren – dennoch gelten Augenblicksempfindungen nicht als Leiden (Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008; Binder 2009; Hendriksen et al. 2011). Leiden müssen aber auch nicht nachhaltig und lang andauernd sein (Lorz et al. 2008). Die Leidensfähigkeit kann sich zwischen den einzelnen Spezies graduell unterscheiden (Binder 2009). Leiden umfasst speziesspezifische Äußerungen wie Angst, Distress, starke Aufregung oder Erschöpfung, Trauer, starkes Unwohlsein, Hunger und Durst, Störungen des Verhaltens und/oder der Körperfunktionen (Sambraus 1997; Lorz et al. 2008; Binder 2009). Leiden impliziert nicht, dass ein Tier krank oder verletzt ist, sondern vielmehr dass es seine Bedürfnisse nicht befriedigen kann und sein Normalverhalten beeinträchtigt ist (Sambraus 1997; Hirt et al. 2016).

### 2.3.3. Schmerzen

Die International Association for the Study of Pain definiert Schmerz als eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die in Zusammenhang mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung oder die mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird (Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain 1994). Schmerzstimuli werden über das vegetative Nervensystem ans zentrale Nervensystem weitergeleitet (Melzack et al. 1965; Sambraus 1997; Hirt et al. 2016). Daraufhin werden zum einen automatische Schutzreflexe ausgelöst, so dass die Tiere speziesspezifische Schmerzäußerungen zeigen (Sambraus 1997; Hirt et al. 2016). Zum anderen wird der Schmerz im limbischen System des Gehirns emotional-affektiv verarbeitet und in der Großhirnrinde bewusst erkannt sowie lokalisiert (Hirt et al. 2016; Lorz et al. 2008; Hendriksen et al. 2011). Die Wahrnehmung des Schmerzes erfordert einen funktionierenden zerebralen Kortex und einen Bewusstseinszustand (Wolfensohn et al. 2003; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals 2009), wobei die Schmerzempfindungsfähigkeit immer im Hinblick auf die aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisse beurteilt werden sollte (Binder 2009).

Schmerzen können akut oder chronisch auftreten (Wolfensohn et al. 2003; Binder 2009). Vor allem chronische Schmerzen können zu Distress und anderen pathologischen Veränderungen wie Immunsuppression, Depression, kognitiven oder strukturellen Veränderungen im Gehirn führen, wodurch das Wohlbefinden reduziert wird (National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals 2009). Tiere versuchen, wiederholte Erfahrungen eines Schmerzstimulus zu vermeiden (Sambraus 1997; Wolfensohn et al. 2003). Sie können ihre Erfahrungen auch über beispielsweise Vokalisation oder Pheromone vermitteln, um andere Artgenossen zu warnen (Wolfensohn et al. 2003).

### 2.3.4. Ängste

Die Begriffe Angst sowie Furcht werden in der Literatur unterschiedlich definiert, vor allem die Verwendung der beiden Begriffe im Deutschen und Englischen stimmt teilweise nicht überein.

Angst zählt zu den Grundgefühlen (Ekman et al. 1980; Oatley et al. 1987) und wird als unangenehmer emotionaler Zustand, in dem ein negatives Ereignis erwartet wird, beschrieben (Sambraus 1997; Lorz et al. 2008). Abzugrenzen von der Angst, ist die Furcht, die in einer defensiven Immobilität wie „freezing“ oder einer defensiven Aktion, das heißt Kampf- oder Flucht-Reaktion, resultiert (Lang et al. 2000; Perusini et al. 2015). Tiere erleben Angst in Situationen, die ihrer Natur zuwider sind, oder unter Zwang (Lorz et al. 2008). Es ist davon auszugehen, dass für Tiere Angst belastender als für erwachsene Menschen ist, da Letztere

die intellektuellen Fähigkeiten besitzen, „Rationalisierungsstrategien und Sinnfindungsmechanismen zu entwickeln“ (Binder 2009; Alzmann 2016). Wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge muss zwischen der „state anxiety“ und „trait anxiety“ unterschieden werden (Spielberger 1966; Hodgues et al. 1969). „State anxiety“ wird durch eine bestimmte Situation, beispielsweise einer unbekanntem Umgebung, induziert; „trait anxiety“ beschreibt hingegen eine persönliche Eigenschaft, die auf frühere Erfahrungen vorübergehender Angst (Lister 1990; Belzung et al. 1997; Reiss 1997), aber auch auf genetische oder aufzuchtbedingte Unterschiede zurückzuführen ist (Rex et al. 1996). „State anxiety“ und „trait anxiety“ können bei Labornagern in unterschiedlichen Verhaltenstests untersucht werden (Belzung et al. 1997; File et al. 2004; Bert et al. 2013). In der deutschen Rechtsprechung schließt der Begriff Leiden auch die Angst ein (Hirt et al. 2016).

### 2.3.5. Stress und Distress

**Stress:** Da Stressoren, also Stress auslösende Faktoren/Situationen, in Abhängigkeit vom Individuum, Tierstamm sowie -spezies unterschiedliche Reaktionen hervorrufen und verschiedene Parameter beeinflussen können, liegen viele Definitionen von Stress vor.

Das Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals des National Research Council (USA, Vereinigte Staaten von Amerika) beschreibt Stress als eine tatsächliche oder wahrgenommene Störung der physiologischen Homöostase oder des psychischen Wohlbefindens. Der Körper begegnet Stressoren, unter anderem Training mit negativer Verstärkung, Fixierung, Gefahren physischer Verletzungen, Hunger, Durst, Pharmaka oder Infektionen, unbewusst mit Bewältigungsmechanismen, sogenannten Coping-Strategien, um eine Rückkehr zum normalen Zustand zu bewirken. Coping-Strategien sind spezies- und stammspezifische Verhaltensweisen. Dabei werden der Sympathikus sowie das Nebennierenmark aktiviert, Stresshormone ausgeschüttet und das Immunsystem aktiviert (Wolfensohn et al. 2003; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008).

Da Stressoren nicht immer unangenehm, sondern auch angenehm sein können, führte Selye die Begriffe Eustress und Distress ein (Szabo 1998; Hendriksen et al. 2011). Stressreaktionen können sogar erwünschte Effekte auslösen: Indem das sympatho-adrenomedulläre System aktiviert wird, erhöht sich der Blutfluss zur Muskulatur und die Konzentration an zirkulierender Glukose im Blut, so dass Kampf- oder Flucht-Reaktionen verstärkt werden (National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008).

**Distress:** Distress wird als ein aversiver, negativer Zustand, in dem der Körper nicht mehr mithilfe von Bewältigungs- und Anpassungsstrategien in eine physiologische und/oder psychologische Homöostase zurückgeführt werden kann, beschrieben (Moberg 1987; Carstens et al. 2000; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008). Wenn ein Tier nicht mehr in der Lage ist, einen Stressor bzw. mehrere Stressoren zu bewältigen, und das Normalverhalten beeinträchtigt ist, geht Stress in Distress über (Lorz et al. 2008; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008; Binder 2009; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals 2009; Hendriksen et al. 2011).

Nach Moberg werden die Ressourcen eines Tieres, die für biologische Funktionen notwendig sind, umverteilt, wenn ein Stressor einsetzt. Ein Teil dieser Ressourcen wird für die Bewältigung des Stressors eingesetzt, so dass dieser Teil für die biologischen Funktionen fehlt

(National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008; Moberg 1999). Distress kann sowohl aus akutem als auch aus chronischem Stress resultieren (Moberg 2000). Dabei wird akuter Stress von einem kurzen Stressor, der wichtige biologische Vorgänge stört oder biologische Ressourcen umverteilt, ausgelöst. Hingegen entsteht chronischer Stress infolge multipler akuter Stressoren, die akkumulieren, so dass deren Bewältigung einen stetig steigenden Anteil an biologischen Ressourcen in Anspruch nimmt und nicht mehr ausreichend biologische Ressourcen für andere Funktionen zur Verfügung stehen (Moberg 2000; Hendriksen et al. 2011). Dementsprechend kann auch die wiederholte Exposition mit dem gleichen Stressor bzw. der gleichen Intervention, zum Beispiel innerhalb eines tierexperimentellen Verfahrens, zu chronischem Stress und damit Distress führen, obwohl sich das Tier nach den einzelnen Interventionen wieder schnell zu erholen scheint (Moberg 2000; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008).

Wenn das Tier die Möglichkeit hat, die Dauer des Stressors zu kontrollieren oder diesen sogar zu verhindern, verringern sich die physischen sowie verhaltensbezogene Auswirkungen des Stressors auf das Tier (Maier et al. 2005; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008).

### 2.3.6. Schäden

Ist der körperliche und seelische Zustand eines Tieres reversibel oder irreversibel negativ beeinträchtigt und somit vom Normalzustand abweichend, liegt ein Schaden vor (Hirt et al. 2016; Binder 2009; Alzmann 2016). Der Normalzustand wird dabei gemessen an Tieren der gleichen Spezies bzw. des gleichen Stammes, die unter seminaturalen oder natürlichen Bedingungen gehalten werden (Hirt et al. 2016).

Ein Schaden muss nicht direkt mit Schmerzen oder Leiden in Verbindung stehen (Hackbarth et al. 2000; Binder 2009; Alzmann 2016), kann aber Ursache oder Folge dieser Zustände sein. Andersherum können Schmerzen oder Leiden einen Schaden verursachen oder einem Schaden folgen (Hackbarth et al. 2000). Ebenso wenig steht ein Schaden immer mit der Verletzung körperlicher Substanz in Verbindung (Hackbarth et al. 2000; Hirt et al. 2016).

Ein Tier vor Schäden zu bewahren, bedeutet, seine Unversehrtheit und demzufolge auch sein Leben zu schützen (Lorz et al. 2008). Daher gilt in der rechtswissenschaftlichen Literatur zum Tierschutzrecht die „vorzeitige Beendigung des Lebens (weitgehend) gesunder Tiere durch einen gewaltsamen, der Tiernutzung dienenden Akt“ (Binder 2009) als größter Schaden für ein Individuum (BVerwG Urteil vom 18.06.1997, Az.: BVerwG 6 C 5/96), zumal der Tod dem Selbstaufbau- und Selbsterhaltungstrieb des Tieres entgegensteht (Hirt et al. 2016; Binder 2009). Hingegen kann die schmerzlose Tötung von kranken Tieren nicht als größter Schaden bewertet werden, da die Euthanasie in diesen Fällen geboten ist (Hackbarth et al. 2000). Nach Luy besitzt die schmerzlose Tötung von Tieren keinen moralischen Status (Luy 1998). Wie die Tötung eines Tieres bewertet wird, hängt davon ab, ob ein vernünftiger Grund vorliegt (Hackbarth et al. 2000) – ein unbestimmter Rechtsbegriff, der sich stetig mit den „Gerechtigkeits- und Richtigkeitsvorstellungen der Gesellschaft“ weiterentwickelt (Chmielewska et al. 2015).

## 2.4. Belastungsbeurteilung von tierexperimentellen Verfahren

### 2.4.1. Belastungsbeurteilung gemäß Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU

Im deutschen Tierschutzrecht existiert der Begriff „Belastung“ als solches nicht. Er wird aber als Sammelbegriff für Schmerzen, Leiden oder Schäden verwendet. Jedes tierexperimentelle Verfahren kann mit Schmerzen, Leiden oder Schäden einhergehen und das Wohlbefinden der Tiere reduzieren, wodurch das Versuchstier belastet wird. Gemäß Artikel 15 Absatz 1 RL 2010/63/EU muss die Belastung der Tiere in Tierversuchen beurteilt und dementsprechend der Schweregrad des Verfahrens klassifiziert werden. Im Anhang VIII der RL 2010/63/EU werden die Schweregrade „gering“, „mittel“, „schwer“ oder „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ definiert. Darüber hinaus werden Zuordnungskriterien beschrieben und entsprechende Beispiele vorgestellt:

- „Keine Wiederherstellung der Lebensfunktion: Verfahren, die gänzlich unter Vollnarkose durchgeführt werden, aus der das Tier nicht mehr erwacht, werden als ‚keine Wiederherstellung der Lebensfunktion‘ eingestuft“ (Anhang VIII RL 2010/63/EU).
- „Gering: Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie bei den Tieren kurzzeitig geringe Schmerzen, Leiden oder Ängste verursachen sowie Verfahren ohne wesentliche Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere werden als ‚gering‘ eingestuft“ (Anhang VIII RL 2010/63/EU).
- „Mittel: Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie bei den Tieren kurzzeitig mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste oder lang anhaltende geringe Schmerzen verursachen sowie Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine mittelschwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere verursachen, werden als ‚mittel‘ eingestuft“ (Anhang VIII RL 2010/63/EU).
- „Schwer: Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie bei den Tieren starke Schmerzen, schwere Leiden oder Ängste oder lang anhaltende mittelstarke Schmerzen, mittelschwere Leiden oder Ängste verursachen sowie Verfahren, bei denen zu erwarten ist, dass sie eine schwere Beeinträchtigung des Wohlergehens oder des Allgemeinzustands der Tiere verursachen, werden als ‚schwer‘ eingestuft“ (Anhang VIII RL 2010/63/EU).

Verfahren, die „starke Schmerzen, schwere Leiden oder schwere Ängste verursach[en], die voraussichtlich lang anhalten und nicht gelindert werden können“, werden als „schwerst“ belastend eingestuft und sind grundsätzlich verboten (Anhang VIII RL 2010/63/EU). Diese Obergrenze an Schmerzen, Leiden und Schäden darf nur dann überschritten werden, wenn ein Mitgliedsstaat von der Schutzklausel in Artikel 55 Absatz 3 der RL 2010/63/EU Gebrauch macht und in wissenschaftlich begründeten Fällen Ausnahmen genehmigt.

Bei der Belastungsbeurteilung werden alle mit dem Verfahren zusammenhängenden Interventionen bzw. Manipulationen eines Tieres berücksichtigt. Dabei spielen auch Faktoren wie beispielweise Tierart und Genotyp, Alter, Geschlecht, der tatsächliche Schweregrad der vorherigen Verfahren bei Wiederverwendung und Refinement-Maßnahmen eine wichtige Rolle (Anhang VIII RL 2010/63/EU). Der Schweregrad muss prospektiv bei Beantragung des Versuchsvorhabens (Artikel 15 Absatz 1 RL 2010/63/EU) eingeschätzt und der tatsächliche Schweregrad nach Versuchsende (Artikel 54 Absatz 2 RL 2010/63/EU) für jedes Individuum beurteilt werden.

Um den Bestimmungen der RL 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere nachzukommen, rief die Europäische Kommission (EC) eine Sachverständigen-Arbeitsgruppe (AG) für die Bewertung des Schweregrades von Verfahren ins Leben. Als Resultat entstand das Arbeitspapier „Rahmen für die Bewertung des Schweregrades (Belastungsbeurteilung)“, das als Leitlinie für die EU-Mitgliedstaaten dienen

und die Umsetzung der RL innerhalb der Mitgliedstaaten harmonisieren soll (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012).

#### **2.4.2. Belastungsbeurteilung in der versuchstierkundlichen Praxis**

Die Belastungsbeurteilung ist ein fortlaufender Prozess, der vor, während und nach dem tierexperimentellen Versuchsvorhaben stattfindet (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Durch die intensive Auseinandersetzung mit dem Schweregrad eines tierexperimentellen Verfahrens werden Überlegungen hinsichtlich der 3R, vor allem in Bezug auf das Refinement, angeregt – damit wird neben dem Tierwohl auch die Qualität der erhobenen Daten erhöht (National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008; National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals 2009; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; RSPCA and LASA 2015). Die Veröffentlichung der verwendeten Bewertungskonzepte und Ergebnisse der retrospektiven Belastungsbeurteilung ist wünschenswert, da die gesamte tierexperimentell arbeitende Gesellschaft, vor allem aber natürlich die Versuchstiere, von den neuen Erkenntnissen profitieren würden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015). Allerdings ist eine retrospektive Belastungsbeurteilung nicht bei allen Versuchsvorhaben zwingend erforderlich und die Ergebnisse werden bisher noch nicht veröffentlicht. Zudem verbessert die jährliche Berichterstattung des tatsächlichen Schweregrades tierexperimenteller Verfahren die Transparenz gegenüber der Öffentlichkeit (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; RSPCA and LASA 2015).

**Prospektive Belastungsbeurteilung:** Bei der Projektplanung (Kilkenny et al. 2010; Smith et al. 2017) spielt die Wahl des Tiermodells, des Studienkonzepts und der möglichen Refinement-Maßnahmen eine entscheidende Rolle, um die Belastung schon im Vorhinein zu minimieren (Hawkins et al. 2011; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Lilley et al. 2014). Wirksame Refinement-Maßnahmen umfassen Analgesie und Anästhesie, postoperative Versorgung, soziales Enrichment bei geselligen Arten und Stressfreiheit in Haltung, Pflege sowie Umgang mit den Tieren (Handling, Tiertraining mit positiver Verstärkung) (Flecknell 2002; Hurst et al. 2010; Hawkins et al. 2011; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Golledge et al. 2016; Leidinger et al. 2017). Die prospektive Belastungsbeurteilung erfolgt – nach Anwendung der entsprechenden Refinement-Maßnahmen – projekt-, art- sowie stammspezifisch in Orientierung an die in Anhang VIII der RL 2010/63/EU genannten Beispiele und gemäß dem aktuellen Stand der Erkenntnisse (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Sie basiert auf dem höchsten Schweregrad, der für die Tiere der geplanten Studie prognostiziert wird (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Anhand von versuchs-, art- und stammspezifischen Überwachungssystemen sollen Beeinträchtigungen durch das Verfahren, aber auch – im gesamten Lebensverlauf erfasste – nachteilige Auswirkungen durch Haltung, Pflege und Umgang erfasst werden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015).

Alle mit den Tieren betrauten Personen müssen die erforderlichen Kenntnisse haben, um im Verlauf des Projekts die Anzeichen von Schmerzen, Leiden und Ängsten erkennen und die Tiere entsprechend versorgen zu können (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Dabei ist vor allem darauf zu achten, dass alle Beteiligten den gleichen Maßstab bei der Überwachung der Tiere anwenden, so dass die Belastungsbeurteilung einheitlich durchgeführt wird (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Während des Projekts ist die enge Zusammenarbeit und Kommunikation zwischen Tierpfleger und -arzt, Tierschutzbeauftragten, Versuchsleiter sowie -durchführenden essenziell (Hawkins



et al. 2011; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015).

**Interventionen und Humane Endpoints:** Um zu verhindern, dass der prospektiv festgelegte Schweregrad überschritten wird, werden Interventionen und Abbruchkriterien (Humane Endpoints) schon bei der Projektplanung festgelegt (Hawkins et al. 2011; Hendriksen et al. 2011; Morton et al. 2011; Fentener van Vlissingen et al. 2015; Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte 2017). Wenn projektbezogene Symptome auftreten, müssen Interventionen ergriffen werden, um damit verbundene Schmerzen, Leiden, Ängste, Stress oder Schäden zu minimieren (National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals 2008; Hawkins et al. 2011; Hendriksen et al. 2011; Bugnon et al. 2016; Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte 2017). Wird ein Abbruchkriterium erreicht, muss der Versuch für das jeweilige Tier beendet und das Tier entsprechend seinen Zustands versorgt werden (Wolfensohn et al. 2003; Hawkins et al. 2011; Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte 2017). In Abhängigkeit von den Symptomen zählen zu möglichen Maßnahmen Analgesie, Rehydratation, Angebot von Futter/Wasser bzw. aufgeweichtem Futter auf dem Käfigboden, Wärmezufuhr oder auch Euthanasie (Hawkins et al. 2011; Bugnon et al. 2016; Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte 2017).

**Retrospektive Belastungsbeurteilung:** Nach Projektende wird der tatsächliche Schweregrad des tierexperimentellen Verfahrens ermittelt, indem die Score Sheets sowie darüberhinausgehende Auffälligkeiten bei der täglichen Inaugenscheinnahme und gegebenenfalls weitere Indikatoren für das Wohlbefinden der Tiere, die im Verlauf der Studie erfasst wurden, herangezogen werden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Für jedes Tier wird der höchste im Verlauf des Verfahrens aufgetretene Schweregrad dokumentiert (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Dabei müssen alle Erfahrungen, die im gesamten Lebensverlauf gesammelt wurden, berücksichtigt werden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015). Unter anderem spielen auch die Invasivität oder Wiederholungen der Interventionen, Einzel- oder Gruppenhaltung und der Tagesrhythmus der Tiere eine Rolle (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012).

Gesetzlich verpflichtend vorgeschrieben ist eine rückblickende Bewertung des gesamten Projekts für alle „schwer“ sowie „schwerst“ belastenden Tierversuche und für alle Verfahren, in denen Primaten eingesetzt werden (Artikel 39 Absatz 2 RL 2010/63/EU). Die rückblickende Projektbeurteilung beinhaltet unter anderem auch den Schweregrad des Verfahrens (Artikel 39 Absatz 1 RL 2010/63/EU). Die EU-Mitgliedstaaten können Verfahren mit den Schweregraden „gering“ oder „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ von der rückblickenden Bewertung ausnehmen (Artikel 39 Absatz 3 RL 2010/63/EU). Ob eine rückblickende Bewertung für Verfahren mit den Schweregraden „gering“ oder „mittel“ erforderlich ist, kann bei der Projektbeurteilung festgelegt werden (Artikel 38 Absatz 2 RL 2010/63/EU). Dabei bewertet die zuständige Behörde das Erreichen des Projektziels, den Schaden, die Anzahl sowie Art der eingesetzten Versuchstiere, den Schweregrad und weitere potenzielle 3R-Maßnahmen auf Basis der Projektunterlagen, die zur Verfügung gestellt werden müssen (Artikel 39 Absatz 1 RL 2010/63/EU).

### 2.4.3. Belastungsbeurteilung von wiederholten Interventionen

Werden innerhalb eines Verfahrens Interventionen wie Narkosen wiederholt durchgeführt, kann sich der Effekt dieser Intervention auf das Wohlbefinden der Tiere über die Zeit verändern. Einerseits besteht die Möglichkeit eines Gewöhnungseffekts, wodurch sich der Schweregrad bei Wiederholungen verringert. Andererseits kann sich der Schweregrad aber auch erhöhen, wenn die Tiere negative Erfahrungen mit der Intervention bzw. den Wirkungen der Pharmaka verbinden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Daher kann der Schweregrad wiederholter Interventionen nicht einfach addiert werden. Es

muss gesondert untersucht werden, inwiefern das Wohlbefinden der Tiere beeinträchtigt ist, wenn dieselben Eingriffe oder Behandlungen mehrfach durchgeführt werden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012).

Von wiederholten Interventionen, die innerhalb eines Verfahrens stattfinden, ist die erneute Verwendung eines Tieres in einem anderen (darauffolgenden) Verfahren abzugrenzen. Laut Artikel 16 Absatz 1 der RL 2010/63/EU darf ein Tier aus einem vorherigen Verfahren mit dem Schweregrad „gering“ oder „mittel“, erneut in einem weiteren Verfahren mit dem Schweregrad „gering“, „mittel“ oder „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“ eingesetzt werden, wenn sein allgemeiner Gesundheitszustand und sein Wohlergehen vollständig wiederhergestellt sind. Dabei hängt die erneute Verwendung von der tierärztlichen Empfehlung unter Berücksichtigung aller Erfahrungen im gesamten Lebensverlauf des Tieres ab (Erwägungsgrund 25 RL 2010/63/EU). Nach Erwägungsgrund 25 der RL 2010/63/EU müssen die Vorteile der erneuten Verwendung gegen die negativen Auswirkungen auf das Wohlergehen der Tiere abgewogen werden, was für jeden Einzelfall überprüft werden muss.

#### **2.4.4. Tools zur Belastungsbeurteilung von Mäusen**

Für die Beurteilung des tatsächlichen Schweregrades eines tierexperimentellen Verfahrens muss das Wohlbefinden der Tiere erfasst werden. Generell wird Wohlbefinden anhand von zwei Kategorien, ressourcenbasiertes Input (Haltung, Ernährung, Umgebung, Management etc.) und tierbasiertes Outcome (physische, physiologische/biochemische und verhaltensbezogene Parameter) (Hawkins et al. 2011), evaluiert (Leach et al. 2008a; Leach et al. 2008b). Die Belastung eines Tieres durch ein Verfahren hängt aber vom versuchsbedingten Einfluss auf das Wohlbefinden des Tieres ab, so dass sich für die Belastungsbeurteilung vor allem tierbasierte Parameter für Wohlbefinden anbieten (Spangenberg et al. 2016).

Voraussetzung, um Wohlbefinden bewerten zu können, ist die Definition des idealen Zustands („ideal welfare state“) eines Tieres in Abhängigkeit von Tierspezies und -stamm. Dieser Zustand liegt vor, wenn die ernährungs-, umwelt-, gesundheits- sowie verhaltensbedingten und mentalen Bedürfnisse eines Tieres befriedigt sind (Mellor et al. 1994; Hawkins et al. 2011). Wenn ein Protokoll zur Beurteilung von Wohlbefinden entwickelt wird, sollten alle Komponenten berücksichtigt werden und angemessene Indikatoren für Wohlbefinden gewählt werden (Hawkins et al. 2011).

Entsprechend des Welfare Quality® Projekts können die tierbasierten physischen, physiologischen/biochemischen und verhaltensbezogenen Indikatoren auch den vier Kategorien „good housing“, „good feeding“, „good health“ und „appropriate behavior“ zugeordnet werden (Blokhuis et al. 2010; Spangenberg et al. 2016). Die Indikatoren müssen an das jeweilige Verfahren, Tierspezies sowie -stamm angepasst und durch eine standardisierte Terminologie definiert werden (Hawkins et al. 2011; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015; Bugnon et al. 2016; Golledge et al. 2016). Zudem müssen sie objektiv (Hawkins et al. 2011; Bugnon et al. 2016) und praktisch messbar sein (Hawkins et al. 2011). Dabei sollte berücksichtigt werden, dass neben Indikatoren für negative Zustände auch eine Reihe an Indikatoren für positive Zustände vorliegt (Yeates et al. 2008; Hawkins et al. 2011): Gesichtsausdruck (Finlayson et al. 2016), Putz- und Komfortverhalten, Verteilung der Aktivitäts- und Ruhephasen, freiwillige Interaktionen mit Menschen, Neugier und Explorationsverhalten (Spangenberg et al. 2016), soziale Interaktion mit Artgenossen, Sexualverhalten, antizipatorisches Verhalten (van der Harst et al. 2007), Interaktion mit Enrichment, Interesse an Futterbelohnung, Spielverhalten (Boissy et al. 2007), Lernverhalten und Gedächtnisfunktionen. Somit können Abweichungen vom idealen Zustand darauf hindeuten, dass das Wohlbefinden beeinträchtigt ist, aber auch durch positive Erfahrungen (Aufregung beim Spielen) hervorgerufen werden (Hawkins et al. 2011). Das Wissen über Indikatoren positiver Zustände ist allerdings noch begrenzt und bedarf weiterer Forschung.

Um den Zustand eines Tieres zu bewerten, sollte zunächst aus Distanz ohne das Tier zu stören, das allgemeine Erscheinungsbild, Körperposition und Verhalten, aber auch der Käfig (Nest, Nagehölzer, veränderte Fäzes, Blut etc.) begutachtet werden. Anschließend kann der Käfig geöffnet und die Reaktionen der Tiere darauf bzw. provoziertes Verhalten beobachtet werden. Erst danach sollten Parameter, die ein Handling erfordern, evaluiert werden (Wolfensohn et al. 2003; Hawkins et al. 2011). Alle Personen, die für die Beurteilung der Parameter verantwortlich sind, müssen ausreichende Kenntnisse über das Verhalten der jeweiligen Spezies bzw. des Stamms besitzen und in der Begutachtung der Tiere trainiert sein (Hawkins et al. 2011; Bugnon et al. 2016).

In der Praxis wird der Zustand eines Tieres mittels Score Sheets, wie erstmals von Morton und Griffith beschrieben (Morton et al. 1985), in für das Verfahren angemessenen Intervallen evaluiert (Wolfensohn et al. 2003; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Score Sheets sind auf das jeweilige Tierversuchsvorhaben sowie die Spezies bzw. Stamm abgestimmt und sollten stetig überprüft sowie gegebenenfalls angepasst werden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Sie umfassen vor allem physische Parameter, obwohl auch physiologische/biochemische und verhaltensbezogene Parameter zentrale Rollen für das Wohlbefinden der Tiere und somit deren Belastung spielen. Protokolle zur systematischen Überwachung des Wohlbefindens sollten aber alle Komponenten beinhalten. Nur so kann die tatsächliche Belastung eines Tieres durch ein Verfahren systematisch und evidenzbasiert beurteilt werden (Bodden et al. 2018).

**Physische Indikatoren:** In der Literatur auf dem Gebiet der Versuchstierkunde sind verschiedene geeignete physische Indikatoren beschrieben (Wolfensohn et al. 2003; Leach et al. 2008a; Leach et al. 2008b; Hendriksen et al. 2011; Morton et al. 2011; Burkholder et al. 2012; 2012; Fentener van Vlissingen et al. 2015). Neben dem allgemeinen äußeren Erscheinungsbild (Entwicklungs- und Ernährungszustand, Fellzustand, Kot-/Urinabsatz, Körperhaltung, Gang) werden weitere spezifische Parameter von Kopf bis zum Schwanz des Tieres beurteilt (Hawkins et al. 2011; Fentener van Vlissingen et al. 2015; Spangenberg et al. 2016). Dabei müssen mögliche Faktoren, die die Parameter beeinflussen können, berücksichtigt werden, zum Beispiel hängt das Körpergewicht vom Tierstamm, Geschlecht sowie Alter ab (Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte 2017). Ein Körpergewichtsverlust kann durch Stress verursacht (Jeong et al. 2013), aber durch Trächtigkeit, Tumorwachstum oder auch Aszites maskiert werden, so dass sich statt des Körpergewichts eher der Body Condition Score anbietet, wenn diese Zustände erwartet werden (Ullman-Cullere et al. 1999). Der Body Condition Score erfasst, ob skelettale Strukturen, wie Wirbelsäule und Hüfte, sichtbar oder palpierbar sind, und ordnet dem Tier dementsprechend einen Score zwischen 1 (abgemagert) und 5 (adipös) zu (Ullman-Cullere et al. 1999).

**Physiologisch/biochemische Indikatoren:** Als physiologische Parameter stehen beispielsweise Körpertemperatur, Herz- und auch Atemfrequenz zur Verfügung (Meijer et al. 2006; Hawkins et al. 2011). Stresshormone und deren Metabolite spiegeln die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) wider und können als biochemische Parameter eingesetzt werden, um Stress bzw. Wohlbefinden zu beurteilen (Otvic et al. 2015). Bei der Maus kann Kortikosteron im Blut, Speichel oder Haar und Kortikosteronmetabolite in den Fäzes sowie Harn bestimmt werden (Touma et al. 2003; Gong et al. 2015; Otvic et al. 2015; Yu et al. 2015; Jarcho et al. 2016; Nohara et al. 2016). Kortikosteron im Blut (Maus und Ratte: Peak 40 Minuten nach Stressinsult) (Cavigelli et al. 2003; Gong et al. 2015) und Speichel (Kortisol beim Mensch: Peak mit einer Verzögerung von ein bis zwei Minuten nach maximaler Konzentration im Blut) (Kirschbaum et al. 1989) steigen relativ schnell an. Kortikosteronmetabolite im Harn sowie fäkale Kortikosteronmetabolite (FCM) erreichen bei der Maus zwei Stunden (Harn) bzw. acht bis zehn Stunden (Fäzes) nach Stressinsult einen Peak in der Konzentration (Touma et al. 2003). Kortikosteron im Blut und Speichel sowie Kortikosteronmetabolite in den Fäzes sowie Harn reflektieren das akute Stresslevel eines Tieres. Hingegen repräsentiert Kortikosteron im Haar das chronische Stresslevel (Davenport et al. 2008; Otvic et al. 2015; Scorrano et al. 2015). Ein Nachteil der

Analyse von Stresshormonen im Blut und Speichel ist das Fixieren der Tiere während der Probenentnahme, was selbst wiederum Stress verursacht und die Ergebnisse verfälschen kann (Madetoja et al. 2009; Sheriff et al. 2011; Otovic et al. 2015). Im Gegensatz dazu können Kotproben für die Analyse der FCM ohne ein Fixieren der Tiere nichtinvasiv gewonnen werden (Otovic et al. 2015). In Abhängigkeit der Transitzeit im Darm, die unter anderem durch die Aktivität des Tieres beeinflusst wird, erreichen FCM-Konzentrationen acht bis zehn Stunden nach einem Stressinsult das Maximum (Touma et al. 2003). Da die Ausscheidung an Stresshormonen und deren Metabolite von der zirkadianen Rhythmik abhängt, spielt der Zeitpunkt der Probensammlung eine wichtige Rolle (Touma et al. 2003; Touma et al. 2004; Otovic et al. 2015), das heißt, die Proben sollten immer zur gleichen Zeit gewonnen werden.

Physiologische Parameter ändern sich allerdings nicht nur bei aversiven, sondern auch bei positiven Stimuli wie Paarung, Training oder Erwartung einer Belohnung. Daher sollten sie unter Berücksichtigung physischer und verhaltensbezogener Parameter interpretiert werden (Dawkins 2006; Otovic et al. 2015).

**Verhaltensbezogene Indikatoren:** Zu den verhaltensbezogenen Indikatoren zählen Futterraufnahme (Jeong et al. 2013), zirkadianer Rhythmus (Hawkins et al. 2011), Aktivität (Burkholder et al. 2012), Aufrichten („rearing“) (Spangenberg et al. 2016), Spielen (Boissy et al. 2007; Hawkins et al. 2011), Interaktion mit Enrichment (Hawkins et al. 2011), Exploration (Hawkins et al. 2011; Spangenberg et al. 2016), soziale Interaktion mit Artgenossen (Hawkins et al. 2011), Paarungsverhalten (van der Harst et al. 2007; Hawkins et al. 2011), Putzen (Hawkins et al. 2011), Wühlen (Deacon et al. 2001; Deacon 2006; Deacon 2009; Jirkof et al. 2010; Deacon 2012), Nestbau (Deacon 2006; Deacon 2012), Lernverhalten und Gedächtnisfunktionen (Hawkins et al. 2011), antizipatorisches Verhalten (Hawkins et al. 2011), Interesse an Futterbelohnung (Hawkins et al. 2011), Interaktion mit Menschen (Hawkins et al. 2011; Spangenberg et al. 2016), Leichtigkeit beim Handling (Spangenberg et al. 2016), Stereotypien (Spangenberg et al. 2016), Gesichtsmimik (Langford et al. 2010; Sotocinal et al. 2011; Finlayson et al. 2016) und schmerzspezifisches Verhalten wie „twitches“ (Hautfaszikulationen), „flinches“ (Zuckungen durch den gesamten Körper), „staggering“ (taumelnder/schwankender Gang), „belly press“ (Pressen des Bauches gegen den Boden), „writhing“ (Zuckungen im Flankenbereich) (Hawkins et al. 2011; Miller et al. 2016). Da in den vorliegenden Studien Futterraufnahme, Aktivität im Heimatkäfig, Explorations- bzw. Erkundungsverhalten, Wühl- sowie Nestbauverhalten und Mimik beobachtet wurden, werden diese Parameter im Folgenden detailliert beschrieben.

Die Futterraufnahme von Mäusen wird durch Stressoren (Jeong et al. 2013), zum Beispiel postoperativen Stress (Jacobsen et al. 2012) oder chronischen Fixierungsstress (Jeong et al. 2013), reduziert. Die Ursachen dafür sind noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen kann die reduzierte Futterraufnahme darauf zurückgeführt werden, dass im Hypothalamus die Expression von Genen, deren Proteine mit der Futterraufnahme assoziiert sind, durch Stress modifiziert wird (Jeong et al. 2013). Beispielsweise ändert sich die Expression von Ghrelin- und Proopiomelanocortin-mRNA (Messenger-Ribonukleinsäure) bei chronischem Fixierungsstress (Jeong et al. 2013). Zum anderen stehen vermutlich auch der erhöhte Kortikosteron- und der verringerte Leptin-Plasmaspiegel infolge des Stresses mit der Höhe der Futterraufnahme in Verbindung (Jeong et al. 2013).

Auf die zirkadiane Aktivität wirken sich vor allem akute Stressoren aus (Koch et al. 2017). Bei Ratten kann Stress sowohl die Schlafdauer in der Lichtphase (Abou-Ismaïl et al. 2008) als auch die Aktivität in der Dunkelphase reduzieren (Land et al. 1995). Zudem korrelieren Schlafhäufigkeit und -dauer negativ mit dem Gewicht der Nebennieren und positiv mit dem Körpergewicht (Abou-Ismaïl et al. 2007). Ruhe- und Aktivitätsphasen können über automatische Überwachungssysteme erfasst werden (Hawkins et al. 2011).

Nach einem akuten Stressinsult zeigen Mäuse sowie Ratten einiger Stämme ein erhöhtes Explorationsverhalten, was mit stammspezifischen Coping-Strategien (aktiv oder passiv) erklärt wird (Brinks et al. 2007; Nosek et al. 2008). Chronischer Stress kann bei

Mäusen hingegen das Explorationsverhalten senken (Strekalova et al. 2004). In Tests zum Angst-bezogenen Verhalten von Mäusen wird oft Explorationsverhalten beobachtet (Bailey et al. 2009). Ein gesteigertes Explorationsverhalten kann auch direkt mit einem Faktor, der das Wohlbefinden der Tiere verbessert, assoziiert sein: Gemessen anhand fäkaler Kortikosteron-Konzentrationen vermehrt Enrichment das Explorationsverhalten und verringert das Stresslevel (Acklin et al. 2015). Dieser Effekt kann beobachtet werden, wenn der Käfig der Mäuse mit natürlichem Enrichment ausgestattet ist (Acklin et al. 2015). Das Material lässt sich durch die Mäuse manipulieren, also in Form sowie Größe ändern oder an eine andere Position verbringen, so dass die Mäuse mit dem Enrichment den Käfig strukturieren können (Acklin et al. 2015).

Die sogenannten „Luxury Behaviors“ wie Wühl- und Nestbauverhalten werden durch Distress, zum Beispiel ausgelöst von Aggressionen der Käfiggenossen oder postoperativen Stress, beeinträchtigt (Arras et al. 2007; Boissy et al. 2007; Jirkof et al. 2010; Deacon 2012; Gaskill et al. 2013; Jirkof et al. 2013a; Jirkof et al. 2013b; Jirkof 2014; Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b). Wenn das Wohlbefinden bzw. der allgemeine Gesundheitszustand reduziert ist, wühlen die Tiere weniger Material aus den künstlichen Gängen und bauen Nester mit geringerer Komplexität (Arras et al. 2007; Boissy et al. 2007; Jirkof et al. 2010; Deacon 2012; Gaskill et al. 2013; Jirkof et al. 2013a; Jirkof et al. 2013b; Jirkof 2014; Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b). Auch die Mimik von Nagern lässt Rückschlüsse auf Schmerzen und Distress, aber auch auf positive Emotionen zu (Langford et al. 2010; Sotocinal et al. 2011; Finlayson et al. 2016). Mit der MGS kann auf einer 3-Punkteskala von 0–2 anhand der Position der Tasthaare, der Stellung der Ohren, des Grades der Augenöffnung und der Nasen- sowie Wangenwölbung erkannt werden, ob sich ein Tier unwohl fühlt oder gar Schmerzen hat (Langford et al. 2010; Miller et al. 2015; Miller et al. 2016).

**Validierung der tierbasierten Indikatoren für Wohlbefinden:** Ein breites Spektrum an tierbasierten Indikatoren für Wohlbefinden bei Labormäusen ist bereits bekannt. Doch die Indikatoren sollten stetig angepasst und verbessert werden (Hawkins et al. 2011; Hendriksen et al. 2011; Bugnon et al. 2016; Golledge et al. 2016). Damit das Wohlbefinden mittels wissenschaftlich fundierter Parameter bewertet werden kann, müssen die Indikatoren validiert und ihre Spezifität sowie ihre Sensitivität getestet werden (Golledge et al. 2016). Im Sinne des Refinement sollten die Indikatoren innerhalb des tierexperimentell arbeitenden Fachkollegiums verbreitet und ausgetauscht werden (Fentener van Vlissingen et al. 2015; Golledge et al. 2016).

## 2.5. Allgemeinnarkosen bei Mäusen

Eine Allgemeinanästhesie führt reversibel zur Bewusstlosigkeit (Hypnose), Relaxation der Skelettmuskulatur und Analgesie (Flecknell 2016b). Dabei werden die Vitalfunktionen wie die Atmung, das Herz-Kreislauf-System und die Thermoregulation, aber auch die Funktionen von Leber, Nieren und endokrinen Drüsen beeinträchtigt (Erhardt 2012a). Um die unerwünschten Wirkungen gering zu halten, sollte eine Allgemeinanästhesie gut steuerbar sein, das heißt die Einschlaf- und Aufwachphase sollten gut reguliert werden können. Die Steuerbarkeit hängt von der Wahl des Anästhetikums ab (Ammer et al. 2002). Für eine Allgemeinanästhesie stehen Inhalations- und Injektionsanästhetika zur Verfügung (Flecknell 2016b). Inhalationsanästhetika (volatile Hypnotika) werden einem Trägergas zugemischt und durch Inhalation über die Lunge verabreicht. Sie verfügen daher in der Regel über eine gute Steuerbarkeit. Injektionsanästhetika hingegen werden parenteral appliziert und werden zu einem großen Teil metabolisiert. Daher sind sie weniger gut steuerbar als Inhalationsnarkotika (Bovill 2008; Flecknell 2016b).

### 2.5.1. Narkoseregime mit wiederholten Narkosen bei Bildgebungsstudien

Bildgebende Techniken wie Computertomografie (CT), Positronen-Emissions-Tomografie (PET), Single-Photon-Emissions-Computer-Tomografie (SPECT), Magnetresonanztomografie (MRT), hochfrequente Ultraschall-Bildgebung oder optische Methoden wie Biolumineszenz sowie Fluoreszenz (Tremoleda et al. 2012) tragen zum Refinement und zur Reduktion von Tierversuchen bei (Heindl et al. 2008; Lauber et al. 2017). Sie sind nichtinvasiv und ermöglichen, dass longitudinale Verlaufsuntersuchungen am gleichen Tier durchgeführt werden können (Heindl et al. 2008). Somit kann ein Tier als eigene Kontrolle dienen (Lauber et al. 2017). Vor der Zeit von bildgebenden Techniken mussten zu jedem Zeitpunkt Tiere getötet werden, um den Verlauf von Krankheits- oder Heilungsprozesse festzustellen (Heindl et al. 2008). Bildgebende Verfahren finden beispielsweise in tierexperimentellen Studien zu Tumorwachstum (Gambhir 2002), Gelenk- und Knochenverletzung (Tremoleda et al. 2011), kardiovaskulären Erkrankungen (Jaffer et al. 2006), Schlaganfall (Wey et al. 2013) oder neurodegenerativen Krankheiten (Strome et al. 2007) Anwendung.

Um Bildartefakte zu verhindern, bedingt die Bildgebung, dass die Tiere in Narkose gelegt und immobilisiert werden (Dittmar et al. 2004; Hildebrandt et al. 2008). Wenn also die Verlaufskontrolle über einen längeren Zeitraum erfolgt, müssen die Tiere zum Teil mehrfach wiederholt in Narkose gelegt werden (Hildebrandt et al. 2008; Tremoleda et al. 2012). Dazu sind standardisierte Narkoseprotokolle erforderlich, die einen reproduzierbaren Effekt auf die Tiere haben (Flecknell 2016a). Häufig werden das volatile Anästhetikum Isofluran zur Inhalationsnarkose oder die Kombination von Ketamin und Xylazin als Injektionsnarkose bei Mäusen in bildgebenden Verfahren verwendet (Dittmar et al. 2004; Richardson et al. 2005; Hildebrandt et al. 2008). Bei der Wahl der Narkoseform muss die wissenschaftliche Fragestellung der Studie berücksichtigt werden (Albrecht 2015). Wird beispielsweise die Funktion des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors (5-HT<sub>1A</sub>, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor Subtyp 1A) untersucht, muss berücksichtigt werden, dass zum Beispiel Isofluran bei männlichen Marmosets (Yokoyama et al. 2016) und bei männlichen Ratten (Martin et al. 1990) einen Einfluss auf die Rezeptorbindung hat.

### 2.5.2. Inhalationsnarkose mit Isofluran

Isofluran ist ein halogenierter Ether, der als klare, farblose und volatile Flüssigkeit vorliegt (Bovill 2008; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012). Der stechende Geruch führt bei Kaninchen und Meerschweinchen, aber auch Katzen dazu, dass sie die Luft anhalten, so dass sich die Narkoseeinleitung verlängert (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012; Flecknell 2016b). Die Substanz ist stabil gegenüber Atemkalk und Ultraviolettstrahlung; sie ist nicht brennbar oder explosiv (Erhardt et al. 2012b).

