

**Evidenz-basierte Belastungseinschätzung
bei Labornagern in der post-operativen Phase
und bei kabel-gebundener Ableitung**

von

Katharina Maria Aulehner

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

**Evidenz-basierte Belastungseinschätzung
bei Labornagern in der post-operativen Phase
und bei kabel-gebundener Ableitung**

von

Katharina Maria Aulehner

aus Starnberg

München 2022

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

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Michael H. Erhard

Tag der Promotion: 30. Juli. 2022

*Meinen Eltern, meiner Schwester
und meiner Oma Martha*

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Wohlbefinden und Belastungseinschätzung in Tierversuchen	3
1.1.	Relevanz von Tierversuchen	3
1.2.	Ethik von Tierversuchen	4
1.3.	<i>Refinement</i> von Tierversuchen	6
1.4.	Einschätzung des Wohlbefindens und affektiver Status.....	7
1.5.	Schmerz	10
1.6.	Übersicht Parameter der Belastungseinschätzung	11
2.	Review.....	13
2.1.	Arten von Reviews.....	13
2.2.	Bedeutung und Durchführung eines systematischen <i>Reviews</i>	14
3.	Aufzeichnungen und Schlaf	17
3.1.	Elektrophysiologische Aufzeichnungen.....	17
3.2.	Schlafmuster und -regulation	18
3.3.	Aufzeichnungsgestützte Schlafmustersauswertung.....	20
4.	Ausgewählte Parameter der Belastungseinschätzung.....	22
4.1.	Saccharin-Präferenz.....	22
4.2.	Wühlverhalten.....	23
4.3.	Nestbauverhalten	24
4.4.	Grimace-Scale.....	26
4.5.	Irwin-Score	28
4.6.	Corticosteron und dessen Metaboliten.....	28
III.	ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG	31
IV.	MATERIAL UND METHODEN.....	33
1.	Systematisches Review	33
1.1.	Suchfaden und Studienauswahl.....	33
1.2.	Datenextraktion	37
1.3.	Bewertung des Verzerrungspotentials	37
1.4.	Auswertung der Daten	39
2.	Schlafmusterstudie	40
2.1.	Versuchstiere.....	40
2.2.	Studiendesign.....	40

2.3.	Elektroden- und Transmitterimplantation	42
2.4.	Telemetrische Aufzeichnungen.....	44
2.5.	Klinischer Score, Irwin-Score, Grimace-Scale, Körpergewicht	44
2.6.	Auswertung der Schlaf- und Aktivitätsmuster	45
2.7.	Auswertung der Schlafarchitektur	46
2.8.	Quantitative EEG Analyse der <i>slow wave activity power</i>	46
2.9.	Analyse des Verhaltens im Heimkäfig und der Saccharin-Präferenz.....	47
2.10.	Analyse von Corticosteron und dessen Metaboliten.....	47
2.11.	Auswertung der Aktivitätszählung	48
2.12.	Statistische Auswertung	48
V.	ERGEBNISSE	51
1.	Systematisches Review	51
1.1.	Identifizierte Publikationen	51
1.2.	Postoperative Anwendung des <i>Grimace-Scales</i>	54
1.3.	Postoperative Auswertung der Nestbauaktivität.....	69
1.4.	Postoperative Auswertung des Wühlverhaltens	78
1.5.	Anästhesie und Analgesie	86
1.6.	Verzerrungspotential.....	87
2.	Schlafmusterstudie	90
2.1.	Einfluss des chirurgischen Eingriffes auf das Tier-Wohlbefinden	90
2.2.	Einfluss des Kabels auf die Schlafmikroarchitektur und auf den Anteil der Vigilanzstadien.....	91
2.3.	Auswirkung des Kabels auf die Bout-Längen und auf die Übergänge zwischen den Vigilanzstadien.....	98
2.4.	Quantitative EEG Auswertung <i>slow wave activity power</i>	107
2.5.	Einfluss des Kabels auf Nestbauverhalten und Saccharin-Präferenz.....	109
2.6.	Auswirkungen des Kabels auf Corticosteron und seine Metaboliten	110
2.7.	Einfluss des Kabels auf das Aktivitätslevel	114
2.8.	Berechnung der <i>Area under the receiver operating characteristic</i>	117
VI.	DISKUSSION	120
1.	Systematisches Review	120
2.	Schlafmusterstudie	129
3.	Schlussfolgerung	135
4.	Ausblick und Limitation	136
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	139

VIII.	SUMMARY	142
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	144
X.	ANHANG	162
1.	Geräte	162
2.	Software	163
3.	Lösungen und Substanzen	163
4.	Modifizierter Irwin-Score	166
5.	Systematic Review Protocol	171
XI.	PUBLIKATIONSLISTE	179
XII.	DANKSAGUNG	180

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3R	<i>Replace, Reduce, Refine</i>	lat	lateral
Abb.	Abbildung	MeSH-Terms	<i>Medical Subject Headings</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	MGS	<i>Mouse-Grimace-Scale</i>
ANOVA	Varianzanalyse	n	Stichprobenumfang
ap	anterio-posterior	NA	nicht anwendbar
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i> , (Richtlinien zur Berichterstattung von In-vivo-Experimenten)	NREM Schlaf	<i>non rapid eye movement sleep</i>
AUC	<i>area under the receiver operating characteristic</i>	p	Signifikanzniveau
AWAKE	<i>Active Wake</i> , aktiver Wachzustand	QWAKE	<i>Quiet Wake</i> , ruhiger Wachzustand
COVID-19	Coronavirus-Erkrankung 2019 (Coronavirus Disease 2019)	REM Schlaf	<i>rapid eye movements sleep</i>
cpm	<i>counts per minute</i>	RGS	<i>Rat-Grimace-Scale</i>
CRP	<i>Corticotropin-releasing-Factor</i>	RoB Tool	<i>Risk of Bias tool</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	s.c.	Subkutan
dtsch.	Deutsch	SEM	Standardfehler
dv	dorso-ventral	SWA	<i>slow wave activity</i>
EEG	Elektroenzephalogramm	SWS	<i>slow wave sleep, langsam-welliger Schlaf</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	SYRCLE	<i>Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation</i>
EMG	Elektromyogramm	SyRF	<i>Systematic Review Facility</i>
engl.	Englisch	TierSchG	Tierschutzgesetz
FCM	fäkale Corticosteron-Metaboliten	VersTierMeldV	Versuchstiermeldeverordnung
HPA	<i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse</i>	ZNS	Zentrales Nervensystem
i.p.	Intraperitoneal	ZT	<i>Zeitgeber time</i>
KI	Konfidenzintervall		

I. EINLEITUNG

Die aktuelle weltweite pandemische Situation im Rahmen von COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) hat die Relevanz von Tierversuchen verdeutlicht. Besonders in der präklinischen Forschung sind Tierversuche wichtig, um geeignete Therapeutika zu testen und zu entwickeln (LUNDT et al., 2016). Nichtsdestotrotz wird tiergestützte Forschung von Teilen der Bevölkerung und der Politik kritisch hinterfragt und diskutiert.

Auf europäischer Ebene wird von der *Richtlinie 2010/63/EU* die Einstufung des Schweregrads von Tierversuchen vorgeschrieben (EUROPEAN COMMISSION, 2012). In diesem Zusammenhang ist die gezielte Erkennung von (postoperativen) Schmerzen eine Voraussetzung für eine evidenzbasierte Bewertung des Schweregrads sowie für die Anwendung wirksamer perioperativer Analgetika. Die Beurteilung des Wohlbefindens, einschließlich der Bewertung von Schmerzen, ist bei Labornagern herausfordernd. Dies liegt zum einen daran, dass Nagetiere nonverbal kommunizieren und zum anderen daran, dass sie als Beutetiere dazu neigen Schmerzen nicht zu zeigen (STASIAK et al., 2003; JIRKOF et al., 2010; TURNER et al., 2019). Daher sind sensitive Parameter zur Messung von Schmerzen und anderen Aspekten, die das Wohlbefinden beeinträchtigen können, notwendig, um eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung und damit eine Einstufung des Schweregrads zu ermöglichen. Im Rahmen unserer Forschungsgruppe *severity assessment in animal based research* (FOR 2591, www.severity-assessment.de) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurden in der ersten Förderphase verschiedene Parameter in Hinblick auf die Einschätzung des Schweregrads (= der Belastung) in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht. Es wurden sensitive Parameter für eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung auf der Basis der erhobenen Daten ausgewählt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein systematisches *Review* durchgeführt. Zu den Parametern, die als Folge von Schmerzen verändert oder reduziert sein können, gehören *Grimace-Scale*, *Nest-building* (Nestbauaktivität) und *Burrowing* (Wühlverhalten). In der Vergangenheit wurden bereits *Reviews* veröffentlicht, in denen die verfügbaren Informationen zu diesen Parametern als Schmerzparameter informativ zusammengefasst wurden (JIRKOF, 2014; MOTA-ROJAS et al., 2020). Allerdings besteht nach wie vor eine Wissenslücke in Bezug auf das Ausmaß der Anwendung dieser Parameter für die Beurteilung postoperativer Schmerzen. Daher zielte das systematische *Review* darauf ab die verfügbaren Literaturinformationen (Evidenzbasis) über die Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* in der postoperativen Phase bei Mäusen und Ratten zu untersuchen. In einem vorab veröffentlichten Protokoll (<https://syrf.org.uk/protocols>, 26. März 2020) wurde die Methodik festgelegt. Informationen zu den Studiendesign-

Charakteristika, Tiermodell-Charakteristika, Interventions-Charakteristika und Zielparametern wurden extrahiert. Darüber hinaus wurde das Risiko einer Verzerrung mithilfe des *Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation Risk of Bias tools* (SYRCLE's RoB tool) bewertet.

Sensitive Parameter zur Belastungseinschätzung erlauben eine evidenzbasierte Beurteilung von *Refinement*-Maßnahmen. Dies ist von enormer Bedeutung für eine konsequente Umsetzung des *Refinements* im Rahmen des rechtlich verankerten 3R-Prinzips (RUSSELL & BURCH, 1959). Angesichts der gegenwärtigen Reproduzierbarkeitskrise in der biomedizinischen Forschung ist es außerdem wichtig, den potenziellen Einfluss der verwendeten experimentellen Techniken auf die Tiere zu untersuchen. Elektrophysiologische Aufzeichnungen werden häufig als experimentelle Technik in der tiergestützten neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Die Übertragung der elektrographischen Daten kann entweder über ein Kabel oder über Radiotelemetrie erfolgen (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; LIDSTER et al., 2016). Verschiedene Autoren haben einen negativen Einfluss der kabelgebundenen Aufzeichnung auf das Tierwohlbefinden beschrieben (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; ZAYACHKIVSKY et al., 2015; LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016). Daher wurde die telemetrische Aufzeichnung als potentielle *Refinement*-Maßnahme für chronische Aufzeichnungen gegenüber der kabelgebundenen Aufzeichnung vorgeschlagen.

Um zu untersuchen, ob eine telemetrische Aufzeichnung eine *Refinement*-Maßnahme gegenüber einer kabelgebundenen Aufzeichnung darstellt, haben wir im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit eine telemetrische Auswertung der Schlaf- und Aktivitätsmuster durchgeführt, wobei eine nicht-kabelgebundene Gruppe mit einer kabelgebundenen Gruppe verglichen wurde. Außerdem wurden ausgewählte sensitive verhaltensbezogene und biochemische Parameter erhoben, um die Auswirkung der experimentellen Techniken auf den affektiven Zustand der Tiere zu untersuchen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Wohlbefinden und Belastungseinschätzung in Tierversuchen

1.1. Relevanz von Tierversuchen

Das Bewusstsein für das Wohlergehen von Labortieren ist in der Vergangenheit stetig gewachsen. Sofern möglich müssen von Versuchsdurchführenden Alternativmethoden eingesetzt werden, um das Forschungsziel zu erreichen. Zu diesem Zweck wurden Organisationen wie die ZEBET (**Z**entralstelle zur **E**rfassung und **B**ewertung von **E**rsatz- und **E**rgänzungsmethoden zum Tierversuch) gegründet.

Allerdings gibt es zum jetzigen Zeitpunkt einige Tiermodelle für Krankheiten in der Human- und Veterinärmedizin, für welche noch keine Alternativmethode gefunden wurde. Daher ist der Einsatz von geeigneten Tiermodellen notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen und die Pathophysiologie von Erkrankungen zu verstehen und um geeignete Therapeutika zu entwickeln (LUNDT et al., 2016). Vor allem in präklinischen Studien im Rahmen der Arzneimittelentwicklung spielen Tierversuche eine entscheidende Rolle (LUNDT et al., 2016).

Die aktuelle weltweite pandemische Situation im Rahmen von COVID-19 hat die Relevanz von Tierversuchen verdeutlicht. Im Rahmen der Erforschung von SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) wurden verschiedene Tierarten eingesetzt (CLEARY et al., 2020; MUÑOZ-FONTELA et al., 2020). Auch inzwischen zugelassene Impfstoffe wurden zuerst in Tiermodellen auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen untersucht. Für den Impfstoff mRNA-1273 von dem US-Unternehmen Moderna wurden Tierversuche an Mäusen (CORBETT et al., 2020b) und an nichtmenschlichen Primaten (CORBETT et al., 2020a) durchgeführt.

Im Rahmen der Epilepsieforschung werden Tiermodelle eingesetzt, um die Pathophysiologie der verschiedenen Epilepsieformen zu verstehen und um neue Antiepileptika zu erforschen (LIDSTER et al., 2016). Dies stellt eine wichtige Grundlage für die Entwicklung von Medikamenten dar. Epilepsie, als eine der häufigsten schweren neurologischen Erkrankung, geht mit unvorhersehbaren Anfällen aufgrund von gesteigerter und/oder synchroner elektrischer Gehirn-Aktivität einher (LIDSTER et al., 2016). Komorbiditäten wie kognitive Beeinträchtigungen und Depressionen können im Zusammenhang mit Epilepsien auftreten (KANNER, 2003; INOSTROZA et al., 2011; KLEIN et al., 2015). Die Anfälle sowie Komorbiditäten beeinträchtigen das Leben der Patienten

oftmals sehr.

Verglichen mit der Zahl der für die Fleischproduktion verwendeten Tiere ist die Anzahl der Tiere die für Versuchszwecke verwendet werden gering (JIRKOF et al., 2019). Nichtsdestotrotz werden Tierversuche von Teilen der Bevölkerung kritisch betrachtet. Zusammen mit dem wachsenden Bewusstsein für das Wohlergehen der Tiere in der Forschung wächst auch das Bewusstsein der Relevanz der Verringerung der Belastung der Tiere für die Datenqualität (LIDSTER et al., 2016).

Bei der Planung und Durchführung von experimentellen Studien sollten wichtige Prinzipien, wie beispielsweise die Durchführung einer Randomisierung und einer Verblindung, berücksichtigt werden. Dies ist insofern von großer Bedeutung, da robuste Daten in der präklinischen Forschung zu reproduzierbaren Ergebnissen mit weniger Ausfällen und Nebenwirkungen in der klinischen Phase führen, was im Umkehrschluss eine Reduktion der Tierzahl bewirken kann. In diesem Zusammenhang sollten auch die ARRIVE-Richtlinien (von engl. *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) berücksichtigt werden, welche als Grundlage für eine umfassende und transparente Berichterstattung dienen (PERCIE DU SERT et al., 2020).

1.2. Ethik von Tierversuchen

Im §1 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) steht geschrieben „Zweck dieses Gesetzes ist es, aus der Verantwortung des Menschen für das Tier als Mitgeschöpf dessen Leben und Wohlbefinden zu schützen. Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schäden zufügen“. Damit tragen Menschen die ethische Mitverantwortung zu entscheiden, ob ein „vernünftiger Grund“ vorliegt und ob es ethisch vertretbar ist, einem Tier „Schmerzen, Leiden oder Schäden“ zuzufügen. Dies wird auch im Rahmen von Tierversuchsanträgen deutlich. In diesen muss nach § 7a Abs. 2 Nr. 3 TierSchG die ethische Vertretbarkeit der „zu erwartenden Schmerzen, Leiden oder Schäden“ berücksichtigt werden.

In 2010 trat die EU-Richtlinie *des europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere* (2010/63/EU) in Kraft, welche in allen europäischen Mitgliedstaaten ratifiziert werden musste. Dies wurde in Deutschland durch die Änderung des Tierschutzgesetzes umgesetzt und führte am 13.07.2013 zum aktuellen Tierschutzgesetz. Das Tierschutzgesetz gibt die Verordnungs-Ermächtigung gewisse Bereiche durch Verordnungen genauer zu regeln. Daraufhin hat das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) die Tierschutzversuchstierverordnung erlassen, welche ebenfalls zur Umsetzung der Richtlinie 2010/63/EU dient.

Die Versuchstiermeldeverordnung (VersTierMeldV), resultiert aus dem Anhang B des sogenannten *Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere*

wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. Die VersTierMeldV legt unter anderem fest, dass eine retrospektive Einschätzung des tatsächlichen Schweregrads für jedes im Versuch verwendete Tier angegeben werden muss. Des Weiteren muss angegeben werden, ob die Tiere im Versuch verwendet wurden oder ob eine Tötung der Tiere zu wissenschaftlichen Zwecken erfolgte. Informationen unter anderem zur Art, zur Anzahl, zum Geburtsort und zum genetischen Status der verwendeten Tiere müssen gemeldet werden. In Artikel 15 Absatz 1 der Richtlinie 2010/63/EU wird die Einstufung des Schweregrads von Tierversuchen wie folgt vorgeschrieben: „Die Mitgliedstaaten stellen sicher, dass alle Verfahren im Einzelfall unter Verwendung der in Anhang VIII aufgeführten Zuordnungskriterien als „keine Wiederherstellung der Lebensfunktion“, „gering“, „mittel“ oder „schwer“ eingestuft werden.“

Im Anhang VIII der Richtlinie 2010/63/EU wird die Einteilung des Schweregrads wie folgt kategorisiert: i. „Verfahren, die gänzlich unter Vollnarkose durchgeführt werden, aus der das Tier nicht mehr erwacht, werden als ‚keine Wiederherstellung der Lebensfunktion‘ eingestuft“, ii. „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“, iii. „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“, iv. „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“.

Die Bewertung des Schweregrads muss sowohl prospektiv als auch retrospektiv erfolgen. Des Weiteren muss auch während des Versuches ein intensives Monitoring der Belastung der Versuchstiere stattfinden (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

Die prospektive Belastungseinschätzung muss während der Projektplanung erfolgen. Vor dem Beginn des Projektes müssen zur Überwachung der Tiere geeignete Score-Sheets erstellt werden, welche auf das Projekt abgestimmt sind. Die Belastungseinschätzung während des Versuchs muss anhand einer intensiven Überwachung von fachkundigen Mitarbeitern erfolgen. Bei der retrospektive Belastungseinschätzung soll der tatsächliche Schweregrad nach Abschluss des Projektes eingeschätzt werden (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

1.3. *Refinement* von Tierversuchen

Im Jahr 1959 führten Russel und Burch das 3R-Prinzip ein (RUSSELL & BURCH, 1959). Dieses zielte darauf ab, Tierversuche zu ersetzen (**R**eplacement), zu verbessern (**R**efinement), sowie die Anzahl der verwendeten Tiere zu reduzieren (**R**eduction).

Das *Refinement* basiert beispielsweise auf der Anwendung von experimentellen Messungen und Techniken, die das Ziel haben Schmerzen, Distress, Leiden und dauerhafte Schäden der Tiere zu verringern (BLAKEMORE et al., 2012). Die Umsetzung von *Refinement*-Maßnahmen wird auch in Artikel 4 Absatz 3 der Richtlinie 2010/63/EU gefordert: „Die Mitgliedstaaten gewährleisten, dass die Zucht, Unterbringung und Pflege sowie die Methoden, die in Verfahren angewandt werden, verbessert werden, damit mögliche Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden ausgeschaltet oder auf ein Minimum reduziert werden“. Des Weiteren soll die (in Richtlinie 2010/63/EU geforderte) pro- und retrospektive Bewertung des Schweregrads und das Monitoring der Tiere während des Versuches, der Umsetzung des 3R Prinzips dienen und insbesondere das Wohlbefinden der Tiere während des Versuches durch das Erkennen von Schmerzen, Leiden und Schäden erhöhen (EUROPEAN COMMISSION, 2012).

In der Vergangenheit ist das Bewusstsein für das Wohlergehen von Labortieren gewachsen. Das Reduzieren von Leiden im Kontext von Tierversuchen ist eines der Hauptziele der *Refinement*-Forschung (JIRKOF et al., 2019). Die Verringerung von negativen affektiven Zuständen, und damit das *Refinement* eines Tiermodells, kann beispielsweise durch den Einsatz von geeigneten Analgetika und Anästhetika und durch die Anwendung von weniger invasiven oder stressvollen Methoden erreicht werden (JIRKOF et al., 2019).

Langzeitstudien, wie sie beispielsweise im Rahmen der Epilepsieforschung erforderlich sind, erfordern eine regelmäßige Applikation von Substanzen, um die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Therapeutika zu untersuchen (LIDSTER et al., 2016). In diesem Kontext kann eine *Refinement*-Maßnahme die Auswahl des weniger stressvollen Applikationsweges sein. Die Verabreichung der Substanz auf oralem Weg führt zu weniger Stress bei den Tieren, im Vergleich zur invasiven intraperitonealen Applikation (MORTON et al., 2001; LIDSTER et al., 2016).

Mäuse sind soziale Tiere und werden ihren natürlichen Bedürfnissen entsprechend in Gruppen gehalten. Das ist allerdings in der Forschung beispielsweise nach einem operativen Eingriff oftmals nicht mit dem Studienziel vereinbar. So zum Beispiel aufgrund von experimentellen Aufzeichnungen, welche eine Einzelhaltung erforderlich machen. Daher haben VAN LOO et al. (2007) ein *Refinement* der postoperativen Haltung basierend auf einem Gitter, das zwei Mäuse voneinander trennt, im Vergleich zur Gruppen- und Einzelhaltung untersucht. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass diese Form der Haltung wahrscheinlich belastender als eine Einzelhaltung ist.

Ein Kernelement des perioperativen *Refinements* stellt die Anwendung von wirksamen Analgetika zur Linderung von akuten Schmerzen dar. Im Jahr 2015 untersuchten FALLER et al. (2015) eine zweite Dosis Buprenorphin als *Refinement*-Maßnahme bei C57BL/6J Mäusen, die einer Thorakotomie unterzogen wurden. Sie ermittelten eine Verbesserung des *Mouse-Grimace-Scale* (MGS) in den Tieren, die eine zweite Dosis Buprenorphin erhalten hatten (FALLER et al., 2015).

Im gleichen Jahr haben PRÉFONTAINE et al. (2015) beschrieben, dass eine Leberbiopsie durch *Laparoskopie* weniger postoperative Schmerzen in Ratten auslöst als eine Leberbiopsie durch *Laparotomie* und damit sowohl das Wohlbefinden der Tiere als auch die Datenqualität im Vergleich zur *Laparotomie* erhöht.

PFEIFFENBERGER et al. (2015) untersuchte ein *Refinement* der experimentellen Technik bei der Knochenmarktransplantation bezüglich der Zielregion. Dabei stellte die Transplantation in den *Femur* ein *Refinement* gegenüber der Transplantation in die *Tibia* dar.

REDAELLI et al. (2019) untersuchten eine auf einem analgetischen Ansatz basierende *Refinement-Maßnahme* nach einer *Laminektomie* bei Mäusen, in Kombination mit Infrarot-Thermographie als nicht-invasive Methode der Temperaturkontrolle. Dabei fanden sie heraus, dass eine multimodale Analgesie, bestehend aus Buprenorphin und Carprofen, akute Schmerzzeichen bei einer Laminektomie unterzogenen Mäusen signifikant reduzierte, während die alleinige Applikation von Buprenorphin nicht ausreichend war akute Schmerzen zu reduzieren. Zusätzlich schlugen die Autoren Infrarot-Thermographie als *Refinement*-Maßnahme vor, da es, im Gegensatz zur rektalen Messung mit einem Temperatursensor, ein nicht-invasives Tool zur Messung der Körpertemperatur ist und daher mit weniger Stress für die Tiere verbunden ist (REDAELLI et al., 2019).

Bei den *Refinement*-Maßnahmen durch den Einsatz von Analgetika muss allerdings auch berücksichtigt werden, dass eine wiederholte Gabe von Analgetika wiederum eine Belastung und kein *Refinement* für das Tier sein kann. Zum einen durch die wiederholte invasive Applikation und zum anderen durch die Nebenwirkungen, die von den Analgetika hervorgerufen werden können wie zum Beispiel Übelkeit oder Erbrechen.

1.4. Einschätzung des Wohlbefindens und affektiver Status

Für die Einschätzung einer möglichen Belastung ist es wichtig zu verstehen, was für das Wohlbefinden eines Labortieres relevant ist und welche Faktoren das Wohlbefinden der Labortiere beeinflussen und damit eine Belastung für das Tier darstellen können. MELLOR (2016) hat in einem Modell fünf Freiheiten und fünf Bestimmungen tabellarisch zusammengefasst, die für das Tierwohlbefinden relevant sind: Unter Punkt 1 wird die Freiheit von Hunger, Durst und Unterernährung und die damit verbundene Forderung nach

ad libitum Zugang zu Wasser und einer adäquaten Ernährung beschrieben. Unter Punkt 2 wird die Freiheit von Unbehagen und dem Gefühl ausgesetzt zu sein beschrieben und die damit verbundenen Forderung eine angemessene Umgebung mit einem Ruhebereich und Versteckmöglichkeiten, beispielsweise durch den Einsatz von Häuschen, zu schaffen. Unter Punkt 3 wird die Freiheit von Verletzungen, Schmerzen und Krankheit beschrieben und der damit verbundenen Forderung den genannten Beeinträchtigungen vorzubeugen, diese schnell zu erkennen und zu behandeln. Punkt 4 beschreibt die Freiheit von Ängsten und Distress und der damit verbundenen Forderung Verfahren anzuwenden, die mentales Leiden vermeiden. In Punkt 5 wird die Freiheit zum Ausleben von normalen Verhaltensweisen beschrieben und die damit verbundene Forderung nach einer Haltung mit Artgenossen, ausreichend Platz und geeigneten Haltungseinrichtungen (MELLOR, 2016).

Die *Fünf-Freiheiten* erlangten internationale Bekanntheit, da sie bei der Veröffentlichung von WEBSTER (1994) die ersten waren, welche das Tierwohlbefinden breiter beschrieben, indem sie beispielsweise subjektive Erfahrungen wie Angst, Distress und Unbehagen einbezogen (MELLOR, 2016).

Zwei Haupttypen von Sinneseindrücken, die zu negativen subjektiven Gefühlen führen können, bezeichnet als Affekte oder affektiver Status, wurden beschrieben (DENTON et al., 2009; MELLOR, 2016). Zum einen gibt es negative Affekte, die durch den physischen/funktionellen Zustand des Tieres, wie zum Beispiel Hunger, Durst, Schmerzen und Krankheit, erzeugt werden und zum anderen negative Affekte, die durch sensorische Eindrücke des Tieres erzeugt werden. Diese umfassen zum Beispiel Furcht, Langeweile, Panik und Depression. Die *Fünf-Freiheiten* enthalten nur einen Teil der negativen Affekte. Die Liste der negativen Affekte, die das Wohlbefinden von Säugetieren und Vögel beeinflussen können, umfasst weitere Affekte. Die meisten davon werden durch das Wort „Distress“ erfasst (MELLOR, 2016).

Ein Nachteil des Fünf-Freiheiten-Konzepts ist, dass nicht zwischen den physischen/funktionalen (wie zum Beispiel Verletzung, Krankheit, Unterernährung) und affektiven (wie zum Beispiel Furcht, Unbehagen, Distress) Typen von Sinneseindrücken differenziert wird (MELLOR, 2016).

MELLOR & REID (1994) haben daraufhin das Fünf-Domänen-Modell für eine umfassende Bewertung des Tierwohlbefindens entwickelt. Folgend wurde das Modell regelmäßig aktualisiert. Beispielsweise wurde der Begriff „Distress“ durch die Aufnahme zusätzlicher negativer Affekte genauer definiert und eine Bandbreite an positiven Affekten wurde aufgenommen (MELLOR & BEAUSOLEIL, 2015; MELLOR, 2016).