**Pharmakokinetik:** Aufgrund der niedrigen Blut-, aber hohen Lipidlöslichkeit diffundiert Isofluran schnell von den Alveolen ins Blut und von dort aus ins zentrale Nervensystem (ZNS), so dass die An- sowie Abflutungszeit kurz ist und die Anästhesietiefe schnell variiert werden kann (Ammer et al. 2002; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012; Flecknell 2016b). Neben der Blut-Hirn-Schranke überwindet Isofluran auch die Plazentaschranke (Fink et al. 2002). Der Blut-Gas-Koeffizient ist relativ niedrig und liegt (bei 37° C) bei 1,4 (Bovill 2008; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012). Ein niedriger Blut-Gas-Koeffizient weist auf eine geringe Verteilung des Inhalationsanästhetikums im Blut und einen raschen Übertritt ins Gehirn hin, was zu einer hohen Geschwindigkeit der An- und Abflutung führt (Ammer et al. 2002). Isofluran wird fast vollständig über die Lunge eliminiert (Holaday et al. 1975; Ammer et al. 2002). Nur 0,2 % Isofluran werden in der Leber metabolisiert und über den Harn ausgeschieden (Holaday et al. 1975; Ammer et al. 2002). Isofluran ist nicht nierentoxisch (Eger 1981; Bovill 2008). Die Lebertoxizität ist zu vernachlässigen, aber nicht ausgeschlossen (Ruxanda et al. 2016). Zudem scheint es neuroprotektiv zu sein (Statler et al. 2006).

**Pharmakodynamik:** Der genaue Wirkmechanismus von Isofluran ist noch unklar, aber die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>,  $\gamma$ -Aminobuttersäure Subtyp A) scheint eine wichtige Rolle zu spielen (Flaishon et al. 2003). Daneben bindet Isofluran an Glutamat-Rezeptoren: Aminomethylphosphonsäure (AMPA)- und N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren werden schwach inhibiert, die Wirkung an Kainat-Rezeptoren hingegen wird verstärkt (Dildy-Mayfield et al. 1996; de Sousa et al. 2000; Yamakura et al. 2000; Yamakura et al. 2001). Letztere sind stark bei GABA-ergen Interneuronen vertreten, so dass die Verstärkung der Kainat-Rezeptoren die GABA-Exkretion erhöhen könnte (Akk et al. 2008).

Isofluran besitzt eine gute hypnotische und muskelrelaxierende Wirkung, ist aber nur schwach analgetisch (Schulte am Esch et al. 2000; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012). Die minimale alveoläre Konzentration (MAC<sub>50</sub>), bei der 50 % der Tiere keine Reaktion auf Schmerzreize zeigen, beträgt bei der Maus 1,34 % (Henke et al. 2012). Bei Ratten kann Isofluran zu einer anterograden Amnesie (Dutton et al. 2002) und kognitiven Defiziten (Cao et al. 2012) führen, bei Mäusen kann Isofluran in Abhängigkeit von der Konzentration und Expositionsdauer ebenfalls das Lernverhalten und Gedächtnis stören (Valentim et al. 2010; Liu et al. 2014). In tiefer Isofluran-Narkose werden keine epileptoiden Aktivitäten im Elektroenzephalogramm beobachtet (Eger 1981). Isofluran besitzt eine antiepileptische Wirkung im Rattenmodell der Temporallappenepilepsie, so dass spontan wiederkehrenden Anfälle nicht auftreten (Bar-Klein et al. 2016). Isofluran hat einen dosisabhängigen hypotensiven und atemdepressiven Effekt (Eger 1981; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012). Seine relaxierende Eigenschaft wirkt sich auch auf die glatte Gefäß- sowie Bronchialmuskulatur in der Lunge aus und reduziert somit die hypoxische Vasokonstriktion und verhindert die Bronchokonstriktion. Letzteres ist durchaus von Vorteil bei Erkrankungen wie Asthma (Eger 1981; Hirshman et al. 1982). Jedoch kann Isofluran Irritationen im Atemtrakt auslösen (Kichko et al. 2015) und wirkt aversiv, vor allem wenn die Tiere dem Inhalationsnarkotikum wiederholt ausgesetzt sind (Moody et al. 2014; Boulanger Bertolus et al. 2015). Beim Meerschweinchen und Chinchilla werden Bronchosekretion und Salivation verstärkt (Erhardt et al. 2012b).

Unter den volatilen Anästhetika besitzt Isofluran die größte Sicherheit für das Herz-Kreislauf-System (Dale et al. 1987) und wirkt gering negativ inotrop (Kemmons et al. 1973; Komai et al. 1987). Allerdings führt Isofluran zur Vasodilatation, so dass sich der periphere Gefäßwiderstand vermindert (Eger 1981). Damit sinkt der Blutdruck und eine kompensatorische Tachykardie stellt sich ein (Eger 1981; Dale et al. 1987; Ammer et al. 2002; Ensinger 2005). Obwohl sich das Schlagvolumen verringern kann, bleibt das Herzzeitvolumen gleich, da sich die Herzfrequenz erhöht (Eger 1981; Erhardt et al. 2012b). Isofluran verändert die Organdurchblutung: Neben einer verminderten Perfusion des Myokards und der Nierenrinde wird auch ein geringerer intestinaler sowie muskulärer Blutfluss beobachtet (Hartman et al. 1992). Als Folge der reduzierten Durchblutung sinkt die glomeruläre Filtrationsrate und damit auch die Harnmenge (Dale et al. 1987). Hingegen erhöht Isofluran die zerebrale Durchblutung, wodurch der Hirndruck gering steigt (Cucchiara et al. 1974).

**Anwendung:** In Deutschland ist Isofluran für Mäuse, Gerbils, Ratten, Chinchillas, Frettchen, Hamster, Meerschweinchen, Reptilien, Ziervögel, Brieftauben (außer Tiere, die der Lebensmittelgewinnung dienen), Hunde, Katzen und Pferde (außer Stuten, deren Milch für den menschlichen Verzehr vorgesehen ist) zugelassen.

Isofluran zählt zu den häufigsten verwendeten Inhalationsanästhetika bei Mäusen (Richardson et al. 2005). In der Regel wird die Flüssigkeit in einem Präzisionsverdampfer, der für Isofluran kalibriert wurde, in einen gasförmigen Zustand verbracht und mittels Trägergas wie Sauerstoff, Luft-Sauerstoffgemisch oder Lachgas dem Tier per inhalationem zugeführt (Hellebrekers et al. 2011). Dabei kann die Konzentration von Isofluran über den Präzisionsverdampfer genau eingestellt werden (Hellebrekers et al. 2011). Die Einleitung erfolgt in einer Narkosekammer mit 3–5 % Isofluran, um einen schnellen und effektiven Bewusstseinsverlust mit minimalen Distress herbeizuführen (Constantinides et al. 2011;

Jacobsen et al. 2012; Albrecht et al. 2014; Albrecht et al. 2014; Miller et al. 2015). Nach Verlust des Stellreflexes werden die Tiere an Nasen- oder Gesichtsmasken angeschlossen und die Narkose bei 2–3 % Isofluran erhalten (Erhardt et al. 2012b; Erhardt et al. 2012c; Flecknell 2016b). Eine endotracheale Intubation ist bei Mäusen mithilfe spezifisch für diesen Zweck angefertigter Instrumente auch möglich, aber technisch sehr schwierig (Flecknell 2016b).

### 2.5.3. Injektionsnarkose mit der Kombination von Ketamin und Xylazin

#### 2.5.3.1. Ketamin

Ketamin zählt zu den Cyclohexanonen (Mion et al. 2013) und ist ein Derivat von Phencyclidin (Mion et al. 2013; Persson 2013). Es liegen zwei Formen von Ketamin vor, das S(+)- und das R(-)-Enantiomer (Mion et al. 2013). Das aktive Enantiomer S(+) wirkt zwei- bzw. viermal stärker als das Racemat bzw. das R(-)-Enantiomer (Mion et al. 2013). Präparate, die in der Veterinärmedizin zugelassen sind, enthalten beide Formen des Ketamins, so dass die Wirkdauer und -stärke dieser racemischen Mischungen zwischen Wirkdauer und -stärke der beiden Enantiomere liegt (Erhardt et al. 2012b; Mion et al. 2013). Der pH-Wert der Injektionslösung liegt zwischen 3,5 und 5,5 (Ensinger 2005; Mion et al. 2013).

**Pharmakokinetik:** Die Plasmaproteinbindung ist gering und die Lipidlöslichkeit hoch, so dass sich Ketamin zwar schnell im Gewebe verteilt, aber – vor allem bei Nachdosierungen – im Fettgewebe akkumuliert (Dayton et al. 1983; Mion et al. 2013). Die Plasma-Halbwertszeit von Ketamin beträgt circa 13 Minuten (Maxwell et al. 2006). In der Leber wird Ketamin hauptsächlich (zu 80 %) durch ein Cytochrom-P450-Enzym zu Norketamin N-demethyliert, das wiederum zu 6-Hydroxy-Norketamin abgebaut und nach Glucuronidierung über Galle sowie Harn ausgeschieden wird (Hijazi et al. 2002; Mion et al. 2013). Bei Ratten wurde allerdings nachgewiesen, dass auch Darm, Niere und Lunge am Metabolismus von Ketamin involviert sind (Edwards et al. 2001; Mion et al. 2013). Bei Menschen kann die Clearance bei Frauen bis zu 20 % höher sein als bei Männern (Sigtermans et al. 2009). Der Metabolit Norketamin ist schwächer aktiv als Ketamin und wird langsamer eliminiert, bei der Maus beträgt die Halbwertszeit von Norketamin 1,5–1,9 Stunden (Mion et al. 2013; Toki et al. 2018). Norketamin wirkt analgetisch bei Nagern (Holtman et al. 2008).

**Pharmakodynamik:** Neben der antagonistischen Wirkung am NMDA-Glutamat-Rezeptor interagiert Ketamin auch mit Non-NMDA-Glutamat-Rezeptoren, cholinergen, monoaminergen, nikotinergen und muskarinergen Rezeptoren sowie Opioid-Rezeptoren (Kohrs et al. 1998; Mion et al. 2013; Persson 2013). Der Hauptangriffspunkt für die wichtigsten pharmakologischen Eigenschaften von Ketamin ist allerdings der NMDA-Rezeptor (Kohrs et al. 1998; Mion et al. 2013). Ketamin bindet an die Phencyclidin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptor-Kanal-Komplexes, die auf der Innenseite des Kanals liegt und die Magnesium-Bindungsstelle teilweise überlappt, und wirkt somit nichtkompetitiv antagonistisch auf die Glutamat-Aktivierung des Kanals (Kohrs et al. 1998). Dadurch wird der Kanal blockiert und die Kalzium-, Kalium- sowie Natrium-Ionen können den Kanal nicht mehr passieren (Kohrs et al. 1998; Ensinger 2005; Starke 2005). Ketamin wirkt aber nicht nur am exzitatorischen (NMDA), sondern auch am inhibitorischen Signalweg (GABA<sub>A</sub>), wobei der Einfluss auf ersteren größerer ist (Hevers et al. 2008). Ketamin moduliert zerebellare GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit  $\alpha 6$ - und  $\delta$ -Untereinheiten bei anästhetischen Dosen und aktiviert diese direkt bei hohen Konzentrationen (Hevers et al. 2008), wobei die durch Ketamin herbeigeführte Immobilisierung allerdings nicht durch eine Blockade des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors aufgehoben werden kann (Sonner et al. 2003).

Ketamin ist ein dissoziatives Anästhetikum, das heißt, dass sich eine funktionelle und elektrophysiologische Spaltung im ZNS einstellt, da das thalamokortikale System und somit insbesondere die Wahrnehmung gedämpft, aber das limbische System stimuliert wird (Corssen et al. 1966; Erhardt et al. 2012b; Mion et al. 2013; Zoetis Deutschland GmbH 2013). Wenn sensorische Inputs das kortikale Zielareal erreichen, können sie in den assoziativen



Arealen nicht verarbeitet werden (Schulte am Esch et al. 2000; Mion et al. 2013). Ketamin besitzt analgetische, sedative sowie hypnotische Eigenschaften und verursacht eine Amnesie des Kurzzeitgedächtnisses (Kohrs et al. 1998; Li et al. 2016; Flecknell 2016b). Beim Menschen können nach Ketamin-Applikation Halluzinationen, Stimmungsschwankungen oder Alpträume auftreten (Seamans 2008; Blagrove et al. 2009; Flecknell 2016b).

Aufgrund der zentralen Stimulation erhöht sich der Skelettmuskeltonus (Mion et al. 2013; Amornyotin 2014; Flecknell 2016b). Die Muskelaktivität produziert Wärme und birgt somit die Gefahr der Hyperthermie (Posner et al. 2007). Allerdings liegen auch Studien darüber vor, dass Ketamin zur Hypothermie führen kann, indem 5-Hydroxytryptamin (5-HT) im Hypothalamus freigesetzt wird (Fahim et al. 1973). Wird Ketamin in einer anästhetischen Konzentration verabreicht, bleibt der Lidspalt geöffnet (Mion et al. 2013) und die Schutzreflexe wie der Laryngeal- sowie Pharyngealreflex bleiben erhalten (Flecknell 2016b). Salivation sowie Bronchialsekretion werden angeregt (Li et al. 2016).

Während sich die Atemfrequenz reduziert und häufig ein apnoisches Atemmuster auftritt, steigen kardiovaskuläre Parameter wie Blutdruck, Pulsfrequenz und das Herz-Zeit-Volumen an (White et al. 1982; Mion et al. 2013; Amornyotin 2014; Li et al. 2016; Flecknell 2016b; Tyler et al. 2017).

### 2.5.3.2. $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist Xylazin

Xylazin ist ein Thiazinderivat und wird als Hydrochlorid angewendet (Ammer et al. 2002).

**Pharmakokinetik:** Xylazin ist lipophil und reichert sich sehr rasch im Körpergewebe an (Garcia-Villar et al. 1981). Die Bioverfügbarkeit variiert in Abhängigkeit von der Tierart zwischen 20 und 90 % (Garcia-Villar et al. 1981; Ammer et al. 2002). Xylazin wird in der Leber metabolisiert; die Metaboliten werden über die Nieren ausgeschieden (Garcia-Villar et al. 1981; Park Choo et al. 1991). Die Plasma-Halbwertszeit von Xylazin nach intraperitonealer Injektion beträgt bei jungen Ratten 1,3 Stunden (Veilleux-Lemieux et al. 2013). Für Mäuse liegen dazu bisher keine Daten vor, aber vermutlich ist die Plasma-Halbwertszeit bei Mäusen kürzer als bei Ratten (Xu et al. 2007; Veilleux-Lemieux et al. 2013; Erickson et al. 2016).

**Pharmakodynamik:** Xylazin ist ein  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist (Paddleford et al. 1999). Neben  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren bindet Xylazin auch an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren mit einem Rezeptorbindungsverhältnis von 160 : 1 ( $\alpha_2$  :  $\alpha_1$ ) (Virtanen et al. 1988). Xylazin bindet sowohl an zentrale als auch an periphere prä- und postsynaptische  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren (Paddleford et al. 1999; Ammer et al. 2002). Dadurch wird das inhibitorische  $G_i$ -Protein aktiviert und die Adenylatzyklase gehemmt, wodurch der Spiegel an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) sinkt (Paddleford et al. 1999; Ma et al. 2005; Elliott 2008). Präsynaptisch wird dadurch der Kalium-Ausstrom erhöht, was zur Hyperpolarisierung der Neuronenmembran führt und die Erregungsweiterleitung hemmt (Paddleford et al. 1999; Ma et al. 2005; Elliott 2008). Somit strömt kein bzw. weniger Kalzium in die Präsynapse ein (Paddleford et al. 1999; Ma et al. 2005; Elliott 2008). Eine geringere Konzentration an Kalzium-Ionen reduziert die Freisetzung von Neurotransmittern wie Noradrenalin in den synaptischen Spalt (Paddleford et al. 1999; Ma et al. 2005; Elliott 2008). Postsynaptisch reduziert die Hyperpolarisation die Aktivierung spannungsabhängiger NMDA-Rezeptoren, indem die Blockierung durch Magnesium-Ionen verstärkt wird (Ma et al. 2005).

Indem Xylazin die  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren im ZNS aktiviert, bewirkt es eine lang andauernde Sedation und eine Muskelrelaxation (Paddleford et al. 1999). Der analgetische Effekt hingegen ist nur von kurzer Dauer (Paddleford et al. 1999; Flecknell 2016b), bei einer Applikation von 0,1–0,2 mg/kg in der postoperativen Phase circa 30 Minuten (Henke et al. 2015). Bei einigen Spezies, zum Beispiel Katzen, wurden starke Exzitationen infolge äußerer Faktoren wie Lärm oder Manipulationen während der Einschlafphase beobachtet (Erhardt et

al. 2012b). Xylazin senkt den Sympathikotonus und erhöht den Parasympathikotonus (Greene et al. 1988; Paddleford et al. 1999).

Da die zentrale Thermoregulation reduziert ist, besteht die Gefahr einer Hypothermie (Livingston et al. 1984). Der Blutdruck steigt initial kurz an, weil die peripheren postsynaptischen adrenergen Rezeptoren aktiviert werden (Paddleford et al. 1999). Dadurch kontrahieren die glatten Gefäßmuskelzellen und verursachen eine Vasokonstriktion (Paddleford et al. 1999). Nach dem initialen Anstieg sinkt allerdings aufgrund der Aktivierung von zentralen präsynaptischen  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren der Blutdruck wieder (Paddleford et al. 1999). Der zentrale Effekt überwiegt den peripheren und ist lang andauernd (Greene et al. 1988; Ammer et al. 2002). Xylazin verursacht eine kardiovaskuläre und respiratorische Depression (Flecknell 2016b). Die Substanz wirkt bradykard sowie arrhythmogen (Paddleford et al. 1999). Darüber hinaus wird die Atemfrequenz reduziert (Millan et al. 2000; Flecknell 2016b).

Bei Tieren mit Brechreflex kann ein Reflux auftreten, da der Sphinkterdruck der Cardia erniedrigt ist (Paddleford et al. 1999; Flecknell 2016b). Xylazin führt zu einer ausgeprägten Polyurie – zum einen aufgrund der reduzierten Insulinproduktion im Pankreas und der daraus resultierenden Hyperglycämie (Saha et al. 2005), zum anderen durch die Hemmung der Ausschüttung des antidiuretischen Hormons aus dem Hypophysen-Hinterlappen (Greene et al. 1988).

Die Wirkung von Xylazin kann durch die Gabe der  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Antagonisten Yohimbin und Atipamezol antagonisiert werden, wobei bei der Maus Atipamezol effektiver als Yohimbin ist (Flecknell 2016b; Janssen et al. 2017).

Für Nager wurden anxiolytische Eigenschaften von  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-Agonisten beschrieben (Millan et al. 2000), vor allem der  $\alpha_{2A}$ -Adrenorezeptor-Subtyp spielt eine wichtige protektive Rolle bezüglich Depression und Angst (Schramm et al. 2001).

### **2.5.3.3. Anwendung der Kombination von Ketamin und Xylazin**

In der Veterinärmedizin ist Ketamin für Meerschweinchen, Kaninchen, Katzen, Hunde, Schafe, Ziegen, Schweine, Rinder, Pferde (außer Stuten, deren Milch für den menschlichen Verzehr vorgesehen ist) und Xylazin für Hund, Katze, Rind sowie Pferd zugelassen.

Wenn Ketamin und Xylazin in Kombination verabreicht werden, ergänzen sich die positiven Eigenschaften der beiden Substanzen und ihre Nebenwirkungen heben sich weitgehend gegenseitig auf: Die Kombination von Ketamin und Xylazin führt zur Anästhesie mit Bewusstlosigkeit, Relaxation der Skelettmuskulatur sowie Analgesie (Flecknell 2016c). Die beiden Substanzen können zusammen in einer Mischspritze verabreicht werden (Flecknell 2016c). Die Kombination aus Ketamin und Xylazin zählt zu den am häufigsten verwendeten Injektionsnarkosen bei Mäusen (Dittmar et al. 2004). Dabei hängen die Dosierung von Mausstamm, Geschlecht, Alter sowie experimentellen Verfahren (Gargiulo et al. 2012) und die Narkosetiefe sowie -dauer von der Dosierung der beiden Komponenten ab (Arras et al. 2001).

Für die Applikation bei Mäusen wird in der Regel die intraperitoneale Applikationsroute gewählt (Flecknell 2016c). Hier besteht allerdings die Gefahr, intraabdominale Organe zu punktieren (Miner et al. 1969; Gaines Das et al. 2007; Levin-Arama et al. 2016). 10–20 % Fehlinjektionen in beispielweise die Blase, den Darm, das Muskel- oder Fettgewebe können auftreten, so dass Organe verletzt werden und die verabreichten Substanzen sich langsamer bzw. in einem geringeren Ausmaß im Organismus verteilen können (Miner et al. 1969; Gaines Das et al. 2007; Levin-Arama et al. 2016). Zudem können an der Injektionsstelle Entzündungen und nekrotische Veränderungen des Fettgewebes infolge einer Muskelnekrose entstehen, begleitet von erhöhten Alaninaminotransferase (ALT)-, Aspartataminotransferase (AST)- und Kreatinkinase (CK)-Serumwerten (Wellington et al. 2013).

Bei der subkutanen Applikation können geringgradige Ödeme mit Infiltration von Neutrophilen und Lymphozyten auftreten (Levin-Arama et al. 2016). Im Vergleich zur peritonealen Injektion erreichen weniger Mäuse die chirurgische Toleranz und die Dauer bis zum Erreichen dieses Narkosestadiums ist länger (Levin-Arama et al. 2016).

Eine intramuskuläre Injektion sollte vermieden werden, denn es liegen Berichte zu Muskelnekrosen bei Hamstern (Gaertner et al. 1987) und Ratten (Albrecht et al. 2014) sowie Nervendegeneration bei Kaninchen (Vachon 1999) als Folge einer intramuskulären Applikation von Ketamin und Xylazin, in Kombination mit Acepromazin in der Studie von Vachon (1999), vor. Grund für die Gewebeschäden ist der geringe pH-Wert von Ketamin (Vachon 1999; Wellington et al. 2013; Albrecht et al. 2014; Levin-Arama et al. 2016).

Durch die Antagonisierung von Xylazin kann die Anästhesie partiell aufgehoben werden (Flecknell 2016c).

## 2.6. Ziel der Untersuchung

Im Sinne der 3R ist die wiederholte Verwendung von Tieren nur dann sinnvoll, wenn sich dadurch der Schweregrad an Schmerzen, Leiden, Ängsten, Distress und/oder Schäden für das Einzeltier nicht erhöht. Wiederholte Interventionen sollten nicht belastender sein als eine einzelne Intervention, denn die Tierzahl darf nicht auf Kosten des Wohlbefindens einzelner Tiere reduziert werden. Beim Einsatz bildgebender Techniken bietet es sich an, dieselben Tiere zu mehreren Zeitpunkten innerhalb eines Verfahrens zu untersuchen. Damit müssen die Tiere aber auch wiederholt in Narkose gelegt werden. Gemäß Anhang VIII der RL 2010/63/EU gilt eine Allgemeinnarkose zwar als gering belastend, jedoch unabhängig von Anzahl der Narkosen und Gruppe der verwendeten Allgemeinanästhetika. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von einer einmaligen Narkose und wiederholten Narkosen auf das Wohlbefinden von Mäusen, den am häufigsten verwendeten Versuchstieren verglichen. Verwendet wurden die im tierexperimentellen Bereich routinemäßig eingesetzte Inhalationsnarkose mit Isofluran und Injektionsnarkose mit einer Kombination von Ketamin und Xylazin.

### 3. Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia

---

**Autoren:** Katharina Hohlbaum<sup>1,2</sup>, Bettina Bert<sup>2,3</sup>, Silke Dietze<sup>2</sup>, Rupert Palme<sup>4</sup>, Heidrun Fink<sup>2</sup>, Christa Thöne-Reineke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Tierschutz, Tiervershalten und Versuchstierkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>2</sup> Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>3</sup> Aktuelle Adresse: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

<sup>4</sup> Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Department Biomedizinische Wissenschaften, Veterinärmedizinische Universität Wien

**Jahr:** 2018

Journal of Visualized Experiments (J Vis Exp) (133), e57046.

**URL:** [www.jove.com/video/57046](http://www.jove.com/video/57046) (abgerufen am 26.2.2018).

**DOI:** <https://doi.org/10.3791/57046>

**You have to purchase this part online.**

## 4. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

---

**Autoren:** Katharina Hohlbaum<sup>1,2</sup>, Bettina Bert<sup>2,3</sup>, Silke Dietze<sup>2</sup>, Rupert Palme<sup>4</sup>, Heidrun Fink<sup>2</sup>, Christa Thöne-Reineke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>2</sup> Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>3</sup> Aktuelle Adresse: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

<sup>4</sup> Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Department Biomedizinische Wissenschaften, Veterinärmedizinische Universität Wien

**Jahr:** 2017                      **Journal:** PLoS ONE 12(6): e0179588.

**URL:** [journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179588](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0179588) (abgerufen am 26.2.2018).

**DOI:** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588>

**Inhalt:** According to the EU Directive 2010/63, the severity of a procedure has to be classified as mild, moderate or severe. General anesthesia is thought to be mild, but the Directive does not differentiate between single and repeated anesthesia. Therefore, we investigated the impact of repeated administration of isoflurane, the most commonly used inhalation anesthetic, on the well-being of adult C57BL/6JRj mice, in comparison to single administrations and to untreated animals, when applied six times for 45 min at an interval of 3–4 days. For the animals anesthetized, excitations, phases of anesthesia, and vital parameters were monitored. Well-being after anesthesia was assessed using a behavioral test battery including luxury behavior like burrowing and nest building behavior, the Mouse Grimace Scale (MGS), the free exploratory paradigm for anxiety-related behavior, home cage activity and the rotarod test for activity, as well as food intake and body weight. Additionally, hair corticosterone and fecal corticosterone metabolites were measured. Our results show that nest building behavior, home cage activity, body weight, and corticosterone concentrations were not influenced by anesthesia, whereas changes in burrowing behavior, the MGS, food intake, and the free exploratory behavior indicated that the well-being of the mice was more affected by repeated than single isoflurane anesthesia. This effect depended on the sex of the animals, with female mice being more susceptible than male mice. However, repeated isoflurane anesthesia caused only short-term mild distress and impairment of well-being, mainly in the immediate postanesthetic period. Well-being stabilized at 8 days after the last anesthesia, at the latest. Therefore, we conclude that when using our anesthesia protocol, the severity of both single and repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice can be classified as mild. However, within the mild severity category, repeated isoflurane anesthesia ranks higher than single isoflurane anesthesia. Additionally, our results imply that male and female mice can differently perceive the severity of a procedure.

RESEARCH ARTICLE

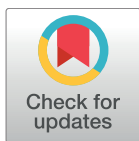
# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

Katharina Hohlbaum<sup>1,2\*</sup>, Bettina Bert<sup>2a</sup>, Silke Dietze<sup>2</sup>, Rupert Palme<sup>3</sup>, Heidrun Fink<sup>2</sup>, Christa Thöne-Reineke<sup>1</sup>

**1** Institute of Animal Welfare, Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **2** Institute of Pharmacology and Toxicology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **3** Unit of Physiology, Pathophysiology and Experimental Endocrinology, Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

<sup>a</sup> Current address: Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

\* [katharina.hohlbaum@fu-berlin.de](mailto:katharina.hohlbaum@fu-berlin.de)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C (2017) Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress. *PLoS ONE* 12(6): e0179588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588>

**Editor:** Zhongcong Xie, Massachusetts General Hospital, UNITED STATES

**Received:** February 2, 2017

**Accepted:** June 1, 2017

**Published:** June 15, 2017

**Copyright:** © 2017 Hohlbaum et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** The study is part of the Berlin-Brandenburg research platform BB3R ([www.bb3r.de](http://www.bb3r.de)) and was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (grant number: 031A262A) ([www.bmbf.de/en/index.html](http://www.bmbf.de/en/index.html)). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

According to the EU Directive 2010/63, the severity of a procedure has to be classified as mild, moderate or severe. General anesthesia is thought to be mild, but the Directive does not differentiate between single and repeated anesthesia. Therefore, we investigated the impact of repeated administration of isoflurane, the most commonly used inhalation anesthetic, on the well-being of adult C57BL/6JRj mice, in comparison to single administrations and to untreated animals, when applied six times for 45 min at an interval of 3–4 days. For the animals anesthetized, excitations, phases of anesthesia, and vital parameters were monitored. Well-being after anesthesia was assessed using a behavioral test battery including luxury behavior like burrowing and nest building behavior, the Mouse Grimace Scale (MGS), the free exploratory paradigm for anxiety-related behavior, home cage activity and the rotarod test for activity, as well as food intake and body weight. Additionally, hair corticosterone and fecal corticosterone metabolites were measured. Our results show that nest building behavior, home cage activity, body weight, and corticosterone concentrations were not influenced by anesthesia, whereas changes in burrowing behavior, the MGS, food intake, and the free exploratory behavior indicated that the well-being of the mice was more affected by repeated than single isoflurane anesthesia. This effect depended on the sex of the animals, with female mice being more susceptible than male mice. However, repeated isoflurane anesthesia caused only short-term mild distress and impairment of well-being, mainly in the immediate postanesthetic period. Well-being stabilized at 8 days after the last anesthesia, at the latest. Therefore, we conclude that when using our anesthesia protocol, the severity of both single and repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice can be classified as mild. However, within the mild severity category, repeated isoflurane anesthesia ranks higher than single isoflurane anesthesia. Additionally, our results imply that male and female mice can differently perceive the severity of a procedure.

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

## Introduction

In laboratory animal science, the most commonly used inhalation anesthetic in rodents is isoflurane [1]. Its use has increased over the last years [2] because of its quick on- and offset of anesthesia and low metabolism rate [3]. Isoflurane causes moderate respiratory and cardiovascular system depression, but maintains better cardiac function than the combination of ketamine and xylazine [3]. However, apart from these advantages, isoflurane was also found to cause reversible deficits in object recognition memory [4], impaired learning function in the cued fear conditioning, and higher anxiety-related behavior in the elevated plus maze in mice in the postanesthetic period [5]. Rabbits even have periods of apnea during the induction of anesthesia with isoflurane indicating a high aversion towards this inhalant agent [6]. In mice and rats, repeated administration of isoflurane is more aversive than a single administration [7]. Additionally, general anesthesia in rodents is often associated with several side effects, e.g. the disturbance of the circadian rhythm [8] as well as hypothermia and hypoglycemia [9], which can negatively influence the recovery period.

Isoflurane anesthesia is repeatedly performed in studies using imaging techniques for small animal models [10]. In order to apply imaging techniques correctly and to gain the optimum results, animals need to be immobilized by using general anesthesia [11]. Imaging techniques are non-invasive and contribute to reducing the number of animals for an experiment, since several experiments are conducted using a single animal. Instead of euthanizing an animal at each time point of the study, an animal can be examined several times in its life in order to control the progress of diseases like stroke, tumor growth, bone healing, epileptogenesis or neurodegenerative disorders. Therefore, imaging techniques are a great benefit for reduction and refinement. However, in terms of the 3R-principle the benefit of the repeated use of an animal only becomes obvious, when the total amount of pain, distress or harm does not exceed the severity degree of pain, distress or harm of each single manipulation. Hence, with regard to the EU Directive 2010/63 [12], this needs to be evaluated for every test strategy that shall be applied in an animal. The Directive implies to fully apply the 3-R-principle of Russel and Burch [13], i.e. not only to replace animal experiments, but also to reduce the number of animals and to refine animal experiments, whenever they are necessary. Moreover, the severity of a procedure has to be classified as mild, moderate or severe. According to Annex VIII of the EU Directive 2010/63, general anesthesia is considered as mild, though, the Directive does not distinguish between a single and repeated anesthesia. However, in fact, it is unknown whether repeated anesthesia affects well-being in the same way as single anesthesia. We hypothesized that repeated anesthesia may enhance the behavioral and pharmacological effects of isoflurane in laboratory animals and, subsequently, causes additional distress for the animal.

In order to test our hypothesis, we investigated the effects of repeated compared to single isoflurane anesthesia on the well-being of mice. Based on this, we assessed the severity category of repeated isoflurane anesthesia. We chose C57BL/6JRj mice, since they are widely used in research studies [14], and examined both sexes.

In the present study, mice were anesthetized six times for 45 min at an interval of 3–4 days over 3 weeks according to Albrecht et al. [15, 16], which is equivalent to anesthesia protocols performed in imaging studies. Although surgical tolerance is not a mandatory prerequisite for imaging techniques, we induced surgical tolerance, so that the results can also be transferred to studies including repeated minor invasive manipulations like blood or tissue sampling [17]. Well-being was assessed by a broad behavioral test battery in the postanesthetic period and non-invasive analysis of the adrenocortical activity.

## Methods

### Ethics statement

The study at hand was performed according to the guidelines of the German Animal Welfare Act and was approved by the Berlin State Authority (“Landesamt für Gesundheit und Soziales”, permit number: G0053/15). A sample size calculation was performed to determine the number of animals to be used. Experimental methods were refined by closely monitoring the animals after anesthesia. The duration of single housing to measure specific parameters, i.e. nest building behavior, home cage activity, food intake, and fecal corticosterone metabolites (FCM), was kept to a minimum.

### Animals and handling methods

A total number of 32 adult female and 33 adult male C57BL/6JRj mice at the age of 11–13 weeks obtained from Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France) were used. The mice were randomly assigned to the 6 study groups: control ♀ (n = 6), control ♂ (n = 7), single anesthesia ♀ (n = 13), single anesthesia ♂ (n = 13), repeated anesthesia ♀ (n = 13), repeated anesthesia ♂ (n = 13). Female mice were group-housed with 3–5 mice in Makrolon type IV cages (55 × 33 × 20 cm). Male mice had to be single-housed in Makrolon type III cages (42 × 26 × 15 cm) with the beginning of the experiments due to aggressive behavior against conspecifics. The cages contained fine wooden bedding material (LIGNOCEL® 3–4 S, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg, Germany). A red plastic house, tunnels, and nestlets (Ancare, UK agents, Lillico) were provided as cage enrichment. The animals were maintained under standard conditions (room temperature  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; relative humidity  $55 \pm 10\%$ ) on a light:dark cycle of 12:12 hours of artificial light with a 5 min twilight transition phase (lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m.). The mice were fed pelleted mouse diet (Ssniff rat/mouse maintenance, Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and had free access to tap water.

In order to prevent the impact of distress caused by male persons, both animal care attendant and veterinarian were female [18]. The same veterinarian performed all experiments. A week before the experiments started, the mice were habituated to handling by using combined tunnel and cup handling. The mice were carefully caught in a tunnel belonging to the standard enrichment and then transferred to the experimenter’s hands. This method is known to cause less anxiety in mice than picking up the mice by the tail [19].

### Test schedule

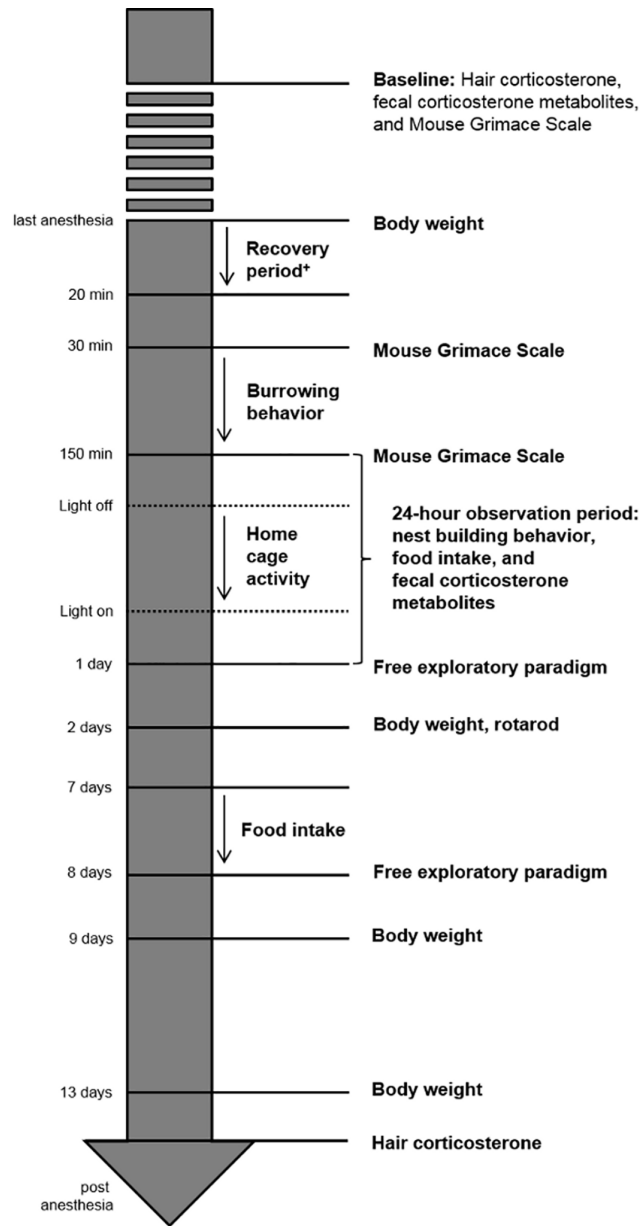
The test schedule is outlined in Fig 1. At the beginning of the experiment, photos for the baseline Mouse Grimace Scale (MGS) score were taken and samples for baseline values of FCM as well as hair corticosterone were collected.

Anesthesia was performed as follows: mice of the group with single anesthesia were anesthetized once for 45 min, mice of the group with repeated anesthesia were anesthetized 6 times for 45 min at an interval of 3–4 days over a period of 3 weeks, and control mice did not receive any anesthesia.

During the induction and after the cut-off of narcosis, the loss and regain of reflexes were observed in order to determine the phases of anesthesia. During anesthesia, vital parameters (i.e. heart rate, oxygen saturation, and respiratory rate) were carefully monitored. After anesthesia, the mice were directly transferred to a custom-made box and their behavior was monitored for 20 min. Photographs of the mouse faces for applying the MGS were taken 30 min after the last anesthesia. 150 min after awakening another photo was taken. In the meantime, burrowing behavior was tested for 2 h. Then all mice were transferred into a (new) Makrolon



# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress



**Fig 1. Flow chart of the test schedule.** + Number [n] of rearings, number [n] of grooming episodes, duration of resting [s], duration of activity [s], duration of food intake [s], and the latency to first food intake [s] were observed during the recovery period.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.g001>

type III cage and single-housed for a period of 24 hours in order to evaluate nest building behavior, to measure food intake, and to collect fecal samples for FCM analysis. Moreover, home cage activity was recorded for 12 h during the dark period. In order to observe a change in anxiety-related and exploratory behavior over time, the free exploratory paradigm was performed at 1 day and 8 days after the last anesthesia. The rotarod test for motor coordination and balance was conducted at 2 days after last anesthesia. Hair samples for corticosterone

measurement were collected at the beginning and at the end of the study, when hair had regrown. Mice were regularly weighted over the whole study period.

## Anesthesia

Anesthesia was induced with 4% isoflurane (Isofluran CP<sup>®</sup>, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Germany) in 100% oxygen in an anesthetic chamber (with sliding cover, Evonik Plexiglas, 240 × 140 × 120 mm), which was not prefilled in order to prevent distress. During induction, the number of mice showing excitations was recorded.

Anesthesia was divided in five anesthetic stages [15]: 1) Induction started when isoflurane was turned on and ended with the loss of righting reflex. 2) Non-surgical-tolerance was defined as the time from loss of righting reflex to loss of pedal withdrawal and lid reflex. 3) Surgical tolerance began with the loss of all reflexes tested and ended when isoflurane administration was terminated after 45 min. 4) Then the wake-up period followed and ended after the first forward movement. 5) Recovery period was defined as the time from the first forward movement until 20 min after anesthesia.

In order to test the loss of righting reflex, the anesthetic chamber was tipped over. After losing their righting reflex, the mice were laid in abdominal position on a heating pad and anesthesia was maintained with 1.75–2.5% isoflurane in 100% oxygen via nose cone for 45 min. Artificial tears (Artelac<sup>®</sup> Splash MDO<sup>®</sup>, Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Germany) were administered to both eyes to prevent the eyes from drying out. When pedal withdrawal and lid reflex were lost, all reflexes were regularly tested. 45 min after induction, isoflurane administration was terminated and the latency to forwards movement, the number of mice showing excitations and/or opisthotonus during wake-up period and mice showing twitches (skin fasciculation) during recovery period were observed.

During anesthesia, vital parameters (respiratory rate, heart rate, and oxygen saturation) were controlled every 10 min. Respiratory rate was counted for 15 sec and then calculated for 1 min [breathes per min]. A pulse oximeter (MouseOx, STARR Life Sciences<sup>®</sup> Corp., Oakmont, PA, USA), attached to the shaved left hind leg, was used to measure heart rate [beats per min] and oxygen saturation [%].

## Recovery period

The mice were video-recorded for 20 min after the first forward movement in the custom-made photography cube. Number [n] of rearings, number [n] of grooming episodes, duration of resting [s], duration of activity [s], and duration of food intake [s] were analyzed with ethological analyses software (Etholog version 2.2.5; Ottoni 1999). Furthermore, the latency to the first food intake [s] was noted. Activity comprised forward movement and sniffing behavior. Grooming behavior was defined as self-grooming including paw licking, nose and face wash, head wash, body wash and fur licking, leg licking, and tail/genitals licking and wash [20].

## Mouse Grimace Scale (MGS)

The MGS was originally developed to assess pain [21]. However, besides pain, stress has also an impact on the MGS [21] and, moreover, positive emotions are indicated by facial expressions [22]. Thus, in the present study, the MGS served as a tool to assess distress. Scores were obtained by photographs taken in a custom-made box used as photography cube (with three white and one clear wall, 22 × 29 × 39 cm, 0.5 cm bedding material) at 2 days before the first anesthesia (baseline), 30 min after the last anesthesia and 150 min after the last anesthesia. For photography, a high definition camera (Canon EOS 350D, Canon Inc., Tokyo, Japan) was used.

The photograph was cropped to display only the head of the mouse so that the body position was not visible [21]. According to Langford et al. [21], five facial action units, i.e. orbital tightening, nose bulge, cheek bulge, ear position, and whisker change, were scored on a scale from 0 to 2 (0 = not present, 1 = moderately present, 2 = obviously present).

Three blinded persons independently analyzed the photographs. For each scorer, the mean of the five facial action units was calculated. Then the MGS difference score was calculated between the baseline MGS score and the mean of MGS score at 30 min and 150 min after last anesthesia, respectively [21]. As the MGS difference scores did not significantly differ between the three observers, the MGS difference score of each mouse was averaged to be used for further statistics.

### Luxury behavior

Luxury behavior like burrowing and nest building behavior are only present when important needs of the mice are met and, thus, can serve as indicators of well-being [23].

**Burrowing behavior.** The test was modified according to Jirkof et al. [24]. A standard opaque plastic water bottle (250 ml, 150 mm length, 55 mm diameter, 45 mm diameter of bottle neck) was filled with  $140 \pm 2$  g food pellets normally supplied as diet and placed parallel to the back wall of the photography cube. After 2 h, when the test ended, the food pellets [g] removed from the bottle by the mice were weighted.

**Nest building behavior.** The nests were scored by using a modified protocol developed by Deacon [25]. A nestlet (Ancare, Bellmore, NY, USA; UK agent: Lillico, Betchworth, UK) with an exact weight of 2.0 g was placed in the middle of the cage (Makrolon type III,  $420 \times 260 \times 150$  mm) bedded with 0.5 cm height of bedding material. In order to reduce distress caused by a new environment, used bedding material without feces from the home cage was scattered on top of the new bedding. No further environmental enrichment items were provided.

2 h after the light was turned on, the nests were assessed on a 5-point scale (1 = more than 90% of the nestlet intact; 2 = 50–90% intact; 3 = 50–90% shredded; 4 = more than 90% shredded but flat nest, less than 50% of its circumference is higher than mouse body height when curled up; 5 = more than 90% shredded and high nest, more than 50% of its circumference is higher than mouse body height when curled up) [25]. Any untorn nestlet pieces, defined as approximately 0.1 g, were weighted.

### Home cage activity

Home cage activity was evaluated by InfraMot (TSE systems, Bad Homburg Germany) during the dark period for 12 hours (6:00 p.m. to 6:00 a.m.). An infrared sensor was mounted on the top of the gridded cage top and recorded the number of impulses per minute. For analysis, impulse intervals of 10 min were used and the area under the time curve (AUC) [impulses/(10 min)] was calculated.

### Free exploratory paradigm

The free exploratory paradigm is a test to investigate trait anxiety-related behavior [26]. The gridded cage top was placed in the cage at an angle of  $45^\circ$  to the longer side of the home cage. Then, the latency to first exploration [s] (with all four paws on the lid) within 10 min was observed.

### Rotarod test

An accelerating rotarod was used to evaluate motor coordination and balance. The mice were placed on the rotating drum at a speed of 4 rounds per minute. The speed of the rotarod

accelerated to 40 rounds per minute. The latency [s] to loose balance and fall off the rotating drum was measured. Some mice held on and rode around the rotarod a few times before they lost their balance. For those mice, the time until they finally fell off the rotarod was recorded. Mice performed 4 trials at 2 days after the last anesthesia, with a maximum of 300 s and 30-min intertrial rest intervals [5, 27]. Trial 1–3 served as training and trial 4 as the test trial.

### Food intake and body weight

Food intake of the standard food diet [g] was manually measured over a period of 24 hours. Since tiny pieces of food pellets may fall through the gridded cage top, the cage side beneath the food unit was carefully scanned.

The body weight [g] was regularly controlled over the experimental period. For analysis, the body weight of day 0, day 2, day 9, and day 14 after last anesthesia was used.

### Corticosterone

FCM with a  $5\alpha$ - $3\beta$ , $11\beta$ -diol structure in feces and hair corticosterone were measured since the sampling techniques are non-invasive. In our study, FCM indicate acute stress during the 24-hour postanesthetic period and hair corticosterone may reflect chronic stress. Since there are differences in baseline values, for each mouse the percentage change [%] relative to baseline was calculated.