Die ersten vier Domänen, die physischen/funktionalen-Domänen (*engl. „physical/functional domain“*), beurteilen körperliche und funktionelle Faktoren. Sie umfassen zum einen die zum Überleben notwendige Faktoren „Ernährung“ (1. Domäne), „Umwelt“ (2. Domäne),

„Gesundheit“ (3. Domäne) und zum anderen den situationsbedingten Faktor „Verhalten“ (4. Domäne). Die fünfte Domäne, die „Domäne der affektiven Erfahrungen“ (*engl. „affective experience domain“*), bezieht sich auf den mentalen (psychischen) Zustand (5. Domäne) der Tiere (MELLOR, 2016).

Der mentale (psychische) Zustand wird zum einen durch die vier „physischen und funktionellen“ *Domänen* beeinflusst, zum anderen von dem affektiven Status, das heißt durch Erfahrungen wie Angst, Einsamkeit, Ärger oder Depression. Dieser fünfte Bereich soll somit alle negativen Affekte ermitteln und das gesamtheitliche Wohlbefinden des Tieres aufzeigen. Alle fünf Domänen fließen in das gesamtheitliche Tierwohlbedingen ein (MELLOR, 2016).

Der affektive Zustand kann sowohl eine negative Valenz (negativer affektiver Zustand), als auch positive Valenz (positiver affektiver Zustand) haben (RUSSELL, 1980; DÉSIRÉ et al., 2002; MENDEL et al., 2010; ŠPINKA, 2012). Im Rahmen der *Refinement*-Forschung ist der affektive Zustand ein wichtiges Konzept, da er eine beeinträchtigte oder verbesserte Lebensqualität aufzeigen kann. Die Erhöhung des Tierwohlbedingens sollte über die Reduzierung und Vermeidung von negativen Bedingungen und Einflüssen hinausgehen und sollte auch positive affektive Zustände in den Tieren auslösen, um ein lebenswertes Leben von Versuchstieren zu fördern (JIRKOF et al., 2019).

Das mentale (psychische) Leiden von Tieren, sprich der affektive Zustand, ist schwer zu erfassen und zu messen (JIRKOF et al., 2019). Hinzu kommt, dass Nagetiere als Beutetiere dazu neigen Schmerzen, Leiden und Distress in der Umgebung von Versuchstierhaltungen zu verstecken (STASIAK et al., 2003; JIRKOF et al., 2010; TURNER et al., 2019), sodass subtile Veränderungen im Wohlergehen nicht auffallen, so zum Beispiel depressionsartige Verhaltensweisen. Daher sind sensitive Parameter (das heißt zuverlässige Methoden zur Messung des Wohlbefindens), die sowohl einen negativen affektiven Zustand, als auch einen positiven affektiven Zustand erkennen, notwendig, um eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung zu ermöglichen.

Entscheidungen über potenzielle *Refinement*-Maßnahmen werden häufig aus einer anthropozentrischen Sichtweise heraus getroffen, ohne die Wirksamkeit der jeweiligen Maßnahme wissenschaftlich zu prüfen. Sensitive Parameter zur Belastungseinschätzung erlauben eine evidenzbasierte Beurteilung von *Refinement*-Maßnahmen. Auf dieser Basis kann es gelingen unser Wissen über die Auswirkungen von Verfahren und Techniken auf das Wohlergehen von Versuchstieren anhand wissenschaftlich geprüfter sensitiver Parameter zu verbessern.

1.5. Schmerz

Schmerz ist ein negativer Affekt, welcher in einigen Tiermodellen hervorgerufen wird. Die gezielte Erkennung und Bewertung von (postoperativen) Schmerzen ist aus verschiedenen Gründen von großer Bedeutung.

Das Erkennen von Schmerzen ist eine Voraussetzung für die Bewertung des Schweregrads in Studien mit chirurgischen Eingriffen. Dies bildet die Grundlage für eine ethische Rechtfertigung und Abwägung vor der Durchführung der Studie sowie für eine evidenzbasierte retrospektive Bewertung des Schweregrads (EUROPEAN COMMISSION, 2012; SMITH et al., 2018). Außerdem stellt die zuverlässige Beurteilung von Schmerzen die Basis für die Entscheidung dar, wann ein humaner Endpunkt bei einzelnen Tieren erreicht ist.

Eine zuverlässige Bewertung von Schmerzen ist für die Entscheidung der Notwendigkeit einer Analgesie, für die Auswahl eines geeigneten Analgetikums und für die Auswahl eines geeigneten Analgetika-Regimes nötig. Während des Versuchs ermöglicht die Schmerzbeurteilung bei Tieren, die ein Analgetikum erhalten haben, die Kontrolle der therapeutischen Wirksamkeit und die Anpassung des Schmerzmanagements als *Refinement*-Maßnahme. Die Erkennung von Schmerzen ist auch für die Verabreichung eines geeigneten Analgetikums bei akut auftretenden Schmerzen während des Versuches, die nicht mehr mit dem Versuchsziel vereinbar sind, notwendig.

Unterschiedliche Grade unkontrollierter Schmerzen können zu einer Varianz der erhobenen Daten beitragen und somit die Qualität der Studie einschränken (POOLE, 1997; LIDSTER et al., 2016; JIRKOF & POTSCHKA, 2021), wodurch sich die Zahl der benötigten Tiere erhöht. Durch eine schlechte Qualität der Studien in der präklinischen Phase kann es passieren, dass die Translation von Medikamenten in der klinischen Phase, aufgrund der Entdeckung von unerwünschten Nebenwirkungen oder schlechter Wirksamkeit, nicht gelingt. Das hat zur Folge, dass wiederum mehr Tiere in der präklinischen Phase eingesetzt werden, um in dem Bereich weiter zu forschen.

Die Beurteilung von Schmerzen bei Nagetieren ist herausfordernd. Diese Herausforderungen beginnen mit der Unterscheidung zwischen Nozizeption und Schmerz. Die Nozizeption beschreibt die Signalübertragung von den spezialisierten zellulären Nozizeptoren an das zentrale Nervensystem.

Dahingegen gilt Schmerz bei Tieren als *“aversive, sensory experience representing awareness by the animal of damage or threat to the integrity of its tissues; (note that there might not be any damage). It changes the animal’s physiology and behavior to reduce or avoid the damage, to reduce the likelihood of its recurrence and to promote recovery“* (MOLONY & KENT, 1997).

Eine weitere große Herausforderung ist, dass Nagetiere als Beutetiere dazu neigen Schmerzen nicht zu zeigen (STASIAK et al., 2003; JIRKOF et al., 2010; TURNER et al.,

2019). Insbesondere in der Anwesenheit eines Wissenschaftlers oder Tierpflegers muss dieser Aspekt berücksichtigt werden, welches eine optimale Bewertung von Schmerzen erschwert. Daher sollten die Vertrautheit mit den Personen oder indirekte Methoden, wie beispielsweise eine Videoaufzeichnung, berücksichtigt werden.

Für eine möglichst zuverlässige Bewertung von Schmerzen bei Labornagern sollten Verfahren angewandt werden, die verschiedene Parameter kombinieren (TURNER et al., 2019).

Zu den Verhaltensmustern, die als Folge von Schmerzen verändert sein können oder reduziert sein können, gehören auch der MGS (von engl. *Mouse-Grimace-Scale*), der RGS (von engl. *Rat-Grimace-Scale*) und die Interaktion mit Nest- oder Wühlmaterial. Mehrere Übersichtsarbeiten haben verschiedene Schmerzbewertungsmethoden, einschließlich *Grimace-Scale*, *Nest-building* (Nestbauaktivität) und *Burrowing* (Wühlverhalten), informativ zusammengefasst und diskutiert (JIRKOF, 2014; TAPPE-THEODOR & KUNER, 2014; WHITTAKER & HOWARTH, 2014; DEUIS et al., 2017; FLECKNELL, 2018; LARSON et al., 2019; TAPPE-THEODOR et al., 2019; TURNER et al., 2019; MOTA-ROJAS et al., 2020).

1.6. Übersicht Parameter der Belastungseinschätzung

Im Rahmen der ersten Förderphase unserer Forschungsgruppe *severity assessment in animal based research* (FOR 2591, www.severity-assessment.de) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) wurden verschiedene Parameter in Hinblick auf die Einschätzung des Schweregrads in unterschiedlichen Tiermodellen untersucht. Es wurden sensitive Parameter für eine evidenzbasierte Belastungseinschätzung auf der Basis der erhobenen Daten ausgewählt.

Die gemessenen Parameter, welche sich als Kandidaten für sensitive Parameter erwiesen haben, können wie folgt unterteilt werden:

- i. **Verhaltensparameter:** Hierzu zählen der Saccharin-Präferenz-Test, das Wühlverhalten, die Nestbauaktivität, die Laufradnutzung, die lokomotorische Aktivität und die soziale Interaktion.

Da sich der **Saccharin-Präferenz Test** als sensitiv erwiesen hat und im Heimkäfig durchgeführt werden kann, wurde er in der vorliegenden *in vivo* Studie erhoben. Eine genaue Erläuterung des Tests findet sich in der Literaturübersicht unter Punkt vier.

Das **Wühlverhalten** hat sich als sehr sensitiv erwiesen und wurde deshalb zur Untersuchung von vorhandenen Wissenslücken in Bezug auf die Beurteilung von postoperativen Schmerzen in das vorliegende systematische *Review* inkludiert. Eine genaue Beschreibung findet sich in der Literaturübersicht unter Punkt vier.

Da sich **Nestbauaktivität** als sensitiv erwiesen hat und im Heimkäfig durchgeführt

werden kann, wurde diese in der *in vivo* Studie analysiert. Des Weiteren sollte die aktuelle Evidenzbasis der Nestbauaktivität zur Erkennung von postoperativen Schmerzen im vorliegenden systematischen *Review* untersucht werden. Eine genaue Beschreibung findet sich in der Literaturübersicht unter Punkt vier.

- ii. **Biochemischen Parameter:** Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten haben sich in früheren Studien als sensitiv erwiesen (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019). Daher wurden sie in der vorliegenden *in vivo* Studie zu mehreren Zeitpunkten analysiert. Eine genaue Beschreibung zu diesem Parameter findet sich in der Literaturübersicht unter Punkt 4.
- iii. Zu den **physiologischen Parametern** gehören die Herzfrequenz und deren Variabilität.

Für die vorliegende *in vivo* Studie wurden sensitive Parameter ausgewählt, die im Heimkäfig durchgeführt werden können, da wir eine Unterbrechung der telemetrischen Aufnahmen vermeiden wollten. Des Weiteren muss bei Untersuchungen, die nicht im Heimkäfig durchgeführt werden, berücksichtigt werden, dass das Einsetzen der Tiere in eine neue Umgebung und das *Handling* der Tiere einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben kann (JIRKOF et al., 2019).

2. Review

2.1. Arten von Reviews

Vor der Durchführung einer experimentellen Studie sollte die für das Thema bereits vorhandene Literatur aus wissenschaftlichen und ethischen Gründen gesichtet werden. Dafür eignen sich sogenannte *Reviews* gut. *Reviews* bieten gute Informationsquellen für die Versuchsplanung von experimentellen Studien, um relevante Parameter, Methoden und Techniken zu vergleichen. Damit tragen sie dazu bei systematische Fehler zu begrenzen. Außerdem kann mithilfe von *Reviews* überprüft werden, ob die Forschungsfrage der Studie bereits bekannt ist (LEENAARS et al., 2021).

Es existieren verschiedene Arten von *Reviews*, die sich in der Methodik der Durchführung unterscheiden. Diese Arten von *Reviews* wurden nach LEENAARS et al. (2021) wie folgt voneinander abgegrenzt und beschrieben:

- i. Der traditionelle **Narrative-Review**, ist eine nicht-systematische Übersichtsarbeit. *Narrative Reviews* werden idealerweise von Experten in Bezug auf das Thema geschrieben und können so einen wichtigen Beitrag für die Wissenschaft liefern.
- ii. **Mapping-Reviews** verwenden teilweise eine systematische Methodik und bieten einen Überblick über die gesamte Literatur. Sie basieren auf einer breiten Forschungsfrage, die sich auf ein Thema konzentriert, so zum Beispiel eine bestimmte Intervention. Sie zielen darauf ab, mithilfe einer umfassenden systematischen Suche alle relevanten Studien zu finden, die zum Beispiel diese Intervention beinhalten, um eine klare Evidenzlücke eindeutig zu beantworten. Nach guter Praxis wird die Suche nach relevanten Publikationen am besten systematisch von zwei unabhängigen Personen durchgeführt, um das Risiko für Verzerrungen zu minimieren. Da die Anzahl der Publikationen für ein *Mapping-Review* jedoch sehr hoch ist, ist die Bewertung des Verzerrungspotentials zu umfangreich. Außerdem werden nur ausgewählte Charakteristika extrahiert, um die Forschungsfrage zu beantworten.
- iii. **Scoping-Reviews** verwenden eine teilweise systematische Methodik und liefern eine explorative Bewertung eines Themas. Dabei wird eine definierte Teilmenge der relevanten Literatur zu einem Thema einbezogen und eine relativ vollständige Beschreibung dieser Literatur geliefert. Sie unterscheiden sich von *Mapping-Reviews*, da sie im Umfang der Publikationen kleiner sind und da die Analyse der inkludierten Publikationen breiter und explorativer ist. Im Unterschied zu systematischen Übersichten können *Scoping-Reviews* Vereinfachungen enthalten, wie zum Beispiel die Verwendung einer einfachen Suchstrategie, die Suche nach relevanten Publikationen in nur einer Datenbank und/oder nur eine Person überprüft

die Publikationen nach Relevanz. Eine weitere Möglichkeit der Verkürzung ist ein zufällig ausgewähltes Teil-Set der Publikationen zu verwenden, die in der Datenbank/den Datenbanken gefunden wurden. Hier kann beispielsweise so vorgegangen werden, dass zwei relevante Jahre (zum Beispiel am Anfang des letzten Jahrzehnts und am Ende des letzten Jahrzehnts) ausgewählt werden. Von jedem Jahr können zum Beispiel randomisiert 100 Publikationen ausgewählt, die anschließend analysiert und verglichen werden. Eine Bewertung des Verzerrungspotentials wird meist nicht durchgeführt.

- iv. Eine weitere Art von *Reviews* sind **Systematische *Reviews***. Im nächsten Abschnitt wird auf deren Bedeutung und Durchführung genauer eingegangen.

2.2. Bedeutung und Durchführung eines systematischen *Reviews*

Bei traditionellen narrativen Übersichtsarbeiten besteht das Risiko, dass sie nur einen Teil der für das Thema relevanten Literatur enthalten, die dem durchführenden Autor bekannt ist. Somit kann das *Narrative-Review* eine auf der Meinung und dem Netzwerk des Autors beruhende Verzerrung enthalten (LEENAARS et al., 2021; RIX et al., 2021)

Im Gegensatz dazu haben systematische *Reviews* das Ziel die gesamte relevante Literatur zu einer vordefinierten Forschungsfrage zu analysieren, neue Daten (zum Beispiel bestehende Wissenslücken) zu generieren und idealerweise die Ergebnisse mit einer Meta-Analyse zusammenzufassen (RIX et al., 2021). Systematische *Reviews* beantworten eine definierte Forschungsfrage unter den verschiedenen Arten von *Reviews* am zuverlässigsten, da sie am wenigsten anfällig für Verzerrungen sind (LEENAARS et al., 2021). Damit eignen sich systematische *Reviews* am besten, um vor dem Start einer experimentellen Studie, die bereits verfügbare Literatur sorgfältig zu überprüfen (LEENAARS et al., 2012).

Im ersten Schritt eines systematischen *Reviews* wird die Grundlage geschaffen, um alle potenziell relevanten Publikationen für das Thema zu finden (COOK et al., 1997). Eine Voraussetzung dafür ist die sorgfältige Formulierung einer spezifischen Forschungsfrage, welche die folgenden Elemente enthalten sollte: Die interessierenden Zielparameter sollten genannt werden. Die interessierende Intervention, die interessierende Beeinträchtigung oder Erkrankung und die verwendete Tierart/Population sollten aufgeführt werden (LEENAARS et al., 2012; RIX et al., 2021). In humanmedizinischen, klinischen Studien wird das PICO-Format (*population, intervention, comparison, outcome*) zur Definition einer Forschungsfrage verwendet, welches Parallelen zu den genannten Elementen für tierexperimentelle Studien hat (LEENAARS et al., 2012). Die Suche nach potenziell relevanten Publikationen sollte in mehr als einer Datenbank erfolgen. Häufig verwendete Datenbanken, die ein Index-System nutzen, sind EMBASE und MEDLINE (LEENAARS et

al., 2012).

Im nächsten Schritt wird eine umfassende Suchstrategie für die Suche in den Datenbanken entwickelt. Die Suchkomponenten können festgelegt werden, indem die Elemente der Forschungsfrage als übergreifende Suchkomponenten übertragen werden. Allerdings muss bedacht werden, dass nicht alle Studien ihre Zielparameter im Titel und Abstract beschreiben, weswegen dieses Element in manchen Fällen nicht als Komponente für den Suchfaden berücksichtigt werden sollte. Für jede definierte Suchkomponente sollte ein separater umfassender Suchfaden entwickelt werden (LEENAARS et al., 2012).

Für die Suchstrategie sollten passende Suchbegriffe, bestehend aus standardisierten Fachbegriffen (engl. *standardized subject terms*) und Frei-Text Begriffen (engl. *free-text terms*), verwendet werden. Ein Beispiel für standardisierte Begriffe sind die *Medical Subject Headings* (MeSH-Terms). MeSH-Terms bilden einen Teil des Indexierungssystems in MEDLINE. Experten weisen jedem Paper eine Anzahl an MeSH-Terms zu, welche das Hauptthema des Papers beschreiben sollen. Dies macht es möglich alle indizierten Paper zu finden, auch wenn sie in ihrem Title und Abstract das Thema unterschiedlich beschreiben (LEENAARS et al., 2012).

Da kürzlich veröffentlichte Paper möglicherweise noch nicht von Experten indiziert wurden oder die Indizierung nicht immer korrekt ist, sollte man im Rahmen der Suchfadenentwicklung für Pubmed MeSH-Terms mit Frei-Text-Begriffen kombinieren, mit welchen beispielsweise Titel/Abstract und Schlüsselwörter der Publikationen durchsucht werden können. Die Frei-Text-Begriffe des Suchfadens sollten alle relevanten Synonyme und alternative Schreibweisen umfassen. Entry Terms, welche mit dem entsprechenden MeSH-Term verknüpft sind und bei der Suche nach dem MeSH-Terms vorgeschlagen werden sind zur Identifizierung relevanter Synonyme hilfreich (LEENAARS et al., 2012).

Relevante Publikationen, die nicht gefunden werden, können zu falschen Ergebnissen und Schlussfolgerungen führen. Daher ist ein umfassender Suchfaden für die Qualität des Systematischen *Reviews* wichtig (HIGGINS, 2011; LEENAARS et al., 2012).

Ein bekanntes Problem ist, dass negative Ergebnisse oftmals nicht oder nur in unbekanntem Journals publiziert werden. Wenn diese Studien mit negativen Ergebnissen in systematischen *Reviews* nicht gefunden werden, führt dies zu einem *reporting bias*, da dessen Schlussfolgerung positiv verzerrt ist (LEENAARS et al., 2012). Dies kann zu Problemen in der Translation von Versuchsergebnissen in die Klinik führen. SENA et al. (2010) beschrieb beispielsweise, dass nur 2% der veröffentlichten tierexperimentellen Studien, zur Untersuchung eines akuten ischämischen Schlaganfalls, keinen signifikanten Effekt in Bezug auf das Infarktvolumen berichteten.

Die vorherige Registrierung des systematischen *Review*-Protokolls spezifiziert die Methoden, einschließlich der prädefinierten Einschluss- und Ausschlusskriterien, im Voraus. Somit wird das Risiko einer methodischen Verzerrung verringert, da jede

Abweichung von dem Protokoll in der Studie erklärt werden sollte und eine nachträgliche Anpassung an die Präferenzen der Autoren nicht ohne weiteres möglich ist (LEENAARS et al., 2020; RIX et al., 2021). Darüber hinaus wird das sogenannte HARKing „*hypothesising after results are known*“ durch eine vorherige Registrierung des Protokolls verhindert (LEENAARS et al., 2021).

Im nächsten Schritt wird ein geeignetes Software-Tool für den *Review* Prozess ausgewählt. Hierfür existiert Literatur, welche die Vor- und Nachteile der verfügbaren Tools aufzeigt (KOHL et al., 2018; VAN DER MIERDEN et al., 2019).

Die Überprüfung der Studien auf Relevanz wird idealerweise von zwei unabhängigen Wissenschaftlern systematisch in zwei Screening-Phasen durchgeführt. In der ersten Phase werden die Titel und Abstracts nach prädefinierten Ein- und Ausschlusskriterien in Hinblick auf die Forschungsfrage überprüft. In dieser Screening-Phase ist es besser, zu viel zu berücksichtigen und so vorzugehen, eher Arbeiten einzuschließen, als sie fälschlicherweise auszuschließen (LEENAARS et al., 2012; LEENAARS et al., 2021). Die verbleibenden, potenziell relevanten Publikationen werden anschließend im Voll-Text-Screening nach prädefinierten Einschluss- und Ausschlusskriterien überprüft.

Inwieweit aus einem systematischen Review zuverlässige Schlussfolgerungen gezogen werden können, hängt von der Zuverlässigkeit der aus den eingeschlossenen Studien gewonnenen Daten ab (MOHER et al., 1999; MACLEOD et al., 2009; HOOIJMANS et al., 2014; LEENAARS et al., 2021). Idealerweise wird daher eine Bewertung des Verzerrungspotentials und der Qualität der Berichterstattung aller eingeschlossenen Studien durchgeführt, was eine Schlüsselfunktion einer systematischen Übersichtsarbeit ist (HOOIJMANS et al., 2014; LEENAARS et al., 2021). Das Verzerrungspotential der relevanten Studien kann zum Beispiel unter Verwendung des *Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation Risk of Bias tools* (SYRCLE's RoB tool) überprüft werden (HOOIJMANS et al., 2014). Das *SYRCLE's RoB tool* basiert auf dem *Cochrane RoB tool*, das zur Bewertung des Verzerrungspotentials in randomisierten klinischen Studien entwickelt wurde (HIGGINS, 2011; HOOIJMANS et al., 2014).

3. Aufzeichnungen und Schlaf

3.1. Elektrophysiologische Aufzeichnungen

Elektrophysiologische Aufzeichnungen werden häufig als Technik in der tiergestützten neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt, da sie funktionelle Analysen der Signalübertragung im Gehirn ermöglichen. Die Übertragung der elektrographischen Daten kann entweder über ein Kabel oder über Radiotelemetrie erfolgen (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; LIDSTER et al., 2016). Die kabelbasierte Verbindung einer Kopfmontage mit einem technischen System wird in verschiedenen Tiermodellen der neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Ein kabelgebundenes Setup wurde beispielsweise in einem Tiermodell zur Alzheimer-Krankheit eingesetzt, wobei das Schlafverhalten bei Ratten untersucht wurde (KREUZER et al., 2020a). Die Verbindung einer Kopfmontage mit einem technischen System ist für elektrische oder optische Stimulationsverfahren erforderlich. In der Epilepsieforschung können epileptische Anfälle, durch elektrische Stimulation über eine Kabelverbindung, induziert werden (SEIFFERT et al., 2019). Im Rahmen von optischen Stimulationsverfahren werden über ein Kabel-Setup neuronale Schaltkreise stimuliert, indem bei den Tieren eine optische Faser implantiert wird (UNG & ARENKIEL, 2012; COIMBRA et al., 2021). Die Verbindung einer Kopfmontage mit einem technischen System wird außerdem für längere Medikamentenverabreichungen in Kombination mit elektroenzephalographischen Aufnahmen eingesetzt (WATANABE et al., 2017). Auch bei der hochfrequenten Stimulation von synaptischen Schaltkreisen im Rahmen der Langzeitpotenzierung, welche zur Erforschung der Erinnerung und des Lernens eingesetzt wird, werden kabelbasierte Setups verwendet (RIEDEL et al., 1995). Es existieren Studien zu Platzzellen („place-cells“) und Rasterzellen („grid-cells“), bei welchen die neuronale Aktivität von kabelgebundenen Ratten von vielen Elektroden aufgenommen wird, während sie sich in einer Arena aufhalten (O'KEEFE, 1976; CRESSANT et al., 1997; HAFTING et al., 2005; WHITLOCK et al., 2012).

Auch wenn die kabelgebundene Aufzeichnung, in Verbindung mit sogenannten *Swivel*-Systemen, eine relativ freie Bewegung des Tieres im Käfig ermöglicht (LUNDT et al., 2016), haben verschiedene Autoren die kabelgebundene Aufzeichnung als Methode, welche die Tiere partiell in ihrer Bewegung eingeschränkt, beschrieben, die das Tierwohlfinden negativ beeinflussen könnte (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; ZAYACHKIVSKY et al., 2015; LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016). Bei der kabelgebundenen Aufzeichnung müssen das auf die Kopfhaltung wirkende Drehmoment und die damit verbundene Bewegungseinschränkung aus Tierschutzgründen und aufgrund der Datenqualität berücksichtigt werden. Die technische Optimierung des Setups durch die Anbringung eines *Swivel*-Systems kann das Drehmoment auf die Kopfhaltung

minimieren. Die Anpassung der Länge des Kabels und die Anbringung eines Gegengewichts oder einer Feder, welche den Bewegungen des Kopfes folgen, können das Gewicht und den Zug auf den Kopf minimieren und damit die Bewegungseinschränkung reduzieren (LIDSTER et al., 2016).

Für die telemetrische Aufzeichnung wird dem Tier ein Transponder, entweder subkutan oder intraperitoneal, implantiert. Der Transponder sendet Radiofrequenzwellen an eine Empfängerplatte, die sich unterhalb des Käfigs befindet. Die Empfängerplatte leitet die aufgezeichnete Information an eine sogenannte *Data Exchange Matrix* weiter. Die Daten werden auf einem Computer zur Erfassung, Verarbeitung und Analyse gespeichert (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; LUNDT et al., 2016).

Telemetrische Aufzeichnungen haben sich zur Untersuchung von Tiermodellen für menschliche Beeinträchtigungen und Krankheiten wie Schlafstörungen, Epilepsie und neurodegenerative Erkrankungen als wertvoll erwiesen (LUNDT et al., 2016). Über telemetrische Aufzeichnungen können neben dem Elektroenzephalogramm (EEG) weitere Biopotentiale, wie das Elektromyogramm (EMG) und das Elektrokardiogramm, sowie Parameter wie der Blutdruck, die Körpertemperatur und die Aktivität erhoben werden (KRAMER & KINTER, 2003; LUNDT et al., 2016). Aufgrund der Vielzahl an Parametern, die erfasst werden können, kann Radiotelemetrie einen Beitrag zur Reduktion der Tierzahl im Rahmen des 3R-Konzepts leisten, da weniger Studien erforderlich sind oder ein geblocktes Studiendesign möglich ist, um die erforderlichen Parameter zu erheben (KRAMER & KINTER, 2003). Allerdings muss die zusätzliche Implantation eines Transponders berücksichtigt werden, welche eine Eintrittspforte für Erreger bietet und postoperative Schmerzen verursachen kann. Davon abgesehen muss die Größe und das Gewicht des Transponders auf das Tier abgestimmt sein. Transponder können kleine Versuchstiere in ihrer Aktivität, in ihrem Schlaf und ihrem Verhalten beeinflussen, daher sollte die Implantation des Transponders so erfolgen, dass die Tiere nicht in ihrer Bewegung eingeschränkt werden (LUNDT et al., 2016). Bei der telemetrischen Aufzeichnung können sich die Tiere frei im Käfig bewegen, da keine Verbindung durch ein Kabel nötig ist, was den physiologischen Zustand repräsentiert. Daher wurde im Zusammenhang mit chronischen Aufzeichnungen vorgeschlagen, dass die Radiotelemetrie, trotz der Notwendigkeit der Transponderimplantation, Vorteile für das Wohlergehen der Tiere haben könnte (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016)

3.2. Schlafmuster und -regulation

In RASCH and BORN (2013) wird Schlaf als *„a natural and reversible state of reduced responsiveness to external stimuli and relative inactivity, accompanied by a loss of*

consciousness“ definiert. Der jederzeit reversible Zustand unterscheidet Schlaf von Koma. Die reduzierte Reaktionsfähigkeit auf externe Reize unterscheidet Schlaf vom ruhigen Wachzustand (CIRELLI & TONONI, 2008). Verschiedene Wirbeltierspezies wurden beim Schlafen beobachtet und die Verhaltensweisen analysiert. Schlafähnliche Zustände wurden auch bei Insekten beobachtet (CIRELLI & TONONI, 2008).