**FCM.** The mice were single-housed for a period of 24 hours. In order to prevent distress due to a new cage, used bedding material without feces from their home cage was scattered on top of the new bedding. All dry fecal pellets were collected from the cages by using forceps. Wet pellets contaminated with urine were eliminated.

FCM were extracted from the 24-hour-bulk samples in accordance to Palme et al. [28]. Briefly, fecal samples were dried at a temperature of 60–70°C and then homogenized by a mortar. An aliquot of 0.05 g was shaken with 1 ml of 80% methanol for 30 min on a multi-vortex. After centrifugation (2500 x g, 15 min), 0.5 ml of supernatant was pipetted in an Eppendorf cup. Before and after extraction, the samples were stored at –80°C. The samples were analyzed for corticosterone metabolites using a  $5\alpha$ -pregnane- $3\beta$ , $11\beta$ , $21$ -triol- $20$ -one enzyme immunoassay as described and validated for mice by Touma et al. [29, 30].

**Hair corticosterone.** Hair was cut off with an electric shaver for small animals (Aesculap Isis GT 420, Suhl, Germany). Hair corticosterone [pg/mg] was analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry in the laboratory of Prof. Kirschbaum, Department of Psychology, Technische Universität Dresden, Germany, as described previously [31].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Version 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Explorative data analysis and tests for normality were performed for each parameter. First, differences between female groups (control, single anesthesia, repeated anesthesia), secondly, differences between male groups (control, single anesthesia, repeated anesthesia), and, thirdly, sex differences (female versus male control, female versus male single anesthesia, female versus male repeated anesthesia) were analyzed using the respective test indicated in the result section.

In all tests, differences were considered significant at  $p < 0.05$ . In tables, data are presented as mean  $\pm$  standard deviation, in graphs data are presented as mean  $\pm$  standard error.

# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

**Table 1. Phases of anesthesia.**

Group	Induction [s]	Non-surgical tolerance [s]	Surgical tolerance [s]	Wake-up period [s]
Single anesthesia ♀ (n = 13)	92.62 ± 20.13	107 ± 15.57 <sup>##</sup>	2500.38 ± 30.17 <sup>##</sup>	150.15 ± 98.99
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	117.15 ± 8.07 <sup>***</sup>	173.38 ± 50.21 <sup>***</sup>	2431.00 ± 21.36 <sup>***, #</sup>	105.38 ± 79.96
Single anesthesia ♂ (n = 13)	100.85 ± 15.09	154.77 ± 37.25	2444.38 ± 47.06	126.31 ± 63.46
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	117.38 ± 12.97 <sup>**</sup>	151.46 ± 42.69	2452.69 ± 22.04	89.15 ± 72.04

Data are given as mean ± standard deviation. p values were calculated using Mann-Whitney-U-Test

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001 versus a single anesthesia

# p < 0.05

## p < 0.01 versus ♂.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t001>

## Results

### Anesthesia

**Phases of anesthesia.** In female (U (13, 13) = 154.000, p < 0.001) and male (U (13, 13) = 146.000, p = 0.001) mice, repeated anesthesia significantly prolonged the duration of induction (Table 1). In addition, in female mice, repeated anesthesia prolonged the duration of non-surgical tolerance (U (13, 13) = 161.000, p < 0.001) and shortened the duration of surgical tolerance (U (13, 13) = 1.000, p < 0.001) versus a single anesthesia (Table 1).

Sex differences in mice with a single anesthesia were observed regarding the duration of non-surgical tolerance (U (13, 13) = 143.500, p = 0.002) and surgical tolerance (U (13, 13) = 27.000, p = 0.002) (Table 1). Non-surgical tolerance was significantly shorter and surgical tolerance significantly longer in female mice exposed to single anesthesia. In mice with repeated anesthesia, surgical tolerance was significantly shorter in female than in male mice (U (13, 13) = 132.000, p = 0.014).

**Excitations, opisthotonus, and twitches.** In female and male mice, repeated anesthesia increased excitations, versus a single anesthesia, during induction (female mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 7.8, p = 0.005; male mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 4.887, p = 0.027) but not during the wake-up period (female mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 0.377, p = 0.539; male mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 1.04, p = 0.308) (Table 2). Running excitement, a high muscle tonus of the tail, and movements of the tail were observed and defined as excitations. Opisthotonus (female mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 1.182, p = 0.277); male mice:

**Table 2. Number of mice showing excitations, opisthotonus, and twitches.**

Group	Induction	Wake-up period		Recovery period
	Excitation	Excitation	Opisthotonus	Twitches
Single anesthesia ♀ (n = 13)	7	2	3	3
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	13 <sup>**</sup>	1	1	2
Single anesthesia ♂ (n = 13)	7	0	2	1
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	12 <sup>*</sup>	1	0	1

Data are number of mice. p values were calculated using Chi-Square-Test

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01 versus single anesthesia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t002>

# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

**Table 3. Vital parameters.**

Group	Heart rate (bpm)	Oxygen saturation (%)	Respiratory rate (brpm)
Single anesthesia ♀ (n = 9)	489.67 ± 31.65	98.51 ± 0.19	97.5 ± 15.12
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	530.27 ± 36.83*	98.46 ± 0.21	105.08 ± 11.90
Single anesthesia ♂ (n = 10)	483.08 ± 32.24	98.49 ± 0.30	91.38 ± 15.93
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	549.06 ± 50.52**	98.5 ± 0.25	98.37 ± 12.34

Data are given as mean ± standard deviation. bpm, beats per min; brpm, breaths per min. p values were calculated using unpaired Student t-test

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01 versus single anesthesia. Due to malfunction of the pulse oximeter, 4 female mice and 3 male mice of the single anesthesia group had to be excluded from statistics.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t003>

Chi<sup>2</sup> (1) = 2.167; p = 0.141) only occurred during the wake-up period and twitches (female mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 0.248, p = 0.619; male mice: Chi<sup>2</sup> (1) = 0, p = 1) during the recovery period. The frequency of opisthotonus and twitches did not differ between the groups. No sex differences were found.

**Vital parameters.** The mean ± standard deviation were calculated from all four measurements of heart rate, oxygen saturation, and respiratory rate (Table 3). In female (t (20) = -2.687, p = 0.014) and male mice (t (21) = -3.595, p = 0.002), repeated anesthesia significantly increased heart rate, versus a single anesthesia. In both sexes, oxygen saturation (female mice: t (20) = 0.621, p = 0.542; male mice: t (21) = -0.053, p = 0.958) and respiratory rate (female mice: t (20) = -1.211, p = 0.240; male mice: t (21) = -2.000, p = 0.59) did not differ between single and repeated anesthesia. No sex differences in heart rate, oxygen saturation or respiratory rate were found.

## Recovery period

Within the period of 20 min after the last anesthesia, repeated anesthesia significantly reduced the number of grooming episodes (U (13, 13) = 26.000, p = 0.030) and the duration of activity (t (19.907) = 2.116, p = 0.047) versus a single anesthesia in female mice (Table 4). By contrast,

**Table 4. Recovery period.**

Group	Number of rearing <sup>1</sup>	Number of grooming episodes <sup>1</sup>	Duration of resting <sup>1</sup> [s]	Duration of activity <sup>2</sup> [s]	Latency to first food intake <sup>1</sup> [s]	Duration of food intake <sup>2</sup> [s]
Single anesthesia ♀ (n = 9)	17 ± 12.11	33.67 ± 15.33	114.41 ± 185.61	581.41 ± 130.55	568.38 ± 265.18	296.15 ± 103.36
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	23.15 ± 25.98	19.62 ± 8.70*	122.72 ± 190.63	441.55 ± 179.38*	351.54 ± 196.50**	411.16 ± 192.19
Single anesthesia ♂ (n = 10)	27.4 ± 24.85	22.7 ± 11.99	132.26 ± 201.10	673.29 ± 151.75	557.85 ± 124.11	221.09 ± 110.62
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	30.08 ± 30.04	16.38 ± 7.86	63.72 ± 107.71	469.36 ± 111.13**	342.92 ± 129.69***	500.43 ± 130.20***

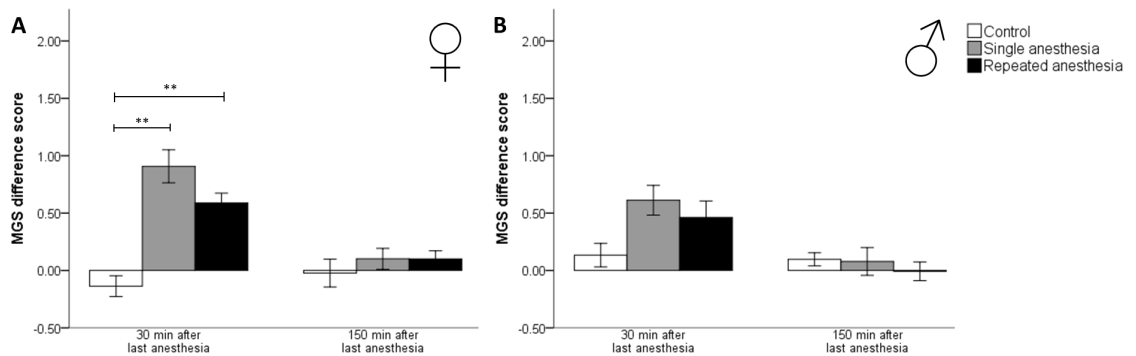
Data are given as mean ± standard deviation. Recovery period was defined as the time from first forward movement until 20 min after the last anesthesia. Due to a malfunction of the camera, 4 female mice and 3 male mice of the single anesthesia group had to be excluded from the statistics. p values were calculated using Mann-Whitney-U-Test<sup>1</sup> or unpaired Student t-test<sup>2</sup>.

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001 versus a single anesthesia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t004>



**Fig 2. Mouse Grimace Scale difference scores at 30 min and 150 min after last anesthesia.** MGS, Mouse Grimace Scale. Data are mean  $\pm$  standard error. p values were calculated using Kruskal-Wallis-Test: \*\*  $p < 0.01$ . (A) Control ♀:  $n = 6$ , single anesthesia ♀:  $n = 9$ , repeated anesthesia ♀:  $n = 13$ ; 4 mice of the single anesthesia group were excluded from statistics because of technical malfunction of the camera. (B) Control ♂:  $n = 6$ , single anesthesia ♂:  $n = 10$ , repeated anesthesia ♂:  $n = 13$ ; 3 mice of the single anesthesia group and 1 control mouse were excluded from statistics because of technical malfunction of the camera.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.g002>

in male mice, repeated anesthesia increased the duration of food intake ( $t(21) = -5.435$ ,  $p < 0.001$ ) and decreased the duration of activity ( $t(21) = 3.726$ ,  $p = 0.001$ ) versus a single anesthesia (Table 4). Repeated anesthesia decreased the latency to the first food intake after the last anesthesia versus a single anesthesia in female mice ( $U(13, 13) = 31.500$ ,  $p = 0.005$ ) and male mice ( $U(13, 13) = 17.000$ ,  $p < 0.001$ ) (Table 4). Male and female mice did not significantly differ.

## MGS

30 min after last anesthesia, in female mice, both single ( $z = 3.467$ ,  $p = 0.002$ ) and repeated anesthesia ( $z = 3.019$ ,  $p = 0.008$ ) caused significantly higher MGS difference scores versus control (Fig 2A). At the following observation time point, 150 min after last anesthesia, the MGS difference scores no longer differed between female groups ( $\text{Chi}^2 = 0.967$ ,  $p = 0.617$ ). No significant differences between male groups were observed either 30 min ( $\text{Chi}^2 = 5.216$ ,  $p = 0.074$ ) or 150 min ( $\text{Chi}^2 = 0.964$ ,  $p = 0.618$ ) after the last anesthesia (Fig 2B). No sex differences were found.

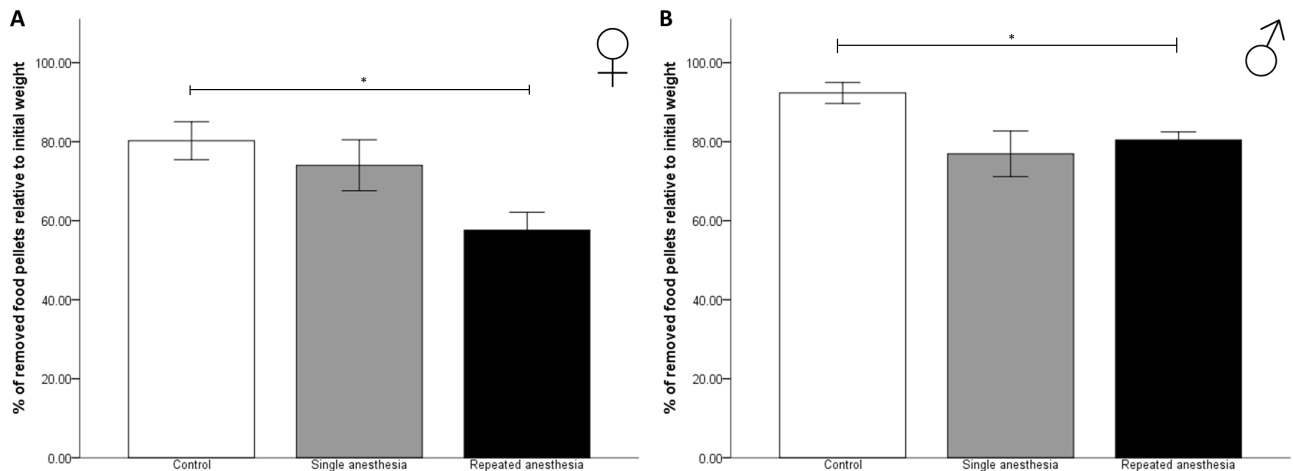
## Luxury behaviors

**Burrowing behavior.** The weight of removed food pellets from the burrow relative to initial weight [%] was calculated. In female ( $z = -2.507$ ,  $p = 0.036$ ; Fig 3A) and male ( $z = -2.604$ ,  $p = 0.028$ ; Fig 3B) mice, repeated anesthesia significantly reduced the percentage of weight of removed food pellets versus control. Sex differences were found for repeated anesthesia, when female mice removed significantly less food pellets from the burrow than male mice ( $U(13, 13) = 151.000$ ,  $p < 0.001$ ).

**Nest building behavior.** Kruskal-Wallis-Analysis did not reveal any significant differences in the nest scores between female groups (values are mean  $\pm$  standard deviation; control:  $3.75 \pm 1.47$ ; single anesthesia:  $4.58 \pm 0.57$ ; repeated anesthesia:  $4.04 \pm 1.09$ ;  $\text{Chi}^2 = 2.857$ ,  $p = 0.240$ ) and male groups (control:  $4.36 \pm 1.11$ ; single anesthesia:  $4.00 \pm 0.91$ ; repeated anesthesia:  $4.27 \pm 0.53$ ;  $\text{Chi}^2 = 2.076$ ,  $p = 0.354$ ), respectively. No sex differences were detected.

## Home cage activity

One day after the last anesthesia, the AUC [ $\text{impulses}^2 / (10 \text{ min})^2$ ] neither significantly differed between female groups (values are mean  $\pm$  standard deviation; single anesthesia:  $7.4 \pm 4.1$  M;



**Fig 3. Burrowing behavior in the immediate postanesthetic period.** Data are means  $\pm$  standard error. p values were calculated using Kruskal-Wallis-Test: \*  $p < 0.05$ . (A) Control ♀:  $n = 6$ , single anesthesia ♀:  $n = 9$ , repeated anesthesia ♀:  $n = 13$ ; 4 mice of the single anesthesia group were excluded from statistics because of technical malfunctions of the scale. (B) Control ♂:  $n = 6$ , single anesthesia ♂:  $n = 10$ , repeated anesthesia ♂:  $n = 13$ ; 3 mice of the single anesthesia group and 1 control mouse were excluded from statistics because of technical malfunction of the scale.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.g003>

repeated anesthesia:  $7.4 \pm 3.8$  M; control:  $8.8 \pm 2.7$  M;  $\text{Chi}^2 = 1.396$ ,  $p = 0.498$ , Kruskal-Wallis-Test) nor between male groups (single anesthesia:  $6.8 \text{ M} \pm 2.6$  M; repeated anesthesia:  $4.8 \pm 1.9$  M; control:  $5.5 \pm 1.8$  M;  $\text{Chi}^2 = 5.230$ ,  $p = 0.073$ , Kruskal-Wallis-Test). The Mann-Whitney-U-Test revealed that control female mice moved significantly more than control male mice ( $U(6, 7) = 6.000$ ,  $p = 0.035$ , Mann-Whitney-U-Test).

### Free exploratory paradigm

Within the test period of 10 min, all mice explored the cage top. Kruskal-Wallis-Analysis revealed that, in female mice, repeated anesthesia significantly increased the latency to explore the cage top on the first day after anesthesia in comparison to control ( $z = 2.956$ ,  $p = 0.009$ ) and single anesthesia ( $z = -3.535$ ,  $p = 0.001$ ) (Fig 4A). 8 days after the last anesthesia, the latency to explore did no longer differ between female groups ( $\text{Chi}^2 = 0.652$ ,  $p = 0.722$ ).

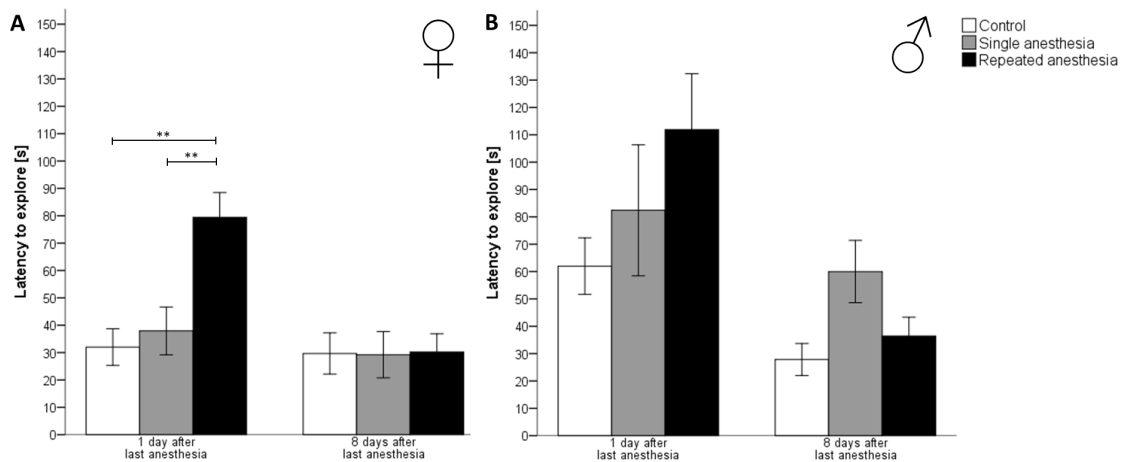
In male mice, the Kruskal-Wallis-Test revealed no significant differences in the latency to explore neither at 1 day ( $\text{Chi}^2 = 2.525$ ,  $p = 0.283$ ) nor at 8 days ( $\text{Chi}^2 = 3.404$ ,  $p = 0.182$ ) after last the anesthesia (Fig 4B).

Sex differences were found in the latency to explore. 1 day after the last anesthesia, in female control mice, the latency to explore was significantly shorter than in male control mice ( $U(6, 7) = 38.000$ ,  $p = 0.014$ , Mann-Whitney-U-Test). 8 days after the last anesthesia, female mice given single anesthesia explored the gridded cage top significantly earlier than their male counterparts ( $U(13, 13) = 130.000$ ,  $p = 0.019$ , Mann-Whitney-U-Test).

### Rotarod test

2 days after the last anesthesia, there were no differences in the rotarod performance in female groups (latency to fall given as mean  $\pm$  standard deviation [s]; control:  $285.17 \pm 23.034$ ; single anesthesia:  $271.62 \pm 60.98$ ; repeated anesthesia:  $297.17 \pm 9.82$ ;  $\text{Chi}^2 = 3.227$ ,  $p = 0.199$ , Kruskal-Wallis-Test) or male groups (control:  $242.43 \pm 86.32$ ; single anesthesia:  $250.92 \pm 54.19$ ; repeated anesthesia:  $213.08 \pm 101.74$ ;  $\text{Chi}^2 = 0.878$ ,  $p = 0.645$ , Kruskal-Wallis-Test).





**Fig 4. Latency to explore in the free exploratory paradigm for trait anxiety-related and exploratory behavior.** Latency to explore [s]; data are means  $\pm$  standard error; p values were calculated using the Kruskal-Wallis-Test: \*\* p < 0.01 versus repeated anesthesia. (A) Control ♀: n = 6, single anesthesia ♀: n = 13, repeated anesthesia ♀: n = 13. (B) Control ♂: n = 7, single anesthesia ♂: n = 13, repeated anesthesia ♂: n = 13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.g004>

The Mann-Whitney-U-Test revealed sex differences in mice with repeated anesthesia: the latency to fall was significantly higher in female mice ( $U(13, 13) = 29.000, p = 0.007$ ).

### Food intake and body weight

**Food intake.** One day after the last anesthesia, female mice given repeated anesthesia consumed significantly less food than female mice given single anesthesia ( $F(2, 29) = 3.457, p = 0.047$ ) (Table 5). 8 days after the last anesthesia, female mice given repeated anesthesia consumed significantly more food than female controls ( $F(2, 29) = 9.965, p = 0.012$ ) and female mice with a single anesthesia ( $F(2, 29) = 9.965, p = 0.001$ ). In male mice, no significant differences in food intake between the groups were found at day 1 ( $F(2, 30) = 0.238, p = 0.79$ ) and day 8 ( $F(2, 30) = 1.593, p = 0.22$ ) after the last anesthesia.

**Table 5. Food intake.**

Group	Food Intake [g/g body weight]	
	1 day after last anesthesia	8 days after last anesthesia
Control ♀ (n = 6)	0.22 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.02
Single anesthesia ♀ (n = 13)	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>	0.2 $\pm$ 0.03
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	0.18 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	0.26 $\pm$ 0.04 <sup>**+, ###</sup>
Control ♂ (n = 7)	0.18 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.02
Single anesthesia ♂ (n = 13)	0.18 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	0.19 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.03

Data are given as mean  $\pm$  standard deviation. p values were calculated using ONEWAY ANOVA (post hoc Tukey-HSD)

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01 versus single anesthesia

+ p < 0.05; versus control. p values were calculated using Student t-Test

## p < 0.01

### p < 0.001 versus ♂.

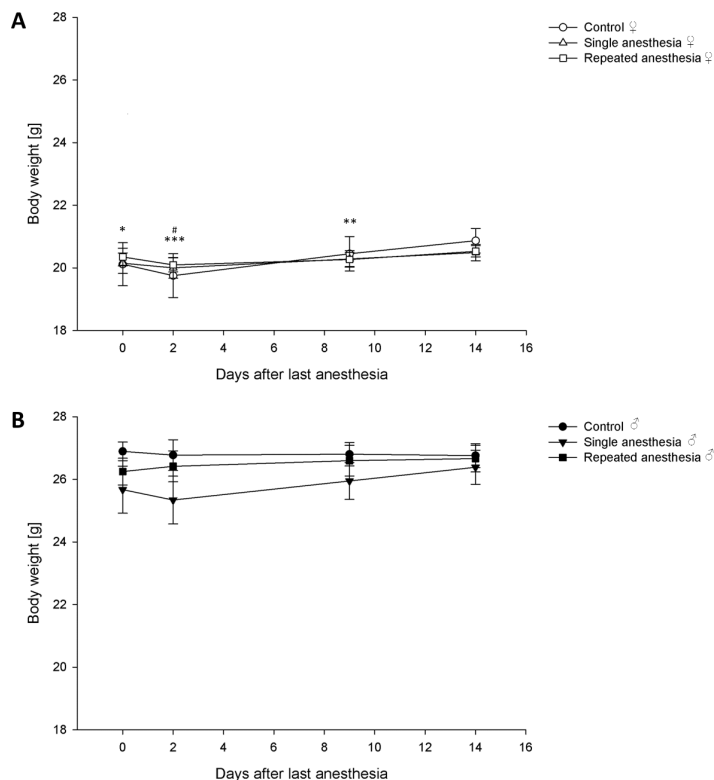
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t005>

Sex differences existed in food intake at 1 day after the last anesthesia, when male mice given a single anesthesia consumed significantly less food ( $t(19.449) = 3.224, p = 0.004$ ) than female mice given a single anesthesia; 8 days after the last anesthesia, male mice given repeated anesthesia ingested significantly less food ( $t(24) = 4.518, p < 0.001$ ) than female mice given repeated anesthesia.

**Body weight.** The body weight was analyzed by performing repeated measures ANOVA with group as between-subject factor. Tests of within-subject comparison indicated that the group (females:  $F = 0.841, p = 0.538$ ; males:  $F = 1.134, p = 0.35$ ) had no effect on the course of body weight, but there was a significant time effect in female mice (females:  $F = 7.863, p < 0.001$ ; males:  $F = 1.879, p = 0.153$ ) (Fig 5). Pairwise comparisons revealed that the body weight of female mice was significantly higher at day 14 compared to day 0 ( $p = 0.013$ ), 2 ( $p < 0.001$ ), and 9 ( $p = 0.004$ ) after the last anesthesia, and higher at day 9 compared to day 2 ( $p = 0.013$ ) after the last anesthesia.

### Corticosterone

The percentage change of both FCM (female groups:  $\text{Chi}^2 = 4.261, p = 0.119$ ; male groups:  $\text{Chi}^2 = 2.119, p = 0.347$ ; Kruskal-Wallis-Test) and hair corticosterone (female groups:  $\text{Chi}^2 = 2.228, p = 0.328$ ; male groups:  $\text{Chi}^2 = 0.689, p = 0.709$ ; Kruskal-Wallis-Test) did not significantly differ in female and male groups, respectively (Table 6). No sex differences were observed.



**Fig 5. Course of body weight.** Data are means  $\pm$  standard error. (A) Control ♀:  $n = 6$ , single anesthesia ♀:  $n = 13$ , repeated anesthesia ♀:  $n = 13$ . (B) Control ♂:  $n = 7$ , single anesthesia ♂:  $n = 13$ , repeated anesthesia ♂:  $n = 13$ .  $p$  values were calculated using repeated measures ANOVA with group as between-subject factor: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus 14 days after the last anesthesia; #  $p < 0.05$  versus 9 days after the last anesthesia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.g005>

Table 6. Fecal corticosterone metabolites (FCM) and hair corticosterone.

Group	FCM [%]	Hair corticosterone [%]
Control ♀ (n = 6)	82.38 ± 31.36	73.43 ± 14.89
Single anesthesia ♀ (n = 13)	115.54 ± 36.18	81.43 ± 29.75
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	102.3 ± 50.14	91.34 ± 29.72
Control ♂ (n = 7)	100.8 ± 20.80	96.25 ± 24.32
Single anesthesia ♂ (n = 13)	117.97 ± 25.97	101.5 ± 50.50
Repeated anesthesia ♂ (n = 13)	151.11 ± 89.31	89.5 ± 23.91

Data are given as mean ± standard deviation. The percentage change relative to baseline value was calculated. FCM, fecal corticosterone metabolites.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588.t006>

## Discussion

Within the scope of refinement, the goal of this study was to compare the effects of repeated with single isoflurane anesthesia on the well-being of adult C57BL/6JRj mice, in order to assess the severity of repeated isoflurane anesthesia. Well-being and distress were assessed by a behavioral test battery, the measurement of body weight, and non-invasive analysis of stress hormones in feces and fur. The behavioral test battery included a broad range of parameters, i.e. luxury behavior, the MGS, food intake, anxiety-related behavior, and motor activity. Moreover, the process of anesthesia was monitored, e.g. phases of anesthesia, motor effects, and vital parameters.

The main findings of the present study are that, depending on the sex, repeated isoflurane anesthesia caused short-term effects in a test of anxiety-related behavior, on the MGS, on burrowing behavior, and, with some caution, on food intake. Effects in the free exploratory paradigm were clear since mice with repeated anesthesia showed significantly higher anxiety-related behavior versus mice with single anesthesia and controls. The MGS indicated a difference between both repeated and single anesthesia versus control, though, no difference between single and repeated anesthesia. Effects on food intake were only seen between single and repeated anesthesia, but not in comparison to control. Burrowing behavior following repeated anesthesia was only decreased in comparison to control, but not when compared to single anesthesia. Interestingly, repeated anesthesia also causes an increase in excitations during induction compared to single anesthesia. Overall, our findings suggest that repeated isoflurane anesthesia had a slightly stronger impact on the stress level and the well-being of mice, especially of female mice, than single isoflurane anesthesia. Well-being seemed to be stabilized at day 8 after the last anesthesia, at the latest, indicated by the free exploratory paradigm.

In the free exploratory paradigm, all mice, independently from the group, explored the cage top. However, the latency to explore was higher in females, but not in males following repeated isoflurane anesthesia, suggesting a higher anxiety level. Our results are supported by observations of higher anxiety levels in female C57BL/6 mice in the elevated plus maze, a test for state anxiety [32]. A reason for the sex dependent effect may lie in the higher hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity and corticosterone release found in female rodents at baseline [33], in response to stress insults [34] and isoflurane exposure [35] compared to male rodents. Stress activates the HPA axis and increases glucocorticoid secretion. Glucocorticoids in turn activate retrograde endocannabinoid signaling to GABAergic (type A  $\gamma$ -aminobutyric acid) neurons and, hence, suppress synaptic inhibition [36, 37]. This mechanism increases excitability of neurons in the basolateral nucleus of the amygdala (BLA), which are implicated in anxiety-related behavior [37]. However, according to Long II et al., the GABAergic activity is increased in the BLA of rats after repeated isoflurane anesthesia, which is not compatible with elevated anxiety-related behavior [38].

Besides glucocorticoids, sexual hormones can also be responsible for the higher anxiety level in females. Both sexual hormones and stress hormones influence the 5-HT<sub>1A</sub> receptor, which plays an important role in modulating anxiety-related behavior [39] and coping with stressful situations [40]. Pieces of evidence suggest that isoflurane influences the functional state of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in male marmosets [41] and hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in male rats at high concentrations [42]. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor underlies sex differences with higher 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in female compared to male mice in particular brain regions (basolateral amygdala, claustrum, median raphe nucleus) [43]. In rats, estradiol suppresses 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling [44] and corticosterone decreases 5-HT<sub>1A</sub> mRNA in the dentate gyrus [45]. Accordingly, we hypothesized that isoflurane exposure might result in different changes of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in females due to the higher estradiol and corticosterone levels, which may explain the higher anxiety levels found in female mice of our study. Moreover, in males, isoflurane inhibits 5-HT uptake in a noncompetitive manner [42], decreases extracellular 5-HT in the mouse hippocampus [46] and decreases 5-HT release in the rat frontal cortex [47]. Since Rex et al. demonstrated a relationship between anxiety-related behavior and 5-HT release in the ventral hippocampus [48], it would be of particular interest to compare the effects of isoflurane on the brain 5-HT levels in females and males.

We applied the MGS at 30 min and 150 min after the last anesthesia, which allows us to analyze the sole impact of anesthesia and not the pharmacological effects of isoflurane. This is based on the knowledge that only 0.2% of isoflurane is metabolized. Isoflurane is eliminated from the brain of rabbits according to the pharmacokinetic two-compartment model with half-lives of 26 min and 174 min [49]. Since the metabolism is faster in mice than rabbits, we assumed that at 30 min and 150 min after anesthesia, most of the inhaled isoflurane was already eliminated from the body so that any pharmacological effects of isoflurane on the behavior of mice and the MGS could be excluded. Both single and repeated isoflurane anesthesia caused a short-term mild increase of the MGS difference scores in the immediate postanesthetic period indicating that repeated anesthesia did not augment the effect of a single application. However, this effect was statistically significant in female mice only, which indicated, that especially the well-being of female C57BL/6JRj mice seemed to be affected by the exposure to isoflurane. Our findings are in line with Miller and Leach revealing that, 30 min after a single isoflurane anesthesia of 10 min, the MGS is increased in CBA mice [50]. There is only little data available investigating the impact of repeated anesthesia on the Grimace Scale. A recent study by Miller et al. [51] shows that in male rats, the Grimace Scale scores recorded after anesthesia are increased when the rats are repeatedly anesthetized with isoflurane (12 min over a 4-day period). Our study is the first to show a comparable effect in mice. We could demonstrate that 150 min after a single or the last anesthesia, at the latest, the MGS difference scores return to control level.

The increase of MGS scores may be due to the noxious stimulus of isoflurane. Its smell is described as pungent [52] and the inhalation of 2.3% isoflurane evokes coughing, burning, irritation, and other discomfort in humans [53]. Similar responses can be expected in mice. It is possible that nociceptive ion channels, transient receptor potential ankirin 1 (TRPA1) and vanilloid 1 (TRPV1), which are activated by isoflurane, enhance the noxious stimulus of isoflurane and potentiate neurogenic inflammation and pain [54]. The sexual dimorphism found in the MGS with significant higher scores in females, but not in males after both single and repeated isoflurane anesthesia versus control may be explained by sex differences in pain nociception as demonstrated by Sorge et al [55]. Overall, the results of the MGS indicate that both single and repeated isoflurane anesthesia impaired well-being, especially, of female C57BL/6JRj mice in the immediate postanesthetic period. We suggest that the impact on well-being can be rated as mild since the MGS difference scores after anesthesia remained  $< 1$  and no significant differences between a single and repeated isoflurane anesthesia were found.

The display of luxury behavior like burrowing and nest building behavior serves as an indicator of well-being in mice [23]. In our study, repeated isoflurane anesthesia reduced burrowing behavior versus controls in mice of both sexes, which was more pronounced in females. However, because of the lack of a significant difference between single and repeated anesthesia, this effect was only weak. Accordingly, repeated anesthesia slightly negatively affected well-being in mice of both sexes during the immediate postanesthetic period. This observation is in line with the work of Jirkof et al. with sevoflurane [24]. However, in contrast to Jirkof et al. [56], who described a reduction of nest building behavior following a short mono-anesthesia with sevoflurane, nest building behavior was not affected in our study. One reason for the discrepancy could be that Jirkof et al. applied a different nest complexity scoring as they carried out the scoring already 9 hours after anesthesia, i.e. at the end of the light period. We decided to score the nests not before 14 hours after the last anesthesia, i.e. in the morning of the following day after the dark period, according to the protocol by Deacon [25]. Therefore, we believe that mice had more time to build complex nests, since high nest scores are achieved especially at the end of the dark phase [56].

Food intake and body weight are useful as non-invasive parameters to assess postoperative distress, well-being as well as appetite in mice. Although mice do not vomit, they can suffer from postoperative nausea, which was proven to be triggered by sevoflurane in mice [57]. Whereas neither single nor repeated anesthesia had a significant effect on the course of body weight in mice of both sexes, female mice showed a marginally decreased food intake 1 day after the last repeated anesthesia, but 8 days afterwards a slightly increased feeding behavior, maybe as some kind of compensation mechanism. This is underlined by the fact that female mice did not significantly lose, but put on weight over time. In accordance to our results, Jacobsen et al. found no change in body weight but, across days, a significant change in food intake of mice that underwent isoflurane anesthesia with or without vasectomy [58]. Hence, analysis of food intake and body weight indicated no impairment of the well-being of male mice, but short-term mild impairment of the well-being of female mice. Differences in food intake between mice with a single anesthesia and mice with repeated anesthesia are result of slightly different effects compared to control.

Both single and repeated isoflurane anesthesia did not increase hair corticosterone levels, independent from sex. Hair corticosterone was described as a retrospective biomarker to reliably reflect long-term HPA axis activity in humans [59], but also in rodents [60]. Whereas our anesthesia protocol did not elevate hair corticosterone levels, other studies have proven the association of a stress insult and an increase in hair corticosterone concentration in mice, e.g. social defeat [61] and social instability [62]. Taking the effects of these stress insults on hair corticosterone into account, our anesthesia protocol did not seem to cause chronic stress.

Similar to hair corticosterone, neither single nor repeated isoflurane anesthesia elevated FCM in both female and male mice. The same method of FCM analysis has been previously utilized in mice and a correlation between an increase in FCM levels and various stressors was found (e.g. train-induced vibrations [63], oral gavage [64], and blood sampling [65]). The peak of the fecal corticosterone metabolite level is reached 8–10 h after a stressor depending on the intestinal transit time from duodenum to rectum, which is influenced by the activity of the mice [29]. Since neither single nor repeated isoflurane anesthesia decreased the home cage activity during the dark period following the last anesthesia, we assumed that the peak was not delayed. In order to prevent any influence of the expressed circadian rhythm on the excretion of FCM [30], samples were collected over a period of 24 h, i.e. all dry fecal pellets were collected. Overall, especially our FCM results, but also the lack of an increase in hair corticosterone levels indicate that our anesthesia protocols did not cause an expressed HPA axis

response in the 24-hour postanesthetic period and later on. However, for future studies, it would be of interest to analyze the momentary stress by blood sampling.

The analysis of the anesthesia phases revealed that repeated anesthesia prolonged the duration of induction in mice of both sexes and increased excitations. Li et al. [66] reported that isoflurane caused airway irritation and neurogenic constriction by the activation TRPA1 channels, which impaired respiratory function and prolonged the duration of induction. The activation of TRPA1 channels may have been enhanced by repeated isoflurane anesthesia with prolongation of induction. However, future studies are necessary to clarify this hypothesis. In mice of both sexes, repeated isoflurane anesthesia increased the heart rate. This may be explained by the observation that repeated exposure to isoflurane is more aversive than initial exposure, which might have led to an elevated arousal in mice [7] and, subsequently, an increase in heart rate. The increase in heart rate and duration of induction may indicate that mice developed a reduced sensitivity to isoflurane due to re-exposure, which was already reported for other volatile anesthetics [67]. Since prolonged exposure to both isoflurane or diazepam reduces sensitivity to isoflurane due to the cross-sensitivity [68], both agents are suggested to act via the GABA<sub>A</sub> receptor, the major inhibitory neurotransmitter receptors [69]. Therefore, the GABA<sub>A</sub> receptor may play a central role in the development of a reduced sensitivity to isoflurane. Further investigation is needed regarding the subunit involved, e.g. via knock-in/knock-out mice [70].

The behavioral test battery was feasible for the assessment of well-being in the postanesthetic period, although the analysis of stress hormones in feces and fur seemed to be unsuitable for measuring postanesthetic stress. With the objective of refinement, we assume that our behavioral test battery will also be useful to investigate the influence of other procedures performed in animal experimentation.

## Conclusion

Repeated isoflurane anesthesia caused short-term mild distress and reduced well-being mainly in the immediate postanesthetic period. Regarding our anesthesia protocol, repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice can be classified as mild. However, sex differences have to be taken into account, as the well-being of female mice seems to be more affected by isoflurane anesthesia.

Within the mild severity category, depending on the sex, repeated isoflurane anesthesia ranks higher than single isoflurane anesthesia. The findings of the present study should be known, when the overall severity level of an animal experiment is estimated by adding the severity levels of all procedures being performed in the course of an experiment, which includes repeated isoflurane anesthesia.

## Acknowledgments

We thank Sabine Jacobs for assisting with the sample collection, Edith Klobetz-Rassam for analysis of FCM, PD Dr. med. vet. habil. Roswitha Merle for assisting with statistical analysis, and Wiebke Gentner for proofreading the manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** KH BB SD RP HF CTR.

**Formal analysis:** KH BB SD CTR.

**Investigation:** KH.

**Resources:** RP.

**Supervision:** BB HF CTR.

**Writing – original draft:** KH BB CTR.

**Writing – review & editing:** KH BB SD RP HF CTR.

## References

1. Richardson CA, Flecknell PA. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *ATLA*. 2005; 33:119–27. PMID: [16180987](#)
2. Stokes EL, Flecknell PA, Richardson CA. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures. *Lab Anim*. 2009; 43:149–54. <https://doi.org/10.1258/la.2008.008020> PMID: [19116297](#)
3. Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia* 4th ed. Oxford: Academic Press; 2016.
4. Ding F, Zheng L, Liu M, Chen R, Leung LS, Luo T. Ciproxifan, an H3 receptor antagonist, improves short-term recognition memory impaired by isoflurane anesthesia. *J Anesth*. 2016; 30:684–90. <https://doi.org/10.1007/s00540-016-2189-y> PMID: [27193325](#)
5. Yonezaki K, Uchimoto K, Miyazaki T, Asakura A, Kobayashi A, Takase K, et al. Postanesthetic effects of isoflurane on behavioral phenotypes of adult male C57BL/6J mice. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0122118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122118> PMID: [25806517](#)
6. Flecknell PA, Roughan JV, Hedenqvist P. Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Lab Anim*. 1999; 33:41–6. <https://doi.org/10.1258/002367799780578516> PMID: [10759391](#)
7. Moody CM, Weary DM. Mouse aversion to isoflurane versus carbon dioxide gas. *Appl Anim Behav Sci*. 2014; 158:95–101.
8. Kikuchi T, Tan H, Mihara T, Uchimoto K, Mitsushima D, Takase K, et al. Effects of volatile anesthetics on the circadian rhythms of rat hippocampal acetylcholine release and locomotor activity. *Neuroscience*. 2013; 237:151–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.01.062> PMID: [23396087](#)
9. Gargiulo S, Greco A, Gramanzini M, Esposito S, Affuso A, Brunetti A, et al. Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research. *ILAR J*. 2012; 53:E55–69. <https://doi.org/10.1093/ilar.53.1.55> PMID: [23382271](#)
10. Tremoleda JL, Kerton A, Gsell W. Anaesthesia and physiological monitoring during in vivo imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare. *EJNMMI Res*. 2012; 2:44. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-44> PMID: [22877315](#)
11. Hildebrandt IJ, Su H, Weber WA. Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals. *ILAR J*. 2008; 49:17–26. PMID: [18172330](#)
12. 2010 EU. Directive 2010/63/EU. Official Journal of the European Union. 2010;L276/33-L276/29.
13. Russel W, Burch R. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen; 1959.
14. Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, et al. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet*. 2008; 22:315–31. <https://doi.org/10.1080/01677060802357388> PMID: [19085272](#)
15. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl. *BMC Vet Res*. 2014; 10:963.
16. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Vet Res*. 2014; 10:198. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0198-3> PMID: [25149627](#)
17. Altholtz LY, Fowler KA, Badura LL, Kovacs MS. Comparison of the stress response in rats to repeated isoflurane or CO<sub>2</sub>:O<sub>2</sub> anesthesia used for restraint during serial blood collection via the jugular vein. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006; 45:17–22.
18. Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*. 2014; 11:629–32. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2935> PMID: [24776635](#)
19. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods*. 2010; 7:825–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500> PMID: [20835246](#)

# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

20. Kalueff AV, Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2004; 13:151–8. <https://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2004.04.002> PMID: 15296852
21. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, et al. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature methods.* 2010; 7:447–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1455> PMID: 20453868
22. Finlayson K, Lampe JF, Hintze S, Wurbel H, Melotti L. Facial indicators of positive emotions in rats. *PloS One.* 2016; 11:e0166446. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166446> PMID: 27902721
23. Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods.* 2014; 234:139–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001> PMID: 24525328
24. Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, Arras M. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci.* 2010; 4:165. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00165> PMID: 21031028
25. Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc.* 2006; 1:1117–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170> PMID: 17406392
26. Bert B, Schmidt N, Voigt JP, Fink H, Rex A. Evaluation of cage leaving behaviour in rats as a free choice paradigm. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013; 68:240–9. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.01.001> PMID: 23313807
27. Paylor R, Spencer CM, Yuva-Paylor LA, Pieke-Dahl S. The use of behavioral test batteries, II: effect of test interval. *Physiol Behav.* 2006; 87:95–102. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.09.002> PMID: 16197969
28. Palme R, Touma C, Arias N, Dominchin MF, Lepschy M. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. *Wien Tierarz Monats.* 2013; 100:238–46.
29. Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003; 130:267–78. PMID: 12606269
30. Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav.* 2004; 45:10–22. PMID: 14733887
31. Gao W, Stalder T, Foley P, Rauh M, Deng H, Kirschbaum C. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013; 928:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.008> PMID: 23584040
32. An XL, Zou JX, Wu RY, Yang Y, Tai FD, Zeng SY, et al. Strain and sex differences in anxiety-like and social behaviors in C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Exp Anim.* 2011; 60:111–23. PMID: 21512266
33. Grad B, Khalid R. Circulating corticosterone levels of young and old, male and female C57B1/6J mice. *J Gerontol.* 1968; 23:522–8. PMID: 5723490
34. Cozzoli DK, Tanchuck-Nipper MA, Kaufman MN, Horowitz CB, Finn DA. Environmental stressors influence limited-access ethanol consumption by C57BL/6J mice in a sex-dependent manner. *Alcohol.* 2014; 48:741–54. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.015> PMID: 25459519
35. Bekhbat M, Merrill L, Kelly SD, Lee VK, Neigh GN. Brief anesthesia by isoflurane alters plasma corticosterone levels distinctly in male and female rats: Implications for tissue collection methods. *Behav Brain Res.* 2016; 305:122–5. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.003> PMID: 26946276
36. Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci.* 2003; 23:4850–7. PMID: 12832507
37. Solomonow J, Tasker J. Anxiety behavior induced in mice by acute stress. *Tulane Undergraduate Research Journal.* 2015; 2:14–9.
38. Long RP II, Aroniadou-Anderjaska V, Prager EM, Pidoplichko VI, Figueiredo TH, Braga MF. Repeated isoflurane exposures impair long-term potentiation and increase basal GABAergic activity in the basolateral amygdala. *Neural Plast.* 2016; 2016:8524560. <https://doi.org/10.1155/2016/8524560> PMID: 27313904
39. Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, et al. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:15049–54. PMID: 9844013
40. Tsuji M, Takeda H, Matsumiya T. Different effects of 5-HT1A receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test. *Psychopharmacology (Berl).* 2000; 152:157–66.
41. Yokoyama C, Mawatari A, Kawasaki A, Takeda C, Onoe K, Doi H, et al. Marmoset serotonin 5-HT1A receptor mapping with a biased agonist PET probe 18F-F13714: comparison with an antagonist tracer 18F-MPPF in awake and anesthetized states. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016; 19. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw079> PMID: 27608810



# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

42. Martin DC, Adams RJ, Aronstam RS. The influence of isoflurane on the synaptic activity of 5-hydroxytryptamine. *Neurochem Res.* 1990; 15:969–73. PMID: [2150219](#)
43. Günther L, Rothe J, Rex A, Voigt J-P, Millan MJ, Fink H, et al. 5-HT<sub>1A</sub>-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test. *Neuropharmacology.* 2011; 61:433–41. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.004> PMID: [21419787](#)
44. Raap DK, DonCarlos LL, Garcia F, Zhang Y, Muma NA, Battaglia G, et al. Ovariectomy-induced increases in hypothalamic serotonin-1A receptor function in rats are prevented by estradiol. *Neuroendocrinology.* 2002; 76:348–56. PMID: [12566942](#)
45. Neumaier JF, Sexton TJ, Hamblin MW, Beck SG. Corticosteroids regulate 5-HT<sub>1A</sub> but not 5-HT<sub>1B</sub> receptor mRNA in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000; 82:65–73. PMID: [11042358](#)
46. Whittington RA, Virag L. Isoflurane decreases extracellular serotonin in the mouse hippocampus. *Anesth Analg.* 2006; 103:92–8. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000221488.48352.61> PMID: [16790633](#)
47. Mukaida K, Shichino T, Koyanagi S, Himukashi S, Fukuda K. Activity of the serotonergic system during isoflurane anesthesia. *Anesth Analg.* 2007; 104:836–9. <https://doi.org/10.1213/01.ane.0000255200.42574.22> PMID: [17377090](#)
48. Rex A, Voigt JP, Fink H. Anxiety but not arousal increases 5-hydroxytryptamine release in the rat ventral hippocampus in vivo. *Eur J Neurosci.* 2005; 22:1185–9. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04251.x> PMID: [16176361](#)
49. Wyrwicz AM, Conboy CB, Ryback KR, Nichols BG, Eisele P. In vivo 19F-NMR study of isoflurane elimination from brain. *Biochim Biophys Acta.* 1987; 927:86–91. PMID: [3790622](#)
50. Miller A, Kitson G, Skalkoyannis B, Leach M. The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2015; 172:58–62. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.038> PMID: [26937061](#)
51. Miller AL, Golledge HD, Leach MC. The influence of isoflurane anaesthesia on the Rat Grimace Scale. *PloS One.* 2016; 11:e0166652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166652> PMID: [27855184](#)
52. Schuettler J, Schwilden H. *Handbook of experimental pharmacology.* Berlin; Germany: Springer-Verlag; 2008.
53. TerRiet MF, DeSouza GJ, Jacobs JS, Young D, Lewis MC, Herrington C, et al. Which is most pungent: isoflurane, sevoflurane or desflurane? *Br J Anaesth.* 2000; 85:305–7. PMID: [10992843](#)
54. Matta JA, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:8784–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711038105> PMID: [18574153](#)
55. Sorge RE, Mapplebeck JCS, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, et al. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci.* 2015; 18:1081–3. <https://doi.org/10.1038/nn.4053> PMID: [26120961](#)
56. Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim.* 2013; 47:153–61. <https://doi.org/10.1177/0023677213475603> PMID: [23563122](#)
57. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Effect of sevoflurane anesthesia on the comprehensive mRNA expression profile of the mouse hippocampus. *Med Gas Res.* 2016; 6:70–6. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.184715> PMID: [27867470](#)
58. Jacobsen KR, Kalliokoski O, Teilmann AC, Hau J, Abelson KS. Postsurgical food and water consumption, fecal corticosterone metabolites, and behavior assessment as noninvasive measures of pain in vasectomized BALB/c mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2012; 51:69–75. PMID: [22330871](#)
59. Thomson S, Koren G, Fraser LA, Rieder M, Friedman TC, Van Uum SH. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010; 118:133–8. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220771> PMID: [19609841](#)
60. Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, et al. Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB J.* 2015; 29:859–67. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254474> PMID: [25398766](#)
61. Yu T, Xu H, Wang W, Li S, Chen Z, Deng H. Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 1002:267–76. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.08.035> PMID: [26343018](#)
62. Jarcho MR, Massner KJ, Eggert AR, Wichelt EL. Behavioral and physiological response to onset and termination of social instability in female mice. *Horm Behav.* 2016; 78:135–40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.11.004> PMID: [26597994](#)
63. Atanasov NA, Sargent JL, Parmigiani JP, Palme R, Diggs HE. Characterization of train-induced vibration and its effect on fecal corticosterone metabolites in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54:737–44. PMID: [26632783](#)

# Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress

64. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260:65–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.025> PMID: 22326784
65. Voigt CC, Klockner P, Touma C, Neuschl C, Brockmann G, Goritz F, et al. Hormonal stress response of laboratory mice to conventional and minimally invasive bleeding techniques. *Anim Welf.* 2013; 22:449–55.
66. Li F, Guo CJ, Huang CC, Yu G, Brown SM, Xu S, et al. Transient receptor potential A1 activation prolongs isoflurane induction latency and impairs respiratory function in mice. *Anesthesiology.* 2015; 122:768–75. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000607> PMID: 25646842
67. Kita M, Watanabe T, Suzuki T, Sato I, Hossain M, Kobayashi H. Effects of repeated administration of inhaled anesthetics on anesthesia, brain acetylcholinesterase, muscarinic receptors and dopaminergic receptors in mice. *Adv Biomed Eng Res.* 2013; 1:24–32.
68. Flaishon R, Halpern P, Sorkine P, Weinbroum A, Leschiner S, Szold O, et al. Cross-sensitivity between isoflurane and diazepam: evidence from a bidirectional tolerance study in mice. *Brain Res.* 1999; 815:287–93. PMID: 9878789
69. Flaishon R, Weinbroum AA, Veenman L, Leschiner S, Rudick V, Gavish M. Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam. *Anesth Analg.* 2003; 97:1046–52. PMID: 14500155
70. Harrison NL. Knockin' on the door of general anesthetic mechanisms: but will U.S. researchers be shut out? *Anesth Analg.* 2003; 97:616–8. PMID: 12933370

## 5. Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

---

**Autoren:** Katharina Hohlbaum<sup>1,2</sup>, Bettina Bert<sup>2,3</sup>, Silke Dietze<sup>2</sup>, Rupert Palme<sup>4</sup>, Heidrun Fink<sup>2</sup>, Christa Thöne-Reineke<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>2</sup> Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

<sup>3</sup> Aktuelle Adresse: Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

<sup>4</sup> Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie, Department Biomedizinische Wissenschaften, Veterinärmedizinische Universität Wien

**Jahr:** 2018                      **Journal:** PLoS ONE 13(9): e0203559

**URL:** [journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203559](https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0203559) (abgerufen am 7.12.2018).

**DOI:** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559>

**Inhalt:** Within the scope of the 3Rs of Russel and Burch, the number of laboratory animals can be reduced by repeated usage of an animal. This strategy only becomes relevant, if the total amount of pain, distress or harm the individual animal experiences does not exceed the severity of a single manipulation. For example, when using imaging techniques, an animal can be examined several times during a study, but has to be anesthetized each time imaging is performed. The severity of anesthesia is thought to be mild according to the Directive 2010/63/EU. However, the Directive does not differentiate between a single and repeated anesthesia, though repeated anesthesia may have a greater impact on well-being. Hence, we compared the impact of a single and repeated anesthesia (6 times at an interval of 3–4 days) with the injection anesthesia ketamine and xylazine (KX) on well-being of adult female and male C57BL/6JRj mice. After anesthesia well-being of mice was assessed using a protocol for the systemic assessment of well-being including nesting, the Mouse Grimace Scale (MGS), a test for trait anxiety, home cage activity and the rotarod test for motor activity, food intake and body weight, as well as corticosterone (metabolite) analysis. Repeated anesthesia increased the MGS in mice of both sexes and caused short-term effects on well-being of female mice in the immediate postanesthetic period indicated by longer lasting effects on trait anxiety-related behavior. However, corticosterone metabolite concentrations suggested that mice habituated to the stress induced by repeated KX administration. Hence, the mild negative effects on well-being of repeated KX anesthesia do not seem to add up over time using the respective regime. However, it still needs to be clarified for how long mice experienced mild distress and trait anxiety. Depending on whether these effects lasted for a short or a long period, severity of repeated anesthesia must be classified as mild or moderate.

RESEARCH ARTICLE

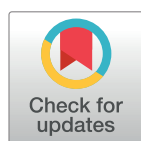
# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

Katharina Hohlbaum<sup>1,2\*</sup>, Bettina Bert<sup>2a</sup>, Silke Dietze<sup>2</sup>, Rupert Palme<sup>3</sup>, Heidrun Fink<sup>2</sup>, Christa Thöne-Reineke<sup>1</sup>

**1** Institute of Animal Welfare, Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **2** Institute of Pharmacology and Toxicology, Department of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **3** Unit of Physiology, Pathophysiology and Experimental Endocrinology, Department of Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

✉ Current address: German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany

\* [katharina.hohlbaum@fu-berlin.de](mailto:katharina.hohlbaum@fu-berlin.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C (2018) Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice. *PLoS ONE* 13(9): e0203559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559>

**Editor:** Thomas H. J. Burne, University of Queensland, AUSTRALIA

**Received:** February 9, 2018

**Accepted:** August 22, 2018

**Published:** September 19, 2018

**Copyright:** © 2018 Hohlbaum et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** The study is part of the Berlin-Brandenburg research platform BB3R ([www.bb3r.de](http://www.bb3r.de)) and was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (grant number: 031A262A) ([www.bmbf.de/en/index.html](http://www.bmbf.de/en/index.html)). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We acknowledge support by the

## Abstract

Within the scope of the 3Rs of Russel and Burch, the number of laboratory animals can be reduced by repeated use of an animal. This strategy only becomes relevant, if the total amount of pain, distress or harm the individual animal experiences does not exceed the severity of a single manipulation. For example, when using imaging techniques, an animal can be examined several times during a study, but it has to be anesthetized each time imaging is performed. The severity of anesthesia is thought to be mild according to the Directive 2010/63/EU. However, the Directive does not differentiate between single and repeated anesthesia, although repeated anesthesia may have a greater impact on well-being. Hence, we compared the impact of single and repeated anesthesia (six times at an interval of three to four days) by injection of ketamine and xylazine (KX) on the well-being of adult female and male C57BL/6JRj mice. After anesthesia, well-being of mice was assessed according to a protocol for systematic assessment of well-being including nesting, the Mouse Grimace Scale (MGS), a test for trait anxiety, home cage activity, and the rotarod test for motor activity, food intake, and body weight, as well as corticosterone (metabolite) analysis. Repeated anesthesia increased the MGS in mice of both sexes and caused short-term effects on well-being of female mice in the immediate post-anesthetic period, indicated by longer lasting effects on trait anxiety-related behavior. However, corticosterone metabolite concentrations suggested that mice habituated to the stress induced by repeated KX administration. Hence, the mildly negative effects on well-being of repeated KX anesthesia do not seem to accumulate over time using the respective regimen. However, further observations for severity classification are warranted in order to more specifically determine the duration of mild distress and trait anxiety.

German Research Foundation and the Open Access Publication Fund of the Freie Universität Berlin.

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

## Introduction

The EU Directive 2010/63 “represents an important step towards achieving” the ultimate goal to phase out all animal experimentation [1]. At the same time, the Directive acknowledges that, for the time being, animal experiments are still necessary to protect human and animal health and to maintain an intact environment. Therefore, the Directive aims at improving the welfare of those animals which are still necessary to be used and at firmly anchoring the 3Rs (replace, reduce, refine) of Russel and Burch (1959) in the EU legislation. The Directive stipulates the application of the 3Rs in total [2], i.e. not only to replace animal experiments, but also to reduce the number of animals and to refine the animal experiments which are still indispensable.

One strategy to reduce the total animal number is their repeated use in the course of an experiment. This approach has been applied, for example, in studies including imaging techniques [3]. The great benefit of imaging studies with respect to animal welfare is their non-invasiveness, although tracer injection may be required prior to imaging. Instead of euthanizing several animals at different time points for further investigations, an animal can be examined several times over the course of an experiment and, thus, serves as its own control. Thereby, the progress of diseases can be monitored in one single animal. However, in terms of the 3Rs, the advantage of repeated animal use only becomes relevant if the total amount of pain, distress, and harm the single animal experiences does not accumulate and, hence, exceed the degree of severity of each single manipulation. Therefore, the reduction of the animal number for a project should not be performed on the expense of the well-being of a single animal. Balancing those values has to be carried out for each individual procedure.

In imaging studies, animals are generally anesthetized to avoid movement-associated artifacts. Hence, animals exposed to an imaging procedure several times will be repeatedly anesthetized. According to Annex VIII of the EU Directive 2010/63, anesthesia is generally classified as mild (i.e. anesthesia is likely to cause short-term mild pain, suffering or distress). However, the Directive does not distinguish between single and repeated anesthesia.

We previously showed in C57BL/6JRj mice that repeated exposure to isoflurane, the most commonly used volatile anesthetic in laboratory rodents, caused slightly more distress and impaired well-being predominantly in the immediate post-anesthetic period [4]. The advantages of volatile anesthetics over injectables are an enhanced controllability, since they are excreted by the lung and undergo almost no metabolism [5]. However, anesthesia with inhalant gases requires specific equipment, which can interfere with the experiment, e.g. when procedures are performed in a biological safety cabinet in barrier facilities [6–8]. Furthermore, the use of inhalation anesthesia may interfere with the study design or objective. If volatile anesthetics cannot be applied, injection anesthesia, such as the combination of ketamine and xylazine, is predominantly used in mice and rats [9].

Ketamine is an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist and induces a dissociative anesthetic state, cataleptic sedation, and analgesia [10–13]. High dose rates are required to achieve surgical tolerance, which can be accompanied by undesirable effects such as high skeletal muscle tonus, sustained laryngeal and pharyngeal reflexes, salivary and bronchial secretions, as well as the risk of respiratory depression or arrest. Moreover, the cardiovascular system is stimulated [10–13]. In the recovery period, hallucinations can occur [10]. Ketamine disturbs the circadian rhythm [14] and has antidepressant-like properties [15], although long-term administration of ketamine can result in sex-dependent effects on anxiety-related behavior [16]. For anesthesia, ketamine is combined with an  $\alpha 2$ -adrenergic agonist such as xylazine, which provides sedation, mild to moderate analgesia, and muscle relaxation [9, 10]. Undesirable effects of xylazine are cardiovascular and respiratory depression [9, 10], hyperglycemia

[17], and marked diuresis [18]. The properties of ketamine and xylazine (KX) complement each other well. The KX combination achieves surgical tolerance, reduces the high ketamine-induced skeletal muscle tonus, and diminishes its stimulation of the cardiovascular system. However, KX also causes hypotension and hypoventilation [10, 19].

The main advantage of injectable anesthetics is that no extra equipment is required [20]. However, due to the high distribution and metabolization of KX, recovery takes longer than that from volatile anesthetics [5, 21, 22]. Furthermore, the procedure of KX anesthesia includes restraining and injection stress, which in turn can influence the well-being of mice [23]. Due to the different pharmacologic properties and route of administration, the severity degree of repeated anesthesia with injectable drugs such as KX may differ from that induced by volatiles like isoflurane. Little is known about the effects of repeated KX administration on well-being and stress levels in mice. A single intraperitoneal injection can cause short-term mild pain, distress, and tissue damage [24, 25] which may potentiate over a series of injections. Post-anesthetic distress can lead to loss of body weight [26–28] and an elevated hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activity [29]. Moreover, if mice are repeatedly anesthetized with KX during early development, motor learning and learning-dependent dendritic spine plasticity will be impaired later in life [30]. Physiological parameters such as heart rate and blood pressure are not affected compared to a single KX anesthesia. However, repeated KX anesthesia reduces sleeping time and can fail to induce surgical tolerance in rats [28, 31]. Although these findings point towards increased distress and reduced well-being in mice after repeated KX anesthesia, a systematic assessment of well-being is still lacking.

Hence, the aim of this study was to analyze the impact of repeated KX anesthesia on well-being and distress compared to single KX exposure using adult female and male C57BL/6JRj mice. We adapted our protocol of systematic well-being assessment for procedures using general anesthesia [32], which we had previously used for severity classification of repeated isoflurane anesthesia in mice [4]. In the present study, we combined behavioral observations of facial expression using the Mouse Grimace Scale (MGS), nest building, anxiety related-behavior, and activity with quantitative measures such as body weight, food intake, and stress hormone (metabolite) levels in feces and hair. Furthermore, phases of anesthesia and vital parameters were recorded. The insights of our investigation shall contribute to the refinement of anesthesia in laboratory mice.

## Methods

### Ethics statement

The study was performed according to the guidelines of the German Animal Welfare Act and the Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. Maintenance of mice and all animal experimentation were approved by the Berlin State Authority (“Landesamt für Gesundheit und Soziales”, permit number: G0053/15). Sample size calculation (primary outcome measure: effect of the anesthesia regime on fecal corticosterone metabolites) was performed to determine the number of animals necessary, as described previously [32]:  $n \geq 2 \times (s/(\mu_1 - \mu_2))^2 \times (z_\alpha + z_\beta)^2$ ;  $\mu_1 - \mu_2$  refers to the difference between population, i.e. at which power and sample size calculations are performed ( $\alpha = 5\%$ ,  $\beta = 80\%$ );  $z_\alpha = 1.96$  and  $z_\beta = 0.84$  are the quantiles of the standard normal distribution.

Following refinement measures were executed: animals were closely monitored after anesthesia. For group-housed mice (i.e. females), the duration of single housing required to measure specific parameters, i.e. nest building, home cage activity, food intake, and fecal corticosterone metabolites (FCM), was kept to a minimum. After the experiment, female mice were rehomed and male mice were used for educational purposes.

## Animals and handling methods

A total number of 33 adult female and 31 adult male C57BL/6JRj mice obtained from Janvier Labs (Saint-Berthevin Cedex, France) at 10–13 weeks of age were used. This strain was chosen since C57BL/6JRj mice are the most commonly used laboratory mice. The mice were assigned to six study groups by simple randomisation: control ♀ (n = 7), control ♂ (n = 6), single anesthesia ♀ (n = 13), single anesthesia ♂ (n = 13), repeated anesthesia ♀ (n = 13), repeated anesthesia ♂ (n = 12; one mouse had to be euthanized due to respiratory depression after the sixth anesthesia). Female mice were group-housed with three to five mice in Makrolon type IV cages (55 × 33 × 20 cm). Male mice had to be single-housed in Makrolon type III cages (42 × 26 × 15 cm) during the entire study due to aggressive behavior toward conspecifics. The cages contained fine wooden bedding material (LIGNOCEL® 3–4 S, J. Rettenmaier & Söhne GmbH + Co. KG, Rosenberg, Germany) and nestlets (Ancare, UK agents, Lilloco, United Kingdom). A red plastic house (length: 100 mm, width: 90 mm, height: 55 mm; ZOONLAB GmbH, Castrop-Rauxel, Germany) and metal tunnels (length: 125 mm, diameter: 50 mm; one tunnel in Makrolon type III cages, two tunnels in Makrolon type IV cages) were provided as cage enrichment. The animals were maintained under standard conditions (room temperature: 22 ± 2 °C; relative humidity: 55 ± 10%) on a light:dark cycle of 12:12 h of artificial light with a 5 min twilight transition phase (lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m.). The mice were fed pelleted mouse diet ad libitum (Ssniff rat/mouse maintenance, Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) and had free access to tap water.

In order to prevent influence due to stress caused by male persons, both the technician and veterinarian were female [33]. One week prior to experiments, the mice were habituated to handling by combined tunnel and cup handling. The mice were carefully caught in a tunnel belonging to the standard enrichment and then transferred to the experimenter's hands. This method is known to cause less anxiety than picking up by the tail [34].

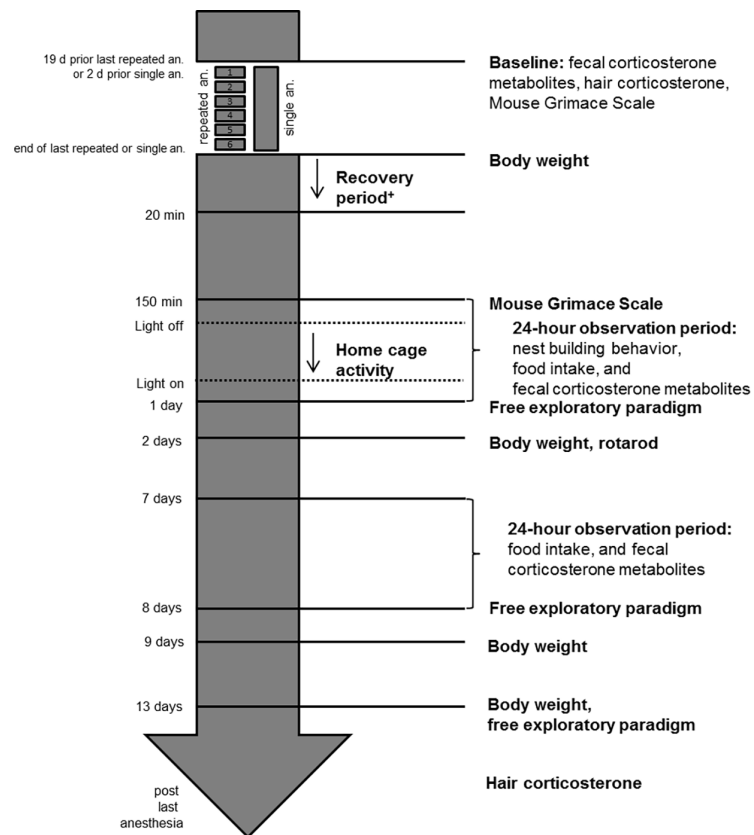
## Test schedule

In the following section, the test schedule is described in brief. Detailed information on materials and methods can be found in the respective sections. The test schedule was adapted from our previous study [4, 32] and is outlined in Fig 1. In the beginning of the experiment, photos for the baseline MGS scores were taken and samples for both baseline values of FCM and hair corticosterone were collected.

Anesthesia was performed as follows: mice in the single anesthesia-group were anesthetized once with a single KX injection, whereas mice in the repeated anesthesia-group were anesthetized six times at three to four day intervals over a period of three weeks.

After KX administration, the onset of the righting reflex loss was recorded and the pedal withdrawal reflex of the front and hind paws as well as the lid reflex were tested every min. After the pedal withdrawal reflexes were lost, all reflexes were monitored every 10 min and vital parameters (i.e. heart rate, oxygen saturation, respiratory rate, and body temperature) were carefully monitored and recorded every 20 min. The end of anesthesia was defined as the time point at which the first forward movement was observed. Mice received only one dose of KX—even if they did not reach surgical tolerance. When mice showed constant forward movements for about two to three min, they were transferred to a custom-made glass box (22 × 29 × 39 cm, consisting of three white walls and one clear wall, with 0.5 cm bedding material including soiled bedding) and their behavior was monitored for 20 min. Photographs of the mouse faces for the MGS were taken at 150 min after awakening. Afterwards, all mice were transferred into a new Makrolon type III cage and single-housed for a period of 24 h, allowing for food intake measurement and collection of fecal samples for FCM analysis. Moreover, home

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice



**Fig 1. Flow chart of the test schedule.** <sup>†</sup> Duration of resting [s], duration of locomotion [s], number of falls [n], and duration of episodes of rapid jerky dorsal-ventral head movements [s]; an.: anesthesia. This figure has been modified from Hohlbaum et al. [4, 32].

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.g001>

cage activity was recorded for 12 h during the dark period and nest building was evaluated in the morning of the following day. Measurement of food intake and FCM analyses were repeated one week later. In order to observe a change in anxiety-related and exploratory behavior over time, the free exploratory paradigm was performed at day 1, 8, and 13 after the last anesthesia. Two days after the last anesthesia, the rotarod test for motor coordination and balance was conducted and another photograph for the MGS was taken. At the end of the experiment, a sample of regrown hair was collected from the same area from which a hair sample for corticosterone measurement had been taken prior to the study. Mice were weighed regularly during the entire study period.

## Anesthesia

**Anesthesia protocol.** A stock solution was prepared in a syringe including 160  $\mu$ L Keta-vet<sup>®</sup> 100 mg/mL (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Germany), 160  $\mu$ L Rompun<sup>®</sup> 2% (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Germany), and 1680  $\mu$ L physiologic saline solution. A dosage of 80 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine [35], warmed to body temperature, was administered intraperitoneally at a volume of 10  $\mu$ L/g body weight using 27 Gauge needles. Sites of injection were alternated to prevent tissue damage [36]. After the administration of KX, the mouse was transferred to a Makrolon Typ III cage, which was placed on a heating pad. When



the mouse lost its righting reflex, it was laid in abdominal position on a heating pad and, subsequently, the loss of pedal withdrawal reflex of both front and hind paws as well as lid reflex was carefully monitored. Artificial tears (Artelac® Splash MDO®, Bausch & Lomb GmbH, Berlin, Germany) were administered to both eyes to protect them from drying out.

Control mice did not receive any treatment since we intended to investigate the impact of the entire KX injection anesthesia procedure, also including restraint and injection besides pharmacological effects. If control mice had received an injection of sodium chloride, we could have only examined the pharmacological effect of KX, which was not the main focus of this study.

**Anesthesia phases.** Anesthesia was divided in five anesthetic stages [37]: 1) induction of anesthesia starting with injection of KX and ending with the loss of righting reflex. 2) Non-surgical-tolerance was defined as the time from loss of righting reflex to loss of pedal withdrawal and lid reflex. 3) Surgical tolerance began with the loss of all reflexes examined and ended with the regain of pedal withdrawal reflex (during surgical tolerance, reflexes were tested every 10 min and the time of regaining the pedal withdrawal reflex was noted). 4) Then, the wake-up period followed (after the first reflex was regained, reflexes were tested approximately every 2 min) and ended after the first forward movement (latency to the first forward movement after anesthesia [s]). 5) The recovery period was defined as the time during which mice showed constant forward movements for about 2–3 min until 20 min after anesthesia.

**Vital parameters.** During anesthesia, vital parameters (respiratory rate, heart rate, oxygen saturation, and body temperature) were carefully monitored at 20 min and 40 min after injection. Respiratory rate was counted for 15 sec and calculated for 1 min [breaths per min]. A pulse oximeter (MouseOx, STARR Life Sciences® Corp., Oakmont, PA, USA), attached to the shaved left hind leg, was used to measure heart rate [beats per min] and oxygen saturation [%]. Body temperature was measured using a rectal probe.

### Recovery period

The mice were video-recorded for 20 min after the first forward movement in the custom-made photography cube. Duration of resting (no movement of the limbs and the head) [s], duration of locomotion [s], number of falls (while walking the mouse loses balance and falls on its left or right side; falls are defined as a pattern of ataxic gait [38]) [n], and duration of episodes of rapid jerky dorsal-ventral head movements [s] with the body remaining stationary (these movements can be defined as stereotypic behavior [39]) were manually measured with ethological analyses software (Etholog version 2.2.5 [40]).

### Behavioral parameters and stress hormone (metabolite) analyses

The MGS, nest building, home cage activity during the dark period, the free exploratory paradigm for trait anxiety related behavior, the rotarod test for motor coordination and balance, food intake/body weight, FCM concentrations for acute stress during the 24-h post-anesthetic period, and hair corticosterone concentrations for chronic stress were investigated as described in [S1 Methods](#) and in our previous studies [4, 32].

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Version 23 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Explorative data analysis and tests for normality were performed for each parameter. First, differences between female groups (control, single anesthesia, repeated anesthesia), secondly, differences between male groups (control, single anesthesia, repeated anesthesia), and, thirdly, sex differences (female versus male control, female versus male single anesthesia,

female versus male repeated anesthesia) were analyzed using the respective test indicated in results section (repeated measures ANOVA, One-way ANOVA, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test or unpaired Student t-test). Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Fleiss kappa was calculated using Microsoft Excel (2013). It is important to note that mice, which did not reach surgical tolerance, were not excluded from statistical analyses. One male mouse of the repeated anesthesia group was excluded from the statistics since it had to be euthanized after the sixth anesthesia due to dyspnea.

## Results

### Anesthesia

**Phases of anesthesia. Comparison of females:** Repeated anesthesia significantly shortened the overall duration of anesthesia (unpaired Student t-test:  $t = 5.026$ ,  $df = 16.187$ ,  $p < 0.001$ ) and the duration of surgical tolerance (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 16.000$ ,  $p < 0.001$ ) compared to a single anesthesia (Table 1). During the sixth anesthesia, four mice did not reach surgical tolerance.

**Comparison of males:** In comparison to a single anesthesia, repeated anesthesia significantly shortened the overall duration of anesthesia (unpaired Student t-test:  $t = 3.494$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.002$ ) (Table 1). Duration of surgical tolerance was also shorter in mice repeatedly anesthetized compared to mice anesthetized only once but no statistical significance was reached (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 51.000$ ,  $p = 0.152$ ). During the sixth anesthesia, one mouse did not reach surgical tolerance.

**Sex differences:** Sex differences were observed after a single anesthesia with a shorter wake-up period in female mice (unpaired Student t-test:  $t = -2.281$ ,  $df = 24$ ,  $p = 0.032$ ) and also after repeated anesthesia with a shorter overall anesthesia duration in female mice (unpaired Student t-test:  $t = 4.476$ ,  $df = 16.624$ ,  $p < 0.001$ ) (Table 1).

**Vital parameters.** The measurements of heart rate, oxygen saturation, respiratory rate, and body temperature at 20 min and 40 min after injection were averaged (for the groups with repeated anesthesia, values of the sixth anesthesia used) (Table 2).

**Comparison of females:** Vital parameters did not differ between single and repeated anesthesia (heart rate: unpaired Student t-test:  $t = -1.589$ ,  $df = 18.815$ ,  $p = 0.129$ ; oxygen saturation: unpaired Student t-test:  $t = 0.562$ ,  $df = 24$ ,  $p = 0.580$ ; respiratory rate: unpaired Student t-test:  $t = -0.649$ ,  $df = 24$ ,  $p = 0.522$ ; body temperature: unpaired Student t-test:  $t = -0.118$ ,  $df = 24$ ,  $p = 0.907$ ) (Table 2).

Table 1. Phases of anesthesia.

Group	Induction <sup>1</sup> [s]	Non-surgical tolerance <sup>1</sup> [s]	Surgical tolerance <sup>2</sup> [s]	Wake-up period <sup>2</sup> [s]	Duration of anesthesia <sup>2</sup> [s]
Single anesthesia ♀ (n = 13)	96 ± 31	444 ± 195	2658 ± 705	1507 ± 426 <sup>#</sup>	4609 ± 658
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	93 ± 10	594 ± 403	1394 ± 846 <sup>***</sup>	1578 ± 273	3612 ± 279 <sup>***,###</sup>
Single anesthesia ♂ (n = 13)	108 ± 28	595 ± 287	2471 ± 1000	1991 ± 636	5057 ± 474
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	90 ± 26	817 ± 755	1714 ± 1120	1814 ± 830	4365 ± 517 <sup>**</sup>

Data are given as mean ± standard deviation.

<sup>1</sup>Data were analyzed using Mann-Whitney-U-Test or

<sup>2</sup>unpaired Student t-test

\*\*  $p < 0.01$

\*\*\*  $p < 0.001$  versus single anesthesia

<sup>#</sup>  $p < 0.05$

###  $p < 0.001$  versus corresponding ♂. ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t001>

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

**Table 2. Vital parameters.**

Group	Heart rate [bpm]	Oxygen saturation [%]	Respiratory rate [brpm]	Body temperature [°C]
Single anesthesia ♀ (n = 13)	280 ± 32	77.5 ± 4.3 <sup>#</sup>	147 ± 19	36.2 ± 0.5
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	296 ± 18	76.6 ± 4.4	152 ± 14	36.3 ± 0.3
Single anesthesia ♂ (n = 13)	285 ± 25	73.4 ± 4.9	151 ± 20	36.4 ± 0.4
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	297 ± 30	75.4 ± 4.9	157 ± 12	36.4 ± 0.2

Data are given as mean ± standard deviation. bpm: beats per min; brpm: breaths per min. Data were analyzed using unpaired Student t-test:

<sup>#</sup> p < 0.05 versus corresponding ♂. ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t002>

**Comparison of males:** Vital parameters did not differ between single and repeated anesthesia (heart rate: unpaired Student t-test:  $t = -1.044$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.307$ ; oxygen saturation: unpaired Student t-test:  $t = -1.006$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.325$ ; respiratory rate: unpaired Student t-test:  $t = -0.931$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.362$ ; body temperature: unpaired Student t-test:  $t = -0.222$ ,  $df = 18.449$ ,  $p = 0.827$ ) (Table 2).

**Sex differences:** There was a significant difference in oxygen saturation only. Oxygen saturation was higher in females than it was in males during single anesthesia (unpaired Student t-test:  $t = 2.279$ ,  $df = 24$ ,  $p = 0.032$ ) (Table 2).

## Recovery period

**Comparison of females:** During the recovery period, the number of falls was more frequently observed after repeated anesthesia than after single anesthesia (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 133.500$ ,  $p = 0.010$ ) (Table 3). Furthermore, the duration of episodes of rapid jerky dorsal-ventral head movements was longer after repeated anesthesia compared to single anesthesia but statistical significance was not reached (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 104.000$ ,  $p = 0.336$ ).

**Comparison of males:** Repeated anesthesia increased both number of falls (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 135.000$ ,  $p = 0.001$ ) and duration of episodes of rapid jerky dorsal-ventral head movements (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 139.000$ ,  $p < 0.001$ ) in comparison to single anesthesia (Table 3).

**Table 3. Recovery period.**

Group	Duration of resting <sup>2</sup> [s]		Duration of locomotion <sup>2</sup> [s]		Number of falls <sup>1</sup> [n]		Duration of episodes of rapid jerky dorsal-ventral head movements <sup>1</sup> [s]	
	M	IQR	M	IQR	M	IQR	M	IQR
Single anesthesia ♀ (n = 13)	453	318–679	468	251–606	4	1–8	160	96–299
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	298	231–469	540 <sup>#</sup>	439–594	25*	15–56	300	116–387
Single anesthesia ♂ (n = 13)	490	341–692	472	281–752	1	0–10	144	75–212
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	417	244–601	403	255–490	16**	10–34	382***	202–500

Data are given as median (M) and interquartile range (IQR). Data were analyzed using

<sup>1</sup>Mann-Whitney-U-Test or

<sup>2</sup>unpaired Student t-test.

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

\*\*\* p < 0.001 versus a single anesthesia

<sup>#</sup> p < 0.05 versus corresponding ♂. ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t003>

**Sex differences:** Sex differences were detected for the duration of locomotion, which was higher in female mice than it was in male mice after repeated anesthesia (unpaired Student t-test:  $t = -2.628$ ,  $df = 23$ ,  $p = 0.015$ ) (Table 3).

### Behavioral parameters and stress hormone (metabolite) analyses

**Mouse Grimace Scale (MGS).** For the MGS difference scores, Fleiss' kappa ( $\kappa = 0.34$ ) indicated fair agreement [41] between the 4 independent scorers, when MGS difference scores were divided into the following categories: 1) MGS difference score  $\leq 0.5$ , 2)  $0.5 < \text{MGS difference score} \leq 1.0$ , 3)  $1.0 < \text{MGS difference score} \leq 1.5$ , 4)  $1.5 < \text{MGS difference score} \leq 2.0$ .

**Comparison of females:** Both single (Kruskal-Wallis-Test:  $z = 3.271$ ,  $p = 0.003$ ) and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $z = 3.331$ ,  $p = 0.003$ ) caused significant higher MGS difference scores versus control at 150 min after the last anesthesia (Fig 2A). Two days after the last anesthesia, the MGS difference scores no longer differed from control animals (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 0.633$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.701$ ).

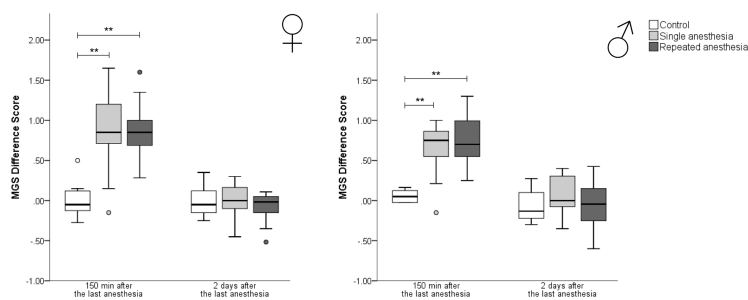
**Comparison of males:** Both single (Kruskal-Wallis-Test:  $z = 3.150$ ,  $p = 0.005$ ) and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $z = 3.264$ ,  $p = 0.003$ ) significantly increased MGS difference scores versus control at 150 min after the last anesthesia (Fig 2B). Two days after the last anesthesia, there were no differences between the groups anymore (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 1.379$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.502$ ).

**Sex differences:** No sex differences were found at 150 min (Mann-Whitney-U-Test: control:  $U = 24.000$ ,  $p = 0.731$ ; single anesthesia:  $U = 55.000$ ,  $p = 0.139$ ; repeated anesthesia:  $U = 59.000$ ,  $p = 0.320$ ) or two days (Mann-Whitney-U-Test: control:  $U = 16.500$ ,  $p = 0.534$ ; single anesthesia:  $U = 66.500$ ,  $p = 0.601$ ; repeated anesthesia:  $U = 83.500$ ,  $p = 0.769$ ) after the last anesthesia.

**Nest building. Comparison of females:** No significant differences in the nest scores were found between control, single anesthesia, and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 4.331$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.115$ ) (Table 4).

**Comparison of males:** There were no differences between control, single anesthesia, and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 4.266$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.118$ ) (Table 4).

**Sex differences:** The Mann-Whitney-U-Test revealed no sex differences (control:  $U = 18.500$ ,  $p = 0.731$ ; single anesthesia:  $U = 107.000$ ,  $p = 0.264$ ; repeated anesthesia:  $U = 59.500$ ,  $p = 0.320$ ).



**Fig 2. Mouse Grimace Scale difference scores.** MGS, Mouse Grimace Scale; ♀: females; ♂: males. Data are presented as boxplot diagrams: the box represents the interquartile range (IQR), box edges are the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quartile. The whiskers represent values which are not greater than  $1.5 \times \text{IQR}$ . Dots are outliers with values between  $1.5\text{--}3.0 \times \text{IQR}$ . Grey asterisks are outliers with values greater than  $3.0 \times \text{IQR}$ . Data were analyzed using Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test \*\*  $p < 0.01$  versus control). (A) Control ♀:  $n = 7$ , single anesthesia ♀:  $n = 13$  at 150 min ( $n = 9$  at day two; at this study day, four mice of the single anesthesia group were excluded from statistics due to technical malfunction of the camera), repeated anesthesia ♀:  $n = 13$ . (B) Control ♂:  $n = 6$ , single anesthesia ♂:  $n = 13$ , repeated anesthesia ♂:  $n = 12$ .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.g002>

**Table 4. Nest building.**

Group	M	IQR
Control ♀ (n = 7)	5.0	4.0–5.0
Single anesthesia ♀ (n = 13)	4.0	2.0–4.5
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	3.0	3.0–4.0
Control ♂ (n = 6)	4.5	3.5–5.0
Single anesthesia ♂ (n = 13)	5.0	3.0–5.0
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	2.5	2.0–4.0

Data are given as median (M) and interquartile range (IQR). Data were analyzed using Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test. ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t004>

**Home cage activity. Comparison of females:** On day one after the last anesthesia, Kruskal-Wallis-Analysis revealed no differences in the home cage activity during the dark period between control animals and the two treatment groups ( $\text{Chi}^2 = 0.498$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.780$ ) (Table 5).

**Comparison of males:** There was no significant difference in the home cage activity during the dark period between control mice and the two anesthesia groups ( $\text{Chi}^2 = 5.271$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.072$ ) (Table 5).

**Sex differences:** Mann-Whitney-U-Test showed no sex differences in the home cage activity (control:  $U = 28.000$ ,  $p = 0.132$ ; single anesthesia:  $U = 61.000$ ,  $p = 0.376$ ; repeated anesthesia:  $U = 29.000$ ,  $p = 0.340$ ).

**Rotarod test. Comparison of females:** In the rotarod test, Kruskal-Wallis-Analysis revealed no significant differences in the latency to fall between the control, single anesthesia, and repeated anesthesia ( $\text{Chi}^2 = 0.722$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.697$ ) (Table 6).

**Comparison of males:** In male mice, the latency to fall in the rotarod test did not significantly differ between the three groups ( $\text{Chi}^2 = 2.295$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.317$ ) (Table 6).

**Sex differences:** No sex differences were found (control:  $U = 21.000$ ,  $p = 1.000$ ; single anesthesia:  $U = 87.000$ ,  $p = 0.920$ ; repeated anesthesia:  $U = 64.000$ ,  $p = 0.470$ ).

**Free exploratory paradigm.** In the free exploratory paradigm for trait anxiety-related and exploratory behavior, all mice, independently of the group, explored the cage top.

**Table 5. Home cage activity during the dark period (one day after the last anesthesia).**

Group	AUC of home cage activity [impulses/10min]	
	Median	IQR
Control ♀ (n = 6)	4.5M	2.8M–6.5M
Single anesthesia ♀ (n = 12)	5.5M	3.1M–7.7M
Repeated anesthesia ♀ (n = 9)	5.6M	4.0M–7.3M
Control ♂ (n = 6)	6.2M	5.3M–7.7M
Single anesthesia ♂ (n = 13)	3.7M	3.3M–6.2M
Repeated anesthesia ♂ (n = 9)	4.8M	3.4M–5.9M

Data are given as median and interquartile range (IQR). AUC: area under the curve; M: million. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test. ♀: females; ♂: males.

Due to technical malfunction of the InfraMot system, one mouse of the control ♀ group, one mouse of the single anesthesia ♀ group, four mice of the repeated anesthesia ♀ group, and three mice of the repeated anesthesia ♂ group were excluded from statistics.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t005>

Table 6. Physical fitness (two days after the last anesthesia).

Group	Latency to fall in the rotarod test [s]	
	2 days after the last anesthesia	
	M	IQR
Control ♀ (n = 7)	300	237–300
Single anesthesia ♀ (n = 13)	300	210–300
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	280	178–300
Control ♂ (n = 6)	300	249–300
Single anesthesia ♂ (n = 13)	300	217–300
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	261	130–300

Data are given as median (M) and interquartile range (IQR). Data were analyzed using the Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test. ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t006>

**Comparison of females:** Animals repeatedly treated with KX showed a significantly higher latency to explore the top of the cage one day after the last anesthesia than control mice (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 13.670$ ;  $df = 2$ ,  $z = 3.671$ ,  $p = 0.001$ ). This effect was still present eight days after anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 11.673$ ;  $df = 2$ , repeated anesthesia versus control:  $z = 3.036$ ,  $p = 0.007$ ). In addition, on day eight animals exposed only to a single KX anesthesia also took significantly longer to explore the outside of the cage (single anesthesia versus control:  $z = 3.164$ ,  $p = 0.005$ ). On day 13 after the last anesthesia, there were no significant differences in the latency to explore between the three groups anymore (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 3.429$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.180$ ) (Fig 3A).

**Comparison of males:** There were no significant differences in the latency to explore between the groups on day one (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 0.974$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.614$ ), 8 days (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 4.805$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.091$ ) and at 13 days (Kruskal-Wallis-Test:  $\chi^2 = 0.258$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0.258$ ) after the last anesthesia (Fig 3B).

**Sex differences:** On day eight after the last anesthesia, there was a significant difference in the latency to explore in mice receiving repeated anesthesia, with a lower latency to explore in male mice versus female mice (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 33.500$ ,  $p = 0.014$ ).

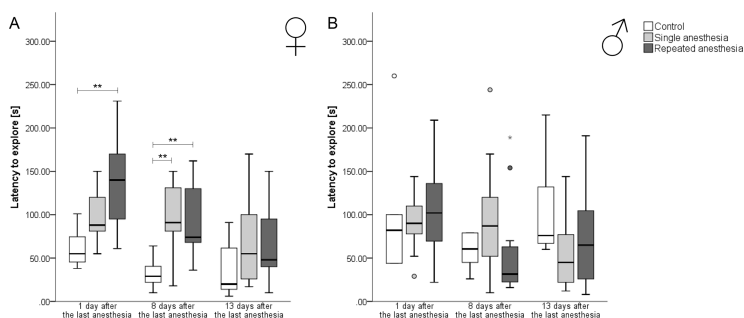


Fig 3. Latency to explore in the free exploratory paradigm for trait anxiety-related and exploratory behavior. ♀: females; ♂: males. Data are presented as boxplot diagrams: the box represents the interquartile range (IQR), box edges are the 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> quartile. The whiskers represent values which are not greater than  $1.5 \times$  IQR. Dots are outliers with values between  $1.5 - 3.0 \times$  IQR. Grey asterisks are outliers with values greater than  $3.0 \times$  IQR. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test (\*\*  $p < 0.01$  versus repeated anesthesia). (A) Control ♀: n = 7, single anesthesia ♀: n = 13, repeated anesthesia ♀: n = 13. (B) Control ♂: n = 6, single anesthesia ♂: n = 13, repeated anesthesia ♂: n = 12.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.g003>

Table 7. Food intake.