Schlaf wird zirkadian reguliert (FRANK et al., 2017; DEBOER, 2018). Die zeitlichen Schlafmuster variieren allerdings zwischen den Spezies. Menschen zeigen ein monophasisches Schlafmuster mit einer Schlafphase von durchschnittlich acht Stunden pro Tag während der Dunkelphase. Ratten zeigen im Gegensatz zum Menschen ein polyphasisches Schlaf-Wach-Muster mit häufigen Wechsel/Übergängen zwischen den verschiedenen Vigilanzstadien (SIMASKO & MUKHERJEE, 2009). Ein weiterer Unterschied im Schlafverhalten der Ratten zum Menschen liegt darin, dass Ratten nachtaktiv sind. In der Dunkelphase zeigen die Tiere lange Wachphasen, die von vielen kurzen Schlafepisoden unterbrochen werden. In der Hellphase zeigen die Tiere längere Schlafepisoden, welche durch kurze Wachphasen unterbrochen sind. Der Anteil an langen Wachphasen ist in der Hellphase reduziert (SIMASKO & MUKHERJEE, 2009).

Schlaf wird homöostatisch reguliert (RASCH & BORN, 2013; DEBOER, 2018). Die homöostatische Regulierung beeinflusst den Zeitpunkt und die Intensität des Schlafens (FRANK et al., 2017). Durch Einflüsse wie zum Beispiel Schlafentzug und Stress kann Schlaf beeinträchtigt werden und in einer Schlafepisode weniger auftreten. Aufgrund der homöostatischen Kompensation wird dieser Schlafverlust durch eine Verlängerung der darauffolgenden Schlafepisode ausgeglichen (DEBOER, 2018). Eine Studie von DISPERSYN et al. (2017) untersuchte die homöostatische und zirkadiane Schlafregulierung an den zwei aufeinanderfolgenden Tagen nach einem 24-stündigen Schlafentzug, der durch ein Laufrad ausgelöst wurde. Die Ergebnisse beschrieben am ersten Tag nach dem 24-stündigen Schlafentzug einen konsekutiven Schlafrebound, der durch einen Anstieg des NREM-Schlafs (Erklärung siehe Abschnitt 3.3.) gekennzeichnet war und welcher am zweiten Tag anhielt. Es wurde beschrieben, dass Faktoren wie das Alter und der Östrus einen Einfluss auf die homöostatische Regulation des Schlafs haben (SCHWIERIN et al., 1998; MENDELSON & BERGMANN, 1999; FRANK et al., 2017; SOLTANI et al., 2019).

Die Kernfunktion des Schlafens, insbesondere auf zellulärer Ebene, wurde bisher noch nicht vollends erforscht (CIRELLI & TONONI, 2008). Schlaf soll aber neben Thermoregulation und Reparatur von Zellgewebe, auch eine wichtig Funktion bei der Gedächtnisbildung haben (RASCH & BORN, 2013). RECHTSCHAFFEN and BERGMANN (2002) zeigten, dass Schlafentzug die Mortalität bei Ratten erhöhte. Schlaf wird streng reguliert, kann nicht ohne Konsequenzen entzogen werden und kann bei vielen Tierarten beobachtet werden (CIRELLI & TONONI, 2008). Dies verdeutlicht die Relevanz von Schlaf.

3.3. Aufzeichnungsgestützte Schlafmusterbewertung

Schlaf kann in zwei Hauptstadien unterteilt werden: NREM-Schlaf (engl. *non rapid eye movement sleep*) und REM-Schlaf (engl. *rapid eye movement sleep*). NREM-Schlaf kann in 3 Schlafstadien, Stadium N1, Stadium N2 und Stadium N3, unterteilt werden. Stadium N1 (Leichtschlaf) und Stadium N2 stellen die leichteren Schlafstadien dar. Zusätzlich gibt es ein viertes Stadium, den REM-Schlaf (IBER, 2007; RASCH & BORN, 2013).

Während des NREM-Schlafs dominieren niederfrequente Wellen im Deltaband (0.5 – 5 Hz) das EEG. Schwingungen mit höherer Frequenz nehmen ab. Das EMG zeigt eine geringe Aktivität (LOUIS et al., 2004).

Ein Bereich des NREM-Schlafs, das Stadium N3, wird als langsam-welliger Schlaf (von engl. *slow wave sleep*, SWS) bezeichnet. Charakteristisch für den SWS sind die niederfrequenten, „langsamen“ Wellen mit hoher Amplitude im EEG (RASCH & BORN, 2013). Ein interessanter Parameter ist die *slow wave activity power* (kurz SWA-Power). Die SWA-Power ist definiert als die EEG-Power im Bereich zwischen 0.5 und 4 Hz während NREM-Schlaf (LEEMBURG et al., 2010). Es wurde bereits beim Menschen und bei der Ratte erforscht, dass SWA während des NREM-Schlafs homöostatisch reguliert wird. Daher ist die SWA am Anfang der Hauptruhephase hoch und nimmt während dieser ab (HUBER et al., 2000; DEBOER, 2018). Interessanterweise wurde beim Menschen gezeigt, dass die SWA nach einem Nachmittagsschlaf zu Beginn der Nacht niedriger ist (FEINBERG et al., 1985; HUBER et al., 2000; DEBOER, 2018). Daher ist die SWA während des NREM-Schlafs ein interessanter Marker, der Auskunft über die Schlafqualität in Abhängigkeit von vorherigem Wachsein liefern kann (HUBER et al., 2000).

Der Zusammenhang zwischen Schlafdeprivation und einem Anstieg des SWS und der SWA wurde bereits in Vögeln und Säugetieren, einschließlich der Ratte, beschrieben (URSIN, 1971; PAPPENHEIMER et al., 1975; TOBLER & BORBÉLY, 1990; HUBER et al., 2000; VYAZOVSKIY & TOBLER, 2005; RATTENBORG et al., 2009; DEBOER, 2018). Somit kann ein Schlafverlust durch verschiedene Strategien ausgeglichen werden. Zum einen kann die nachfolgende Schlafzeit erhöht werden und zum anderen kann die Schlafintensität erhöht werden, die durch einen Anstieg der SWA-Power messbar ist (HUBER et al., 2000; DEBOER, 2018).

Während des REM-Schlafs (engl. *rapid eye movement sleep*) dominieren Theta-Wellen (*hippocampal theta activity*, 4 – 8 Hz) das EEG. Das EEG zeigt während dieser Phase symmetrische „schnelle“ Schwingungen mit niedriger Amplitude. Während dieses aktiven Zustands des Gehirns treten schnelle Augenbewegungen und eine Atonie der Muskeln auf. Das EMG zeigt während des REM-Schlafes eine sehr geringe oder fehlende Aktivität (LOUIS et al., 2004; RASCH & BORN, 2013).

Bei dem charakteristischen Schlafmuster des Menschen dominiert in der ersten Zeit der nächtlichen Schlafphase der SWS und nimmt im zeitlichen Verlauf an Dauer und Intensität

ab. Zum Ende der Schlafphase überwiegt REM-Schlaf an Dauer und Intensität. (RASCH & BORN, 2013). Das Stadium N2, eine leichtere Form des NREM-Schlafs, das 50 % des Schlafs bei erwachsenen Menschen ausmacht, wird bei Nagetieren nicht von dem SWS unterschieden (RASCH & BORN, 2013).

Die folgenden vier Vigilanzstadien können unterschieden werden: Aktiver Wachzustand (engl. *Active Wake*, Abkürzung AWAKE), Ruhiger Wachzustand (engl. *Quiet Wake*, Abkürzung QWAKE), NREM-Schlaf und REM-Schlaf.

Das EEG im Wachzustand (WAKE) ist durch hochfrequente Aktivität mit niedriger Amplitude gekennzeichnet. Das EMG zeigt eine hohe aber variable Aktivität (LOUIS et al., 2004). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass unterschiedliche Arten von Belastungsfaktoren und Beeinträchtigungen das Schlafmuster beeinflussen können.

Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer oder Parkinson, sind häufig durch Veränderungen der Schlafmuster gekennzeichnet (JYOTI et al., 2010; KREUZER et al., 2020a). Elektrophysiologische Aufzeichnungen werden daher häufig in Modellen für neurologische Erkrankungen durchgeführt (LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016).

PAPALE et al. (2005) haben einen reduzierten Anteil an NREM-Schlaf und REM-Schlaf in Ratten festgestellt, die unterschiedlichen chronischen Stressfaktoren, zum Beispiel durch eingeschränkte Bewegungsfreiheit über einen langen Zeitraum, ausgesetzt waren. KANT et al. (1995) stellte ebenfalls eine Reduktion im REM-Schlaf bei Ratten, die chronischem Stress ausgesetzt waren, fest. Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie von RAMPIN et al. (1991) einen Anstieg von REM-Schlaf unmittelbar nach akutem Stress, welcher durch zweistündige Immobilisation erzeugt wurde. In der gleichen Studie wurde allerdings auch festgestellt, dass ein Teil der Tiere keinen Anstieg im REM-Schlaf zeigte. Dies deutet daraufhin, dass einzelne Tiere unterschiedlich sensitiv für Stressfaktoren sind. Diese inter-individuellen Unterschiede im Umgang mit Stress müssen bei der Auswertung der Schlafmuster berücksichtigt werden (BOUYER et al., 1997).

4. Ausgewählte Parameter der Belastungseinschätzung

4.1. Saccharin-Präferenz

Der Verlust oder die Verringerung der natürlichen Präferenz für süße Lösungen, wie zum Beispiel Saccharin, wird bei Nagetieren als Anhedonie-assoziiertes Verhalten interpretiert, das möglicherweise depressionsassoziierte Verhaltensmuster beim Menschen widerspiegelt (HOFFMAN, 2016). Anhedonie beschreibt das Unvermögen Freude zu empfinden und/oder den Verlust der Motivation ein Ziel erreichen zu wollen und tritt als eines der Kardinalsymptome bei Menschen mit Depression auf (KANNER et al., 2012; KLEIN et al., 2015; HOFFMAN, 2016).

Bei dem Saccharin-Präferenz-Test werden den Tieren zwei Flaschen über einen bestimmten Zeitraum angeboten, wobei die eine Flasche mit einer Saccharin-Lösung (oder Saccharose-Lösung) und die andere mit Wasser gefüllt ist (KLEIN et al., 2015). Der Test basiert auf der Annahme, dass sich die natürliche Präferenz der Nagetiere für süße Lösungen in der Menge der konsumierten Saccharin-Lösung widerspiegelt. Ein Zeichen für Anhedonie-assoziiertes Verhalten ist kein oder ein geringer Konsum der Saccharin-Lösung und damit keine oder nur eine geringe Präferenz für Saccharin gegenüber Wasser (HOFFMAN, 2016).

Die Sensitivität des Saccharin-Präferenz-Tests wurde in verschiedenen Tiermodellen beschrieben. KLEIN et al. (2015) untersuchten den Saccharin-/Saccharose-Präferenz-Test in zwei Post-Status-Epilepticus-Mausmodellen während der frühen Epilepsie und in der chronischen Phase. Die Ergebnisse zeigten, dass der Saccharin-Konsumtest in der Lage war, langanhaltende Anhedonie in beiden Modellen zu erkennen. Ein Rückgang der Saccharin-Präferenz wurde in zwei unterschiedlichen Stressmodellen bei Ratten (physikalisches Stressmodell, Restraint-Stressmodell) beschrieben (PŁAŻNIK et al., 1989; PIJLMAN et al., 2003). Sowohl in einer Studie mit einem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell (KOSKA et al., 2019), als auch in einer Studie mit einem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell (SEIFFERT et al., 2019), welche im Rahmen unserer Forschungsgruppe durchgeführt wurden, wurde eine verminderte Präferenz für die Saccharin-Lösung bei Ratten mit spontanen Anfällen beschrieben. Eine weitere Studie aus unserer Forschungsgruppe hat gezeigt, dass die Saccharin-Präferenz in einem Kindling-Maus-Modell reduziert war (BOLDT et al., 2021).

VAN DIJK et al. (2020) hat die Saccharin-Präferenz zusammen mit verhaltensbezogenen, physiologischen und biochemischen Parametern mit einer Hauptkomponentenanalyse analysiert. Die Daten stammten aus umfangreichen Studien, die in verschiedenen Epilepsiemodellen an Ratten in unserem Institut erhoben wurden. Die Analyse zielte darauf ab, Saccharin-Präferenz als Parameter für die evidenzbasierte Bewertung des

Schweregrads zu validieren. Bei der Analyse stellte sich die Saccharin-Präferenz als einer der Top-Kandidaten heraus, der Unterschiede im affektiven Zustand zwischen experimentellen Tieren und naiven Kontrolltieren zeigen kann.

4.2. Wühlverhalten

Das Wühlverhalten (engl. *burrowing behavior*) ist ein angeborenes Verhalten bei Nagetieren, das in der standardisierten Umgebung von Versuchstierhaltungen in der Regel nicht-essentiell ist (JIRKOF et al., 2010; JIRKOF, 2014). Das bedeutet, dass dieses Verhalten, anders als zum Beispiel die Wasser- und Nahrungsaufnahme, bei einer Reduktion des Wohlbefindens eingestellt wird. Deshalb wurde das Wühlverhalten als Indikator für das Wohlbefinden von Labornagern vorgeschlagen (JIRKOF, 2014).

DEACON und Kollegen (2001) beschrieben erstmals den Wühl-Test, um den Fortschritt einer neurodegenerativen Erkrankung zu prüfen. Bei diesem Test wird eine Wühlröhre, welche einen natürlichen unterirdischen Tunnel imitieren soll, in den Heimkäfig der Tiere - bei Ratten meistens in einen frischen separaten Käfig - platziert (JIRKOF, 2014). Die Röhre wird vorab, zur Untersuchung von Änderungen im Wühlverhalten, mit einer bestimmten Menge an Material gefüllt, welches die Tiere aus der Röhre entfernen können (JIRKOF, 2014). Diese Interaktion mit dem Wühlmaterial wird als Wühlverhalten bezeichnet.