Group	Food Intake[g/g body weight]	
	1 day after last anesthesia	8 days after last anesthesia
Control ♀ (n = 7)	0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.08
Single anesthesia ♀ (n = 13)	0.20 ± 0.04 <sup>#</sup>	0.20 ± 0.06
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	0.19 ± 0.04	0.20 ± 0.07
Control ♂ (n = 6)	0.17 ± 0.03	0.21 ± 0.03
Single anesthesia ♂ (n = 13)	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.05
Repeated anesthesia ♂ (n = 12)	0.18 ± 0.04 <sup>*</sup>	0.22 ± 0.04

Data are given as mean ± standard deviation. Data were analyzed using One-way ANOVA with post-hoc Dunnett-T3 (\* p < 0.05 versus single anesthesia) or, for sex differences, unpaired Student t-Test (<sup>#</sup> p < 0.01 versus corresponding ♂). ♀: females; ♂: males.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t007>

**Food intake. Comparison of females:** One-way ANOVA revealed no significant difference in food intake between the three groups on day one (One-way ANOVA: F = 1.039, between-group df = 2, within-group df = 30, p = 0.366) and day eight (F = 0.221, between-group df = 2, within-group df = 30, p = 0.803) after the last anesthesia (Table 7).

**Comparison of males:** There was a significant difference in food intake between single and repeated anesthesia on day one after the last anesthesia (One-way ANOVA: F = 4.292, between-group df = 2, within-group df = 28, p = 0.024; post-hoc Dunnett-T3: p = 0.031) (Table 7). Male mice receiving single anesthesia ingested significantly less food in comparison to male mice receiving repeated anesthesia. Eight days after the last anesthesia, there was no significant difference between the groups (One-way ANOVA: F = 1.739, between-group df = 2, within-group df = 28, p = 0.194).

**Sex differences:** On day one after the last anesthesia, there was no significant sex difference in food intake after repeated anesthesia (unpaired Student t-Test: t = 0.404, df = 23, p = 0.690) or between controls (unpaired Student t-Test: t = 1.980, df = 11, p = 0.073). However, after single anesthesia, males ingested significantly less food than females did (unpaired Student t-Test: t = 3.680, df = 24, p = 0.001) (Table 7).

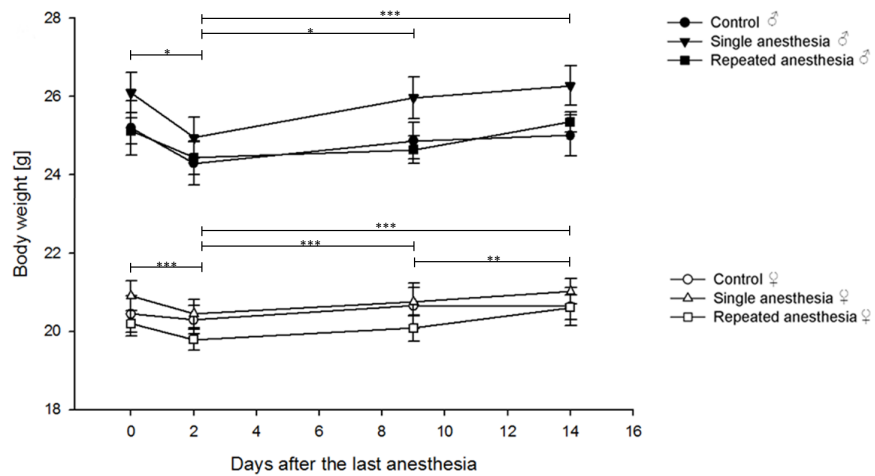
**Body weight.** Tests of between-subject comparison indicated that the group (using repeated measures ANOVA with group as between-subject factor: females: F = 0.803, between-group df = 2, within-group df = 30, p = 0.457; males: F = 1.500, between-group df = 2, within-group df = 28, p = 0.241) had no effect on the body weight, but there was a significant time effect (females: F = 10413.101, between-group df = 2, within-group df = 30, p < 0.001; males: F = 7622.477, between-group df = 2, within-group df = 28, p < 0.001) (Fig 4).

## Corticosterone and its metabolites

For each mouse, the percentage change [%] relative to baseline was calculated with baseline values being defined as 100%.

**Comparison of females:** On day one (Kruskal-Wallis-Test: Chi<sup>2</sup> = 3.682, df = 2, p = 0.159) after the last anesthesia, FCM concentrations were higher after single anesthesia, despite no statistical significance being reached between the three female groups. On day eight (Kruskal-Wallis-Test: Chi<sup>2</sup> = 0.099, df = 2, p = 0.952) after the last anesthesia, female groups did not significantly differ in their FCM concentrations. Moreover, there was no statistically significant difference in hair corticosterone levels between control, single anesthesia, and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test: Chi<sup>2</sup> = 4.431, df = 2, p = 0.109) (Table 8, S1 Table).

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice



**Fig 4. Course of body weight.** Data are given as mean  $\pm$  standard error. (A) Control ♀: n = 7, single anesthesia ♀: n = 13, repeated anesthesia ♀: n = 13. (B) Control ♂: n = 6, single anesthesia ♂: n = 13, repeated anesthesia ♂: n = 12. Data were analyzed using repeated measures ANOVA with group as between-subject factor (pairwise comparisons using Bonferroni correction: \* p < 0.05, \*\*\* p < 0.001 versus day two; \*\* p < 0.01 versus day 14).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.g004>

**Comparison of males:** Single anesthesia increased FCM concentrations on day one after the last anesthesia compared to control mice (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 7.177$ ,  $\text{df} = 2$ ; single anesthesia versus control:  $z = 2.674$ ,  $p = 0.022$ ), whereas no significant change in FCM concentrations on day eight could be detected (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 1.276$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.528$ ) (Table 8). Hair corticosterone levels did not significantly differ between control, single anesthesia, and repeated anesthesia (Kruskal-Wallis-Test:  $\text{Chi}^2 = 0.498$ ,  $\text{df} = 2$ ,  $p = 0.780$ ) (Table 8).

**Sex differences:** One day after the single anesthesia, the percentage change relative to FCM baseline values was higher in males when compared to females (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 128.000$ ,  $p = 0.026$ ) (Table 8). There were no sex differences in hair corticosterone concentrations in control mice (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 21.000$ ,  $p = 1.000$ ), mice with single anesthesia (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 114.000$ ,  $p = 0.139$ ), and mice with repeated anesthesia (Mann-Whitney-U-Test:  $U = 146.000$ ,  $p = 0.649$ ) (Table 8).

**Table 8. Fecal corticosterone metabolites (FCM) and hair corticosterone.**

Group	FCM [%]				Hair corticosterone [%]	
	1 day after the last anesthesia		8 days after the last anesthesia		M	IQR
	M	IQR	M	IQR		
Control ♀ (n = 7)	102.74	87.05–139.52	147.02	75.57–154.88	87.37	81.45–105.83
Single anesthesia ♀ (n = 13)	146.35 <sup>#</sup>	105.90–187.89	138.87	109.32–157.76	71.95	10.34–88.99
Repeated anesthesia ♀ (n = 13)	117.15	84.35–132.31	124.89	107.50–178.80	88.69	71.36–111.28
Control ♂ (n = 6)	124.94	76.13–153.02	95.11	84.84–141.28	87.00	82.52–95.00
Single anesthesia ♂ (n = 13)	220.49 <sup>*</sup>	154.90–248.58	125.44	83.16–171.47	102.04	33.26–126.90
Repeated anesthesia ♂ (n = 12) <sup>a</sup>	181.72	97.92–225.01	173.15	62.18–254.29	99.02	76.98–135.39

The percentage change relative to the baseline value was calculated. Baseline values are defined as 100%. Data are given as median (M) and interquartile range (IQR). FCM: fecal corticosterone metabolites. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis-Test with post-hoc Dunn-Bonferroni test (\* p < 0.05 versus control) or, for sex differences, Mann-Whitney-U-Test (<sup>#</sup> p < 0.05 versus corresponding ♂). ♀: females; ♂: males.

<sup>a</sup> One male mouse of the repeated anesthesia group was excluded from the statistics concerning hair corticosterone (n = 11) since too little sample material was available.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203559.t008>



## Discussion

Within the context of refinement, the aim of this study was to investigate whether repeated anesthesia with the combination of ketamine and xylazine (KX) has a higher impact on well-being of adult female and male C57BL/6JRj mice than single anesthesia with KX. Body weight, corticosterone (metabolite) concentrations, and behavioral parameters such as nest building, MGS, food intake, anxiety-related behavior, and motor activity were compared between single and repeated anesthesia. Furthermore, parameters of anesthesia monitoring, e.g. phases of anesthesia and vital parameters, were recorded.

When investigating the impact of repeated anesthesia with KX on well-being of mice, it has to be considered that these effects can be caused by the procedure itself, i.e. restraining and injection stress when administering the drug, bad experience due to the loss of control during anesthesia and the recovery period, but can also be the result of direct pharmacological drug effects. In our study, the whole process of anesthesia including pharmacological effects, as well as restraining and injection stress was of interest.

The main findings of our study were that repeated anesthesia with KX caused short-term effects on MGS scores in the immediate post-anesthetic period and on well-being of female mice, indicated by longer lasting effects on trait anxiety-related behavior. The rapid jerky dorsal-ventral head movements may suggest more intense psychogenic effects after repeated *versus* single administration of KX. However, MGS scores and well-being were also slightly impaired in the immediate post-anesthetic period after single KX anesthesia: compared to control animals, MGS scores increased and, in females, higher trait anxiety levels were observed. Short-term changes in food intake, depending on sex, and FCM excretion pointed towards mice being likely to suffer from distress after single anesthesia, whereas they seemed to habituate to the stress induced by the repeated procedure of KX anesthesia. Additionally, we observed a shortened duration of KX anesthesia after repeated administration which points towards a narcotic tolerance development to KX.

## Free exploratory paradigm

Repeated anesthesia with KX increased the latency to explore in the free exploratory paradigm in females, but not in males, indicating higher trait anxiety levels in female mice. This is in line with investigations of repeated ketamine administration revealing opposite behavioral effects in female and male mice, indicated by anxiogenic effect exertion in the open field, a test for state anxiety, in females [16]. In contrast, it had been shown that female rats did not display higher state anxiety levels in the elevated plus maze test following repeated administration of ketamine [42]. For  $\alpha_2$ -adrenoceptor-agonists, anxiolytic properties were described [43]. When determining causes of trait anxiety increase, the injection stress as a confounding factor for anxiety-related behavior must also be considered. Intraperitoneal injection of saline can cause an anxiogenic effect in the elevated plus maze test [44].

It is known that the gonadal hormones play a critical role in the effect mechanism of ketamine [45], which may explain the sex-dependent behavioral effects observed in mice. In our study, single anesthesia increased trait anxiety-related behavior at day eight and repeated anesthesia at day one and day eight after the last administration in females. This is in line with deficits induced by a chronic unpredictable stress model still being reversible in male rats seven days after a single administration of ketamine [46]. As we only conducted the free exploratory paradigm after the last anesthesia, we could not determine whether trait anxiety-related behavior was also increased after the second, third, fourth or fifth anesthesia. In order to investigate whether female mice receiving repeated anesthesia experience higher trait anxiety short-term or long-term, further investigations including tests for anxiety-related behavior after each anesthesia are warranted.

### Mouse Grimace Scale and nest building

Short-term negative effects of isoflurane anesthesia on the Mouse and Rat Grimace Scale were previously reported [4, 47, 48]. Our study is the first to show a comparable effect following anesthesia with KX in mice. At 150 min after single KX anesthesia as well as after the last repeated KX anesthesia, the MGS was higher in comparison to control levels. Photographs taken two days later showed no alteration in facial expression anymore. A pharmacological effect on the MGS cannot be excluded, as the serum half-life of ketamine is approximately 13 min in mice [49] and that of xylazine is 1.3 h in young rats, when administered intraperitoneally [50]. Latter effect is not known in mice, but elimination half-life presumably is shorter in mice than in rats [50–52]. The cataleptic effect of ketamine [10, 12], which increases the muscle tonus, may explain higher MGS scores for whisker change. Another explanation for the increase in MGS scores could be nausea. Mice do not vomit, but can suffer from post-operative nausea [53]. However, we could not determine the exact time point of their facial expression returning to control levels, as our protocol did not allow for an earlier time point to take photographs of the mice.

The effects of KX anesthesia itself on the MGS must be taken into account when applying the MGS to assess pain at early time points, as described previously for isoflurane in mice and rats [4, 47, 48].

To the authors' knowledge, nest building has not been investigated following KX anesthesia to date. It is only present when important needs of the mice are met and thus can serve as an indicator of well-being [54]. However, nest building can also be impaired by hippocampal lesions [55]. In the present study, we demonstrated that neither single nor repeated KX anesthesia impaired nest scores according to Deacon [56] one day after anesthesia (i.e. 2 h after lights turned on). It should be noted that both substances, ketamine and xylazine, evoke hypothermia in rodents [57, 58], which in turn triggers building of high and complex nests to decrease the amount of radiated heat and, thus, alleviate thermal discomfort [59]. In our previous study, we found that neither single nor repeated anesthesia with isoflurane impaired nest scores [4] obtained by using the same nesting protocol [56].

### Corticosterone and its metabolites

The influence of the circadian rhythm on FCM excretion was excluded [60] by collecting samples over the 24 h post-anesthetic period [4]. In general, HPA axis activity and corticosterone release are higher in female rodents than in males (S1 Table), which was shown for baseline [61] as well as in response to stress insults [62]. For statistical analysis, we calculated the percentage change relative to baseline values. Interestingly, at day one after the last anesthesia, the percentage change of FCM levels was higher in male than in female groups with statistical significance after single anesthesia. In addition, male mice receiving single anesthesia showed higher percentage values in comparison to controls. The increase in FCM values following single anesthesia reflected higher acute stress levels.

The same method for FCM analysis was previously used to identify a correlation between an increase in FCM levels and various stressors in mice [4], e.g. train-induced vibrations [63], oral gavage [64], and blood sampling [65].

Similar observations to our study were evident in pigtailed macaques with elevated urinary free cortisol levels after ketamine sedation [29]. The effect of KX anesthesia on plasma corticosterone concentrations seems to vary depending on sex and species. Saha et al. found a decrease in plasma levels of corticosterone in male rats following KX anesthesia [17], whereas Illera et al. determined no changes in female rabbits [66]. Accordingly, FCM concentrations in mice receiving single anesthesia were not primarily due to the pharmacological effects of

ketamine or xylazine, but rather a result of restraining and injection stress. When a mouse is restrained and injected for the first time, a clear stress response can be measured, i.e. by heart rate and plasma corticosterone increase [23]. Mice require at least two weeks to habituate to stress caused by repeated injections, as shown for C57BL/6J [67]. Our results of FCM analysis suggested that mice habituated to the procedure of anesthesia including restraining, injection, and the recovery period. Stress may be minimized by administering isoflurane anesthesia prior to the unpleasant injection of KX as described for rats [9]. In our previous study, we demonstrated that repeated administration of isoflurane for 45 min did not significantly elevate the percentage change of FCM levels relative to baseline levels when compared to single anesthesia or controls [4].

In contrast to FCM levels, hair corticosterone concentrations, which serve as a retrospective biomarker to reflect long-term HPA axis activity in humans [68] and rodents [69], did not differ between study groups. In our previous study, we also did not find any effects on hair corticosterone levels following single or repeated anesthesia with isoflurane [4]. However, studies on social defeat [70] and social instability [71] in mice have shown that hair corticosterone concentrations increase when the animals are confronted with stress.

To sum up the results of FCM and hair corticosterone concentrations, single anesthesia seemed to cause a short-term HPA axis response in mice, but did not seem to cause chronic stress.

### Food intake and body weight

Male mice anesthetized only once ingested less food in comparison to male mice receiving repeated anesthesia, which indicates distress following single anesthesia. This was also observed in pigtailed macaques with appetite suppression after ketamine sedation [29]. Ketamine disturbs the circadian rhythm and, therefore, may result in a reduced food intake [14, 72]. Moreover, an increase in stress levels, as indicated by elevated FCM levels in male mice after single KX anesthesia, can explain appetite suppression [29]. Lenglos et al. reported that acute stress decreased 24-h food intake in rats of both sexes [73]. Moreover, the injection of KX increases blood glucose levels in C57BL/6 mice of both sexes [17, 74–76], which subsequently can also reduce appetite and food intake.

Despite the changes in food intake, body weight did not statistically differ between controls, single, and repeated anesthesia. For both anesthesia regimens, body weight decreased two days after the last anesthesia, but increased over the following days. As control mice of both sexes also lost weight at this time point, body weight appeared to be influenced by single housing required during the 24-h observation period, although all efforts were made to reduce distress (used bedding material; visual, acoustic and olfactory contact; duration of single housing kept to a minimum).

A similar body weight loss was present in control and male rats administered with a single anesthesia of ketamine, xylazine, and acepromazine [27]. Dholakia et al. reported that male CD-1 mice at four to six weeks of age also lost an average of 1.6% in body weight by day two post-anesthesia with ketamine-xylazine-lidocaine [26]. Interestingly, in our study, female and male mice anesthetized only once lost nearly twice as much body weight than those anesthetized repeatedly. The lower loss in body weight after repeated anesthesia may be due to habituation to the anesthesia procedure, as suggested by the lower FCM levels. Also, the higher body weight loss after single anesthesia may be due to forced diuresis. Xylazine increases urine production and excretion [77]. This effect may be stronger after single anesthesia since repeated administration of xylazine can result in its tolerance, as also shown for its analgesic effect [78].

## Recovery period

KX anesthesia produced stereotypic behavior (i.e. rapid jerky dorsal-ventral head movements while being stationary [39]) during the recovery period. The NMDA receptor antagonist ketamine is known to cause stereotypies, ataxia, and hyperlocomotion in rats [79] and mice [80]. Behavioral patterns such as head weaving, ataxia, infrequent circling, and reciprocal forepaw treading were described in rats following administration of an uncompetitive NMDA receptor antagonist [81]. Interestingly, ketamine also enhances the head twitch response mediated by the 5-HT<sub>2</sub> (serotonin, 5-Hydroxytryptamine) receptor in mice indicating a glutamatergic modulation of serotonergic function at the postsynaptic 5-HT<sub>2</sub> receptor [82, 83]. More recently, the affinity of the NMDA receptor antagonists phencyclidine and its congener ketamine for both 5-HT<sub>2</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors was proven [84]. Thus, it is possible that the rapid jerky dorsal-ventral head movements we observed in our study are 5-HT<sub>2</sub>-mediated head twitch responses which serves as behavioral assay for hallucinogen-like effects [85]. This behavior pattern was exacerbated when KX was repeatedly administered, suggesting an increase in psychogenic effects, which has been observed in frequent ketamine users displaying greater dissociative and delusional symptoms [86].

## Anesthesia

With repeated administration of KX the overall duration of anesthesia decreased in mice of both sexes with a shorter duration in females. This is in line with findings in rats [28, 31] and rhesus macaques [87] repeatedly anesthetized with KX. A daily intraperitoneal treatment with low dose-ketamine over 10 days in rats resulted in a faster metabolism of ketamine so that circulating and brain levels of ketamine and its N-demethylated metabolite decreased more rapidly [31]. Consequently, Livingston and Waterman concluded that narcotic tolerance to ketamine in rats can be explained by an increase in hepatic metabolism [31]. We suggest that the decrease in overall anesthesia duration and surgical tolerance in mice with repeated anesthesia may also be associated with similar mechanisms. In addition, as stated previously, a tolerance can also be developed against xylazine [78].

In our study, surgical tolerance was reached in all mice anesthetized only once but KX failed to produce surgical tolerance in a total of five mice when the sixth anesthesia was performed. Thus, we could not verify previous findings of Arras *et al.* [8]. Since higher doses and repeat-bolus dosing can prolong the recovery period and cause severe respiratory depression [21], which increases the risk of mortality [8, 88], all mice received only one of KX dose in our study—even if they did not reach surgical tolerance.

KX anesthesia depressed the heart and respiratory rate in the present study, as expected from literature [89], however, without difference between single and repeated anesthesia. This is consistent with the effect of repeated KX anesthesia on heart rate in rats, which underwent the same anesthesia protocol as mice of our study [28]. Although KX anesthesia is known to cause hypoxemia, oxygen administration is still not common laboratory practice [90, 91]. As our study was designed to model a common KX anesthesia protocol, oxygen was not supplied [91]. Consequently, all mice in our study suffered hypoxemia. In humans, hypoxemia can elicit the subjective feelings of malaise, headache, dizziness, fatigue, and insomnia (e.g. when suffering from acute mountain sickness) [92]. If we expect similar responses in mice, hypoxemia will impair well-being, which emphasizes the need of oxygen administration during KX anesthesia. Dittmar *et al.* pointed out the importance of pre-oxygenation prior to administration of KX [9]. Further, oxygen insufflation should be continued until animals reach a stable anesthesia state [9]. In contrast to anesthesia with KX, we measured high values of oxygen saturation

(> 98%) during inhalation anesthesia with isoflurane (in 100% oxygen) in our previous study [4].

### Limitation

Limitations of this study are the use of this exact anesthesia protocol and dosage in solely one particular mouse strain. Firstly, strain-dependent stress responses and tolerances towards KX dosages are known [8, 67]. Besides the KX dose, anesthesia protocols vary in duration of anesthetic episodes, number of consecutive anesthetic episodes, and intervals between the anesthetic episodes. In the present study, we followed an anesthesia protocol described by Albrecht et al. [28] and used a dosage of 80 mg/kg ketamine and 16 mg/kg xylazine [35]. The effects of repeated KX anesthesia on well-being of mice revealed here only refer to this anesthesia protocol and cannot be transferred to other protocols. The present study can serve as a basis for further investigations of different anesthesia protocols (e.g. anesthesia episodes at an interval of 1–2–4–8 weeks). The authors would like to encourage the implementation of the methods described here in studies with repeated anesthetization to investigate the effects of the respective anesthesia protocol on the well-being of mice. The methods can easily be integrated in a planned study.

Since control animals did not receive a vehicle injection, we cannot determine whether effects observed in our study were due to pharmacological KX effects or whether they were caused by restraining and injection stress. Control animals were not injected with a vehicle solution because our study should investigate the impact of the entire KX injection anesthesia procedure, also including restraint and injection besides pharmacological effects. If control mice had received a vehicle injection, we could have only examined the pharmacological effect of KX.

The injection site was not histologically examined. Depending on the route of administration, KX can cause tissue damage at the injection site. Whilst intramuscular injection of KX causes tissue damage [28, 93, 94], subcutaneous injection leads to mild edema with mixed infiltration of neutrophils and lymphocytes [95] at the injection site in rodents. The same also applies to the intraperitoneal route, which can be accompanied by local tissue damage and an increase in serum creatine kinase concentrations in rats [25]. Wellington et al. also demonstrated that rats expressed momentary pain and discomfort after intraperitoneal injection of KX [25]. Tissue damage may be minimized by using small and short needles as well as by injection site alternation [36].

Another limitation is the single housing in new cages during the 24 h observation period, which presumably caused distress in mice indicated by a loss in body weight. However, as controls underwent the same tests, the impact of single housing on the results was considered.

For severity classification of a procedure, the duration of negative effects on well-being is essential. Depending on the duration (short-term or long-term), mild pain, suffering or distress may be classified as mild or moderate: “Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience short-term mild pain, suffering or distress, as well as procedures with no significant impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as ‘mild’. Procedures on animals as a result of which the animals are likely to experience short-term moderate pain, suffering or distress, or long-lasting mild pain, suffering or distress as well as procedures that are likely to cause moderate impairment of the well-being or general condition of the animals shall be classified as ‘moderate’ [1].” Therefore, more observations are warranted to clearly determine whether repeated KX anesthesia only causes short-term mild effects (severity category “mild”) or whether it causes long-term mild effects (severity category “moderate”).

## Conclusion

Both single and repeated anesthesia with KX for six times every three to four days increased MGS scores in adult C57BL/6JRj mice of both sexes during the immediate post-anesthetic period, whilst repeated anesthesia additionally exacerbated psychogenic effects. Effects on anxiety were sex-dependent with longer lasting effects on trait anxiety levels in female mice after both single and repeated anesthesia.

All in all, negative effects on well-being did not accumulate in repeatedly anesthetized mice since stress and anxiety levels were comparable to mice anesthetized only once. Hence, effects of both single and repeated anesthesia can be considered mild. Nevertheless, the duration of increased stress and anxiety levels, which needs to be considered in severity classification, may be longer in mice repeatedly anesthetized and should be examined in further investigations.

## Supporting information

**S1 Methods. Behavioral parameters and stress hormone (metabolite) analyses.**  
(PDF)

**S1 Table. Fecal corticosterone metabolites (FCM) and hair corticosterone.** Data are given as median (M) and interquartile range (IQR). FCM, fecal corticosterone metabolites. <sup>a</sup>1 male mouse of the repeated anesthesia group was excluded from the statistics concerning hair corticosterone because we did not collect enough sample material.  
(GIF)

**S2 Table. Raw data—fecal corticosterone metabolites.**  
(XLSX)

**S3 Table. Raw data—hair corticosterone.**  
(XLSX)

**S4 Table. Raw data—vital parameters during anesthesia.**  
(XLSX)

**S5 Table. Raw data—phases of anesthesia.**  
(XLSX)

**S6 Table. Raw data—recovery period.**  
(XLSX)

**S7 Table. Raw data—Mouse Grimace Scale.**  
(XLSX)

**S8 Table. Raw data—nest building.**  
(XLSX)

**S9 Table. Raw data—home cage activity.**  
(XLSX)

**S10 Table. Raw data—rotarod test.**  
(XLSX)

**S11 Table. Raw data—free exploratory paradigm.**  
(XLSX)

**S12 Table. Raw data—food intake.**  
(XLSX)

**S13 Table. Raw data–body weight.**  
(XLSX)

## Acknowledgments

We thank Sabine Jacobs for assisting with the sample collection and MGS scoring, Giuliano Corte and Melanie Humpenöder for MGS scoring, Edith Klobetz-Rassam for analysis of FCM, Nancy Erickson for proof reading the manuscript, and PD Dr. med. vet. habil. Roswitha Merle for assisting with statistical analysis.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Katharina Hohlbaum, Bettina Bert, Silke Dietze, Rupert Palme, Heidrun Fink, Christa Thöne-Reineke.

**Formal analysis:** Katharina Hohlbaum, Bettina Bert, Silke Dietze, Christa Thöne-Reineke.

**Funding acquisition:** Heidrun Fink, Christa Thöne-Reineke.

**Investigation:** Katharina Hohlbaum.

**Project administration:** Bettina Bert, Silke Dietze, Heidrun Fink, Christa Thöne-Reineke.

**Resources:** Rupert Palme.

**Supervision:** Bettina Bert, Heidrun Fink, Christa Thöne-Reineke.

**Visualization:** Katharina Hohlbaum, Christa Thöne-Reineke.

**Writing – original draft:** Katharina Hohlbaum, Bettina Bert, Christa Thöne-Reineke.

**Writing – review & editing:** Katharina Hohlbaum, Bettina Bert, Silke Dietze, Rupert Palme, Heidrun Fink, Christa Thöne-Reineke.

## References

1. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 2010;AB1. L276/33-L276/79.
2. Russel W, Burch R. The principles of humane experimental technique. London: Methuen; 1959.
3. Tremoleda JL, Kerton A, Gsell W. Anaesthesia and physiological monitoring during in vivo imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare. EJMML research. 2012; 2:44. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-2-44> PMID: 22877315
4. Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thone-Reineke C. Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress. PloS One. 2017; 12: e0179588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179588> PMID: 28617851
5. Eger EI 2nd. Isoflurane: a review. Anesthesiology. 1981; 55:559–76. PMID: 7027831
6. Lorenz JN. A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2002; 282:R1565–82. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00759.2001> PMID: 12010737
7. Buitrago S, Martin TE, Tetens-Woodring J, Belicha-Villanueva A, Wilding GE. Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2008; 47:11–7. PMID: 18210992
8. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rulicke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. Comp Med. 2001; 51:443–56. PMID: 11924805
9. Dittmar MS, Fehm NP, Vatankhah B, Horn M. Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications. Comp Medicine. 2004; 54:652–5.

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

10. Flecknell P. Chapter 1—Basic principles of anaesthesia. In: Flecknell P, editor: *Laboratory animal anaesthesia*. 4th ed. Boston: Academic Press; 2016. pp. 1–75.
11. Amornyotin S. Ketamine: Pharmacology revisited. *Int J Anesthesiol Res*. 2014; 2:42–4.
12. Mion G, Villeveille T. Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings). *CNS Neurosci Ther*. 2013; 19:370–80. <https://doi.org/10.1111/cns.12099> PMID: 23575437
13. White PF, Way WL, Trevor AJ. Ketamine—its pharmacology and therapeutic uses. *Anesthesiology*. 1982; 56:119–36. PMID: 6892475
14. Mihara T, Kikuchi T, Kamiya Y, Koga M, Uchimoto K, Kurahashi K, et al. Day or night administration of ketamine and pentobarbital differentially affect circadian rhythms of pineal melatonin secretion and locomotor activity in rats. *Anesth Analg*. 2012; 115:805–13. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182632bcb> PMID: 22886841
15. Franceschelli A, Sens J, Herchick S, Thelen C, Pitychoutis PM. Sex differences in the rapid and the sustained antidepressant-like effects of ketamine in stress-naïve and “depressed” mice exposed to chronic mild stress. *Neuroscience*. 2015; 290:49–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.01.008> PMID: 25595985
16. Thelen C, Sens J, Mauch J, Pandit R, Pitychoutis PM. Repeated ketamine treatment induces sex-specific behavioral and neurochemical effects in mice. *Behav Brain Res*. 2016; 312:305–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.041> PMID: 27343934
17. Saha JK, Xia J, Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; 230:777–84.
18. Greene SA, Thurmon JC. Xylazine—a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. *J Vet Pharmacol Ther*. 1988; 11:295–313. PMID: 3062194
19. Allen DG, Dyson DH, Pascoe PJ, O’Grady MR. Evaluation of a xylazine-ketamine hydrochloride combination in the cat. *Can J Vet Res*. 1986; 50:23–6. PMID: 3742353
20. Siriarchavatana P, Ayers JD, Kendall LV. Anesthetic activity of alfaxalone compared with ketamine in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2016; 55:426–30. PMID: 27423149
21. Flecknell P. Chapter 3—Special techniques. In: Flecknell P, editor. *Laboratory animal anaesthesia*. 4th ed. Boston: Academic Press; 2016. pp. 109–40.
22. Hijazi Y, Boulieu R. Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2002; 30:853–8. PMID: 12065445
23. Meijer MK, Spruijt BM, Zutphen LFMv, Baumans V. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Lab Anim*. 2006; 40:382–91. <https://doi.org/10.1258/002367706778476370> PMID: 17018209
24. Roughan JV, Ojeda OB, Flecknell PA. The influence of pre-anaesthetic administration of buprenorphine on the anaesthetic effects of ketamine/medetomidine and pentobarbitone in rats and the consequences of repeated anaesthesia. *Lab Anim*. 1999; 33:234–42. <https://doi.org/10.1258/002367799780578183> PMID: 10780842
25. Wellington D, Mikaelian I, Singer L. Comparison of Ketamine–Xylazine and Ketamine–Dexmedetomidine Anesthesia and Intraperitoneal Tolerance in Rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2013; 52: 481–7. PMID: 23849447
26. Dholakia U, Clark-Price SC, Keating SCJ, Stern AW. Anesthetic effects and body weight changes associated with ketamine-xylazine-lidocaine administered to CD-1 mice. *PLoS One*. 2017; 12:e0184911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184911> PMID: 28910423
27. Welberg LA, Kinkead B, Thirivikraman K, Huerkamp MJ, Nemeroff CB, Plotsky PM. Ketamine-xylazine-acepromazine anesthesia and postoperative recovery in rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2006; 45: 13–20.
28. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl. *BMC Vet Res*. 2014; 10:963.
29. Crockett CM, Shimoji M, Bowden DM. Behavior, appetite, and urinary cortisol responses by adult female pigtailed macaques to cage size, cage level, room change, and ketamine sedation. *Am J Primatol*. 2000; 52:63–80. [https://doi.org/10.1002/1098-2345\(200010\)52:2<63::AID-AJP1>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1098-2345(200010)52:2<63::AID-AJP1>3.0.CO;2-K) PMID: 11051442
30. Huang L, Yang G. Repeated exposure to ketamine-xylazine during early development impairs motor learning-dependent dendritic spine plasticity in adulthood. *Anesthesiology*. 2015; 122:821–31. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000579> PMID: 25575163



# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

31. Livingston A, Waterman AE. The development of tolerance to ketamine in rats and the significance of hepatic metabolism. *Br J Pharmacol*. 1978; 64:63–9. PMID: [698482](#)
32. Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C. Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia. *J Vis Exp*. 2018;(133):e57046. <https://doi.org/10.3791/57046> PMID: [29630060](#)
33. Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Meth*. 2014; 11:629–32.
34. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Meth*. 2010; 7:825–6.
35. Löscher W, Ungemach F, Kroker R. Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren. Berlin; Hamburg: Verlag Paul Parey; 1991.
36. Machholz E, Mulder G, Ruiz C, Corning BF, Pritchett-Corning KR. Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *J Vis Exp*. 2012;(67). <https://doi.org/10.3791/2771> PMID: [23051623](#)
37. Albrecht M, Henke J, Tacke S, Markert M, Guth B. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Vet Res*. 2014; 10:198. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0198-3> PMID: [25149627](#)
38. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 1968; 13:222–57. PMID: [5679627](#)
39. Liu J, Ji X-Q, Zhu X-Z. Comparison of psychic emergence reactions after (±)-ketamine and (+)-ketamine in mice. *Life Sci*. 2006; 78:1839–44. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.08.027> PMID: [16289139](#)
40. Ottoni EB. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behav Res Methods Instrum Comput*. 2000; 32:446–9. PMID: [11029818](#)
41. Hartling L, Hamm M, Milne A, Vandermeer B, Santaguida PL, Ansari M, et al. AHRQ methods for effective health care. Validity and inter-rater reliability testing of quality assessment instruments. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012.
42. Guarraci FA, Gonzalez CMF, Lucero D, Womble PD, Abdel-Rahim H, DeVore J, et al. The effects of ketamine on sexual behavior, anxiety, and locomotion in female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2017; 165:36–44. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2017.12.004> PMID: [29273457](#)
43. Millan MJ, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Milligan G, et al. S18616, a highly potent, spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoceptors: I. Receptor profile, antinociceptive and hypothermic actions in comparison with dexmedetomidine and clonidine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 295:1192–205. PMID: [11082457](#)
44. Lapin IP. Only controls: Effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995; 34:73–7. PMID: [8563035](#)
45. Carrier N, Kabbaj M. Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine. *Neuropharmacology*. 2013; 70:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.12.009> PMID: [23337256](#)
46. Li N, Liu R-J, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*. 2011; 69:754–61. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.12.015> PMID: [21292242](#)
47. Miller A, Kitson G, Skalkoyannis B, Leach M. The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. *Appl Anim Behav Sci*. 2015; 172:58–62. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.038> PMID: [26937061](#)
48. Miller AL, Golledge HD, Leach MC. The influence of isoflurane anaesthesia on the Rat Grimace Scale. *PloS One*. 2016; 11:e0166652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166652> PMID: [27855184](#)
49. Maxwell CR, Ehrlichman RS, Liang Y, Trief D, Kaness SJ, Karp J, et al. Ketamine produces lasting disruptions in encoding of sensory stimuli. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006; 316:315–24. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.091199> PMID: [16192313](#)
50. Veilleux-Lemieux D, Castel A, Carrier D, Beaudry F, Vachon P. Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2013; 52:567–70. PMID: [24041212](#)
51. Xu Q, Ming Z, Dart AM, Du XJ. Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007; 34:499–507. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2007.04601.x> PMID: [17439422](#)
52. Erickson RL, Terzi MC, Jaber SM, Hankenson FC, McKinstry-Wu A, Kelz MB, et al. Intraperitoneal continuous-rate infusion for the maintenance of anesthesia in laboratory mice (*Mus musculus*). *J Am Assoc Lab Anim Sc*. 2016; 55:548–57.

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

53. Hayase T, Tachibana S, Yamakage M. Effect of sevoflurane anesthesia on the comprehensive mRNA expression profile of the mouse hippocampus. *Med Gas Res.* 2016; 6:70–6. <https://doi.org/10.4103/2045-9912.184715> PMID: 27867470
54. Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods.* 2014; 234:139–46. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.02.001> PMID: 24525328
55. Deacon RM, Croucher A, Rawlins JN. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res.* 2002; 132:203–13. PMID: 11997150
56. Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc.* 2006; 1:1117–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170> PMID: 17406392
57. Fahim I, Ismail M, Osman OH. Role of 5-hydroxytryptamine in ketamine-induced hypothermia in the rat. *Br J Pharmacol.* 1973; 48:570–6. PMID: 4274691
58. Livingston A, Low J, Morris B. Effects of clonidine and xylazine on body temperature in the rat. *Br J Pharmacol.* 1984; 81:189–93. PMID: 6704581
59. Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol Behav.* 2013; 110–111:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.018> PMID: 23313562
60. Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav.* 2004; 45:10–22. PMID: 14733887
61. Grad B, Khalid R. Circulating corticosterone levels of young and old, male and female C57B1/6J mice. *J Gerontol.* 1968; 23:522–8. PMID: 5723490
62. Cozzoli DK, Tanchuck-Nipper MA, Kaufman MN, Horowitz CB, Finn DA. Environmental stressors influence limited-access ethanol consumption by C57BL/6J mice in a sex-dependent manner. *Alcohol.* 2014; 48:741–54. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.015> PMID: 25459519
63. Atanasov NA, Sargent JL, Parmigiani JP, Palme R, Diggs HE. Characterization of train-induced vibration and its effect on fecal corticosterone metabolites in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2015; 54:737–44. PMID: 26632783
64. Walker MK, Boberg JR, Walsh MT, Wolf V, Trujillo A, Duke MS, et al. A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012; 260:65–9. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.01.025> PMID: 22326784
65. Voigt CC, Klockner P, Touma C, Neuschl C, Brockmann G, Goritz F, et al. Hormonal stress response of laboratory mice to conventional and minimally invasive bleeding techniques. *Anim Welf.* 2013; 22:449–55.
66. Illera JC, Gonzalez Gil A, Silvan G, Illera M. The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits. *J Physiol Biochem.* 2000; 56:329–36. PMID: 11321527
67. Ryabinin AE, Wang Y-M, Finn DA. Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1999; 63:143–51. PMID: 10340535
68. Thomson S, Koren G, Fraser LA, Rieder M, Friedman TC, Van Uum SH. Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2010; 118:133–8. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220771> PMID: 19609841
69. Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, et al. Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB J.* 2015; 29:859–67. <https://doi.org/10.1096/fj.14-254474> PMID: 25398766
70. Yu T, Xu H, Wang W, Li S, Chen Z, Deng H. Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 1002:267–76. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.08.035> PMID: 26343018
71. Jarcho MR, Massner KJ, Eggert AR, Wichelt EL. Behavioral and physiological response to onset and termination of social instability in female mice. *Horm Behav.* 2016; 78:135–40. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.11.004> PMID: 26597994
72. Prudian F, Gantenbein M, Pelissier AL, Attolini L, Bruguerolle B. Daily rhythms of heart rate, temperature and locomotor activity are modified by anaesthetics in rats: a telemetric study. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol.* 1997; 355:774–8. PMID: 9205963
73. Lenglos C, Mitra A, Guevremont G, Timofeeva E. Sex differences in the effects of chronic stress and food restriction on body weight gain and brain expression of CRF and relaxin-3 in rats. *Genes Brain Behav.* 2013; 12:370–87. <https://doi.org/10.1111/gbb.12028> PMID: 23425370
74. Brown ET, Umino Y, Loi T, Solessio E, Barlow R. Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice. *Vis Neurosci.* 2005; 22:615–8. <https://doi.org/10.1017/S0952523805225105> PMID: 16332272

# Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice

75. Pomplun D, Mohlig M, Spranger J, Pfeiffer AF, Ristow M. Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57BL/6 mice. *Horm Metab Res.* 2004; 36:67–9. <https://doi.org/10.1055/s-2004-814104> PMID: [14983410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14983410/)
76. Windeløv JA, Pedersen J, Holst JJ. Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57BL/6 mice. *Physiol Rep.* 2016; 4:e12824. <https://doi.org/10.14814/phy2.12824> PMID: [27255361](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27255361/)
77. Sinclair MD. A review of the physiological effects of  $\alpha(2)$ -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can Vet J.* 2003; 44:885–97. PMID: [14664351](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14664351/)
78. Ware TD, Paul D. Cross-tolerance between analgesia produced by xylazine and selective opioid receptor subtype treatments. *Eur J Pharmacol.* 2000; 389:181–5. PMID: [10688982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10688982/)
79. Razoux F, Garcia R, Lena I. Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens. *Neuro-psychopharmacology.* 2007; 32:719–27. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301057> PMID: [16525415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16525415/)
80. Irifune M, Shimizu T, Nomoto M, Fukuda T. Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 1995; 51:291–6. PMID: [7667342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7667342/)
81. Löscher W, Hönack D. Effects of the novel 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist, (+)-way 100135, on stereotyped behaviour induced by the NMDA receptor antagonist dizocilpine in rats. *Eur J Pharmacol.* 1993; 242:99–104. PMID: [8223942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8223942/)
82. Kim HS, Park IS, Park WK. NMDA receptor antagonists enhance 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated behavior, head-twitch response, in mice. *Life Sci.* 1998; 63:2305–11. PMID: [9877220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9877220/)
83. Kim H-S, Park I-S, Lim H-K, Choi H-S. NMDA receptor antagonists enhance 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated behavior, head-twitch response, in PCPA-treated mice. *Arch Pharm Res.* 1999; 22:113–8. PMID: [10230499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10230499/)
84. Kapur S, Seeman P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 2002; 7:837–44. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001093> PMID: [12232776](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12232776/)
85. Halberstadt AL, Geyer MA. Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice. *Psychopharmacology.* 2013; 227:727–39. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3006-z> PMID: [23407781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23407781/)
86. Morgan CJ, Muetzelfeldt L, Curran HV. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction.* 2010; 105:121–33. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02761.x> PMID: [19919593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19919593/)
87. Settle TL, Rico PJ, Lugo-Roman LA. The effect of daily repeated sedation using ketamine or ketamine combined with medetomidine on physiology and anesthetic characteristics in rhesus macaques. *J Med Primatol.* 2010; 39:50–7. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2009.00393.x> PMID: [19912466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19912466/)
88. Jaber SM, Hankenson FC, Heng K, McKinstry-Wu A, Kelz MB, Marx JO. Dose Regimens, Variability, and Complications Associated with Using Repeat-Bolus Dosing to Extend a Surgical Plane of Anesthesia in Laboratory Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2014; 53:684–91. PMID: [25650976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25650976/)
89. Erhardt W, Hebestedt A, Aschenbrenner G, Pichotka B, Blumel G. A comparative study with various anesthetics in mice (pentobarbitone, ketamine-xylazine, carfentanyl-etomidate). *Res Exp Med (Berl).* 1984; 184:159–69.
90. Vogler GA. Chapter 19—Anesthesia and analgesia A2. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL, editors. *The laboratory rat.* 2nd ed. Burlington: Academic Press; 2006. pp. 627–64.
91. Hedenqvist P, Roughan JV, Flecknell PA. Effects of repeated anaesthesia with ketamine/medetomidine and of pre-anaesthetic administration of buprenorphine in rats. *Lab Anim.* 2000; 34:207–11. <https://doi.org/10.1258/002367700780457536> PMID: [10817461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10817461/)
92. Clarke C. Acute mountain sickness: medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia. *Postgrad Med J.* 2006; 82:748–53. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047662> PMID: [17099095](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17099095/)
93. Vachon P. Self-mutilation in rabbits following intramuscular ketamine-xylazine-acepromazine injections. *Can Vet J.* 1999; 40:581–2. PMID: [12001340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12001340/)
94. Gaertner DJ, Boschert KR, Schoeb TR. Muscle necrosis in Syrian hamsters resulting from intramuscular injections of ketamine and xylazine. *Lab Anim Sci.* 1987; 37:80–3. PMID: [3586612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3586612/)
95. Levin-Arama M, Abraham L, Waner T, Harmelin A, Steinberg DM, Lahav T, et al. Subcutaneous compared with intraperitoneal ketamine-xylazine for anesthesia of mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2016; 55:794–800. PMID: [27931319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27931319/)

## 6. Diskussion

---

Nach dem 3R-Prinzip sollen, wenn immer möglich, Tierversuche durch Alternativmethoden ersetzt werden. Wenn ein Tierversuch nicht durch Alternativmethoden ersetzt werden kann und als unerlässlich gilt, darf nur die notwendige Anzahl an Versuchstieren verwendet werden. Um die Tierzahl zu reduzieren, können Tiere wiederholt in einem Verfahren verwendet werden, wie beispielsweise in Bildgebungsstudien. Mit der Bildgebung ist allerdings jedes Mal eine Narkose verbunden, um die Tiere zu immobilisieren und Artefakte zu vermeiden. Gemäß Anhang VIII der RL 2010/63/EU gilt eine Allgemeinnarkose als gering belastend. Dabei wird weder die Anzahl der Narkosen noch die Gruppe der verwendeten Allgemeinanästhetika berücksichtigt, obwohl es denkbar wäre, dass wiederholte Narkosen das Wohlbefinden der Tiere stärker beeinträchtigen als eine einmalige Narkose. Zudem wäre zu vermuten, dass sich wiederholte Inhalations- und Injektionsnarkosen unterschiedlich auf das Wohlbefinden auswirken.