Es existieren verschiedene Parameter, die im Rahmen des Wühl-Tests gemessen werden können. Der am häufigsten beurteilte Parameter ist die Menge an Material, die nach einer bestimmten Zeit entfernt wurde. Dieser Parameter kann entweder über einen kurzen (beispielsweise zwei Stunden) oder über einen längeren Zeitraum (zum Beispiel 24 Stunden) beurteilt werden (JIRKOF, 2014). Ein weiterer Parameter ist die Latenz bis zum Beginn des Wühlens (JIRKOF, 2014). Dabei muss klar definiert werden, was als Wühlen definiert wird. Das heißt, ob die erste Interaktion mit dem Material ausreicht oder ob Material aus der Röhre bewegt werden muss. Des Weiteren kann die Dauer, die das Tier mit dem Wühlverhalten verbringt, meistens mithilfe einer Videoaufnahme, beurteilt werden (JIRKOF, 2014).

Während Futterpellets bei Mäusen am besten als Wühlmaterial funktionieren (JIRKOF, 2014), eignet sich bei Ratten Kies gut als Wühlmaterial (TURNER et al., 2019).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Wühlverhalten sensitiv für verschiedene Beeinträchtigungen ist (JIRKOF, 2014), beispielsweise gegenüber Einflüssen im Zusammenhang mit viralen oder bakteriellen Infektionen (TEELING et al., 2007; DE SOUSA et al., 2011) oder in Modellen für neurodegenerative (CUNNINGHAM et al., 2003; DEACON et al., 2005) und psychiatrische Erkrankungen (BARKUS et al., 2012). Die besondere Sensitivität des Wühlverhaltens wurde auch gegenüber Schmerzen, einschließlich Schmerzen nach einem chirurgischen Eingriff, in verschiedenen Studien

festgestellt. JIRKOF et al. (2010) haben erstmals eine nachteilige Auswirkung von Schmerzen auf das Wühlverhalten nach einer Laparotomie bei weiblichen und männlichen C57BL/6J Mäusen beschrieben. Eine Studie, welche eine Darmentzündung (Kolitis) durch Dextransulfat-Natrium-Polymeren im Trinkwasser von Mäusen induzierte, bestätigte, dass das Auftreten der schmerzhaften Darmentzündung mit einer Abnahme des Wühlens korrelierte (JIRKOF et al., 2013a). Eine Studie zur Untersuchung eines komplexen regionalen Schmerzsyndroms mithilfe eines Mausfrakturmodells beschrieb eine Reduktion im Wühlverhalten von Mäusen nach einer geschlossenen distalen Tibiafraktur im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe. Die Gabe von verschiedenen Analgetika in der gleichen Studie, zum Beispiel von Morphin und Paracetamol, führte zu einer Zunahme des Wühlverhaltens (DAS et al., 2017). In einer Studie von DESEURE & HANS (2018) wurde das Wühlverhalten in einem Mausmodell für neuropathische Schmerzen nach einer Verletzung des Infraorbitalnervs untersucht. Nach dem chirurgischen Eingriff war das Wühlverhalten signifikant reduziert. Die Sensitivität von *Burrowing* gegenüber Schmerzen, die durch eine Entzündung im Kniegelenk oder in der plantaren Pfote von männlichen Ratten nach der Injektion von Freund-Adjuvant verursacht wurden, wurde in einer Studie von RUTTEN et al. (2014) und in einer Studie von GOULD et al. (2016) beschrieben. WODARSKI und Kollegen (2016), die das Wühlverhalten im Rahmen einer multizentrischen Studie bei Ratten untersucht haben, beschrieben eine Reduktion des Wühlverhaltens in einem Modell für entzündliche Schmerzen mit Unterschieden zwischen den Laboren.

Studien, die im Rahmen unserer Forschungsgruppe durchgeführt wurden, bestätigten ebenfalls die Sensitivität des Wühlverhaltens beziehungsweise der Wühlleistung. Sowohl in einer Studie mit einem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell (KOSKA et al., 2019), als auch in einer Studie mit einem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell (SEIFFERT et al., 2019) aus unserer Arbeitsgruppe war die Wühlleistung während allen Versuchsphasen reduziert.

4.3. Nestbauverhalten

Das Nestbauverhalten (engl. *nest-building behavior*) ist wie das Wühlverhalten ein angeborenes Verhalten (im Heimkäfig) bei Nagetieren, das in der standardisierten Umgebung von Versuchstierhaltungen in der Regel nicht-essentiell ist (JIRKOF, 2014). Das bedeutet, dass dieses Verhalten, anders als zum Beispiel die Wasser- und Nahrungsaufnahme, bei einer Reduktion des Wohlbefindens eingestellt wird. Deshalb wurde die Nestbauaktivität als Indikator für das Wohlbefinden von Labornagern vorgeschlagen (JIRKOF, 2014).

Eine Vielzahl von Studien haben das Nestbauverhalten untersucht. VAN LOO & BAUMANS (2004) stellte die Hypothese auf, dass das Nestbauverhalten bei Ratten nicht angeboren

ist, sondern durch das Muttertier erlernt werden muss (SCHWABE et al., 2020). Eine kürzlich im Rahmen unserer Forschungsgruppe durchgeführte Multicenterstudie von SCHWABE et al. (2020) bestätigte diese Hypothese nicht und wies darauf hin, dass die Leistung des Nestbauverhaltens von Ratten im Vergleich zu Mäusen allgemein schlecht ist. Des Weiteren wies diese multizentrische Studie darauf hin, dass das Nestbauverhalten bei Ratten stark variieren kann, wobei die Unterschiede zwischen den Laboren bei Ratten stärker ausgeprägt sind als bei Mäusen. Im offensichtlichen Gegensatz dazu scheinen sich Mäuse durch eine höhere intrinsische Motivation für den Nestbau auszuzeichnen (SHERWIN, 1997; JIRKOF, 2014).

Eine Möglichkeit das Nestbauverhalten systematisch zu untersuchen, ist die Beurteilung der Nestbauaktivität (engl. *nest-building*). Ein Parameter zur Beurteilung der Qualität des gebauten Nests ist die Bestimmung der Nestkomplexität mithilfe einer Skala (JIRKOF, 2014). Im Rahmen der oben genannten Multicenterstudie wurde ein Nest-Score bei Ratten in unserer Arbeitsgruppe an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und in einer Arbeitsgruppe an der Medizinischen Hochschule Hannover untersucht, der vier Abstufungen von 0 (= kein Nest gebaut) bis 4 (= komplexes Nest) unterscheidet (SCHWABE et al., 2020). Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass dieser Score nicht spezifisch genug ist, um die Qualität des Nests zu beurteilen. Deswegen beschrieben die Autoren eine angepasste Skala, bei der ein weiterer Score hinzugefügt wurde. Somit kann die Nestbauaktivität nach SCHWABE et al. (2020) mit folgender fünfstufigen Skala bewertet werden:

- i. **Score 0:** Fast keine Interaktion mit dem Nestmaterial ist erkennbar.
- ii. **Score 1:** Eine Interaktion mit dem Nestmaterial ist erkennbar, ohne einen erkennbaren Nestbereich. Das Nestmaterial wurde über mehr als die Hälfte des Käfigs verteilt.
- iii. **Score 2:** Ein Nestbereich von begrenzter Fläche ist erkennbar. Das gebaute Nest hat ein flaches Aussehen mit keiner sichtbaren Vertiefung in der Mitte.
- iv. **Score 3:** Ein klar abgegrenztes Nest ist sichtbar. Das gebaute Nest hat entweder ein flaches Aussehen mit einer klaren Vertiefung in der Mitte oder hat eine definierte Höhe, die mindestens ein Fünftel der Käfighöhe entspricht, mit einer weniger klaren Vertiefung.
- v. **Score 4:** Das Nest hat sowohl eine klare Vertiefung in der Mitte als auch eine definierte Höhe, die mindestens ein Viertel der Käfighöhe entspricht.

Die am häufigsten eingesetzten Materialien zur systematischen Beurteilung der Nestbauaktivität sind Papier und Baumwollquadrate (JIRKOF, 2014). In einer Studie von HESS et al. (2008) wurde beschrieben, dass C57BL/6J-Mäuse, die zerkleinerte Papierstreifen erhielten, hochwertigere Nester bauten, als Mäuse die Taschentücher

erhielten.

Nagetiere bauen in ihrer natürlichen Umgebung Nester zum Schutz vor Feinden und zum Zweck der Thermoregulation (KINDER, 1927; DEACON, 2006). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Nestbauaktivität durch verschiedene Beeinträchtigungen eingeschränkt wird (JIRKOF, 2014), zum Beispiel bei Modellen für neurodegenerative (CUNNINGHAM et al., 2003; DEACON et al., 2005; SAGER et al., 2010) und psychiatrische Erkrankungen (HALENE et al., 2009; BELFORTE et al., 2010; BARKUS et al., 2012).

Die Sensitivität der Nestbauaktivität gegenüber Distress und gegenüber Schmerzen, einschließlich Schmerzen nach einem chirurgischen Eingriff, wurde in verschiedenen Studien beschrieben (ARRAS et al., 2007; JIRKOF et al., 2013c; JIRKOF, 2014; GREENBERG et al., 2016; HOHLBAUM et al., 2018).

4.4. Grimace-Scale

Bereits frühe Beschreibungen in 1872 von DARWIN in seinem Werk „Der Ausdruck der Gemütsbewegungen bei dem Mensch und den Tieren“ weisen auf Parallelen in der Mimik bei verschiedenen Tierarten und beim Menschen hin (DARWIN, 1872).

Während die Schmerzbewertung bei Menschen typischerweise auf einer verbalen Selbsteinschätzung zum Beispiel anhand einer 0 bis 10 Skala basiert, werden Gesichtsausdrücke herangezogen, wenn eine verbale Auskunft nicht möglich ist (MOGIL et al., 2020). Dies trifft beispielsweise auf Säuglinge, junge Kinder und Menschen mit verbalen Beeinträchtigungen zu (MOGIL et al., 2020).

EKMAN and FRIESEN (1978) haben den Gesichtsausdruck von Menschen anhand des von ihnen entwickelten *facial action coding systems (FACS)* bei verschiedenen Emotionen, einschließlich Schmerz, intensiv untersucht und haben den Begriff „*action units*“, (deutsch: Aktionseinheiten) als Basis für eine systematische Beurteilung des Gesichtsausdrucks eingeführt (LANGFORD et al., 2010). Im Jahr 2010 waren Langford und Kollegen (LANGFORD et al., 2010) die Ersten, die Mimik als Maß von Schmerz bei Mäusen systematisch anhand von zahlreichen Schmerzmodellen untersuchten und die darauf basierend den *Mouse-Grimace-Scale (MGS)* entwickelten. Der MGS besteht aus fünf verschiedenen anatomisch basierten Parametern, den „*action units*“. Anhand von diesen Aktionseinheiten können schmerzbedingte Abweichungen von dem physiologischen Zustand untersucht werden.

Bei der Maus werden die folgenden fünf Aktionseinheiten untersucht (LANGFORD et al., 2010):

- i. **„Orbital Tighthening“ (Öffnung des Augenlids):** Eine teilweise oder vollständige Verengung des Auges, durch das Schließen des Augenlids oder durch zusammendrücken des Auges - erkennbar durch Fältchen im Bereich des

- Auges – ist ein Zeichen für schmerzhafte Zustände. Im physiologischen Zustand sind die Augenlider der Mäuse im wachen Zustand geöffnet.
- ii. **„Nose Bulge“ (Wölbung der Nase):** Bei schmerzhaften Zuständen kann auf dem Nasenrücken der Maus eine Wölbung der Haut sichtbar werden. Im physiologischen Zustand ist die Haut auf dem Nasenrücken flach und glatt.
 - iii. **„Cheek Bulge“ (Wölbung des Oberkieferbereichs):** Es wird eine konvexe Form der Wange im Bereich zwischen den Augen und der Vibrissen, welche bei schmerzhaften Zuständen auftreten kann, untersucht. Im physiologischen Zustand hat der Oberkieferbereich ein flaches und glattes Aussehen.
 - iv. **„Ear position“ (Stellung der Ohren):** Bei schmerzhaften Zuständen können die Ohren weiter nach außen oder nach hinten positioniert werden. Dadurch kann ein größerer Abstand im Bereich zwischen den Ohren sichtbar werden.
 - v. **„Whisker change“ (Veränderung der Vibrissen):** Bei schmerzhaften Zuständen kann sich die Position der Vibrissen ändern. Entweder sie befinden sich weiter rostral/caudal als die Ausgangsposition oder sie können sich bündeln.

Eine Skala von 0 bis 2 ermöglicht eine Abstufung des Schmerzes innerhalb der einzelnen Aktionseinheiten: keine Anzeichen von Schmerz erkennbar (Score = 0), moderate Anzeichen von Schmerz sichtbar (Score = 1) und starke Anzeichen von Schmerz (Score = 2) erkennbar.

Im darauffolgenden Jahr wurde der *Rat-Grimace-Scale (RGS)* von SOTOCINAL et al. (2011) entwickelt. Im Unterschied zur Maus werden bei der Ratte insgesamt vier Aktionseinheiten vorgeschlagen. „Nose bridge“ und „cheek bulge“ des MGS werden bei der Ratte zu einer Action Unit zusammengefasst und als „Nose/Cheek Flattening“ (Abflachung der Nase/Wangen) bezeichnet, da Sotocinal und Kollegen herausgefunden haben, dass bei schmerzhaften Zuständen eine Veränderung der Nase und der Wange bei Ratten immer zusammen auftritt und schwer voneinander zu unterscheiden ist. Bei der Abflachung der Nase/Wangen wird eine, bei schmerzhaften Zuständen stufenweise auftretende, Abflachung und Verlängerung des Nasenrückens und eine damit verbundene Abflachung der Wange untersucht. Im physiologischen Zustand sind die Nase und die Wange bei Ratten deutlich gewölbt.

Anschließend wurden eine Vielzahl von *Grimace-Scales* für unterschiedliche Tierarten, beispielsweise für Kaninchen (KEATING et al., 2012), Pferde (DALLA COSTA et al., 2014), Schafe (HÄGER et al., 2017) und Katzen (EVANGELISTA et al., 2019) entwickelt und untersucht.

4.5. Irwin-Score

Der Irwin-Test wurde im Rahmen der Neuropharmakologie zur Prüfung unerwünschter Wirkungen von ZNS-Therapeutika entwickelt (IRWIN, 1968; FONCK et al., 2015). Im Bereich der Arzneimittelentwicklung wird der Irwin-Test häufig in der Sicherheitspharmakologie zur Prüfung der Verträglichkeit und Nebenwirkungen von Substanzen, die das Nervensystem betreffen, eingesetzt (FONCK et al., 2015).

Der Irwin-Test liefert Information über Verhaltensänderungen und zusätzlich neurologische Änderungen, die das zentrale und vegetative Nervensystem betreffen. Dies grenzt den Irwin-Score von üblichen klinischen Scoringssystemen ab, die häufig zur Beurteilung des Schweregrads (zum Beispiel im Rahmen des Tierversuchsantrags) eingesetzt werden.

In der ersten Stufe werden Scores adspektorisch untersucht, zum Beispiel das Vorhandensein von Stereotypen, ohne das Tier im Käfig zu stören. Danach werden die Tiere für weitere manipulative Tests aus dem Käfig genommen (FONCK et al., 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde ein modifizierter Irwin-Score angewendet, um eine Auswirkung auf die Versuchsergebnisse durch eine intensivere Interaktion mit dem Tier zu vermeiden. Der modifizierte Irwin-Score ist im Anhang 4 dargestellt.

Die Sensitivität eines modifizierten Irwin-Tests gegenüber einem klinischen Score wurde in unserer Arbeitsgruppe in zwei Studien mit einem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell (KOSKA et al., 2019) und einem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell (SEIFFERT et al., 2019) beschrieben. In der Latenzphase und der chronischen Phase der Status-Epilepticus-Modelle war nur der Irwin-Score sensitiv genug, um Veränderungen bei den Tieren zu erkennen.

4.6. Corticosteron und dessen Metaboliten

Ein sensitiver Parameter, um Aussagen über Stress bei den Tieren zu treffen, ist die Messung der Aktivität der Nebennierenrinde. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Abk. HPA, engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) wird durch Stress schnell aktiviert (ARMARIO, 2006; SCORRANO et al., 2015). Der *Corticotropin-releasing-Factor* (CRF), gebildet von Neuronen im Hypothalamus, wird als Folge in die hypophysären Portalgefäße freigesetzt. Die Bindung des CRF an CRF-Typ-1-Rezeptoren aktiviert die Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus dem Hypophysenvorderlappen in den systemischen Kreislauf (SMITH & VALE, 2006). Das ACTH stimuliert die adrenokortikale Synthese und Sekretion von Glukokortikoiden in den systemischen Kreislauf (SMITH & VALE, 2006; SCORRANO et al., 2015). Das primäre Glukokortikoid bei Menschen ist Cortisol, bei Nagetieren ist es Corticosteron (SCORRANO et al., 2015). Durch eine negative Rückkopplung hemmt Corticosteron die durch Stress ausgelöste Aktivierung der HPA-Achse. Somit hat Corticosteron eine wichtige Funktion bei

der Anpassung des Organismus an Stress (SAPOLSKY et al., 2000; SCORRANO et al., 2015).

Ein Vorteil der Corticosteron-Messung ist, dass sie nicht durch die subjektive Einschätzung des Wissenschaftlers beeinflusst wird. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Corticosteron sowohl bei positivem Stress (Eustress) zum Beispiel während der Paarung, als auch bei negativem Stress (Distress) ausgeschüttet wird (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

Eine Möglichkeit der invasiven Probenahme ist die Bestimmung der Konzentration von Corticosteron-Metaboliten im Serum. Eine Option ist, mehrmals Blutproben während des Versuchs zu nehmen. Die mehrmalige Probenahme hat allerdings negative Auswirkung auf das Tierwohlbefinden, da sie belastend und stressvoll für das Tier ist. Ergebnisse des Versuches können wegen der stressvollen Blutentnahmen und der Schwankungen des Hormons verfälscht sein (LEPSCHY et al., 2007). Eine andere Option ist Corticosteron am Ende des Versuches im Serum zu bestimmen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass Serum-Corticosteron und generell die Aktivierung der HPA-Achse ein interessanter Marker für akuten Stress ist. Die Aussagekraft von Serum-Corticosteron als Marker für chronischen Stress am Ende des Experiments ist wahrscheinlich eher begrenzt (SCORRANO et al., 2015).

Eine Methode der nicht-invasiven Probenahme zur Beurteilung der Nebennierenrindenaktivität ist die Bestimmung der Corticosteron-Metaboliten in den fäkalen Exkreten (LEPSCHY et al., 2007). Die Analyse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten ermöglicht eine wiederholte Bewertung möglicher Auswirkungen experimenteller Verfahren auf den Stresshormonspiegel ohne invasive, stressvolle Probenahmeverfahren, die das Ergebnis verfälschen können (PALME, 2019). Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten können relativ einfach täglich gesammelt werden, ohne den endokrinen Status des Tieres zu beeinflussen (LEPSCHY et al., 2007). Nach einer Extraktion der Faeces können die Corticosteron-Metaboliten quantifiziert werden, wobei Rückschlüsse auf die Nebennierenrindenaktivität gezogen werden können. Distress spiegelt sich nach 12 bis 14 Stunden in den Corticosteron-Metaboliten wieder (LEPSCHY et al., 2007). Unter Berücksichtigung von diesem zeitlichen Aspekt kann auch akuter Stress bei den Tieren gemessen werden.

Zu beachten ist die circadiane Rhythmik und die pulsatile Ausschüttung der fäkalen Corticosteron-Metaboliten. Die Konzentration schwankt im tageszeitlichen Verlauf mit mehreren Spitzen (engl. *Peaks*). Um unterscheiden zu können, ob ein *Peak* durch den diurnalen Rhythmus oder durch einen Stressor ausgelöst wurde, sollten die Proben nach einem festen Zeitplan gesammelt werden (LEPSCHY et al., 2007).

Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten schwanken bei weiblichen Tieren während des Zyklus (LEPSCHY et al., 2007). Eine Überprüfung der Zyklusphase bei den Tieren im

Versuch, kann einen Einfluss des Östrus auf die fäkalen Corticosteron-Metaboliten ausschließen.

In einer Studie von KROLL et al. (2021) wurde Schlafentzug durch motorisierte Laufräder als Stressor eingesetzt, was zu einer Erhöhung der Corticosteron-Metaboliten bei Ratten führte.

Die Quantifizierung der Corticosteron-Metaboliten im Haar bei Tieren ist eine weitere nichtinvasive Möglichkeit, um Rückschlüsse auf die Aktivität der Nebennierenrinde zu ziehen. Ein Einfluss der Probennahme muss hier nicht berücksichtigt werden, da das Probenmaterial leicht gewonnen werden kann. Eine Studie von SCORRANO et al. (2015) beschrieb einen Anstieg der Corticosteron-Metaboliten im Haar bei männlichen Ratten, die chronischen Stress durch Immobilisierung unterzogen wurden.

Bei drei Epilepsiemodellen, die in Studien im Rahmen unserer Forschungsgruppe untersucht wurden, waren die Corticosteron-Metaboliten im Haar nicht beeinflusst (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019) und erwiesen sich als weniger sensitiv als die fäkalen Corticosteron-Metaboliten, die in zwei Post-Status-Epilepticus-Modellen erhöht waren (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019).

III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Diese Arbeit besteht zum einen aus einer systematischen Übersichtsarbeit und zum anderen aus einem *in vivo* Projekt. Der erste Teil dieser Arbeit zielt darauf ab, das Wissen über ausgewählte Parameter (der Belastungseinschätzung) für die Beurteilung von postoperativen Schmerzen anhand eines systematischen *Reviews* zu verbessern. Im zweiten Teil wird eine potentielle *Refinement*-Maßnahme einer experimentellen Technik überprüft.

Trotz der Tatsache, dass umfangreiche *Reviews* veröffentlicht wurden, in denen die verfügbaren Informationen über den informativen Wert, die praktische Anwendung und die Grenzen von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* als Schmerzparameter zusammengefasst wurden (JIRKOF, 2014; MOTA-ROJAS et al., 2020), besteht nach wie vor eine Wissenslücke in Bezug auf das Ausmaß der Anwendung dieser Parameter bei der Beurteilung postoperativer Schmerzen.

Daher haben wir uns als Ziel gesetzt diese Parameter, welche für die Bewertung des Schweregrads als relevant erachtet wurden, anhand eines systematischen *Reviews* zu analysieren.

Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass Wissenslücken in Bezug auf das Ausmaß der Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing*, die zur Beurteilung von postoperativen Schmerzen bei Ratten und Mäusen verwendet werden, bestehen. Daher zielt das vorliegende systematische *Review* darauf ab, die verfügbaren Literaturinformationen (Evidenzbasis) über die Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* als Verhaltenskontrolle zur Erkennung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen und Ratten zu untersuchen.

Zusätzlich zu der Analyse von Parametern anhand eines systematischen *Reviews* wurde auf der Basis bereits validierter Parameter eine potentielle *Refinement*-Maßnahme in einer experimentellen Studie getestet. Die folgenden Parameter wurden ausgewählt: Saccharin-Präferenz, Wühlverhalten, Nestbauverhalten, *Grimace-Scale*, Irwin-Score, und fäkale Corticosteron-Metaboliten.

Sowohl in einer Studie mit einem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell (KOSKA et al., 2019) als auch in einer Studie mit einem elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell (SEIFFERT et al., 2019), die im Rahmen unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, wurden Tiergruppen mit kabel-gebundener und telemetrischer Aufzeichnung unter Verwendung ausgewählter Parameter verglichen. Tiere mit kabel-gebundener Aufzeichnung zeigten eine reduzierte Saccharin-Präferenz, eine erhöhte Aktivität und erhöhte fäkale Corticosteron-Metaboliten. Im Rahmen einer durchgeführten

Hauptkomponentenanalyse wurde die Trennung zwischen der kabel-gebundenen und telemetrischen Gruppe bestätigt. Allerdings waren die Ergebnisse in Bezug auf die Belastung nicht eindeutig.

Trotz der Verwendung eines *Swivel*-Systems können Zugkräfte auftreten, die unter Umständen Einfluss auf Ruhe- und Schlafphasen aber auch auf das Aktivitätsmuster haben könnten. Daher zielt die vorliegende experimentelle Studie darauf ab, die Auswirkungen der kabel-gebundenen Aufzeichnung auf das Wohlbefinden der Tiere, anhand einer detaillierten Analyse der Aktivitäts- und Schlafmuster und von verhaltensbezogenen und biochemischen Parametern, zu beurteilen.

Mit dem experimentellen Ansatz überprüfen wir die Hypothese, dass kabel-gebundene Aufzeichnungen relevante Auswirkungen auf die Aktivitäts-, Ruhe- und Schlafmuster von Sprague-Dawley-Ratten haben. Dies ist für die Planung von chronischen Tiermodellen in den Neurowissenschaften von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Fragestellungen untersucht:

- i. Was ist der aktuelle Stand des Anwendungsumfangs von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* in der postoperativen Phase bei Ratten und Mäusen?
- ii. Bestehen Wissenslücken in Bezug auf die Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* zur Beurteilung von postoperativen Schmerzen bei Ratten und Mäusen?
- iii. Wie gut ist die Berichterstattung der identifizierten Studien und wie hoch ist das Verzerrungspotential?
- iv. Können *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* in der postoperativen Phase bei Ratten und Mäusen als Schmerzbewertungsparameter empfohlen werden?
- v. Haben kabel-gebundene Aufzeichnungen relevante Auswirkungen auf die Aktivitäts-, Ruhe- und Schlafmuster von Sprague-Dawley-Ratten?
- vi. Haben kabel-gebundene Aufzeichnungen relevante Auswirkungen auf verhaltensbezogene und biochemische Parameter?
- vii. Können anhand dieser Arbeit *Refinement*-Vorschläge für chronische Aufzeichnungsmodelle gegeben werden?

IV. MATERIAL UND METHODEN

1. Systematisches Review

Das Systematische *Review* Protokoll (Anhang 5) wurde vor Beginn des formellen Screenings von Studien bei der *Systematic Review Facility* (SyRF) für präklinische Studien am 26. März 2020 registriert und ist unter <https://syrf.org.uk/protocols> verfügbar. Zur Erstellung des Protokolls wurde die Protokollvorlage Version 2 des *Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation* (SYRCLE) verwendet (DE VRIES et al., 2015). Die Forschungsfrage wurde wie folgt definiert: *Was ist die aktuelle Evidenzbasis für die Verwendung von Grimace-Scale, Nest-building und Burrowing für die Bewertung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen und Ratten?*

1.1. Suchfaden und Studienauswahl

Es wurde eine umfassende Such-Strategie für Pubmed unter Verwendung von *Entry-Terms*, Schlüsselwörtern und medizinischen Fachbegriffen (MeSH) entwickelt.

Jeder Begriff, der potenziell relevant für den Suchfaden war, wurde einzeln getestet, um zu sehen, wie viele Ergebnisse er uns liefert und ob sie relevant sind. Oftmals wurde eine „NICHT-Suche“ durchgeführt, um zu bewerten, ob die Begriffe relevant sind.

Wir führten eine "tiab" (title/abstract)-Suche - das heißt es werden Titel, Abstracts und vom Autor definierte Schlüsselwörter durchsucht - durch. Die Suche umfasste relevante Synonyme und alternative Schreibweisen für die vier folgenden Komponenten: „Tests“ (*Grimace-Scale*, *Burrowing*, *Nest-building*), „chirurgischer Eingriff“, „Schmerz“ und „Nagetiere“. Für jede Suchkomponente wurde ein umfassender separater Suchfaden entwickelt. Die vier Komponenten wurden so gewählt, dass sie Themen der Forschungsfrage abdeckten und wurden in den Datenbanken mit dem Booleschen Operator "AND" verknüpft.

Die folgenden Plattformen wurden für die Suche nach relevanten Artikeln verwendet: *Pubmed*, *Embase via Ovid* und *Web of Science*. Die folgenden Datenbanken wurden über die Plattform *Web of Science* durchsucht: *Science Citation Index Expanded*, *Social Sciences Citation Index*, *Arts & Humanities Citation Index*, *Conference Proceedings Citation Index - Science*, *Conference Proceedings Citation Index - Social Science & Humanities*, *Emerging Sources Citation Index*.

Der Suchfaden wurde für *Embase* und *Web of Science* übersetzt. Die finale Suchstrategie befindet sich im Protokoll (Anhang 5) und in Tabelle 1.