Werden innerhalb eines Verfahrens Interventionen wie Narkosen wiederholt durchgeführt, kann sich der Einfluss des Verfahrens auf das Wohlbefinden der Tiere über die Zeit verändern. Einerseits besteht die Möglichkeit eines Gewöhnungseffekts, wodurch sich der Schweregrad dieser Intervention mit jeder Wiederholung verringert (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Andererseits kann sich der Schweregrad aber auch erhöhen, wenn die Tiere negative Erfahrungen mit der Intervention oder den Wirkungen der Pharmaka verbinden (EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012). Dementsprechend kann der Schweregrad wiederholter Interventionen nicht einfach mit jeder Wiederholung aufsummiert werden. Es muss gesondert untersucht werden, in welchem Umfang das Wohlbefinden der Tiere beeinträchtigt ist, wenn die Intervention mehrfach durchgeführt wird. Eine wiederholte Verwendung von Tieren innerhalb eines Verfahrens ist nur sinnvoll, wenn sich dadurch der Schweregrad an Schmerzen, Leiden, Ängsten, Disstress und/oder Schäden nicht erhöht. Die Gesamtbelastung durch wiederholte Eingriffe sollte die Belastung durch einen einzelnen Eingriff nicht übersteigen, denn die Zahl an Versuchstieren darf nicht auf Kosten des Wohlbefindens einzelner Tiere reduziert werden.

Im Sinne von Refinement und Reduction wurde daher in der vorliegenden Arbeit der Effekt von wiederholten Narkosen und einer einmaligen Narkose auf das Wohlbefinden von adulten C57BL/6JRj Mäusen verglichen. Ziel war es, die Belastung durch wiederholte Narkosen gemäß der RL 2010/63/EU zu beurteilen. Untersucht wurden die in der tierexperimentellen Praxis am häufigsten verwendeten Anästhesien, die Inhalationsanästhesie mit Isofluran sowie die Injektionsanästhesie mit der Kombination aus Ketamin und Xylazin. Um die verhaltensbezogenen, biochemischen und physischen Parameter im postanästhetischen Zeitraum objektiv für jedes Einzeltier zu erfassen, entwickelten wir ein Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen. Dabei wurde das Verhalten der Tiere über einen Test für Angst-bezogenes Verhalten, die Mouse Grimace Scale, Luxury Behavior wie das Nest- sowie Wühlverhalten, die Futteraufnahme und die Aktivität ermittelt. Als biochemische Parameter wurden fäkale Kortikosteronmetabolite sowie Kortikosteron im Haar gemessen; der physische Zustand wurde über das Körpergewicht bestimmt. Darüber hinaus wurden die Atem- und Herzfrequenz sowie die Sauerstoffsättigung im Blut als physiologische Parameter während der Anästhesieüberwachung erfasst, die Anästhesiephasen bestimmt und die Aufwachphase analysiert.

### 6.1. Belastungsbeurteilung von wiederholten Inhalationsnarkosen mit Isofluran

Die wichtigsten Erkenntnisse zur Belastung von Mäusen durch wiederholte Inhalationsnarkosen mit Isofluran umfassten Effekte, die nur nach wiederholten Narkosen,

nicht aber nach einer einmaligen Narkose mit Isofluran auftraten bzw. nach wiederholten Narkosen prominenter waren als nach einer einmaligen Narkose. Im Gegensatz zu einer einmaligen Narkose verursachten wiederholte Narkosen mit Isofluran kurzzeitige Effekte auf das Wühlverhalten und, abhängig vom Geschlecht, auf das Angst-bezogene Verhalten im Free Exploratory Paradigm (Hohlbaum et al. 2017). Außerdem zeigten die Mäuse, die wiederholt narkotisiert wurden, mehr Exzitationen während der Induktionsphase und eine höhere Herzfrequenz während der nichtchirurgischen sowie chirurgischen Toleranz im Vergleich zu Tieren, die nur eine Narkose erhielten (Hohlbaum et al. 2017). Die Aktivität im Heimatkäfig, das Nestbauverhalten, das akute Stresslevel gemäß der FCM-Werte und das Körpergewicht blieben unbeeinflusst von den wiederholten Isofluran-Narkosen. Die Futteraufnahme bei weiblichen Tieren war nach wiederholten Narkosen marginal verändert. Spätestens nach acht Tagen normalisierte sich das Wohlbefinden der Tiere wieder und erreichte das Niveau der Kontrollen, wie der Free Exploratory Paradigm zeigte. Insgesamt hatten wiederholte Narkosen mit Isofluran einen geringgradig höheren Einfluss auf das Wohlbefinden der Mäuse, vor allem der Weibchen, als eine einmalige Narkose mit Isofluran (Hohlbaum et al. 2017).

Isofluran wird im Körper nur zu 0,2 % metabolisiert (Holaday et al. 1975; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH 2012). Halbwertszeiten entsprechend des Zwei-Kompartiment-Modells liegen bei 26 und 174 Minuten beim Kaninchen (Wyrwicz et al. 1987), bei Mäusen können aufgrund des schnelleren Metabolismus kürzere Zeiten angenommen werden. Demnach müssen pharmakologische Effekte in der Erholungsphase berücksichtigt werden, spielen aber im weiteren Verlauf der Beobachtungen eine untergeordnete Rolle (Hohlbaum et al. 2017).

Im Folgenden werden die wichtigsten Erkenntnisse zu den Auswirkungen von wiederholten Narkosen mit Isofluran auf das Wohlbefinden hinsichtlich der verhaltensbezogenen, physischen und physiologischen/biochemischen Parameter diskutiert.

**Verhaltensbezogene Indikatoren:** Das „Luxury Behavior“ war nach letzter wiederholter Narkose über einen kurzen Zeitraum geringgradig gestört. Das Wühlverhalten war im unmittelbaren postanästhetischen Zeitraum nach den wiederholten Narkosen bei Mäusen beider Geschlechter, vor allem bei weiblichen Mäusen, im Vergleich zu den Kontrollen reduziert, was auf ein reduziertes Wohlbefinden hindeuten kann (Hohlbaum et al. 2017). Am darauffolgenden Tag wiesen die komplexen und hohen Nester auf eine Erholung der Tiere hin (Hohlbaum et al. 2017). Schmerzen und Distress (Arras et al. 2007; Jirkof et al. 2010), aber auch hippocampale Läsionen (Deacon et al. 2001; Guenther et al. 2001; Deacon et al. 2002; Deacon et al. 2005; Felton et al. 2005; Filali et al. 2011) können das Wühl- sowie Nestbauverhalten beeinträchtigen. Nach aktuellen Erkenntnissen scheint das Wühlverhalten sogar ein sensiblerer Indikator für Wohlbefinden als das Nestbauverhalten zu sein (Deacon et al. 2008; Greenberg et al. 2016). Die geringe Belastung durch die Narkosen spiegelte sich nicht im Nestbau wider, weder nach einer einmaligen noch nach einer wiederholten Narkose im Vergleich zu den Kontrolltieren (Hohlbaum et al. 2017).

Im Free Exploratory Paradigm steigerten wiederholte Narkosen die Latenz bis zur Exploration bei weiblichen Mäusen, was auf eine erhöhte „trait anxiety“ hinwies (Hohlbaum et al. 2017). Beim Free Exploratory Paradigm nach Bert et al. (2013) wird der Gitterdeckel so im Käfig platziert, dass die Tiere auf ihn klettern und den Deckel explorieren können. Bei diesem Test finden sich die Tiere in einem Konflikt zwischen ihrer Neugier, den Käfigdeckel zu erkunden, und der Angst vor dem Neuen, das sie auf dem Käfigdeckel erwarten könnten (Neophobie). Ob und wann das Tier den Käfigdeckel erkundet, basiert auf seiner freiwilligen Entscheidung. Die beobachtete längere Latenz bis zur Exploration im Free Exploratory Paradigm ist als gering belastend zu werten. Die geschlechtsspezifischen Effekte (Hohlbaum et al. 2017) könnten auf den Einfluss von Sexualhormonen sowie die bei weiblichen Tieren höhere Aktivität der HPA-Achse zurückzuführen sein. Schon bei Baseline-Messungen (Grad et al. 1968), aber auch nach Einwirkung von Stressoren (Cozzoli et al. 2014) und nach Isofluran-Exposition (Bekhat et al. 2016) wurden bei weiblichen Nagern höhere Kortikosteron-

Level nachgewiesen. Sowohl Sexualhormone, vor allem Östrogen (Raap et al. 2002), als auch Kortikosteron (Neumaier et al. 2000) beeinflussen die Funktion des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors, der eine wichtige Rolle im Angst-bezogenem Verhalten (Heisler et al. 1998) und in der Stressbewältigung (Tsuji et al. 2000) spielt (Heisler et al. 1998; Raap et al. 2002). In einigen Gehirnregionen ist die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindung bei weiblichen höher als bei männlichen Mäusen (Raap et al. 2002; Günther et al. 2011). Darüber hinaus wirkt auch Isofluran auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindung (Martin et al. 1990; Yokoyama et al. 2016). Die Rezeptorbindung wird in Abhängigkeit von der Gehirnregion bei männlichen Marmosets (Yokoyama et al. 2016) und männlichen Ratten (Martin et al. 1990) durch Isofluran beeinflusst.

Vor diesem Hintergrund kann hypothetisiert werden, dass sich Isofluran bei weiblichen Mäusen (Hohlbaum et al. 2017) möglicherweise aufgrund höherer Östrogen- und Kortikosteron-Konzentrationen anders auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindung auswirkte als bei männlichen Mäusen (Raap et al. 2002).

Die marginale Abnahme der Futteraufnahme, die bei weiblichen Mäusen nach wiederholten Narkosen beobachtet wurde, kann durch den Einfluss von Isofluran auf die Glukose-Konzentration im Blut erklärt werden. Bei weiblichen Mäusen C57BL/6 Mäusen wurde bereits gezeigt, dass Isofluran zu einer Hyperglykämie führt (Windeløv et al. 2016), weshalb die Tiere weniger Hunger gehabt haben könnten. Dieser Effekt war nach wiederholten Narkosen offensichtlich verstärkt.

**Physische Indikatoren:** Über den gesamten Versuchsverlauf beeinflussten die Narkoseregime das Körpergewicht nicht (Hohlbaum et al. 2017), wie auch Jacobsen und Kollegen (2012) bereits für eine einmalige Narkose mit Isofluran berichteten.

**Biochemische Indikatoren:** Um akuten Stress zu messen, wurden FCM-Konzentrationen im 24-stündigen postanästhetischen Zeitraum mittels 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ , 11 $\beta$ ,21-triol-20-one Enzymimmunoassay nach Touma (Touma et al. 2003; Touma et al. 2004) sowie Palme und Kollegen (2013) untersucht (Hohlbaum et al. 2017). Dieser Assay konnte bei Mäusen schon erfolgreich Stress, der durch Vibration (Atanasov et al. 2015), orale Verabreichung von Substanzen (Walker et al. 2012) oder Blutabnahme (Voigt et al. 2013) verursacht wurde, nachweisen. Als retrospektiver Biomarker für chronischen Stress (Thomson et al. 2010; Scorrano et al. 2015) bzw. für das Stresslevel der Tiere am Studienende wurde Kortikosteron im Haar analysiert (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Die Kortikosteron-Konzentration im Haar steigt durch Stress wie beispielsweise länger andauernde Unruhen in der sozialen Gruppe bei Mäusen (Yu et al. 2015; Jarcho et al. 2016). Da weder eine einmalige Narkose noch wiederholte Narkosen die FCM- oder Haar-Kortikosteron-Konzentration signifikant beeinflussten, schienen die Narkoseprotokolle die Aktivität der HPA-Achse nicht wesentlich verändert zu haben (Hohlbaum et al. 2017).

**Physiologische Indikatoren:** Wiederholte Narkosen erhöhten die Herzfrequenz bei Mäusen beider Geschlechter im Vergleich zu einer einmaligen Narkose (Hohlbaum et al. 2017). Da eine wiederholte Exposition von Isofluran aversiver ist als die initiale Exposition (Marquardt 2013; Moody et al. 2014), könnte die Aversion die Tiere stärker erregt und somit auch die Herzfrequenz erhöht haben.

**Belastungsbeurteilung:** Wiederholte Narkosen mit Isofluran verursachten kurzzeitige geringe Effekte auf das Wohlbefinden, vor allem im frühen postanästhetischen Zeitraum (Hohlbaum et al. 2017). Daher können wiederholte Narkose mit Isofluran entsprechend des verwendeten Narkoseprotokolls als gering belastend klassifiziert werden (Hohlbaum et al. 2017). Trotzdem müssen wiederholte Narkosen innerhalb des Schweregrades gering auf einem höheren Level als eine einmalige Narkose eingeordnet werden (Hohlbaum et al. 2017). Zudem war das Wohlbefinden weiblicher Mäusen stärker beeinflusst (Hohlbaum et al. 2017).

Im Hinblick auf die Frage, ob die Tierzahl durch die wiederholte Verwendung einzelner Tiere innerhalb eines Verfahrens reduziert werden darf, sind Studien, die wiederholte

Narkosen mit Isofluran entsprechend des untersuchten Narkoseregimes beinhalten, vertretbar und stehen im Sinne der Reduktion.

## **6.2. Belastungsbeurteilung von wiederholten Injektionsnarkosen mit der Kombination von Ketamin und Xylazin**

Wenn der Einfluss wiederholter Injektionsnarkosen mit Ketamin und Xylazin (KX) auf das Wohlbefinden der Tiere beurteilt wird (Hohlbaum et al. 2018b), müssen neben den pharmakologischen Effekten der Substanzen auch die Fixierung und die Injektion als Stressoren berücksichtigt werden (Meijer et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der gesamten Narkoseprozedur, also aller möglichen Stressoren auf das Wohlbefinden der Mäuse untersucht werden (Hohlbaum et al. 2018b). Die Kontrolltiere wurden daher weder einer Fixierung noch einer Injektion ausgesetzt (Hohlbaum et al. 2018b).

Zu den wichtigsten Erkenntnissen zur Belastung von Mäusen durch wiederholte Injektionsnarkosen mit KX zählten allgemeine Effekte, die nach wiederholten Narkosen ausgeprägter waren als nach einer einmaligen Narkose mit KX (Hohlbaum et al. 2018b). Dazu gehören die „rapid jerky dorsal-ventral head movements“, die während der Erholungsphase häufiger nach der letzten wiederholten als nach der einmaligen Narkose auftraten (Hohlbaum et al. 2018b). Zudem war bei weiblichen Tieren die „trait anxiety“ nach wiederholten Narkosen für einen längeren Zeitraum erhöht als nach einmaliger Narkose (Hohlbaum et al. 2018b). Allerdings gewöhnten sich die Mäuse, die wiederholt mit KX narkotisiert wurden, mit der Zeit an den – mit der Prozedur der Narkose in Verbindung stehenden – Stress: Wiederholte Narkosen mit KX erhöhten zwar die FCM-Konzentration, aber der Anstieg war im Vergleich zur Kontrolle, wie nach einer einmaligen Narkose mit KX, nicht signifikant (Hohlbaum et al. 2018b). Auch die Futteraufnahme bei männlichen Mäusen war nach wiederholten Narkosen höher als nach einer einmaligen Narkose, aber dennoch hatte das Narkoseregime keinen Einfluss auf das Körpergewicht (Hohlbaum et al. 2018b).

Im Folgenden werden die Haupteigenschaften zu den Auswirkungen von wiederholten Narkosen mit KX auf das Wohlbefinden hinsichtlich der verhaltensbezogenen, physischen und physiologischen/biochemischen Parameter diskutiert.

**Verhaltensbezogene Indikatoren:** Während der Erholungsphase wurden, wenn die Tiere ruhten, „rapid jerky dorsal-ventral head movements“ beobachtet (Hohlbaum et al. 2018b). Diese Kopfbewegungen (Hohlbaum et al. 2018b) könnten als stereotype Verhaltensweisen beschrieben werden, denn sowohl bei Maus als auch bei Ratte kann Ketamin Stereotypien verursachen (Irifune et al. 1995; Razoux et al. 2007). Die Kopfbewegungen ähneln aber auch der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelten „head twitch response“, die auf eine glutamaterge Modulation der serotonergen Funktion am postsynaptischen 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor (Kim et al. 1998; Kim et al. 1999) und auf halluzinogen-ähnliche Effekte hinweist (Halberstadt et al. 2013). Ketamin bindet an den 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor (Kapur et al. 2002) und verstärkt bei Mäusen die 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelte „head twitch response“ (Kim et al. 1998; Kim et al. 1999). Dieser Effekt war nach wiederholten Narkosen signifikant stärker ausgeprägt als nach einer einmaligen Narkose (Hohlbaum et al. 2018b).

Das Angst-bezogene Verhalten wurde gemäß Bert et al. (2013) im Free Exploratory Paradigm untersucht (Hohlbaum et al. 2018b). Die Latenz bis zur Exploration und damit die „trait anxiety“ waren bei weiblichen Mäusen bis zu acht Tage nach einmaliger bzw. letzter wiederholter Narkose erhöht (Hohlbaum et al. 2018b). Da bereits eine einmalige Narkose die „trait anxiety“ erhöhte, kann vermutet werden, dass weiblichen Tiere, die wiederholt narkotisiert wurden, nach jeder Narkose und demnach über einen länger anhaltenden Zeitraum von insgesamt circa vier Wochen eine erhöhte „trait anxiety“ zeigten (Hohlbaum et al. 2018b). Ähnliche geschlechtsspezifische Effekte wiederholter Ketamin-Gaben wurden bei Mäusen im Open Field Test für „state anxiety“ beobachtet (Thelen et al. 2016) und könnten darauf

zurückzuführen sein, dass die Sexualhormone am Angstverhalten beteiligt sind (Carrier et al. 2013). Die durch eine einmalige Ketamin-Gabe ausgelösten Effekte können bis zu sieben Tage anhalten (Li et al. 2011). Da die Halbwertszeit von Ketamin relativ kurz ist, 12,7 Minuten bei C57BL/6Hsd Mäusen (Maxwell et al. 2006), unterliegen die Effekte, die bis zu acht Tage nach erster bzw. letzter Narkose beobachtet wurden (Hohlbaum et al. 2018b), vermutlich anhaltenden Veränderungen der Transmissionsprozesse (Browne et al. 2013). Im Gegenteil zu Ketamin werden für  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonisten eher anxiolytische Eigenschaften beschrieben (Millan et al. 2000). Neben der pharmakologischen Wirkung von Ketamin und Xylazin kann aber auch die Fixierung und die Injektion das Angst-bezogene Verhalten beeinflussen, denn schon eine intraperitoneale Injektion von Kochsalz-Lösung kann das Angst-bezogene Verhalten von Mäusen, wie im Elevated Plus Maze Test gezeigt, erhöhen (Lapin 1995). Zudem ist es möglich, dass der Anstieg des Angst-bezogenen Verhaltens mit den – im frühen postanästhetischen Zeitraum erlebten – Ketamin-induzierten Alpträumen oder Halluzinationen (Seamans 2008; Blagrove et al. 2009; Flecknell 2016b) zusammenhängt.

**Biochemische Indikatoren:** Die FCM-Konzentrationen wurden im 24-stündigen postanästhetischen Zeitraum mittels  $5\alpha$ -pregnane- $3\beta,11\beta,21$ -triol-20-one Enzymimmunoassay nach Touma (Touma et al. 2003; Touma et al. 2004) sowie Palme und Kollegen (2013) untersucht (Hohlbaum et al. 2018b). Mit diesem Assay kann verlässlich Stress bei Mäusen nachgewiesen werden (Walker et al. 2012; Voigt et al. 2013; Atanasov et al. 2015). Die einmalige Narkose steigerte die Aktivität der HPA-Achse in diesem Zeitraum mit signifikantem Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen am stärksten, gefolgt von den wiederholten Narkosen (Hohlbaum et al. 2018b). Kontrolltiere zeigten die geringsten FCM-Werte (Hohlbaum et al. 2018b).

Inwiefern die Substanzen Ketamin und Xylazin die Ausscheidung an FCM beeinflussen, wird in der Literatur nicht beschrieben, wohl aber die Auswirkungen auf den Plasmakortikosteron-Spiegel. Nach KX-Narkose sinkt dieser bei männlichen Ratten (Saha et al. 2005), aber verändert sich hingegen bei weiblichen Kaninchen nicht (Illera et al. 2000). Für die Maus liegen keine Daten vor. Basierend auf den Angaben zu Ratte und Kaninchen scheinen bei den Mäusen der vorliegenden Studie die erhöhten FCM-Konzentrationen eher auf den Stress durch Fixierung und Injektion als auf die pharmakologische Wirkung von Ketamin und Xylazin zurückzuführen zu sein (Hohlbaum et al. 2018b). Fixierung und Injektion erhöhen den Plasmakortikosteron-Spiegel (Meijer et al. 2006). Allerdings führt eine Wiederholung dieser Interventionen zu einem Gewöhnungseffekt (Ryabinin et al. 1999), wie bei Mäusen, die wiederholt eine KX-Injektion erhielten, beobachtet wurde (Hohlbaum et al. 2018b).

Ob die Aktivität der HPA-Achse langfristig bis zum Studienende erhöht war, wurde nach Gao et al. (Gao et al. 2013) mittels Kortikosteron-Konzentration im Haar untersucht (Hohlbaum et al. 2018b). Da die unterschiedlichen Narkoseregime die Kortikosteron-Konzentration im Haar nicht beeinflussten, schien der durch eine einmalige Narkose ausgelöste Stress bei wiederholten Narkosen nicht zu akkumulieren (Hohlbaum et al. 2018b). Im Gegensatz dazu, war der Stress gemäß den FCM-Konzentrationen nach der letzten wiederholten Narkose sogar geringer als nach einer einmaligen Narkose, wenn auch nicht signifikant (Hohlbaum et al. 2018b).

Offen bleibt allerdings, wie hoch die FCM-Konzentrationen nach der zweiten bis fünften Narkose waren. Diese Informationen sind wichtig, um einschätzen zu können, über welche Dauer das akute Stresslevel der Tiere, die wiederholt narkotisiert wurden, erhöht war (Hohlbaum et al. 2018b).

**Physische Indikatoren:** Die Narkose beeinflusste den Verlauf des Körpergewichts über den Versuchszeitraum zwar nicht statistisch signifikant, aber dennoch sank das Gewicht bis zu zwei Tage nach einmaliger sowie letzter wiederholter Narkose (Hohlbaum et al. 2018b).



**Belastungsbeurteilung:** Die negativen Effekte der Narkosen auf das Wohlbefinden akkumulierten nicht, wenn die Mäuse wiederholt in Narkose gelegt wurden (Hohlbaum et al. 2018b). Daraus lässt sich ableiten, dass die Effekte auf das Wohlbefinden sowohl nach einer einmaligen Narkose als auch nach wiederholten Narkosen mit KX gering waren (Hohlbaum et al. 2018b). Hingegen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Zeitraum, in dem Stress und Angst-bezogenes Verhalten erhöht waren, bei Mäusen, die wiederholt der Narkoseprozedur unterzogen wurden, länger andauerte (Hohlbaum et al. 2018b). Da das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden nach Allgemeinnarkosen jedoch nur nach der ersten Narkose bzw. der letzten wiederholten Narkose durchgeführt wurde, kann angenommen werden, dass die „trait anxiety“ bei weiblichen Mäusen nach jeder Narkose erhöht war (Hohlbaum et al. 2018b). Zudem wissen wir nicht, nach welcher Narkose männliche Mäuse nicht mehr in der Futteraufnahme beeinträchtigt waren und in welchem Ausmaß sich die Ausscheidung an FCM nach der zweiten bis fünften Narkose verminderte (Hohlbaum et al. 2018b). Für die Beurteilung des Schweregrades eines Verfahrens ist die Dauer der Effekte allerdings essenziell (Hohlbaum et al. 2018b). Daher kann nicht eindeutig festgelegt werden, ob wiederholte Narkosen mit KX kurzfristige geringe Effekte (Schweregrad „gering“) oder länger anhaltende geringe Effekte auf das Stresslevel und Angst-bezogene Verhalten (Schweregrad „mittel“) verursachten (Hohlbaum et al. 2018b).

In der vorliegenden Studie wurde eine Dosierung von 80 mg/kg Ketamin und 16 mg/kg Xylazin gewählt (Löscher et al. 1991), weil nach Erfahrungen der Arbeitsgruppen mit dieser Konzentration bei Mäusen eine chirurgische Toleranz von circa 40 Minuten erreicht werden kann. Eine andere Dosierung der beiden Substanzen könnte zu abweichenden Ergebnissen führen. Die gewählte Dosierung ist aber keinesfalls zu hoch. In einer umfangreichen Übersicht stellten Arras und Mitarbeiter fest, dass eine Dosierung von 100 mg/kg Ketamin und 20 mg/kg Xylazin und 3 mg/kg Azepromazin die höchste Effektivität bei Mäusen in Bezug auf die chirurgische Toleranz und geringe Todesraten besitzt (Arras et al. 2001).

Im Hinblick auf die Reduktion der Tierzahl durch die wiederholte Verwendung einzelner Tiere innerhalb eines Verfahrens würden demnach Studien mit einem gering belastenden Narkoseregime im Sinne der 3R stehen und gerechtfertigt sein. Wenn aber im Rahmen zukünftiger Studien festgestellt wird, dass die Effekte lang anhaltend sind, wäre die Reduktion der Tierzahl auf Kosten einer höheren Belastung einzelner Tiere ethisch schwieriger zu vertreten.

### **6.3. Belastung wiederholter Inhalations- und Injektionsnarkosen im Vergleich**

Ob sich eher die Inhalationsnarkose mit Isofluran oder die Injektionsnarkose mit KX eignet, hängt von der jeweiligen wissenschaftlichen Fragestellung und dem Versuchsdesign ab. Generell bietet die Inhalationsanästhesie mit Isofluran eine größere Sicherheit, denn die Anästhesietiefe ist steuerbar und die Aufwachphase ist kurz (Ammer et al. 2002; Gargiulo et al. 2012; Flecknell 2016b). Zudem sind der Einfluss auf das Herz-Kreislauf-System und der Metabolismus in der Leber gering (Holaday et al. 1975; Eger 1981; Dale et al. 1987; Ammer et al. 2002; Gargiulo et al. 2012). Allerdings kann eine Inhalationsnarkose mit Isofluran in einigen Studien kontraindiziert sein, da das Anästhetikum die Schleimhaut des Atemtrakts reizen kann (Kichko et al. 2015) und zu einer dosisabhängigen respiratorischen Depression (Eger 1981) sowie einer durch die Vasodilatation bedingten Hypotonie führt (Eger 1981; Dale et al. 1987; Ammer et al. 2002; Ensinger 2005). Bei wiederholter Anwendung von Isofluran können sich Herzfrequenz und Blutdruck verändern (Albrecht et al. 2014). Neben der pharmakologischen Wirkung kann aber auch das sperrige (kostenintensive) Equipment, das für eine Inhalationsnarkose benötigt wird, ein Ausschlusskriterium sein (Arras et al. 2001; Lorenz 2002; Buitrago et al. 2008). Eine Alternative zur Inhalationsnarkose ist eine

Injektionsnarkose wie die Kombination von KX (Dittmar et al. 2004). Für eine Injektionsnarkose ist kein zusätzliches Equipment erforderlich (Siriarchavatana et al. 2016). Ein weiterer Vorteil ist vor allem die analgetische Wirkung von KX, allerdings ist die Narkose mit KX nicht steuerbar (Flecknell 2016a). Die Aufwachphase ist länger als nach einer Inhalationsnarkose (Gargiulo et al. 2012; Flecknell 2016a). Ketamin und Xylazin unterliegen im Gegensatz zu Isofluran einem intensiven Metabolismus durch Leberenzyme (Hijazi et al. 2002). Zusätzlich kann die in der Regel intraperitoneal erfolgende Applikation Verletzungen der inneren Organe verursachen (Miner et al. 1969; Gaines Das et al. 2007; Gargiulo et al. 2012; Levin-Arama et al. 2016) und das Wohlbefinden durch Fixierungs- sowie Injektionsstress beeinflussen (Meijer et al. 2006).

Da sich die Injektionsnarkose mit KX und die Inhalationsnarkose mit Isofluran in der Durchführung und im Verlauf der Narkosestadien voneinander unterscheiden, ist es möglich, dass bei wiederholter Durchführung der Schweregrad der Injektions- und Inhalationsnarkose voneinander abweichen könnten.

Weder nach wiederholten Inhalations- noch nach wiederholten Injektionsnarkosen akkumulierten die negativen Effekte auf das Wohlbefinden der Tiere hinsichtlich der verhaltensbezogenen, physiologischen/biochemischen und physischen Indikatoren (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Demzufolge können die Effekte als gering klassifiziert werden (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Dennoch unterschieden sich die Auswirkungen der wiederholten Inhalations- und Injektionsnarkosen auf das Wohlbefinden in ihrer Dauer (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Wiederholte Inhalationsnarkosen mit Isofluran verursachten kurzzeitige geringe Effekte auf das Wohlbefinden im frühen postanästhetischen Zeitraum (Hohlbaum et al. 2017). Hingegen beeinträchtigten wiederholte Injektionsnarkosen das Wohlbefinden zwar im geringen Ausmaß, aber über einen vermutlich längeren Zeitraum – das Angst-bezogene Verhalten war möglicherweise bis zu vier Wochen bei Weibchen und das akute Stresslevel über einen noch nicht bestimmbareren Zeitraum insbesondere bei Männchen erhöht (Hohlbaum et al. 2018b). Generell reagierten weibliche Tiere sensibler auf beide Narkoseregime (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b).

Im Folgenden werden die Belastungen von Mäusen durch wiederholte Narkosen mit Isofluran und KX verglichen. Die Belastung im postanästhetischen Zeitraum bezieht sich auf die Beobachtungen, die anhand des Protokolls zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen gemacht wurden. Die Belastung im anästhetischen Zeitraum basiert auf den Vitalparametern, die während der Narkoseüberwachung dokumentiert wurden, und dem Verlauf der Narkosephasen.

**Belastung im postanästhetischen Zeitraum:** Im unmittelbaren postanästhetischen Zeitraum zeigten die Mäuse bis zu 30 Minuten nach Inhalationsnarkose und bis zu 150 Minuten nach Injektionsnarkose erhöhte Scores auf der MGS nach Langford et al. (2010) (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Zwischen 30 und 150 Minuten nach Inhalationsnarkose indizierte eine Reduktion im Wühlverhalten, dass das Wohlbefinden in diesem Zeitraum noch in geringem Umfang beeinträchtigt war (Hohlbaum et al. 2017). Dieser Test (Deacon et al. 2001; Deacon 2006; Deacon 2009; Jirkof et al. 2010; Deacon 2012) war nach Injektionsnarkose nicht zielführend, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Lage waren, die Pellets aus dem Bau herauszuwühlen (Hohlbaum et al. 2018b). Die im Vergleich zur Inhalationsnarkose längeren Ruhephasen in der Erholungsphase nach Injektionsnarkosen deuteten darauf hin, dass sich die Mäuse nach Inhalationsnarkosen schneller wieder erholten (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b), was durch die Pharmakokinetik der Substanzen zu erklären ist.

Das Wohlbefinden regenerierte sich bei allen Tieren, unabhängig vom Narkoseregime, bis zum nächsten Morgen wieder, wie die unveränderte Aktivität im Heimatkäfig während der Dunkelphase und die nach Deacon (Deacon 2006) bewerteten hohen, komplexen Nester zeigten (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Beide Narkoseregime hatten keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht und alle Tiere nahmen über den Verlauf der Studie zu (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b).

Wenn die FCM-Werte nach Inhalations- und Injektionsnarkose verglichen werden, fällt auf, dass sie sowohl an Tag 1 als auch an Tag 8 nach letzter wiederholter Narkose mit KX höher waren (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Demzufolge waren die Tiere infolge wiederholter Injektionsnarkosen vermehrt akutem Stress ausgesetzt als nach wiederholten Inhalationsnarkosen (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Da die FCM-Konzentration auch schon nach einmaliger Injektionsnarkose über dem Wert der einmaligen Inhalationsnarkose lag (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b), ist anzunehmen, dass die Beobachtung dieses Zustands auf die gesamte Dauer des Narkoseprotokolls zutrifft. Insgesamt war das akute Stresslevel infolge wiederholter Injektionsnarkosen über mindestens vier Wochen höher als infolge wiederholter Inhalationsnarkosen (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b).

Allerdings war ein deutlicher Habituationseffekt an die Prozedur der Injektionsnarkose zu verzeichnen: Die erhöhte Aktivität der HPA-Achse, gemessen mittels FCM-Konzentrationen, verringerte sich nach letzter wiederholter Narkose (Hohlbaum et al. 2018b). Zudem nahmen Männchen nach letzter wiederholter Narkose mehr Futter als nach einmaliger Narkose auf (Hohlbaum et al. 2018b). Ein solch ausgeprägter Habituationseffekt war bei wiederholter Inhalationsnarkose nicht zu beobachten, weil die einmalige Narkose mit Isofluran das Wohlbefinden der Tiere in geringerem Maß beeinflusste als eine einmalige Narkose mit KX (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Demzufolge waren nach letzter wiederholter Inhalationsnarkosen auch keine Effekte auf die Aktivität der HPA-Achse anhand der FCM-Werte zu erkennen (Hohlbaum et al. 2017). Wohl aber waren Habituationseffekte an die Situation während der Erholungsphase zu beobachten. Die Tiere zeigten eine schnellere sowie höhere Futteraufnahme nach letzter wiederholter als nach einmaliger Narkose mit Isofluran (Hohlbaum et al. 2017).

Das Angst-bezogene Verhalten verstärkte sich bei weiblichen Tieren infolge beider Narkoseregime (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Die Tiere zeigten eine höhere „trait anxiety“ an Tag 1 nach letzter wiederholter Inhalationsnarkose und an den Tagen 1 sowie 8 nach letzter wiederholter Injektionsnarkose (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Dabei muss berücksichtigt werden, dass bei weiblichen Mäusen bereits eine höhere „trait anxiety“ nach einer einmaligen Injektions-, nicht aber nach einer einmaligen Inhalationsnarkose vorlag (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Demnach ist anzunehmen, dass Mäuse, die innerhalb von drei Wochen wiederholt mit KX narkotisiert wurden, vermutlich über insgesamt vier Wochen und somit über einen längeren Zeitraum als nach wiederholten Inhalationsnarkosen vermehrt angstbezogenes Verhalten zeigten (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b).

**Belastung im anästhetischen Zeitraum:** Bei Betrachtung der letzten wiederholten Inhalations- und Injektionsnarkosen fällt auf, dass die Mäuse scheinbar eine Toleranz gegen die narkotische Wirkung von Isofluran und auch KX entwickelten (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Dennoch änderte sich die Dauer der Einleitungsphase bei KX-Narkose nicht wesentlich, wohl aber bei Isofluran-Narkose. Die Einleitungsphase der sechsten Isofluran-Narkose dauerte somit länger als die Einleitungsphase der sechsten KX-Narkose (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Die verlängerte Einleitungsphase der Isofluran-Narkose, die möglicherweise durch die verstärkte Aktivierung der Transient Receptor Potential

Ankirin 1 (TRPA1)-Kanäle sowie der damit induzierten Störung der respiratorischen Funktion verursacht wurde (Li et al. 2015) und zusätzlich mit vermehrten Exzitationen verbunden war, erhöht die Belastung, denn die wiederholte Exposition von Isofluran wirkt aversiv (Moody et al. 2014). Zudem ist es denkbar, dass die Tiere den Kontrollverlust während der Narkoseeinleitung länger bewusst wahrnahmen.

Mit der Aufwachphase verhielt es sich umgekehrt. Wegen der Umverteilung und auch des umfangreichen Metabolismus von KX im Körper dauerte die Aufwachphase nach Injektionsnarkose länger als nach Inhalationsnarkose (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Während der Narkose war unter KX im Vergleich zu Isofluran die Atmung zwar stabiler, aber die Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung deutlich supprimiert (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Aufgrund der raschen Elimination von Isofluran (Holaday et al. 1975; Eger 1981; Ammer et al. 2002; Gargiulo et al. 2012) erholt sich die Atemfrequenz schnell wieder nach Ende der Narkose. Hingegen ist anzunehmen, dass sich die verringerte Herzfrequenz und die damit vermutlich assoziierte niedrige Sauerstoffsättigung nach Injektionsnarkose relativ langsam wieder stabilisieren. Angenommen, die Maus empfindet im hypoxischen Zustand ähnliche Symptome wie der Mensch (Unwohlsein, Kopfschmerzen, Schwindel und Müdigkeit) (Clarke 2006), kann das Wohlbefinden, je nach Dauer dieses Zustands, dadurch reduziert werden.

Wie aufgrund der Pharmakokinetik der Anästhetika anzunehmen war, zeigten die Tiere nach wiederholten Injektionsnarkosen längere Ruhezeiten als nach wiederholten Inhalationsnarkosen und konnten Verhaltensweisen wie Futteraufnahme, Putzen sowie Aufrichten in der 20-minütigen Erholungsphase noch nicht ausüben (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Letztere wurden nach Inhalationsnarkosen innerhalb kurzer Zeit beobachtet (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Nach Injektionsnarkosen traten Auffälligkeiten in der Erholungsphase („rapid jerky dorsal-ventral head movements“) auf (Hohlbaum et al. 2018b).

Zwischen wiederholter KX- und wiederholter Isofluran-Narkose unterschieden sich die Phasen der Narkose, welche die Tiere vermutlich bei Bewusstsein erlebten, aber mit Kontrollverlust einhergingen, also Einleitung und Aufwach- sowie Erholungsphase, in ihrer Dauer und der Summe sowie der Intensität an negativen Effekten auf das Wohlbefinden. Die Narkoseeinleitung mit Isofluran schien aufgrund ihrer Dauer und den vermehrten Exzitationen bei wiederholter Anwendung belastender zu sein als die Induktion mit KX. Wenn allerdings die Folgen des Fixierungs- und Injektionsstress der Injektionsnarkosen, die sich vor allem in den Erhebungen der verhaltensbezogenen und biochemischen Parameter widerspiegeln, berücksichtigt werden, muss diese Aussage relativiert werden (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). In der Aufwach- und Erholungsphase war das Wohlbefinden infolge wiederholter Injektionsnarkosen über einen längeren Zeitraum als nach wiederholten Inhalationsnarkose beeinträchtigt (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b).

**Fazit für die versuchstierkundliche Praxis:** Wenn beide Narkoseregime einander gegenüber gestellt werden, waren die negativen Effekte auf das Wohlbefinden sowohl bei Inhalations- als auch Injektionsnarkose gering, hielten aber nach Injektionsnarkosen länger an (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018b). Wiederholte Injektionsnarkosen beeinträchtigten die MGS und erhöhten, in Abhängigkeit vom Geschlecht, das Angstbezogene Verhalten sowie das Level an akuten Stress über einen längeren Zeitraum als wiederholte Inhalationsnarkosen (Hohlbaum et al. 2018b). Darüber hinaus waren die Tiere während der Erholungsphase nach wiederholten Injektionsnarkosen stärker beeinträchtigt (Hohlbaum et al. 2018b). Kommen für eine Studie unter Berücksichtigung der Fragestellung, des Tiermodells und der jeweiligen Methoden beide Narkoseregime in Betracht, ist auf der Basis der vorliegenden Arbeit die Inhalationsnarkose vorzuziehen.

Generell sollten die Ergebnisse der vorliegenden Studie beachtet werden, wenn die Gesamtbelastung eines Tieres durch ein Verfahren unter Berücksichtigung aller durchgeführten Interventionen prospektiv im Tierversuchsantrag eingeschätzt wird.

#### **6.4. Eignung des Protokolls zur Belastungsbeurteilung von tierexperimentellen Verfahren mit Narkosen**

Das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen wurde ursprünglich entwickelt, um die Belastung von adulten C57BL/6JRj Mäusen nach einmaliger Narkose und wiederholten Narkosen mit Isofluran oder KX auf tierbasierter und wissenschaftlicher Ebene objektiv zu beurteilen (Hohlbaum et al. 2018a). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass sich der Großteil der verhaltensbezogenen, physiologischen/biochemischen und physischen Indikatoren, die für das Protokoll ausgewählt wurden, für diesen Zweck eignen (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b).

Am sensitivsten waren die MGS, das Wühlverhalten, die Futteraufnahme, das Angst-bezogene Verhalten und die FCM-Werte (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b). Dabei muss aber auch der Verlauf der Erholungsphase beachtet werden, da sich die Tiere aufgrund der Pharmakokinetik der Substanzen nach der Injektionsnarkose wesentlich langsamer erholen und somit vor allem für Beobachtungen im unmittelbaren postanästhetischen Zeitraum, wie für die MGS sowie das Wühlverhalten, spätere Zeitpunkt gewählt werden müssen (Hohlbaum et al. 2018b). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die MGS erst 150 Minuten nach Injektionsnarkose gemessen; der Test zum Wühlverhalten im Zeitraum 30 und 150 Minuten nach Narkose war nicht durchführbar, da die Tiere noch nicht in der Lage waren, die Pellets aus dem Bau herauszuwühlen (Hohlbaum et al. 2018b). Auch wenn die Aktivität im Heimatkäfig keine signifikanten Veränderungen infolge der Narkoseregime offenbarte, ist dieser Parameter für die Interpretation der anderen Tests wichtig. Würde die Aktivität im Heimatkäfig auf eine reduzierte motorische Aktivität hinweisen, könnte dadurch auch die Futteraufnahme sowie die Exploration im Free Exploratory Paradigm beeinträchtigt und – aufgrund der damit verbundenen Transitzeit im Darmtrakt (Touma et al. 2003) – der Peak der FCM-Werte verschoben sein. Die FCM-Werte spiegelten den Stress im 24-stündigen postanästhetischen Zeitraum wider, aber die Konzentration an Kortikosteron im Haar schien weniger geeignet zu sein, um chronischen Stress infolge von wiederholten Narkosen zu messen. Da durch Letztere aber auch bei Mäusen bereits chronischer Stress infolge länger andauernder Unruhen in der sozialen Gruppe nachgewiesen werden konnte (Yu et al. 2015; Jarcho et al. 2016), bleibt zu vermuten, dass wiederholte Narkosen die HPA-Achse in einem geringeren Ausmaß als soziale Unruhen aktivierten und dieser Effekt somit nicht durch den Haar-Kortikosteron-Wert nachweisbar war. Das Körpergewicht bzw. der Body Condition Score sind in der Regel Teil von jedem Score Sheet und ein essenzieller Indikator für die Belastung von Mäusen durch ein tierexperimentelles Verfahren (Ullman-Cullere et al. 1999; EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren 2012).

Das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen ist einfach durchführbar und benötigt kein aufwendiges Equipment (Hohlbaum et al. 2018a). Es kann komplett oder teilweise in laufende Studien integriert werden (Hohlbaum et al. 2018a). Wenn das Protokoll an eine Studie angepasst wird und Zeitpunkte der Beobachtungen festgelegt werden, muss der zirkadiane Rhythmus der Mäuse berücksichtigt werden – Mäuse sind morgens aktiver als nachmittags (Saibaba et al. 1996). Daher sollten die jeweiligen Beobachtungen bei allen Tieren zu gleichen Tageszeiten erfolgen (Hohlbaum et al. 2018a).

Um mithilfe des Protokolls ausschließlich die Effekte des zu untersuchenden Verfahrens zu messen, müssen die Mäuse vor jeglichen zusätzlichen Stressoren in der

Tierhaltung bewahrt werden. Andernfalls können die Ergebnisse der Tests aus dem Protokoll verzerrt werden. Ein zentraler alltäglicher Stressor, das Handling, sei hier genannt, denn durch die Wahl einer geeigneten Methode wie das Cupping und/oder Tunnel-Handling lässt sich der durch die Interaktion mit dem Menschen induzierte Stress minimieren (Hurst et al. 2010).

Das Protokoll eignet sich vor allem für Verfahren, über deren Schweregrad noch nicht ausreichend Informationen zur Verfügung stehen (Hohlbaum et al. 2018a). Wenn laut des Protokolls das Wohlbefinden einer Maus gestört ist, sollten die jeweiligen Tests zu einem späteren Zeitpunkt erneut durchgeführt werden, um festzustellen, wann sich das Tier wieder erholt (Hohlbaum et al. 2018a). Außerdem offenbart die Erkenntnis über den Zustand des Tieres die Möglichkeit, angemessene Refinement-Maßnahmen zu den richtigen Zeitpunkten einzusetzen (Hohlbaum et al. 2018a). Das Protokoll kann dann wiederum angewendet werden, um zu beurteilen, ob Refinement-Maßnahmen gewirkt und die Belastung der Tiere verringert haben (Hohlbaum et al. 2018a).

Ergänzend zu Score Sheets erfasst das Protokoll wichtige Informationen über das Wohlbefinden der Mäuse nach Allgemeinnarkosen (Hohlbaum et al. 2018a). Somit können Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler es nutzen, um den Schweregrad eines Verfahrens mit Allgemeinnarkosen auf wissenschaftlicher und tierbasierter Ebene objektiv zu beurteilen (Hohlbaum et al. 2018a). Dennoch enthält das Protokoll keine Skala, um Verfahren den jeweiligen Schweregraden „gering“, „mittel“ oder „schwer“ zu zuordnen. Bei der Belastungsbeurteilung müssen die Beispiele in Annex VIII der RL 2010/63/EU als Vergleich hinzugezogen werden (Hohlbaum et al. 2018a).

### 6.5. Limitationen

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Belastungsbeurteilungen beziehen sich auf die jeweilig angewendeten Narkoseprotokolle. Variationen in der Applikationsweise, Dosierung, Dauer der einzelnen Narkosen, Anzahl an Narkosen oder Abständen zwischen den Narkosen könnten dazu führen, dass die Tiere in einem anderen Maß belastet werden und somit der Schweregrad zu- oder abnimmt. Daneben muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Studie gesunde adulte C57BL/6JRj-Mäuse untersucht wurden, um die reine Belastung durch die Narkosen zu erfassen – unabhängig von anderen Einflussfaktoren. Dieser Stamm wurde gewählt, da er am häufigsten in der tierexperimentellen Forschung genutzt wird. In Abhängigkeit von Alter, Mausstamm oder Tiermodell könnten die Narkoseprotokolle das Wohlbefinden jedoch in einem unterschiedlichen Umfang beeinträchtigen und somit in ihrem Schweregrad variieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als Orientierung für die prospektive Belastungsbeurteilung anderer Studien, die wiederholte Allgemeinnarkosen umfassen, dienen. Dennoch sollte die Belastung der Tiere, unter anderem beispielweise auch mit Hilfe des Protokolls zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen (Hohlbaum et al. 2018a), sorgfältig dokumentiert werden, um im Anschluss an die Studie den tatsächlichen Schweregrad des eigenen Narkoseprotokolls unter Berücksichtigung von Alter und Tierstamm sowie -modell zu erfassen.

Das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen wurde so aufgebaut, dass zusätzlicher Stress durch die verschiedenen Beobachtungen minimiert wurde (Hohlbaum et al. 2018a). Der Zeitraum der Einzelhaltung wurde auf 24 Stunden reduziert, indem gleichzeitig vier verschiedene Parameter (Aktivität im Heimatkäfig, Nestbauverhalten, Futteraufnahme, FCM-Werte) untersucht wurden (Hohlbaum et al. 2018a). Zudem sollten der Gebrauch von Einstreu aus dem Heimatkäfig und der visuelle, akustische sowie olfaktorische Kontakt zu den anderen Tieren – den durch die Einzelhaltung verursachten – Stress verringern (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b). Um den Einfluss der Einzelhaltung auf das Wohlbefinden der Tiere zu erfassen,

wurden die Kontrolltiere der Studie ebenfalls entsprechend des Protokolls beobachtet und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt (Hohlbaum et al. 2018a). Im Hinblick auf das Körpergewicht, das auch bei den Kontrolltieren einen Tag nach der 24-stündigen Einzelhaltung sank, scheint die Einzelhaltung entgegen aller Bemühungen Stress verursacht zu haben (Hohlbaum et al. 2017; Hohlbaum et al. 2018a; Hohlbaum et al. 2018b). Alternativen, diese Parameter zu bestimmen, ohne dass die Tiere einzeln gehalten werden müssen, sollten also in Erwägung gezogen werden. Beispielweise können automatische Analysesysteme die Tiere einer Gruppe anhand eines subkutan applizierten Mikrochips identifizieren und Parameter wie die Aktivität im Heimatkäfig sowie die Futteraufnahme für jedes Einzeltier individuell erfassen (Bains et al. 2016).

Für beide Narkoseregime, Injektions- und Inhalationsnarkose, wäre die Analyse von Blutwerten interessant gewesen, um zu beurteilen, in welchem Umfang wiederholte Narkosen den Metabolismus der Tiere beeinflussen. Auswirkungen auf den Blutglukose-Spiegel sind sowohl für Isofluran als auch für der Kombination von KX bekannt (Pomplun et al. 2004; Brown et al. 2005; Saha et al. 2005; Windeløv et al. 2016). Darüber hinaus können die Tiere über die Dauer der Narkose und gegebenenfalls auch noch während der Aufwach- und Erholungsphase keine Nahrung zu sich nehmen, wodurch der Metabolismus ebenfalls beeinträchtigt wird (Jensen et al. 2013). Eine durch die Narkosen bedingte Störung des zirkadianen Rhythmus (Prudian et al. 1997; Mihara et al. 2012; Kikuchi et al. 2013), der wiederum eng an die Futteraufnahme gekoppelt ist (Jensen et al. 2013), kann auch zu Veränderungen im Metabolismus führen (Jensen et al. 2013). Eine Blutabnahme während oder auch nach den Narkosen hätte das Stresslevel der Tiere beeinflusst und damit die Ergebnisse zum Wohlbefinden nach den Narkosen verzerrt.

Die vorliegende Studie fokussierte sich auf den Zustand der Tiere nach letzter wiederholter Narkose im Vergleich zur einmaligen Narkose bzw. den Kontrolltieren, so dass bei Tieren, die wiederholt narkotisiert wurden, die Beobachtungen erst nach der letzten Narkose durchgeführt wurden. Insbesondere im Hinblick auf die Injektionsnarkose stellt sich nun aber bei der Interpretation der Parameter, die schon nach einer einmaligen Narkose verändert waren und nach der letzten wiederholten Narkose entweder immer noch oder nicht mehr beeinflusst waren, die Frage, zu welchem Grad diese Parameter nach der zweiten bis fünften Narkosen beeinträchtigt waren. Die Dauer der Effekte hat einen essenziellen Einfluss auf den Schweregrad nach Annex VIII der RL 2010/63/EU.

Die Limitationen geben Anlass dazu, die Fragestellung der vorliegenden Studie in zukünftigen Untersuchungen weiterzuentwickeln und das Protokoll weiterzuentwickeln.

### **6.6. Ausblick**

Das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen könnte verbessert werden, indem der durch die Einzelhaltung induzierte Stress verhindert und die Parameter für die gesamte Tiergruppe erfasst werden (Hohlbaum et al. 2018a). Statt auf Ebene eines Individuums könnten die Parameter auf Ebene einer Gruppe an Mäusen, die zusammen in einem Käfig gehalten werden, analysiert werden. Ist ein oder sind mehrere Parameter auf Gruppenebene beeinträchtigt, müssten alle Mäuse der Gruppe sorgfältig untersucht werden, beispielsweise mittels Score Sheet oder einer erweiterten klinischen Untersuchung, um die Mäuse, deren Wohlbefinden reduziert ist, zu identifizieren. Wie sensitiv diese Methode ist, muss in zukünftigen Studien geprüft werden.

Um zu analysieren, wie sich Variationen im Narkoseprotokoll (Applikationsweise, Dosierung bzw. Konzentration der Komponenten, Dauer und Anzahl der Narkosen, Abstände zwischen den Narkosen), aber auch im Alter, Mausstamm sowie Tiermodell auf das Wohlbefinden auswirken, ist es sinnvoll, im Sinne der 3R weitere Studien in Kooperation mit Arbeitsgruppen aus dem Bereich der bildgebenden Techniken durchzuführen. Das Protokoll

## Diskussion

zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen kann an die jeweiligen Studien angepasst werden, so dass kein zusätzlicher Stress für die Tiere entsteht und die Untersuchungen der eigentlichen Studie nicht beeinflusst werden. Die verhaltensbezogenen, physiologischen/biochemischen und physischen Indikatoren könnten schon zu früheren Zeitpunkten als nach der letzten wiederholten Narkose beobachtet werden, gegebenenfalls nach jeder Narkose. So könnte bestimmt werden, inwiefern sich die Parameter über den Verlauf der Studie ändern. Wenn die jeweiligen Studien ohnehin Blutabnahmen oder nach der Tötung der Tiere histologische Untersuchungen vorsehen, könnten im gleichen Zuge weitere Indikatoren zur Belastungsbeurteilung gemessen werden. Blutwerte wie Kreatinkinase für potenzielle Muskelverletzungen infolge der Injektion und Glukose könnten bestimmt bzw. histologische Untersuchungen der Injektionsstelle bei Injektionsnarkose bzw. des Respirationstrakts bei Inhalationsnarkose könnten durchgeführt werden.

Nachdem die Belastung durch ein Verfahren tierbasiert und objektiv anhand des Protokolls zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen ermittelt wurde, erschließen sich möglicherweise neue Erkenntnisse über die Auswirkungen des Verfahrens auf die Tiere. Dies ist die Voraussetzung dafür, dass geeignete Refinement-Maßnahmen eingeführt werden können. Mithilfe des Protokolls kann wiederum geprüft werden, ob die Refinement-Maßnahmen effektiv waren. Im Sinne der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse geht mit der Verbesserung der tierexperimentellen Verfahren auch eine höhere wissenschaftliche Qualität einher (Garner 2005). Indem die Belastungsbeurteilungen und Refinement-Maßnahmen veröffentlicht werden, wird die Transparenz gegenüber der Öffentlichkeit verbessert. Zudem profitieren somit auch andere tierexperimentell arbeitende Arbeitsgruppen von den neuen Erkenntnissen – vor allem aber natürlich die Versuchstiere.



## 7. Zusammenfassung

---

### **Beurteilung des Schweregrades von wiederholten Narkosen bei Mäusen durch objektive Ermittlung tierbasierter Indikatoren für Wohlbefinden**

Das 3R-Prinzip von Russel und Burch (Replace, Reduce, Refine bzw. Vermeiden, Verringern, Verbessern) soll nach der Richtlinie (RL) 2010/63/EU in allen tierexperimentellen Bereichen angewendet werden. Wenn immer möglich, sollen Tierversuche durch Alternativmethoden ersetzt werden. Wenn ein Tierversuch nicht vermieden werden kann und als unerlässlich gilt, darf nur die notwendige Anzahl an Versuchstieren eingesetzt und Schmerzen, Leiden sowie Schäden müssen auf ein Minimum reduziert werden. Eine mögliche Strategie, die Tierzahl zu reduzieren, ist die wiederholte Verwendung von Tieren innerhalb eines Verfahrens wie beispielsweise Bildgebungsstudien. Bildgebende Techniken ermöglichen longitudinale Verlaufsuntersuchungen am gleichen Tier, um Krankheits- oder Heilungsprozesse festzustellen. Allerdings müssen die Tiere für jede bildgebende Untersuchung mittels Narkose immobilisiert werden, obwohl denkbar ist, dass wiederholte Narkosen das Wohlbefinden eines Tieres in einem größeren Ausmaß als eine einmalige Narkose beeinträchtigen könnten. Eine wiederholte Verwendung von Tieren innerhalb eines Verfahrens ist nur sinnvoll im Sinne des 3R-Prinzips, wenn Schmerzen, Leiden und Schäden nicht akkumulieren.

Der Schweregrad der wiederholten Verwendung innerhalb eines Verfahrens darf den Schweregrad der einmaligen Verwendung nicht übersteigen, denn die Tierzahl darf nicht auf Kosten des Wohlbefindens einzelner Tiere reduziert werden. Der Schweregrad von Narkosen gilt entsprechend Anhang VIII der RL 2010/63/EU zwar als gering belastend, aber die Richtlinie differenziert weder zwischen einer einmaligen Narkose und wiederholten Narkosen noch zwischen den verschiedenen Gruppen der Allgemeinanästhetika. Um die Belastung durch wiederholte Narkosen gemäß der RL 2010/63/EU beurteilen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen von wiederholten Narkosen (6 × mit einem Intervall von drei bis vier Tagen) und einer einmaligen Narkose auf das Wohlbefinden von adulten C57BL/6JRj Mäusen mit unbehandelten Mäusen verglichen. Dabei wurden die in der Versuchstierkunde am häufigsten durchgeführten Anästhesien, die Inhalationsanästhesie mit Isofluran sowie die Injektionsanästhesie mit der Kombination aus Ketamin und Xylazin, verwendet. Exzitationen, Narkosephasen und Vitalparameter wurden während der Narkoseüberwachung bestimmt. Für den postanästhetischen Zeitraum wurde ein Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen entwickelt und angewendet. Das Protokoll enthielt Tests zum Luxury Behavior, die Mouse Grimace Scale (MGS), den Free Exploratory Paradigm für Angst-bezogenes Verhalten, die Aktivität, die Futteraufnahme und das Körpergewicht sowie die Analyse von fäkalen Kortikosteronmetaboliten (FCM) für akuten Stress.

In Bezug auf Inhalationsnarkosen mit Isofluran beeinflussten weder eine einmalige Narkose noch wiederholte Narkosen das Nestbauverhalten, die Aktivität, das Körpergewicht und Konzentration an FCM. Unterschiede in der MGS, dem Wühlverhalten, der Futteraufnahme und dem Angst-bezogenem Verhalten in Abhängigkeit vom Geschlecht deuteten darauf hin, dass das Wohlbefinden nach wiederholten Inhalationsnarkosen stärker als nach einer einmaligen Inhalationsnarkose oder bei den Kontrolltieren beeinträchtigt war, insbesondere bei weiblichen Tieren. Außerdem zeigten Tiere, die wiederholt narkotisiert wurden, mehr Exzitationen während der Induktion. Insgesamt beeinträchtigten wiederholte Inhalationsnarkosen das Wohlbefinden der Mäuse geringgradig für einen kurzen Zeitraum in der frühen postanästhetischen Phase.

Die Injektionsnarkosen mit Ketamin und Xylazin in einmaliger und wiederholter Anwendung beeinflussten weder Nestbauverhalten noch die Aktivität oder das Körpergewicht. Veränderungen, abhängig vom Geschlecht, in der MGS, der Futteraufnahme, dem Angst-bezogenen Verhalten und der FCM-Konzentration zwischen einmaliger Narkose, wiederholten

## Zusammenfassung

Narkosen oder unbehandelten Tieren indizierten, dass sich die negativen Effekte von wiederholten Narkosen auf das Wohlbefinden der Mäuse nicht aufsummierten und somit geringgradig waren. Trotz des deutlichen Habituationseffekts an die Prozedur der Injektionsnarkose, gemessen anhand der FCM-Werte, war das Level an akutem Stress und das Angst-bezogene Verhalten nach wiederholten Injektionsnarkosen über einen vermutlich längeren Zeitraum erhöht als nach einer einmaligen Injektionsnarkose.

Gemäß RL 2010/63/EU können wiederholte Inhalationsnarkosen mit Isofluran, entsprechend des verwendeten Narkoseprotokolls, als gering belastend klassifiziert werden. Der Schweregrad wiederholter Injektionsnarkosen mit KX hängt davon ab, ob die noch zu prüfende Dauer der geringgradigen Effekte auf das Wohlbefinden kurzzeitig oder schon lang anhaltend ist und somit dem Schweregrad „mittel“ zugeordnet werden müssen. Insgesamt beeinflussen die wiederholten Inhalationsnarkosen das Wohlbefinden der Mäuse über einen wesentlich kürzeren Zeitraum als wiederholte Injektionsnarkosen und sollte daher vorgezogen werden, wenn in einer Studie – unter Berücksichtigung aller möglichen Faktoren – beide Narkoseregime in Frage kommen.

Um die Belastung durch andere Narkoseregime auf wissenschaftlicher und tierbasierter Ebene zu beurteilen, kann das Protokoll zur systematischen Beurteilung von Wohlbefinden bei Mäusen nach Allgemeinnarkosen genutzt werden. In Verbindung mit Anhang VIII der RL 2010/63/EU kann somit der Schweregrad objektiv ermittelt werden.

## 8. Summary

---

### **Severity assessment of repeated anesthesia in mice—an objective investigation of animal-based indicators of well-being**

The Directive 2010/63/EU stipulates to apply the 3R principle of Russel and Burch (Replace, Reduce, Refine) in all fields of animal experimentation. Animal testing should be replaced whenever possible. When there is no alternative to animal experimentation and the use of live animals continues to be necessary, the total number of laboratory animals used should be the minimum needed to obtain valuable data. Moreover, pain, suffering, and harm should be minimized. One strategy to reduce the number of animals is to repeatedly use an animal in the course of an experiment, such as studies including imaging techniques. Imaging techniques allow performing longitudinal studies, in which disease or healing progresses can be followed in the same animal. Since animals have to be immobilized when imaging is performed, they are anesthetized for every examination, though repeated anesthesia may have a greater impact on well-being of an animal compared to a single anesthesia. However, repeated animal usage is only worth considering in the scope of the 3R principle, if the total amount of pain, distress, and harm does not accumulate.

The severity of repeated animal usage in the course of an experiment should not exceed the severity of a single manipulation, because the reduction of the total number of animals used in an experiment should not be done on the expenses of a single animal. According to Annex VIII of Directive 2010/63/EU, anesthesia is classified as mild, but the Directive does not differentiate between a single and repeated anesthesia. Moreover, the different types of anesthesia are not distinguished in the Directive. In order to assess the severity of repeated anesthesia according to Directive 2010/63/EU, the aim of the present study was to investigate the impact of repeated anesthesia (6 × at an interval of 3–4 days) and a single anesthesia on the well-being of adult C57BL/6JRj mice compared to untreated mice. The most commonly used anesthesia, the inhalation anesthesia with isoflurane as well as the injection anesthesia with the combination of ketamine and xylazine, were used. Excitations, anesthesia phases, and vital parameters were determined. For the postanesthetic period, a protocol for systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia was developed and conducted. The protocol included tests for luxury behaviors, the Mouse Grimace Scale (MGS), the Free Exploratory Paradigm for anxiety-related behavior, activity, food intake and body weight as well as the analysis of fecal corticosterone metabolites (FCM) for acute stress.

Regarding inhalation anesthesia with isoflurane, neither a single nor repeated anesthesia influenced nest building behavior, activity, body weight, and FCM concentrations. Differences in the MGS, burrowing behavior, food intake, and anxiety-related behavior, depending on sex, indicated that repeated anesthesia had a greater impact on well-being in comparison to a single anesthesia or control. This effect was more pronounced in female mice. Moreover, repeated anesthesia increased excitations during induction. All in all, repeated anesthesia had mild effects on the well-being of mice for a short-term in the early postanesthetic period.

Both single and repeated injection anesthesia with the combination of ketamine and xylazine neither impaired nest building behavior nor activity or body weight. Depending on sex, differences in the MGS, food intake, anxiety-related behavior, and FCM concentrations between a single anesthesia, repeated anesthesia and control suggested that the negative effects on well-being of mice did not sum up. Hence, the effects of both a single and repeated

## Summary

anesthesia on well-being were mild. Despite of the clear habituation of mice to the procedure of anesthesia, as indicated by the FCM concentrations, levels of acute stress and anxiety-related behavior were probably increased for a longer period after repeated than after a single anesthesia.

According to Directive 2010/63/EU, repeated inhalation anesthesia with isoflurane performed in accordance to the present protocol can be classified as mild. The severity of repeated injection anesthesia depends on the duration of mild effects on the well-being of mice, which needs to be clarified. If well-being is impaired for a short-term, severity can be classified as mild. However, long-term mild effects accompany a moderate severity. Overall, repeated inhalation anesthesia reduced well-being of mice for a substantially shorter period compared to repeated injection anesthesia. Therefore, inhalation anesthesia should be preferred, when both anesthesia regimes are suitable, considering all potential factors.

In order to assess the severity of anesthesia regimes, other than the present one, in a scientific and animal-based way, the protocol for systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia can be applied. In consideration of Annex VIII of Directive 2010/63/EU, the severity degree can be objectively determined.

## 9. Literaturverzeichnis

---

### 9.1. Wissenschaftliche Literatur

- Abou-Ismaïl, U., O. Burman, C. Nicol and M. Mendl (2007). "Can sleep behavior be used as an indicator of stress in group-housed rats (*Rattus norvegicus*)?" *Anim Welf* 16: 185-188.
- Abou-Ismaïl, U., O. Burman, C. Nicol and M. Mendl (2008). "Let sleeping rats lie: does the timing of husbandry procedures affect laboratory rat behaviour, physiology and welfare?" *Appl Anim Behav Sci* 111(3-4): 329-341.
- Acklin, C. J. and R. A. Gault (2015). "Effects of natural enrichment materials on stress, memory and exploratory behavior in mice." *Lab Anim (NY)* 44(7): 262-267.
- Adams, K. M., A. M. Navarro, E. K. Hutchinson and J. L. Weed (2004). "A canine socialization and training program at the National Institutes of Health." *Lab Anim (NY)* 33(1): 32-36.
- Adler, S., D. Basketter, S. Creton, O. Pelkonen, J. van Benthem, V. Zuang, K. E. Andersen, A. Angers-Loustau, A. Aptula, A. Bal-Price, E. Benfenati, U. Bernauer, J. Bessems, F. Y. Bois, A. Boobis, E. Brandon, S. Bremer, T. Broschard, S. Casati, S. Coecke, R. Corvi, M. Cronin, G. Daston, W. Dekant, S. Felter, E. Grignard, U. Gundert-Remy, T. Heinonen, I. Kimber, J. Kleinjans, H. Komulainen, R. Kreiling, J. Kreysa, S. B. Leite, G. Loizou, G. Maxwell, P. Mazzatorta, S. Munn, S. Pfuhler, P. Phrakonkham, A. Piersma, A. Poth, P. Prieto, G. Repetto, V. Rogiers, G. Schoeters, M. Schwarz, R. Serafimova, H. Tahti, E. Testai, J. van Delft, H. van Loveren, M. Vinken, A. Worth and J. M. Zaldivar (2011). "Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010." *Arch Toxicol* 85(5): 367-485.
- Akk, G., S. Mennerick and J. H. Steinbach (2008). Actions of anesthetics on excitatory transmitter-gated channels. In: J. Schüttler and H. Schwilden (eds.): *Handbook of experimental pharmacology: Modern anesthetics*. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 53-84.
- Albrecht, M. (2015). Dissertation: Telemetrische Untersuchungen bei der Ratte zur Inhalationsanästhesie mit Isofluran, zur Injektionsanästhesie mit Ketamin-Xylazin und zur vollständig antagonisierbaren Anästhesie mit Medetomidin, Midazolam und Fentanyl. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, Lahn, VVB Laufersweiler Verlag.
- Albrecht, M., J. Henke, S. Tacke, M. Markert and B. Guth (2014). "Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats." *BMC Vet Res* 10(1): 198.
- Albrecht, M., J. Henke, S. Tacke, M. Markert and B. Guth (2014). "Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl." *BMC Vet Res* 10(1): 963.
- Alzmann, N. (ed.) (2016). *Tübinger Studien zur Ethik. Zur Beurteilung der ethischen Vertretbarkeit von Tierversuchen*. Tübingen, Narr Francke Attempto Verlag.
- Ammer, H. and H. Potschka (2002). Pharmakologie des zentralen Nervensystems (ZNS). In: H. Frey and W. Löscher (eds.): *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. 3. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag: 115-166.
- Amornyotin, S. (2014). "Ketamine: pharmacology revisited." *Int J Anesthesiol Res* 2: 42-44.
- Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte (2017). Empfehlung aus dem Arbeitskreis Berliner Tierschutzbeauftragte zu Score Sheets, Belastungskategorien und Abbruchkriterien. [www.ak-tierschutzbeauftragte.berlin/empfehlungen](http://www.ak-tierschutzbeauftragte.berlin/empfehlungen) (abgerufen am 05.03.2018).
- Arras, M., P. Autenried, A. Rettich, D. Spaeni and T. Rulicke (2001). "Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth." *Comp Med* 51(5): 443-456.

- Arras, M., A. Rettich, P. Cinelli, H. P. Kasermann and K. Burki (2007). "Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability." *BMC Vet Res* 3: 16.
- Aske, K. C. and C. A. Waugh (2017). "Expanding the 3R principles: more rigour and transparency in research using animals." *EMBO Rep* 18(9): 1490-1492.
- Atanasov, N. A., J. L. Sargent, J. P. Parmigiani, R. Palme and H. E. Diggs (2015). "Characterization of train-induced vibration and its effect on fecal corticosterone metabolites in mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 54(6): 737-744.
- Bailey, K. and J. Crawley (2009). Anxiety-related behaviors in mice. In: J. J. Buccafusco (ed.): *Methods of behavior analysis in neuroscience*. 2nd ed. Boca Raton, USA, CRC Press/Taylor & Francis.
- Bains, R. S., H. L. Cater, R. R. Sillito, A. Chartsias, D. Sneddon, D. Concas, P. Keskivali-Bond, T. C. Lukins, S. Wells, A. Acevedo Arozena, P. M. Nolan and J. D. Armstrong (2016). "Analysis of individual mouse activity in group housed animals of different inbred strains using a novel automated home cage analysis system." *Front Behav Neurosci* 10(106).
- Bar-Klein, G., R. Klee, C. Brandt, M. Bankstahl, P. Bascunana, K. Tollner, H. Dalipaj, J. P. Bankstahl, A. Friedman and W. Loscher (2016). "Isoflurane prevents acquired epilepsy in rat models of temporal lobe epilepsy." *Ann Neurol* 80(6): 896-908.
- Bekhat, M., L. Merrill, S. D. Kelly, V. K. Lee and G. N. Neigh (2016). "Brief anesthesia by isoflurane alters plasma corticosterone levels distinctly in male and female rats: Implications for tissue collection methods." *Behav Brain Res* 305: 122-125.
- Belzung, C. and F. Berton (1997). "Further pharmacological validation of the BALB/c neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety." *Behav Pharmacol* 8(6-7): 541-548.
- Bert, B., A. Dorendahl, N. Leich, J. Vietze, M. Steinfath, J. Chmielewska, A. Hensel, B. Grune and G. Schonfelder (2017). "Rethinking 3R strategies: Digging deeper into AnimalTestInfo promotes transparency in in vivo biomedical research." *PLoS Biol* 15(12): e2003217.
- Bert, B., N. Schmidt, J. P. Voigt, H. Fink and A. Rex (2013). "Evaluation of cage leaving behaviour in rats as a free choice paradigm." *J Pharmacol Toxicol Methods* 68(2): 240-249.
- Binder, R. (2009). Die "Schadenseite": Zur Erfassung der Belastung von Versuchstieren. In: D. Borchers and J. Luy (eds.): *Der ethisch vertretbare Tierversuch: Kriterien und Grenzen*. Paderborn, mentis Verlag: 237-263.
- Binder, R. (2010). "Die neue Tierversuchs-Richtlinie – Anspruch, Realität und Perspektiven." *ALTEXethik*: 11-22.
- Blagrove, M., C. J. Morgan, H. V. Curran, L. Bromley and B. Brandner (2009). "The incidence of unpleasant dreams after sub-anaesthetic ketamine." *Psychopharmacology (Berl)* 203(1): 109-120.
- Blokhuis, H. J., I. Veissier, M. Miele and B. Jones (2010). "The Welfare Quality® project and beyond: safeguarding farm animal well-being." *Acta Agric Scand A Anim Sci* 60(3): 129-140.
- Bodden, C., S. Siestrup, R. Palme, S. Kaiser, N. Sachser and S. H. Richter (2018). "Evidence-based severity assessment: impact of repeated versus single open-field testing on welfare in C57BL/6J mice." *Behav Brain Res* 336: 261-268.
- Boissy, A., G. Manteuffel, M. B. Jensen, R. O. Moe, B. Spruijt, L. J. Keeling, C. Winckler, B. Forkman, I. Dimitrov, J. Langbein, M. Bakken, I. Veissier and A. Aubert (2007). "Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare." *Physiol Behav* 92(3): 375-397.
- Boulanger Bertolus, J., G. Nemeth, I. J. Makowska and D. M. Weary (2015). "Rat aversion to sevoflurane and isoflurane." *Appl Anim Behav Sci* 164: 73-80.
- Bovill, J. G. (2008). Inhalation anesthesia: from diethyl ether to xenon. *Handbook of experimental pharmacology: modern anesthetics*. J. Schüttler and H. Schwilden. Berlin Heidelberg, Springer: 121-142.

- Brinks, V., M. van der Mark, R. de Kloet and M. Oitzl (2007). "Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: a combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice." *Front Behav Neurosci* 1: 8.
- Brown, E. T., Y. Umino, T. Loi, E. Solessio and R. Barlow (2005). "Anesthesia can cause sustained hyperglycemia in C57/BL6J mice." *Vis Neurosci* 22(5): 615-618.
- Browne, C. A. and I. Lucki (2013). "Antidepressant effects of ketamine: mechanisms underlying fast-acting novel antidepressants." *Front Pharmacol* 4: 161.
- Brucker, R., M. Bujok, B. Mütterich, M. Seelinger and F. Thieme (2015). *Das Mensch-Tier-Verhältnis*. Wiesbaden, Springer VS.
- Bugnon, P., M. Heimann and M. Thallmair (2016). "What the literature tells us about score sheet design." *Lab Anim* 50(6): 414-417.
- Buitrago, S., T. E. Martin, J. Tetens-Woodring, A. Belicha-Villanueva and G. E. Wilding (2008). "Safety and efficacy of various combinations of injectable anesthetics in BALB/c mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 47(1): 11-17.
- Burkholder, T., C. Foltz, E. Karlsson, C. G. Linton and J. M. Smith (2012). "Health evaluation of experimental laboratory mice." *Curr Protoc Mouse Biol* 2: 145-165.
- Cao, L., L. Li, D. Lin and Z. Zuo (2012). "Isoflurane induces learning impairment that is mediated by interleukin 1beta in rodents." *PLoS One* 7(12): e51431.
- Carrier, N. and M. Kabbaj (2013). "Sex differences in the antidepressant-like effects of ketamine." *Neuropharmacology* 70: 27-34.
- Carstens, E. and G. P. Moberg (2000). "Recognizing pain and distress in laboratory animals." *ILAR J* 41(2): 62-71.
- Cavigelli, S. A. and M. K. McClintock (2003). "Fear of novelty in infant rats predicts adult corticosterone dynamics and an early death." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26): 16131-16136.
- Chapman, K. L., H. Holzgrefe, L. E. Black, M. Brown, G. Chellman, C. Copeman, J. Couch, S. Creton, S. Gehen, A. Hoberman, L. B. Kinter, S. Madden, C. Mattis, H. A. Stemple and S. Wilson (2013). "Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation." *Regul Toxicol Pharmacol* 66(1): 88-103.
- Chmielewska, J., B. Bert, B. Grune, A. Hensel and G. Schönfelder (2015). "Der „vernünftige Grund“ zur Tötung von überzähligen Tieren. Eine klassische Frage des Tierschutzrechts im Kontext der biomedizinischen Forschung." *Springer* 37(677-682).
- Clarke, C. (2006). "Acute mountain sickness: medical problems associated with acute and subacute exposure to hypobaric hypoxia." *Postgrad Med J* 82(973): 748-753.
- Constantinides, C., R. Mean and B. J. Janssen (2011). "Effects of isoflurane anesthesia on the cardiovascular function of the C57BL/6 mouse." *ILAR J* 52(3): e21-31.
- Corsen, G. and E. F. Domino (1966). "Dissociative anesthesia: further pharmacologic studies and first clinical experience with the phencyclidine derivative CI-581." *Anesth Analg* 45(1): 29-40.
- Cozzoli, D. K., M. A. Tanchuck-Nipper, M. N. Kaufman, C. B. Horowitz and D. A. Finn (2014). "Environmental stressors influence limited-access ethanol consumption by C57BL/6J mice in a sex-dependent manner." *Alcohol* 48(8): 741-754.
- CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH (2012). *Fachinformation zu Isofluran CP 1 ml/ml*. Burgdorf, Germany.
- Cucchiara, R. F., R. A. Theye and J. D. Michenfelder (1974). "The effects of isoflurane on canine cerebral metabolism and blood flow." *Anesthesiology* 40(6): 571-574.
- Dale, O. and B. R. Brown, Jr. (1987). "Clinical pharmacokinetics of the inhalational anaesthetics." *Clin Pharmacokinet* 12(3): 145-167.
- Davenport, M. D., C. K. Lutz, S. Tiefenbacher, M. A. Novak and J. S. Meyer (2008). "A rhesus monkey model of self-injury: effects of relocation stress on behavior and neuroendocrine function." *Biol Psychiatry* 63(10): 990-996.
- Dawkins, M. S. (2006). "A user's guide to animal welfare science." *Trends Ecol Evol* 21(2): 77-82.
- Dayton, P. G., R. L. Stiller, D. R. Cook and J. M. Perel (1983). "The binding of ketamine to plasma proteins: Emphasis on human plasma." *Eur J Clin Pharmacol* 24(6): 825-831.

- de Sousa, S. L., R. Dickinson, W. R. Lieb and N. P. Franks (2000). "Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon." *Anesthesiology* 92(4): 1055-1066.
- Deacon, R. (2012). "Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice." *J Vis Exp*(59): e2607.
- Deacon, R. M. (2006). "Assessing nest building in mice." *Nat Protoc* 1(3): 1117-1119.
- Deacon, R. M. (2006). "Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction." *Nat Protoc* 1(1): 118-121.
- Deacon, R. M. (2009). "Burrowing: a sensitive behavioural assay, tested in five species of laboratory rodents." *Behav Brain Res* 200(1): 128-133.
- Deacon, R. M., A. Croucher and J. N. Rawlins (2002). "Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice." *Behav Brain Res* 132(2): 203-213.
- Deacon, R. M., J. M. Raley, V. H. Perry and J. N. Rawlins (2001). "Burrowing into prion disease." *Neuroreport* 12(9): 2053-2057.
- Deacon, R. M., D. Reisel, V. H. Perry, J. Nicholas and P. Rawlins (2005). "Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice." *Behav Brain Res* 157(1): 99-105.
- Deacon, R. M. J., L. L. Cholerton, K. Talbot, R. G. Nair-Roberts, D. J. Sanderson, C. Romberg, E. Koros, K. D. Bornemann and J. N. P. Rawlins (2008). "Age-dependent and -independent behavioral deficits in Tg2576 mice." *Behav Brain Res* 189(1): 126-138.
- DeGrazia, D. and J. Sebo (2015). "Necessary conditions for morally responsible animal research." *Camb Q Healthc Ethics* 24(4): 420-430.
- Dildy-Mayfield, J. E., E. I. Eger, 2nd and R. A. Harris (1996). "Anesthetics produce subunit-selective actions on glutamate receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 276(3): 1058-1065.
- Dittmar, M. S., N. P. Fehm, B. Vatankhah and M. Horn (2004). "Ketamine/xylazine anesthesia for radiologic imaging of neurologically impaired rats: dose response, respiratory depression, and management of complications." *Comp Med* 54(6): 652-655.
- Dutton, R. C., A. J. Maurer, J. M. Sonner, M. S. Fanselow, M. J. Laster and E. I. Eger, 2nd (2002). "Isoflurane causes anterograde but not retrograde amnesia for pavlovian fear conditioning." *Anesthesiology* 96(5): 1223-1229.
- EC AG für Bewertung des Schweregrads von Verfahren (2012). Arbeitspapier über einen Rahmen für die Bewertung des Schweregrads (Belastungsbeurteilung). [ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/pdf/guidance/severity/de.pdf](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/pdf/guidance/severity/de.pdf) (abgerufen am 05.03.2018). Brüssel, Belgien.
- Edwards, S. R. and L. E. Mather (2001). "Tissue uptake of ketamine and norketamine enantiomers in the rat: indirect evidence for extrahepatic metabolic inversion." *Life Sci* 69(17): 2051-2066.
- Eger, E. I., 2nd (1981). "Isoflurane: a review." *Anesthesiology* 55(5): 559-576.
- Ekman, P., W. V. Friesen and S. Ancoli (1980). "Facial signs fo emotional experience." *J Pers Soc Psychol* 39(6): 1125-1134.
- Elliott, J. A. (2008). Chapter 65:  $\alpha$ 2-agonists. *Current therapy in pain*. 1st ed. H. S. Smith. Philadelphia, USA, Saunders: 476-479.
- Ensinger, H. (2005). Narkose - Inhalationsanästhetika und Injektionsanästhetika. In: W. Forth, D. Henschler and W. Rummel (eds.): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München, Elsevier GmbH.
- Erhardt, W. (2012a). Definition, Aufgaben und Bedeutung der tierärztlichen Anästhesiologie. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner and S. Tacke (eds.): *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2. Auflage. Stuttgart, Schattauer: 5-11.
- Erhardt, W., J. Henke, S. Tacke, C. Baumgartner and R. Kroker (2012b). *Allgemeinanästhesie*. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner and S. Tacke (eds.): *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2. Auflage. Stuttgart, Schattauer: 17-140.
- Erhardt, W., J. Henke and C. Baumgartner (2012c). *Speziesspezifische Anästhesie: Labortiere*. In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner and S. Tacke



- (eds.): Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen. 2. Auflage. Stuttgart, Schattauer: 759-788.
- Erickson, R. L., M. C. Terzi, S. M. Jaber, F. C. Hankenson, A. McKinstry-Wu, M. B. Kelz and J. O. Marx (2016). "Intraperitoneal continuous-rate infusion for the maintenance of anesthesia in laboratory mice (*Mus musculus*)."  
*J Am Assoc Lab Anim Sc* 55(5): 548-557.
- Fahim, I., M. Ismail and O. H. Osman (1973). "Role of 5-hydroxytryptamine in ketamine-induced hypothermia in the rat."  
*Br J Pharmacol* 48(4): 570-576.
- Farm Animal Welfare Council (2009). Farm animal welfare in Great Britain: past, present and future. [www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/319292/Farm\\_Animal\\_Welfare\\_in\\_Great\\_Britain\\_\\_Past\\_\\_Present\\_and\\_Future.pdf](http://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/319292/Farm_Animal_Welfare_in_Great_Britain__Past__Present_and_Future.pdf) (abgerufen am 05.03.2018). London, UK.
- Federation of Veterinarians of Europe (FVE) (2008). Europäischer Verhaltenskodex für Tierärzte. [www.fve.org/news/publications/pdf/coc\\_vet\\_act\\_fve\\_2009\\_german\\_version.pdf](http://www.fve.org/news/publications/pdf/coc_vet_act_fve_2009_german_version.pdf) (abgerufen am 05.03.2018).
- Felton, L. M., C. Cunningham, E. L. Rankine, S. Waters, D. Boche and V. H. Perry (2005). "MCP-1 and murine prion disease: separation of early behavioural dysfunction from overt clinical disease."  
*Neurobiol Dis* 20(2): 283-295.
- Fentener van Vlissingen, J. M., M. Borrens, A. Girod, P. Lelovas, F. Morrison and Y. S. Torres (2015). "The reporting of clinical signs in laboratory animals: FELASA working group report."  
*Lab Anim* 49(4): 267-283.
- Filali, M., R. Lalonde and S. Rivest (2011). "Subchronic memantine administration on spatial learning, exploratory activity, and nest-building in an APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease."  
*Neuropharmacology* 60(6): 930-936.
- File, S. E., A. S. Lippa, B. Beer and M. T. Lippa (2004). "Animal tests of anxiety."  
*Curr Protoc Neurosci* Chapter 8: Unit 8 3.
- Fink, H. and H. Frey (2002). Allgemeine Pharmakologie. In: H. Frey and W. Löscher (eds.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. 3. Auflage. Stuttgart, Enke Verlag: 1-41.
- Finlayson, K., J. F. Lampe, S. Hintze, H. Wurbel and L. Melotti (2016). "Facial indicators of positive emotions in rats."  
*PLoS One* 11(11): e0166446.
- Flaishon, R., A. A. Weinbroum, L. Veenman, S. Leschiner, V. Rudick and M. Gavish (2003). "Flumazenil attenuates development of tolerance to diazepam after chronic treatment of mice with either isoflurane or diazepam."  
*Anesth Analg* 97(4): 1046-1052, table of contents.
- Flecknell, P. (2002). "Replacement, reduction and refinement."  
*ALTEX* 19(2): 73-78.
- Flecknell, P. (2016a). Chapter 3 - Special techniques. Laboratory animal anaesthesia. 4th ed. Boston, Academic Press: 109-140.
- Flecknell, P. (2016b). Chapter 1 - Basic principles of anaesthesia. In: P. Flecknell (ed.): Laboratory animal anaesthesia. 4th ed. Boston, Academic Press: 1-75.
- Flecknell, P. (2016c). Chapter 5 - Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: P. Flecknell (ed.): Laboratory animal anaesthesia. 4th ed. Boston, Academic Press: 193-256.
- Gaertner, D. J., K. R. Boschert and T. R. Schoeb (1987). "Muscle necrosis in Syrian hamsters resulting from intramuscular injections of ketamine and xylazine."  
*Lab Anim Sci* 37(1): 80-83.
- Gaines Das, R. and D. North (2007). "Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures."  
*Lab Anim* 41(3): 312-320.
- Gambhir, S. S. (2002). "Molecular imaging of cancer with positron emission tomography."  
*Nat Rev Cancer* 2(9): 683-693.
- Gao, W., T. Stalder, P. Foley, M. Rauh, H. Deng and C. Kirschbaum (2013). "Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay."  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 928: 1-8.

- Garcia-Villar, R., P. L. Toutain, M. Alvinerie and Y. Ruckebusch (1981). "The pharmacokinetics of xylazine hydrochloride: an interspecific study." *J Vet Pharmacol Ther* 4(2): 87-92.
- Gargiulo, S., A. Greco, M. Gramanzini, S. Esposito, A. Affuso, A. Brunetti and G. Vesce (2012). "Mice anesthesia, analgesia, and care, Part I: anesthetic considerations in preclinical research." *ILAR J* 53(1): E55-69.
- Garner, J. P. (2005). "Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes." *ILAR J* 46(2): 106-117.
- Gaskill, B. N., A. Z. Karas, J. P. Garner and K. R. Pritchett-Corning (2013). "Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice." *J Vis Exp*(82): 51012.
- Golledge, H. and P. Jirkof (2016). "Score sheets and analgesia." *Lab Anim* 50(6): 411-413.
- Gong, S., Y.-L. Miao, G.-Z. Jiao, M.-J. Sun, H. Li, J. Lin, M.-J. Luo and J.-H. Tan (2015). "Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice." *PLoS One* 10(2): e0117503.
- Grad, B. and R. Khalid (1968). "Circulating corticosterone levels of young and old, male and female C57B1/6J mice." *J Gerontol* 23(4): 522-528.
- Greenberg, G. D., L. C. Huang, S. E. Spence, J. P. Schlumbohm, P. Metten, A. R. Ozburn and J. C. Crabbe (2016). "Nest building is a novel method for indexing severity of alcohol withdrawal in mice." *Behav Brain Res* 302: 182-190.
- Greene, S. A. and J. C. Thurmon (1988). "Xylazine—a review of its pharmacology and use in veterinary medicine." *J Vet Pharmacol Ther* 11(4): 295-313.
- Guenther, K., R. M. Deacon, V. H. Perry and J. N. Rawlins (2001). "Early behavioural changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone." *Eur J Neurosci* 14(2): 401-409.
- Günther, L., J. Rothe, A. Rex, J.-P. Voigt, M. J. Millan, H. Fink and B. Bert (2011). "5-HT1A-receptor over-expressing mice: genotype and sex dependent responses to antidepressants in the forced swim-test." *Neuropharmacology* 61(3): 433-441.
- Hackbarth, H. and A. Lückert (2000). *Tierschutzrecht: praxisorientierter Leitfaden*. 1. Auflage. München und Berlin, Jehle-Rehm.
- Halberstadt, A. L. and M. A. Geyer (2013). "Characterization of the head-twitch response induced by hallucinogens in mice." *Psychopharmacology (Berl)* 227(4): 727-739.
- Hartman, J. C., P. S. Pagel, L. T. Proctor, J. P. Kampine, W. T. Schmeling and D. C. Warltier (1992). "Influence of desflurane, isoflurane and halothane on regional tissue perfusion in dogs." *Can J Anaesth* 39(8): 877-887.
- Hawkins, P., D. B. Morton, O. Burman, N. Dennison, P. Honess, M. Jennings, S. Lane, V. Middleton, J. V. Roughan, S. Wells and K. Westwood (2011). "A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement." *Lab Anim* 45(1): 1-13.
- Heindl, C., A. Hess and K. Brune (2008). "Refinement and reduction in animal experimentation: options for new imaging techniques." *ALTEX* 25(2): 121-125.
- Heisler, L. K., H. M. Chu, T. J. Brennan, J. A. Danao, P. Bajwa, L. H. Parsons and L. H. Tecott (1998). "Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT1A receptor mutant mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 15049-15054.
- Hellebrekers, L. and P. Hedenqvist (2011). Laboratory animal analgesia, anesthesia, and euthanasia. In: J. Hau and S. J. Schapiro (eds.): *Handbook of laboratory animal science*. Volume 1: Essential principles and practices. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press/Taylor and Francis Group, LCC: 485-534.
- Hendriksen, C., D. Morton and K. Cussler (2011). Use of humane endpoints to minimize suffering. In: B. Howard, T. Nevalainen and G. Perretta (eds.): *The COST Manual of Laboratory Animal Care and Use: Refinement, Reduction, and Research*. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis: 333-353.
- Henke, J. and W. Erhardt (2012). *Speziesspezifische Anästhesie: Nager, Anästhesie und In: W. Erhardt, J. Henke, J. Haberstroh, C. Baumgartner and S. Tacke (eds.): Analgesie beim Klein- und Heimtier mit Exoten, Labortieren, Vögeln, Reptilien, Amphibien und Fischen*. 2. Auflage. Stuttgart, Schattauer: 703-725.

- Henke, J., J. Haberstroh, M. Sager, K. Becker, E. Eberspächer, A. Bergadano, D. Zahner and M. Arras (2015). Fachinformation aus dem Ausschuss für Anästhesie der GV-SOLAS in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis 4 in der TVT: Schmerztherapie bei Versuchstieren.
- Hevers, W., S. H. Hadley, H. Lüddens and J. Amin (2008). "Ketamine, but not phencyclidine, selectively modulates cerebellar GABA(A) receptors containing  $\alpha 6$  and  $\delta$  subunits." *J Neurosci* 28(20): 5383-5393.
- Hijazi, Y. and R. Boulieu (2002). "Contribution of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 isoforms to N-demethylation of ketamine in human liver microsomes." *Drug Metab Dispos* 30(7): 853-858.
- Hildebrandt, I. J., H. Su and W. A. Weber (2008). "Anesthesia and other considerations for in vivo imaging of small animals." *ILAR J* 49(1): 17-26.
- Hirshman, C. A., G. Edelstein, S. Peetz, R. Wayne and H. Downes (1982). "Mechanism of action of inhalational anesthesia on airways." *Anesthesiology* 56(2): 107-111.
- Hirt, A., C. Maisack and J. Moritz (eds.) (2016). *Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006. Tierschutzgesetz mit TierSchHundeV, TierSchNutzV, TierSchVersV, TierSchTrV, EU-Transport-VO, TierSchIV, EU-TierSchlacht-VO: Kommentar. 3. Auflage. München, Verlag Franz Vahlen.*
- Hodgues, W. F. and C. D. Spielberger (1969). "An indicant of trait or state anxiety?" *J Consult Clin Psychol* 33(4): 430-434.
- Hohlbaum, K., B. Bert, S. Dietze, R. Palme, H. Fink and C. Thöne-Reineke (2017). "Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice—Assessing the degree of distress." *PLoS One* 12(6): e0179588.
- Hohlbaum, K., B. Bert, S. Dietze, R. Palme, H. Fink and C. Thöne-Reineke (2018a). "Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia." *J Vis Exp*(133): e57046.
- Hohlbaum, K., B. Bert, S. Dietze, R. Palme, H. Fink and C. Thöne-Reineke (2018b). "Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice." *PLoS One* (eingereicht am 09.02.2018).
- Holaday, D. A., V. Fiserova-Bergerova, I. P. Latta and M. A. Zumbiel (1975). "Resistance of isoflurane to biotransformation in man." *Anesthesiology* 43(3): 325-332.
- Holtman, J. R., P. A. Crooks, J. K. Johnson-Hardy, M. Hojomat, M. Kleven and E. P. Wala (2008). "Effects of norketamine enantiomers in rodent models of persistent pain." *Pharmacol Biochem Behav* 90(4): 676-685.
- Hurst, J. L. and R. S. West (2010). "Taming anxiety in laboratory mice." *Nat Meth* 7(10): 825-826.
- Iloff, S. A. (2002). "An additional "R": remembering the animals." *ILAR J* 43(1): 38-47.
- Illera, J. C., A. Gonzalez Gil, G. Silvan and M. Illera (2000). "The effects of different anaesthetic treatments on the adreno-cortical functions and glucose levels in NZW rabbits." *J Physiol Biochem* 56(4): 329-336.
- Irifune, M., T. Shimizu, M. Nomoto and T. Fukuda (1995). "Involvement of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in noncompetitive NMDA receptor antagonist-induced hyperlocomotion in mice." *Pharmacol Biochem Behav* 51(2-3): 291-296.
- Jacobsen, K. R., O. Kalliokoski, A. C. Teilmann, J. Hau and K. S. Abelson (2012). "Postsurgical food and water consumption, fecal corticosterone metabolites, and behavior assessment as noninvasive measures of pain in vasectomized BALB/c mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51(1): 69-75.
- Jaffer, F. A., D. E. Sosnovik, M. Nahrendorf and R. Weissleder (2006). "Molecular imaging of myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* 41(6): 921-933.
- Janssen, C. F., P. Maiello, M. J. Wright, K. B. Kracinovsky and J. T. Newsome (2017). "Comparison of atipamezole with yohimbine for antagonism of xylazine in mice anesthetized with ketamine and xylazine." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 56(2): 142-147.
- Jarcho, M. R., K. J. Massner, A. R. Eggert and E. L. Wichelt (2016). "Behavioral and physiological response to onset and termination of social instability in female mice." *Horm Behav* 78: 135-140.

- Jensen, T., M. Kiersgaard, D. Sørensen and L. Mikkelsen (2013). "Fasting of mice: a review." *Lab Anim* 47(4): 225-240.
- Jeong, J. Y., D. H. Lee and S. S. Kang (2013). "Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice." *Endocrinol Metab (Seoul)* 28(4): 288-296.
- Jirkof, P. (2014). "Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice." *J Neurosci Methods* 234: 139-146.
- Jirkof, P., N. Cesarovic, A. Rettich, F. Nicholls, B. Seifert and M. Arras (2010). "Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice." *Front Behav Neurosci* 4: 165.
- Jirkof, P., T. Fleischmann, N. Cesarovic, A. Rettich, J. Vogel and M. Arras (2013a). "Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring." *Lab Anim* 47(3): 153-161.
- Jirkof, P., K. Leucht, N. Cesarovic, M. Caj, F. Nicholls, G. Rogler, M. Arras and M. Hausmann (2013b). "Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice." *Lab Anim* 47(4): 274-283.
- Johnson, J. (2013). "Vulnerable subjects? The case of nonhuman animals in experimentation." *J Bioeth Inq* 10(4): 497-504.
- Kapur, S. and P. Seeman (2002). "NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D(2) and serotonin 5-HT(2) receptors-implications for models of schizophrenia." *Mol Psychiatry* 7(8): 837-844.
- Kemmotsu, O., Y. Hashimoto and S. Shimosato (1973). "Inotropic effects of isoflurane on mechanics of contraction in isolated cat papillary muscles from normal and failing hearts." *Anesthesiology* 39(5): 470-477.
- Kichko, T. I., F. Niedermirtl, A. Leffler and P. W. Reeh (2015). "Irritant volatile anesthetics induce neurogenic inflammation through TRPA1 and TRPV1 channels in the isolated mouse trachea." *Anesth Analg* 120(2): 467-471.
- Kikuchi, T., H. Tan, T. Mihara, K. Uchimoto, D. Mitsushima, K. Takase, S. Morita, T. Goto, T. Andoh and Y. Kamiya (2013). "Effects of volatile anesthetics on the circadian rhythms of rat hippocampal acetylcholine release and locomotor activity." *Neuroscience* 237: 151-160.
- Kilkenny, C., W. J. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson and D. G. Altman (2010). "Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research." *PLoS Biol* 8(6): e1000412.
- Kim, H.-S., I.-S. Park, H.-K. Lim and H.-S. Choi (1999). "NMDA receptor antagonists enhance 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated behavior, head-twitch response, in PCPA-treated mice." *Arch Pharm Res* 22(2): 113-118.
- Kim, H. S., I. S. Park and W. K. Park (1998). "NMDA receptor antagonists enhance 5-HT<sub>2</sub> receptor-mediated behavior, head-twitch response, in mice." *Life Sci* 63(26): 2305-2311.
- Kirschbaum, C. and D. H. Hellhammer (1989). "Salivary cortisol in psychobiological research: an overview." *Neuropsychobiology* 22(3): 150-169.
- Klein, H. J. and K. A. Bayne (2007). "Establishing a culture of care, conscience, and responsibility: addressing the improvement of scientific discovery and animal welfare through science-based performance standards." *ILAR J* 48(1): 3-11.
- Koch, C. E., B. Leinweber, B. C. Drengberg, C. Blaum and H. Oster (2017). "Interaction between circadian rhythms and stress." *Neurobiol Stress* 6: 57-67.
- Kohrs, R. and M. E. Durieux (1998). "Ketamine: teaching an old drug new tricks." *Anesth Analg* 87(5): 1186-1193.
- Komai, H. and B. F. Rusy (1987). "Negative inotropic effects of isoflurane and halothane in rabbit papillary muscles." *Anesth Analg* 66(1): 29-33.
- Land, C. J. v. t. and C. F. M. Hendriksen (1995). "Change in locomotor activity pattern in mice: a model for recognition of distress?" *Lab Anim* 29(3): 286-293.
- Lang, A., J. Saam, R. Ebadi and B. Zimmer (2018). "AniMatch: reducing lab animal usage. [www.animatch.eu](http://www.animatch.eu) (abgerufen am 03.02.2018)."

- Lang, P. J., M. Davis and A. Ohman (2000). "Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology." *J Affect Disord* 61(3): 137-159.
- Langford, D. J., A. L. Bailey, M. L. Chanda, S. E. Clarke, T. E. Drummond, S. Echols, S. Glick, J. Ingrao, 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(6): 447-449.
- Lapin, I. P. (1995). "Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze." *J Pharmacol Toxicol Methods* 34(2): 73-77.
- Lauber, D. T., A. Fulop, T. Kovacs, K. Szigeti, D. Mathe and A. Szijarto (2017). "State of the art in vivo imaging techniques for laboratory animals." *Lab Anim* 51(5): 465-478.
- Leach, M. C. and D. C. J. Main (2008a). "An assessment of laboratory mouse welfare in UK animal units." *Animal Welfare* 17(2): 171-187.
- Leach, M. C., P. D. Thornton and D. C. J. Main (2008b). "Identification of appropriate measures for the assessment of laboratory mouse welfare." *Animal Welfare* 17(2): 161-170.
- Leidinger, C., F. Herrmann, C. Thone-Reineke, N. Baumgart and J. Baumgart (2017). "Introducing clicker training as a cognitive enrichment for laboratory mice." *J Vis Exp*(121): doi: 10.3791/55415.
- Levin-Arama, M., L. Abraham, T. Waner, A. Harmelin, D. M. Steinberg, T. Lahav and M. Harlev (2016). "Subcutaneous compared with intraperitoneal ketamine-xylazine for anesthesia of mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55(6): 794-800.
- Li, F., C. J. Guo, C. C. Huang, G. Yu, S. M. Brown, S. Xu and Q. Liu (2015). "Transient receptor potential A1 activation prolongs isoflurane induction latency and impairs respiratory function in mice." *Anesthesiology* 122(4): 768-775.
- Li, L. and P. E. Vlisides (2016). "Ketamine: 50 years of modulating the mind." *Front Hum Neurosci* 10.
- Li, N., R.-J. Liu, J. M. Dwyer, M. Banasr, B. Lee, H. Son, X.-Y. Li, G. Aghajanian and R. S. Duman (2011). "Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure." *Biol Psychiatry* 69(8): 754-761.
- Lilley, E., P. Hawkins and M. Jennings (2014). "A 'road map' toward ending severe suffering of animals used in research and testing." *Altern Lab Anim* 42(4): 267-272.
- Lister, R. G. (1990). "Ethologically-based animal models of anxiety disorders." *Pharmacol Ther* 46(3): 321-340.
- Liu, J., P. Wang, X. Zhang, W. Zhang and G. Gu (2014). "Effects of different concentration and duration time of isoflurane on acute and long-term neurocognitive function of young adult C57BL/6 mouse." *Int J Clin Exp Pathol* 7(9): 5828-5836.
- Livingston, A., J. Low and B. Morris (1984). "Effects of clonidine and xylazine on body temperature in the rat." *Br J Pharmacol* 81(1): 189-193.
- Lorenz, J. N. (2002). "A practical guide to evaluating cardiovascular, renal, and pulmonary function in mice." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282(6): R1565-1582.
- Lorz, A. and E. Metzger (eds.) (2008). *Tierschutzgesetz: Tierschutzgesetz mit allgemeiner Verwaltungsvorschrift, Rechtsverordnungen und Europäischen Übereinkommen sowie Erläuterungen des Art. 20a GG: Kommentar*. München, Beck.
- Löscher, W., F. Ungemach and R. Kroker (eds.) (1991). *Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey.
- Luy, J. (1998). *Dissertation: Die Tötungsfrage in der Tierschutzethik*. Freie Universität Berlin, Berlin.
- Ma, D., N. Rajakumaraswamy and M. Maze (2005). "α2-Adrenoceptor agonists: shedding light on neuroprotection?" *British Medical Bulletin* 71(1): 77-92.
- Madetoja, J., M. Madetoja, J. Mäkinen, E. Riuttala and J. Jokinen (2009). "Blood sampling from the tail vein, in comparison with two other techniques, causes less stress to mice." *Scand J Lab Anim Sci* 36(2).

- Maier, S. F. and L. R. Watkins (2005). "Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin releasing hormone." *Neurosci Biobehav Rev* 29(4-5): 829-841.
- Marquardt, N. (2013). Dissertation: Vergleich der Belastungen durch Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), Isofluran und Sevofluran in der Phase der Narkoseeinleitung bei Mäusen – ein Beitrag zum Refinement von Tierversuchen. Freie Universität Berlin, Berlin, Mensch und Buch Verlag.
- Martin, D. C., R. J. Adams and R. S. Aronstam (1990). "The influence of isoflurane on the synaptic activity of 5-hydroxytryptamine." *Neurochemical Research* 15(10): 969-973.
- Max-Planck-Gesellschaft (2016). White paper: animal research in the Max Planck Society. München, Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. [www.mpg.de/10882259/MPG\\_Whitepaper.pdf](http://www.mpg.de/10882259/MPG_Whitepaper.pdf) (abgerufen am 05.03.2018).
- Maxwell, C. R., R. S. Ehrlichman, Y. Liang, D. Trief, S. J. Kaness, J. Karp and S. J. Siegel (2006). "Ketamine produces lasting disruptions in encoding of sensory stimuli." *J Pharmacol Exp Ther* 316(1): 315-324.
- Meijer, M. K., B. M. Spruijt, L. F. van Zutphen and V. Baumans (2006). "Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice." *Lab Anim* 40(4): 382-391.
- Meijer, M. K., B. M. Spruijt, L. F. M. v. Zutphen and V. Baumans (2006). "Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice." *Lab Anim* 40(4): 382-391.
- Mellor, D. J. and C. S. W. Reid (1994). Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. In: R. M. Baker, G. Jenkins and D. J. Mellor (eds.): *Improving the well-being of animals in the research environment*. Glen Osmond, Australia, Australian and New Zealand Council for the Care of Animals in Research and Teaching (ANZCCART): 3-18.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." *Science* 150(3699): 971-979.
- Mihara, T., T. Kikuchi, Y. Kamiya, M. Koga, K. Uchimoto, K. Kurahashi and T. Goto (2012). "Day or night administration of ketamine and pentobarbital differentially affect circadian rhythms of pineal melatonin secretion and locomotor activity in rats." *Anesth Analg* 115(4): 805-813.
- Millan, M. J., A. Dekeyne, A. Newman-Tancredi, D. Cussac, V. Audinot, G. Milligan, D. Duqueyroi, S. Girardon, J. Mullot, J. A. Boutin, J. P. Nicolas, A. Renouard-Try, J. M. Lacoste and A. Cordi (2000). "S18616, a highly potent, spiroimidazoline agonist at alpha(2)-adrenoceptors: I. Receptor profile, antinociceptive and hypothermic actions in comparison with dexmedetomidine and clonidine." *J Pharmacol Exp Ther* 295(3): 1192-1205.
- Miller, A., G. Kitson, B. Skalkoyannis and M. Leach (2015). "The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice." *Appl Anim Behav Sci* 172: 58-62.
- Miller, A. L., G. L. Kitson, B. Skalkoyannis, P. A. Flecknell and M. C. Leach (2016). "Using the Mouse Grimace Scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy." *Appl Anim Behav Sci* 181: 160-165.
- Miller, A. L. and M. C. Leach (2015). "The Mouse Grimace Scale: a clinically useful tool?" *PLoS One* 10(9).
- Miner, N. A., J. Koehler and L. Greenaway (1969). "Intraperitoneal injection of mice." *Appl Microbiol* 17(2): 250-251.
- Mion, G. and T. Villeveille (2013). "Ketamine pharmacology: an update (pharmacodynamics and molecular aspects, recent findings)." *CNS Neurosci Ther* 19(6): 370-380.
- Moberg, G. P. (1987). "Problems in defining stress and distress in animals." *J Am Vet Med Assoc* 191(10): 1207-1211.
- Moberg, G. P. (2000). *Biological response to stress: implications for animal welfare. The biology of animal stress: basic Principles and implications for animal welfare*. G. P. Moberg and J. A. Mench. Wallingford, UK, CABI Publishing: 1-21.

- Moberg, G. P. (1999). "When does stress become distress?" *Lab Anim* 28(4): 422-426.
- Moody, C. M. and D. M. Weary (2014). "Mouse aversion to isoflurane versus carbon dioxide gas." *Appl Anim Behav Sci* 158: 95-101.
- Morton, D. and J. Hau (2011). Welfare assessment and humane end points. In: J. Hau and S. J. Schapiro: *Handbook of laboratory animal science. Volume I. Essential principles and practices*. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press/Taylor & Francis Group, LLC: 535-572.
- Morton, D. B. and P. H. Griffiths (1985). "Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment." *Vet Rec* 116(16): 431-436.
- National Animal Ethics Advisory Committee (2002). *A culture of care: a guide for people working with animals in research, testing and teaching*. [anzccart.org.nz/app/uploads/2017/03/culture-of-care.pdf](http://anzccart.org.nz/app/uploads/2017/03/culture-of-care.pdf) (abgerufen am 05.03.2018). Wellington, New Zealand.
- National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals (2008). *Recognition and alleviation of distress in laboratory animals*. [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4032/pdf/Bookshelf\\_NBK4032.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK4032/pdf/Bookshelf_NBK4032.pdf) (abgerufen am 05.03.2018). Washington (DC), National Academies Press (US).
- National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals (2009). *Recognition and alleviation of pain in laboratory animals*. [www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32658/pdf/Bookshelf\\_NBK32658.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32658/pdf/Bookshelf_NBK32658.pdf) (abgerufen am 05.03.2018). Washington (DC), National Academies Press (US).
- NCad (2016). *Rehoming of former laboratory animals. Opinion of the Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (NCad)*. Den Haag, Nederlanden, Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (NCad). [english.ncadierproevenbeleid.nl/documents/publications/16/7/19/adoption-of-former-laboratory-animals](http://english.ncadierproevenbeleid.nl/documents/publications/16/7/19/adoption-of-former-laboratory-animals) (abgerufen am 01.03.2018).
- Neumaier, J. F., T. J. Sexton, M. W. Hamblin and S. G. Beck (2000). "Corticosteroids regulate 5-HT(1A) but not 5-HT(1B) receptor mRNA in rat hippocampus." *Brain Res Mol Brain Res* 82(1-2): 65-73.
- Nohara, M., A. Tohei, T. Sato and H. Amao (2016). "Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mice." *J Vet Med Sci* 78(5): 775-780.
- Nosek, K., K. Dennis, B. M. Andrus, N. Ahmadiyah, A. E. Baum, L. C. S. Woods and E. E. Redei (2008). "Context and strain-dependent behavioral response to stress." *Behav Brain Funct* 4(1): 23.
- Oatley, K. and P. N. Johnson-laird (1987). "Towards a cognitive theory of emotions." *Cogn Emot.* 1(1): 29-50.
- Otovic, P. and E. Hutchinson (2015). "Limits to using HPA axis activity as an indication of animal welfare." *ALTEX* 32(1): 41-50.
- Paddleford, R. R. and R. C. Harvey (1999). "Alpha2 agonists and antagonists." *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29(3): 737-745.
- Palme, R., C. Touma, N. Arias, M. F. Dominchin and M. Lepschy (2013). "Steroid extraction: get the best out of faecal samples." *Wien Tierarz Monats* 100(9-10): 238-246.
- Park Choo, H.-Y. and S.-O. Choi (1991). "The metabolism of xylazine in rats." *Arch Pharm Res* 14(4): 346-351.
- Persson, J. (2013). "Ketamine in pain management." *CNS Neurosci Ther* 19(6): 396-402.
- Perusini, J. N. and M. S. Fanselow (2015). "Neurobehavioral perspectives on the distinction between fear and anxiety." *Learning & Memory* 22(9): 417-425.
- Pomplun, D., M. Mohlig, J. Spranger, A. F. Pfeiffer and M. Ristow (2004). "Elevation of blood glucose following anaesthetic treatment in C57BL/6 mice." *Horm Metab Res* 36(1): 67-69.
- Posner, L. P., R. D. Gleed, H. N. Erb and J. W. Ludders (2007). "Post-anesthetic hyperthermia in cats." *Vet Anaesth Analg* 34(1): 40-47.
- Prudian, F., M. Gantenbein, A. L. Pelissier, L. Attolini and B. Bruguerolle (1997). "Daily rhythms of heart rate, temperature and locomotor activity are modified by anaesthetics in rats: a telemetric study." *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355(6): 774-778.

- Raap, D. K., L. L. DonCarlos, F. Garcia, Y. Zhang, N. A. Muma, G. Battaglia and L. D. Van de Kar (2002). "Ovariectomy-induced increases in hypothalamic serotonin-1A receptor function in rats are prevented by estradiol." *Neuroendocrinology* 76(6): 348-356.
- Razoux, F., R. Garcia and I. Lena (2007). "Ketamine, at a dose that disrupts motor behavior and latent inhibition, enhances prefrontal cortex synaptic efficacy and glutamate release in the nucleus accumbens." *Neuropsychopharmacology* 32(3): 719-727.
- Reiss, S. (1997). "Trait anxiety: it's not what you think it is." *J Anxiety Disord* 11(2): 201-214.
- Rex, A., U. Sondern, J. P. Voigt, S. Franck and H. Fink (1996). "Strain differences in fear-motivated behavior of rats." *Pharmacol Biochem Behav* 54(1): 107-111.
- Richardson, C. A. and P. A. Flecknell (2005). "Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress?" *Altern Lab Anim* 33.
- RSPCA and LASA (2015). Guiding principles on good practice for animal welfare and ethical review bodies. A report by the RSPCA Research Animals Department and LASA Education, Training and Ethics Section. 3rd edition. M. Jennings (ed.). [www.lasa.co.uk/PDF/AWERB\\_Guiding\\_Principles\\_2015\\_final.pdf](http://www.lasa.co.uk/PDF/AWERB_Guiding_Principles_2015_final.pdf) (abgerufen am 05.03.2018).
- Russel, W. and R. Burch (eds.) (1959). *The principles of humane experimental technique*. London, Methuen.
- Ruxanda, F., A. F. Gal, C. Rațiu, V. Miclăuș, V. Rus and L. I. Oana (2016). "Comparative immunohistochemical assessment of the effect of repetitive anesthesia with isoflurane and sevoflurane on rat liver." *Braz J Anesthesiol* 66(5): 465-469.
- Ryabinin, A. E., Y.-M. Wang and D. A. Finn (1999). "Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice." *Pharmacol Biochem Behav* 63(1): 143-151.
- Saha, J. K., J. Xia, J. M. Grondin, S. K. Engle and J. A. Jakubowski (2005). "Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models." *Exp Biol Med (Maywood)* 230(10): 777-784.
- Saibaba, P., G. D. Sales, G. Stodulski and J. Hau (1996). "Behaviour of rats in their home cages: daytime variations and effects of routine husbandry procedures analysed by time sampling techniques." *Lab Anim* 30(1): 13-21.
- Samraus, H. H. (1997). *Grundbegriffe im Tierschutz*. In: H. H. Samraus and A. Steiger (eds.): *Das Buch vom Tierschutz*. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag: 30-39.
- Schönfelder, G. (2015). "Laboratory animals: German initiative opens up animal data." *Nature* 519(7541): 33.
- Schramm, N. L., M. P. McDonald and L. E. Limbird (2001). "The alpha(2a)-adrenergic receptor plays a protective role in mouse behavioral models of depression and anxiety." *J Neurosci* 21(13): 4875-4882.
- Schulte am Esch, J., E. Kochs and H. Bause (2000). *Allgemeinanästhesie: Inhalationsanästhesie*. In: J. Schulte am Esch, E. Kochs and H. Bause (eds.): *Anästhesie und Intensivmedizin*. Stuttgart, Thieme Verlag: 147-161.
- Schulte am Esch, J., E. Kochs and H. Bause (2000). *Allgemeinanästhesie: Intravenöse Anästhetika*. In: J. Schulte am Esch, E. Kochs and H. Bause (eds.): *Anästhesie und Intensivmedizin*. Stuttgart, Thieme Verlag: 130-145.
- Scorrano, F., J. Carrasco, J. Pastor-Ciurana, X. Belda, A. Rami-Bastante, M. L. Bacci and A. Armario (2015). "Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker." *FASEB J* 29(3): 859-867.
- Seamans, J. (2008). "Losing inhibition with ketamine." *Nat Chem Biol* 4(2): 91-93.
- Sheriff, M. J., B. Dantzer, B. Delehanty, R. Palme and R. Boonstra (2011). "Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids." *Oecologia* 166(4): 869-887.
- Sigtermans, M., A. Dahan, R. Mooren, M. Bauer, B. Kest, E. Sarton and E. Olofsen (2009). "S(+)-ketamine effect on experimental pain and cardiac output: a population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling study in healthy volunteers." *Anesthesiology* 111(4): 892-903.



- Siriarchavatana, P., J. D. Ayers and L. V. Kendall (2016). "Anesthetic activity of alfaxalone compared with ketamine in mice." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 55(4): 426-430.
- Smith, A. J., R. E. Clutton, E. Lilley, K. E. A. Hansen and T. Brattelid (2017). "PREPARE: guidelines for planning animal research and testing." *Lab Anim*: 23677217724823.
- Sonner, J. M., Y. Zhang, C. Stabernack, W. Abaigar, Y. Xing and M. J. Laster (2003). "GABA(A) receptor blockade antagonizes the immobilizing action of propofol but not ketamine or isoflurane in a dose-related manner." *Anesth Analg* 96(3): 706-712.
- 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.
- Spangenberg, E. M. and L. J. Keeling (2016). "Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures—a benchmarking tool." *Lab Anim* 50(1): 30-38.
- Spielberger, C. D. (1966). *Theory and research on anxiety*. In: C. D. Spielberger (ed.). *Anxiety and behavior*. New York, Academic Press.
- Starke, K. (2005). *Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems*. In: W. Forth, D. Henschler and W. Rummel (eds.). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München, Elsevier GmbH: 115-145.
- Statler, K. D., H. Alexander, V. Vagni, R. Holubkov, C. E. Dixon, R. S. Clark, L. Jenkins and P. M. Kochanek (2006). "Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury." *Brain Res* 1076(1): 216-224.
- Strekalova, T., R. Spanagel, D. Bartsch, F. A. Henn and P. Gass (2004). "Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration." *Neuropsychopharmacology* 29(11): 2007-2017.
- Strome, E. M. and D. J. Doudet (2007). "Animal models of neurodegenerative disease: insights from in vivo imaging studies." *Mol Imaging Biol* 9(4): 186-195.
- Szabo, S. (1998). "Hans Selye and the development of the stress concept. Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis." *Ann N Y Acad Sci* 851: 19-27.
- Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain (1994). *Classification of chronic pain. Descriptions of chronic syndromes and definition of pain terms*. 2nd ed. Seattle, USA, IASP Press.
- Thelen, C., J. Sens, J. Mauch, R. Pandit and P. M. Pitychoutis (2016). "Repeated ketamine treatment induces sex-specific behavioral and neurochemical effects in mice." *Behav Brain Res* 312: 305-312.
- Thomson, S., G. Koren, L. A. Fraser, M. Rieder, T. C. Friedman and S. H. Van Uum (2010). "Hair analysis provides a historical record of cortisol levels in Cushing's syndrome." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 118(2): 133-138.
- Toki, H., T. Ichikawa, A. Mizuno-Yasuhira and J.-I. Yamaguchi (2018). "A rapid and sensitive chiral LC-MS/MS method for the determination of ketamine and norketamine in mouse plasma, brain and cerebrospinal fluid applicable to the stereoselective pharmacokinetic study of ketamine." *J Pharm Biomed Anal* 148(Supplement C): 288-297.
- Touma, C., R. Palme and N. Sachser (2004). "Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones." *Horm Behav* 45(1): 10-22.
- Touma, C., N. Sachser, E. Mostl and R. Palme (2003). "Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice." *Gen Comp Endocrinol* 130(3): 267-278.
- Tremoleda, J. L., A. Kerton and W. Gsell (2012). "Anaesthesia and physiological monitoring during in vivo imaging of laboratory rodents: considerations on experimental outcomes and animal welfare." *EJNMMI Res* 2(1): 44.
- Tremoleda, J. L., M. Khalil, L. L. Gompels, M. Wylezinska-Arridge, T. Vincent and W. Gsell (2011). "Imaging technologies for preclinical models of bone and joint disorders." *EJNMMI Res* 1: 11-11.

- Tsuji, M., H. Takeda and T. Matsumiya (2000). "Different effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists and benzodiazepine anxiolytics on the emotional state of naive and stressed mice: a study using the hole-board test." *Psychopharmacology (Berl)* 152(2): 157-166.
- Tyler, M. W., H. B. Yourish, D. F. Ionescu and S. J. Haggarty (2017). "Classics in Chemical Neuroscience: Ketamine." *ACS Chem Neurosci* 8(6): 1122-1134.
- Ullman-Cullere, M. H. and C. J. Foltz (1999). "Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice." *Lab Anim Sci* 49(3): 319-323.
- Vachon, P. (1999). "Self-mutilation in rabbits following intramuscular ketamine-xylazine-acepromazine injections." *Can Vet J* 40(8): 581-582.
- Valentim, A. M., P. Di Giminiani, P. O. Ribeiro, P. Rodrigues, I. A. Olsson and L. M. Antunes (2010). "Lower isoflurane concentration affects spatial learning and neurodegeneration in adult mice compared with higher concentrations." *Anesthesiology* 113(5): 1099-1108.
- van der Harst, J. and B. Spruijt (2007). "Tools to measure and improve animal welfare: reward-related behaviour." *Anim Welf* 16(S): 67-73.
- Veilleux-Lemieux, D., A. Castel, D. Carrier, F. Beaudry and P. Vachon (2013). "Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52(5): 567-570.
- Virtanen, R., J. M. Savola, V. Saano and L. Nyman (1988). "Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist." *Eur J Pharmacol* 150(1-2): 9-14.
- Voigt, C. C., P. Klockner, C. Touma, C. Neuschl, G. Brockmann, F. Goritz, R. Palme and R. Thomsen (2013). "Hormonal stress response of laboratory mice to conventional and minimally invasive bleeding techniques." *Anim Welf* 22(4): 449-455.
- Walker, M. K., J. R. Boberg, M. T. Walsh, V. Wolf, A. Trujillo, M. S. Duke, R. Palme and L. A. Felton (2012). "A less stressful alternative to oral gavage for pharmacological and toxicological studies in mice." *Toxicol Appl Pharmacol* 260(1): 65-69.
- Wellington, D., I. Mikaelian and L. Singer (2013). "Comparison of ketamine-xylazine and ketamine-dexmedetomidine anesthesia and intraperitoneal tolerance in rats." *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52(4): 481-487.
- Wey, H.-Y., V. R. Desai and T. Q. Duong (2013). "A review of current imaging methods used in stroke research." *Neurol Res* 35(10): 1092-1102.
- White, P. F., W. L. Way and A. J. Trevor (1982). "Ketamine—its pharmacology and therapeutic uses." *Anesthesiology* 56(2): 119-136.
- Windeløv, J. A., J. Pedersen and J. J. Holst (2016). "Use of anesthesia dramatically alters the oral glucose tolerance and insulin secretion in C57Bl/6 mice." *Physiol Rep* 4(11): e12824.
- Wolfensohn, S. and M. Lloyd (2003). Pain, stress and humane endpoints. In: S. Wolfensohn and M. Lloyd (eds.). *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. 3rd ed. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd: 59-73.
- Wyrwicz, A. M., C. B. Conboy, K. R. Ryback, B. G. Nichols and P. Eisele (1987). "In vivo <sup>19</sup>F-NMR study of isoflurane elimination from brain." *Biochim Biophys Acta* 927(1): 86-91.
- Xu, Q., Z. Ming, A. M. Dart and X. J. Du (2007). "Optimizing dosage of ketamine and xylazine in murine echocardiography." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34(5-6): 499-507.
- Yamakura, T., E. Bertaccini, J. R. Trudell and R. A. Harris (2001). "Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 23-51.
- Yamakura, T. and R. A. Harris (2000). "Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. Comparison with isoflurane and ethanol." *Anesthesiology* 93(4): 1095-1101.
- Yeates, J. W. and D. C. J. Main (2008). "Assessment of positive welfare: a review." *Vet J* 175(3): 293-300.
- Yokoyama, C., A. Mawatari, A. Kawasaki, C. Takeda, K. Onoe, H. Doi, A. Newman-Tancredi, L. Zimmer and H. Onoe (2016). "Marmoset serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mapping with a

## Literaturverzeichnis

- biased agonist PET probe 18F-F13714: comparison with an antagonist tracer 18F-MPPF in awake and anesthetized states." *Int J Neuropsychopharmacol* 19(12).
- Yu, T., H. Xu, W. Wang, S. Li, Z. Chen and H. Deng (2015). "Determination of endogenous corticosterone in rodent's blood, brain and hair with LC-APCI-MS/MS." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1002: 267-276.
- Zoetis Deutschland GmbH (2013). Fachinformation zu Ketavet 100mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen. Berlin, Germany.

## 9.2. Verordnungen, Gesetze und Rechtsurteile

**BGH** Urteil vom 18.2.1987, 2StR, 159/86, NJW 1987, 1833, 1834.

**BVerwG** Urteil vom 18.1.2000, 3 C 12/99, NuR 2001, 454, 455, BVerwG.

**BVerwG** Urteil vom 18.06.1997, Az.: BVerwG 6 C 5/96.

**Deklaration von Basel. Ein Aufruf für mehr Vertrauen, Transparenz und Kommunikation in der Tierforschung.** Angenommen am 29. November 2010 im Rahmen der ersten Basler Konferenz "Research at a crossroads". [de.basel-declaration.org](http://de.basel-declaration.org) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland (GG)** in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 13. Juli 2017 (BGBl. I S.2347) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/gg/GG.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/gg/GG.pdf) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Richtlinie 86/609/EWG des Rates** vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. ABl. Nr. L 358 vom 18.12.1986, 0001-0028. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0609&from=DE](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0609&from=DE) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV)** vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 394 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/TierSchVersV.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/TierSchVersV.pdf) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Tierschutzgesetz (TierSchG)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 141 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/tierschg/TierSchG.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/TierSchG.pdf) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Vertrag über die Arbeitsweise der Europäischen Union (AEUV)**, Fassung aufgrund des am 1.12.2009 in Kraft getretenen Vertrages von Lissabon (Konsolidierte Fassung bekanntgemacht im ABl. EG Nr. C 115 vom 9.5.2008, S. 47), zuletzt geändert durch die Akte über die Bedingungen des Beitritts der Republik Kroatien und die Anpassungen des Vertrags über die Europäische Union, des Vertrags über die Arbeitsweise der Europäischen Union und des Vertrags zur Gründung der Europäischen Atomgemeinschaft (ABl. EU L 112/21 vom 24.4.2012) m.W.v. 1.7.2013. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:12012E/TXT&from=DE](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:12012E/TXT&from=DE) (aufgerufen am 26.02.2018).

**1999/575/EG:** Beschluß des Rates vom 23. März 1998 über den Abschluß des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere durch die Gemeinschaft. Amtsblatt Nr. L 222 vom 24.08.1999 S. 0029 – 0030. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:31999D0575&from=EN](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:31999D0575&from=EN) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (Sammlung Europäischer Verträge Nr. 123)** vom 18. März 1986 (BGBl. 1990 II S. 1486), zuletzt geändert durch ÄndVO vom 15. 6. 2006 (BGBl. 2007 II S. 1714). [rm.coe.int/168007a697](http://rm.coe.int/168007a697) (abgerufen am 26.02.2018).

**Bürgerliches Gesetzbuch** in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Januar 2002 (BGBl. I S. 42, 2909; 2003 I S. 738), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 20. Juli 2017 (BGBl. I S. 2787) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/bgb/BGB.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/bgb/BGB.pdf) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Protokoll über den Tierschutz und das Wohlergehen der Tiere zum Vertrag von Amsterdam** zur Änderung des Vertrages über die Europäische Union, der Verträge zur Gründung der Europäischen Gemeinschaften sowie einiger damit zusammenhängender Rechtsakte, ABl. Nr. C 340 vom 10.11.1997. S. 0001 – 0144. [www.europarl.europa.eu/topics/treaty/pdf/amst-de.pdf](http://www.europarl.europa.eu/topics/treaty/pdf/amst-de.pdf) (aufgerufen am 26.02.2018).

**Richtlinie 2003/65/EG des Europäischen Parlaments und des Rates** vom 22. Juli 2003 zur Änderung der Richtlinie 86/609/EWG des Rates zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt Nr. L 230 vom 16/09/2003 S. 0032 – 0033. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0065&from=en](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0065&from=en) (abgerufen am 26.02.2018).

**Vertrag von Lissabon** zur Änderung des Vertrages über die Europäische Union und des Vertrages zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft (EUVtr Liss), Amtsblatt Nr. C 306, vom 17. Dezember 2007. Teil B Abschnitt II, Art. 5 b Anm. 21. 2007/C 306/01. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2007:306:FULL&from=DE](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2007:306:FULL&from=DE) (abgerufen am 26.02.2018).

**Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates** vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, ABl. Nr. L276/33-L276/79. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=DE](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&from=DE) (aufgerufen am 26.02.2018).

## 10. Publikationen

---

### 10.1. Originalartikel

Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C (2018). Systematic assessment of well-being in mice for procedures using general anesthesia. *J Vis Exp* (133), e57046, doi: 10.3791/57046.

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

Hohlbaum K, Bert B, Dietze S, Palme R, Fink H, Thöne-Reineke C (2018). Impact of repeated anesthesia with ketamine and xylazine on the well-being of C57BL/6JRj mice. *PLoS ONE* 13(9): e0203559.

#### 10.1.1. Beteiligung der Autoren an den Originalartikeln

**Katharina Hohlbaum:** Entwicklung des Studiendesigns, Studienplanung, Erstellen des Tierversuchsantrags, Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Experimente, Versorgung der Tiere, Schreiben der Ursprungsentwürfe der Manuskripte und Durchführen der Änderungen entsprechend der anderen Koautoren oder Gutachter.

**Koautoren:** Bereitstellen der Ressourcen, Beteiligung an der Entwicklung des Studiendesigns, am Tierversuchsantrag und an der Interpretation der Ergebnisse, Supervision, Unterstützung bei der Konzeptplanung der Manuskripte, Review der Ursprungsentwürfe der Manuskripte.

### 10.2. Kongressbeiträge

#### 10.2.1. Vorträge

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2018). Severity classification of repeated anaesthesia. *RSPCA/UFAW 25<sup>th</sup> Rodent and Rabbit Welfare Meeting*. London, UK – 30.10.2018.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2018): Systematic Assessment of Well-Being in Mice for Procedures Using General Anesthesia. *18th Annual Congress of EUSAAT*. Linz, Austria – 23.09.-26.09.2018.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2018): Belastung durch wiederholte Inhalations- und Injektionsnarkosen bei C57BL/7JRj Mäusen. *56. Jahrestagung der GV-SOLAS und 18. IGTP Fortbildung 2018*. München, Germany – 12.09.-14.09.2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2018): Belastungsbeurteilung von wiederholten Narkosen bei Mäusen. *47. Seminar über Versuchstiere und Tierversuche*. Berlin, Germany – 29.05.-30.05.2018.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2018). Severity classification of repeated isoflurane anaesthesia in mice. *Scand-LAS 2018 Symposium “Beyond legislation – Best practice in animal research”*. Kristiansand, Norwegen – 26.04.-28.04.2018.

Hohlbaum, K.: Wie fühlt sich die Maus? Eine systematische Beurteilung des Wohlbefindens von Mäusen. BB3R Doktorandensymposium. Berlin, Germany – 09.04.2018 (ausgezeichnet mit dem 3. Preis für den besten Vortrag).

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2017): Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in C57BL/6JRj mice: Assessing well-being and distress. 10<sup>th</sup> Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences. Seattle, Washington, USA – 20.08.-24.08.2017. In: *Altex Proceedings*; 6(1), S. 217.

Hohlbaum, K.: Was sagen uns Gesichter? Lange Nacht der Wissenschaft. Berlin, Germany – 24.6.2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2016): Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in female mice – assessing well-being and distress. 9<sup>th</sup> BB3R PhD Seminar. Berlin, Germany – 15.03.2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2016): Repeated isoflurane anesthesia in female mice – assessing the severity of stress. 17<sup>th</sup> Annual Congress of EUSAAT. Linz, Austria – 24.08.-27.08.2016. In: *Altex Proceedings*; 5(1), S. 89.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2016): Repeated anaesthesia in rodents – assessing severity levels. 3<sup>rd</sup> BB3R PhD Seminar. Berlin, Germany – 07.07.2015.

#### **10.2.2. Poster**

Hohlbaum, K. & Leidinger, C.; Baumgart, N.; Thöne-Reineke, C.; Baumgart, J. (2017): Resocialization of single-housed male C57BL/6JRj mice after castration. RSPCA/UFAW 24<sup>th</sup> Rodent and Rabbit Welfare Meeting. Animal and Plant Health Agency, Weybridge, UK – 14.11.2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2017): Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in female C57BL/6JRj mice: A systematic assessment of animal based well-being. 10. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences". Berlin, Germany – 22.09.2017. In: 10. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar "Biomedical Sciences". ISBN: 978-3-86387-839-9.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2017): Auswirkungen von wiederholten Injektionsnarkosen mit der Kombination von Ketamin und Xylazin auf das Wohlbefinden von weiblichen C57BL/6JRj. 55. Jahrestagung der GV-SOLAS und 17. IGTP Fortbildung 2017. Köln, Germany – 11.09.-13.09.2017.

Hohlbaum, K. and Leidinger, C.; Baumgart, N.; Thöne-Reineke and C.; Baumgart, J. (2017): Belastungsbeurteilung einer Kastration und anschließende Resozialisierung von einzeln gehaltenen männlichen Mäusen. 55. Jahrestagung der GV-SOLAS und 17. IGTP Fortbildung 2017. Köln, Germany – 11.09.-13.09.2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2017): Beurteilung des Schweregrades von Mehrfachnarkosen mit Isofluran bei C57BL/6J Mäusen. 16. internationale DVG -Fachtagung zu Fragen von Verhaltenskunde und Tierhaltung 22. internationale DVG-Fachtagung zum Thema Tierschutz. München, Germany – 30.03.-01.04.2017. In: *Tierschutz am Ende? - Zum Töten von Tieren (1 Aufl.)* Gießen: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH, S. 216–21. ISBN: 978-3-86345-363-3.

## Publikationen

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2017): Severity classification of repeated isoflurane anesthesia in female C57BL/6JRj mice. JRC Summer School on Alternative Approaches for Risk Assessment. Ispra, Italy – 16.-19.05. 2017.

Hohlbaum, K.; Bert, B.; Dietze, S.; Fink, H.; Thöne-Reineke, C. (2016): Repeated anesthesia in rodents – Assessing severity levels. German Pharm-Tox Summit 2016. Berlin, Germany – 29.02.-03.03.2016. In: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology; 389(Suppl. 1), S. 24.



## 11. Danksagung

---

Ich möchte mich bei allen, die mich während der letzten Jahre begleiteten und unterstützten, bedanken. Ich danke vor allem für die Gespräche zur Tierethik sowie der ethischen Abwägung im tierexperimentellen Bereich, für den regen Austausch über Alternativen zu Tierversuchen und für die gegenseitige Unterstützung, potenzielle Refinement-Strategien zu implementieren. Besonderer Dank gilt...

... meinen PhD-Mentorinnen Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke, PD Dr. Bettina Bert und Prof. Dr. Heidrun Fink, die mir den Eintritt in die Refinement-Forschung ermöglichten und mich im Bereich der 3R förderten. Ich danke meinen Mentorinnen dafür, dass sie ihre jahrelange Expertise mit mir teilten, für ihre motivierenden Worte und für ihre Energie.

... Dr. Silke Dietze, Du standst mir immer mit Rat und Tat beiseite, vor allem in der Endphase.

... PD Dr. Roswitha Merle für die Einführung in die Biometrie. Ich habe viel von Dir gelernt.

... Dr. Mechthild Ladwig-Wiegard, ich danke Dir herzlichst dafür, dass Du mir jederzeit mit tierärztlichem Rat beiseite standst.

... den Tierpflegern und Tierpflegerinnen, vor allem Sindy Schulz, für die sorgfältige und liebevolle Betreuung meiner Tiere.

... meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen sowie Kolleginnen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die unterstützende und angenehme Atmosphäre. Ganz besonders danke ich Sabine Jacobs für Deinen Einsatz im Labor und auch für das stundenlange Betrachten der Mäusebilder. Carmen Bohnwagner und Alexandra Wistel, vielen Dank, dass ich Euch jederzeit um Rat fragen konnte.

... Gundula Jäger, Doris Ciuraj und Maria Rost, dass ihr mir den Weg durch den Verwaltungsdschungel der Universität gezeigt habt.

... meinen „Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen“, vor allem meiner Büromitbewohnerin Eva-Maria Löken. Es war schön, diese Zeit – mit all ihren Höhen und Tiefen – gemeinsam mit Euch zu erleben und sich gegenseitig zu unterstützen.

... meinen Freunden und Freundinnen sowie meiner Familie, die mich immer wieder daran erinnerten, dass es auch außerhalb der Uni ein Leben gibt. Dr. Gernot Hohlbaum und Mechthild Peters-Hohlbaum, ich bin froh, dass es Euch gibt.

... meinem Partner für sein offenes Ohr. Er durfte sich jeden Tag Geschichten über meine Mäuse anhören. Ich bin dankbar, dass sich unsere Wege gekreuzt haben.

## 12. Selbstständigkeitserklärung

---

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

Berlin, den 28.11.2018

Katharina Hohlbaum

Die Studie ist Teil der Berlin-Brandenburger Forschungsplattform BB3R ([www.bb3r.de](http://www.bb3r.de)) und wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (Förderkennzeichen: 031A262A) ([www.bmbf.de/en/index.html](http://www.bmbf.de/en/index.html)). Der Förderer hatte keinen Einfluss auf das Studiendesign, die Datenerhebung oder -analyse oder die die Publikationen.