Pubmed**Specific tests**

"Nesting behavior"[MeSH Terms] OR nesting[tiab] OR nest building[tiab] OR burrowing[tiab] OR grimace[tiab] OR facial grimacing[tiab] OR facial expression[tiab] OR face expression[tiab] OR "facial pain"[MeSH Terms] OR (facial[tiab] AND pain[tiab]) OR (pain[tiab] AND face[tiab]) OR (faces[tiab] AND pain[tiab] AND scale[tiab]) OR (faces[tiab] AND pain[tiab] AND scales[tiab]) OR (face[tiab] AND pain[tiab] AND scale[tiab]) OR (face[tiab] AND pain[tiab] AND scales[tiab]) OR pain assessment[tiab] OR pain assessments[tiab] OR assessment of pain[tiab] OR "pain measurement"[MeSH Terms] OR pain measurement[tiab] OR pain measurements[tiab] OR (experimental[tiab] AND pain[tiab] AND test[tiab]) OR (experimental[tiab] AND pain[tiab] AND tests[tiab]) OR pain evaluation[tiab]

Surgery

"surgical procedures, operative"[MeSH Terms] OR "general surgery"[MeSH Terms] OR surgery[tiab] OR surgeries[tiab] OR surgical[tiab] OR surgically[tiab] OR postsurgical[tiab] OR postsurgically[tiab] OR postoperative[tiab] OR postoperatively[tiab] OR "surgical wound"[MeSH Terms] OR incision[tiab] OR incisions[tiab] OR incisional[tiab] OR operation[tiab] OR operative[tiab] OR operations[tiab] OR laparotomy[tiab] OR laparotomies[tiab] OR laparoscopy[tiab] OR laparoscopies[tiab] OR craniotomy[tiab] OR craniotomies[tiab] OR amputation[tiab] OR amputations[tiab] OR transplantation[tiab] OR transplantations[tiab] OR graft[tiab] OR grafts[tiab] OR grafting[tiab] OR implantation[tiab] OR implantations[tiab] OR hysterotomy[tiab] OR hysterectomy[tiab] OR hysterectomies[tiab] OR "neurosurgery"[MeSH Terms] OR neurosurgery[tiab] OR neurosurgical[tiab] OR neurosurgically[tiab] OR "orthopedics"[MeSH Terms] OR orthopedic[tiab] OR orthopaedic[tiab] OR orthopedics[tiab] OR orthopaedics[tiab]

Pain

"Pain"[MeSH Terms] OR pain[tiab] OR pains[tiab] OR physical suff*[tiab] OR "nociception"[MeSH Terms] OR nociception[tiab] OR allodynia[tiab] OR "hyperalgesia"[MeSH Terms] OR hyperalgesia[tiab] OR "neuralgia"[MeSH Terms] OR neuralgia[tiab] OR neuralgias[tiab] OR sore[tiab] OR soreness[tiab] OR ache[tiab] OR aches[tiab] OR discomfort[tiab] OR distress[tiab] OR hurt[tiab] OR hurts[tiab] OR hurting[tiab]

Rodents

"mice"[MeSH Terms] OR mice[tiab] OR mus[tiab] OR mouse[tiab] OR murine[tiab] OR murines[tiab] OR muridae[tiab] OR m. musculus[tiab] OR "rats"[MeSH Terms] OR rats[tiab] OR rat[tiab] OR rattus[tiab] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR rodentia[tiab] OR rodent[tiab] OR rodents[tiab]

Embase**Specific tests**

Nesting/ OR (nesting OR nest building).ti,ab,kw. OR burrowing.ti,ab,kw. OR facial expression/ OR (facial expression OR face expression OR grimace).ti,ab,kw. OR facial grimacing/ OR facial grimacing.ti,ab,kw. OR face pain/ OR ((facial AND pain) OR (pain AND face)).ti,ab,kw. OR faces pain scale/ OR ((faces AND pain AND scale) OR (faces AND pain AND scales) OR (face AND pain AND scale) OR (face AND pain AND scales)).ti,ab,kw. OR pain assessment/ OR (pain assessment OR pain assessments OR assessment of pain).ti,ab,kw. OR pain measurement/ OR (pain measurement OR pain measurements OR pain evaluation).ti,ab,kw. OR experimental pain test/ OR ((experimental AND pain AND test) OR (experimental AND pain AND tests)) .ti,ab,kw.

Surgery

Surgery/ OR (surgery OR surgeries OR surgical OR surgically OR postsurgical OR postsurgically OR postoperative OR postoperatively OR operation OR operative OR operations).ti,ab,kw. OR surgical wound/ OR incision/ OR (incision OR incisions OR incisional).ti,ab,kw. OR laparotomy/ OR (laparotomy OR laparotomies OR laparoscopy OR laparoscopies).ti,ab,kw. OR craniotomy/ OR (craniotomy OR craniotomies).ti,ab,kw. OR amputation/ OR (amputation OR amputations).ti,ab,kw. OR transplantation/ OR (transplantation OR transplantations OR graft OR grafts OR grafting).ti,ab,kw. OR implantation/ OR (implantation OR implantations).ti,ab,kw. OR hysterotomy.ti,ab,kw. OR (hysterectomy OR hysterectomies).ti,ab,kw. OR neurosurgery/ OR (neurosurgery OR neurosurgical OR neurosurgically).ti,ab,kw. OR orthopedics/ OR (orthopedic OR orthopedics OR orthopaedic OR orthopaedics).ti,ab,kw.

Pain

Pain/ OR (pain OR pains OR physical suff* OR sore OR soreness OR ache OR aches OR discomfort OR distress OR hurt OR hurts OR hurting).ti,ab,kw. OR nociception/ OR nociception.ti,ab,kw. OR allodynia/ OR allodynia.ti,ab,kw. OR hyperalgesia/ OR hyperalgesia.ti,ab,kw. OR neuralgia/ OR (neuralgia OR neuralgias).ti,ab,kw.

<p>Rodents Mouse/ OR (mouse OR mice).ti,ab,kw. OR mus musculus/ OR mus musculus.ti,ab,kw. OR murine/ OR (murine OR murines).ti,ab,kw. OR muridae/ OR muridae.ti,ab,kw. OR rat/ OR (rat OR rats OR rattus).ti,ab,kw. OR rodent/ OR (rodent Or rodents OR rodentia).ti,ab,kw.</p>
<p><u>Web of science</u></p> <p>Specific test TS=(nesting OR “nest building” OR burrowing OR grimace OR “facial grimacing” OR “facial expression” OR “face expression” OR facial pain OR pain face OR faces pain scale OR faces pain scales OR face pain scale OR face pain scales OR “pain assessment” OR “pain assessments” OR “assessment of pain” OR “pain measurement” OR “pain measurements” OR experimental pain test OR experimental pain tests OR “pain evaluation”)</p> <p>Surgery TS=(surgery OR surgeries OR surgical OR surgically OR postsurgical OR postsurgically OR postoperative OR postoperatively OR incision OR incisions OR incisional OR operation OR operative OR operations OR laparotomy OR laparotomies OR laparoscopy OR laparoscopies OR craniotomy OR craniotomies OR amputation amputations OR transplantation OR transplantations OR graft OR grafting OR implantations OR implantations OR hysterotomy OR hysterectomy OR hysterectomies OR neurosurgery OR neurosurgical OR neurosurgically OR orthopedic OR orthopaedic OR orthopedics OR orthopaedics)</p> <p>Pain TS=(Pain OR pains OR “physical suff*” OR nociception OR allodynia OR hyperalgesia OR neuralgia OR neuralgias OR sore OR soreness OR ache OR aches OR discomfort OR distress OR hurt OR hurts OR hurting)</p> <p>Rodents TS=(mice OR mus OR mouse OR murine OR murines OR muridae OR “m. musculus” OR rats OR rat OR rattus OR rodent OR rodents OR rodentia)</p>

Tabelle 1. Suchstrategie für die verwendeten Datenbanken Pubmed, Embase und Web of Science.

Es wurde eine Datumsbeschränkung von 2005 bis 2020 festgelegt, da unseres Wissens nach keine Studien zur Bewertung der interessierenden Schmerzparameter, im Zusammenhang mit postoperativen Schmerzen, vor 2005 veröffentlicht wurden. Alle Publikationen wurden in die Referenzverwaltungssoftware EndNote (Endnote™ X9) übertragen; vor 2005 veröffentlichte Studien und Duplikate wurden manuell entfernt.

Basierend auf einer Übersichtsarbeit von VAN DER MIERDEN et al. (2019) wurde das Online-Tool RAYYAN (OUZZANI et al., 2016) für die zwei separaten Screening-Phasen ausgewählt: Titel- und Abstract-Screening, gefolgt von einem Volltext-Screening.

Alle beim Screening beteiligten Personen erhielten vorab das systematische *Review* Protokoll und eine Anleitung für das vorliegende *Review*, in welchen die Durchführung und wichtige Punkte des systematischen *Reviews* beschrieben wurden. Alle beteiligten Personen wurden mit dem *E-Learning-Tool* von SYRCLE für präklinische systematische *Reviews* und mit einem vorab durchgeführten Trainingsset bestehend aus 50 Abstracts trainiert. Diese 50 Abstracts wurden randomisiert (randomizer.org) aus allen Publikationen ausgewählt. Es mussten mindestens 95% der 50 Publikationen des Trainingssets korrekt

in- oder exkludiert werden, um bei dem Screening kooperieren zu dürfen.

Die vordefinierten Ein- und Ausschlusskriterien sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das Screening der Titel und Abstracts wurde von zwei unabhängigen Personen durchgeführt. Während des Titel- und Abstract-Screenings wurden englischsprachige Primärstudien mit Mäusen und/oder Ratten, die einen chirurgischen Eingriff beschreiben, inkludiert. Ein chirurgischer Eingriff wurde als ein Verfahren definiert, das einen Hautschnitt (einschließlich Biopsie) unter Vollnarkose beinhaltet. In dieser Phase ist es besser zu viel zu berücksichtigen und so vorzugehen eher Arbeiten einzuschließen, als sie fälschlicherweise auszuschließen. Daher wurde bei Zweifeln bezüglich der Entscheidung immer inkludiert. Unstimmigkeiten wurden durch Diskussion mit einer dritten Person geklärt.

Prioritized exclusion criteria per selection phase:

Title-abstract screening

1. No English language
 2. No rats and/or mice
 3. No surgery, defined as skin incision (including biopsy) under general anaesthesia
 4. Review article
-

Full-text screening

1. No English language
 2. No rats and/or mice
 3. No surgery, defined as skin incision (including biopsy) under general anaesthesia
 4. No burrowing and/or nest building and/or grimace scale
 5. Article without original data
 6. Article not retrievable
 7. Paper is not a full peer-reviewed journal article
-

Table 2. Exklusionskriterien, die in dem vorab veröffentlichten Protokoll definiert wurden.

Zwei unabhängige Personen suchten während der Volltextphase nach relevanten Studien. Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien wurden durch *Peer Review* geprüfte Publikationen berücksichtigt, in denen *Grimace-Scale*, *Nest-building* und/oder *Burrowing* als Schmerzparameter beschrieben wurde. Unstimmigkeiten wurden durch Diskussion mit einer dritten Person ausgeräumt.

Die Literaturlisten von inkludierten Studien wurden von zwei unabhängigen Personen auf potenziell relevante Studien durchsucht. Das Literaturlisten-Screening zielte darauf ab Studien zu finden, welche über den Suchfaden nicht gefunden wurden. Für das

Literaturlisten-Screening wurden die oben und in Tabelle 1 genannten Kriterien angewendet. Von Publikationen, deren Titel einen operativen Eingriff und/oder die interessierenden Parameter (*Grimace-Scale*, *Nest-building*, *Burrowing*) einschließlich der Synonyme enthielten, wurde der Voll-Text gesucht und auf die oben genannten Kriterien geprüft.

Die Einschlusskriterien für den *Grimace-Scale* mussten noch genauer definiert werden, da wir Studien identifizierten, die entweder nur die Augen oder die Aktionseinheiten innerhalb einer zusammengesetzten Verhaltensskala bewerteten. Es wurde festgelegt, dass mindestens zwei Aktionseinheiten bewertet werden mussten und dass eines der folgenden Schlüsselwörter im Text beschrieben sein musste: *Grimace-Scale*, Gesichtsausdruck (engl. *facial expression*), Schmerzgesicht (engl. *pain face*).

1.2. Datenextraktion

Bibliografische Details (zum Beispiel Erstautor, Jahr der Veröffentlichung), Studiendesign-Charakteristika (zum Beispiel Haltung, Gruppen), Tiermodell-Charakteristika (zum Beispiel Stamm, Geschlecht), Interventions-Charakteristika (zum Beispiel Art des Eingriffs, Art der Analgesie) und Informationen zu den Zielparametern (zum Beispiel signifikante Veränderungen der *Grimace*-, Wühl- oder Nestbauparameter) wurden für jeden untersuchten Schmerzparameter extrahiert und in einer Excel-Tabelle erfasst.

Bei der Art des Eingriffs wurden folgende Subkategorien unterschieden: Biopsie, Kraniotomie, Laparotomie, Laparoskopie, (Hemi-)Laminektomie, Menishektomie, Neurochirurgie, Fußsohle-Inzision, subkutane Implantation, Thorakotomie, Gefäßchirurgie und Vasektomie. Alle unter "Neurochirurgie" zusammengefassten Interventionen waren Eingriffe am peripheren Nervensystem.

Eine zufällige Teilmenge von 10 % der extrahierten Daten wurde von einer zweiten Person auf Qualität geprüft. Diese wurde durch einfache Randomisierung mit R Version 3.6.3. über RStudio Version 1.2.1335 ausgewählt.

1.3. Bewertung des Verzerrungspotentials

Das Potential für eine Verzerrung (engl. *risk of bias*) wurde mit Hilfe des SYRCLE's *RoB tools* (HOOIJMANS et al., 2014) bewertet. Das Tool umfasst zehn Punkte zur Bewertung der Qualität der eingeschlossenen Publikationen, die sich auf die folgenden sechs Arten von Verzerrungen beziehen:

- i. *Selection bias* (dtsh. Selektionsverzerrung): Diese Art der Verzerrung umfasst den Randomisierungsansatz für die Sequenzerstellung, die Basalwerte und die Verblindung der Studiengruppenzuweisung zu Beginn der Studie.

- ii. *Performance bias* (dt. Durchführungsverzerrung): Diese Art der Verzerrung umfasst die Randomisierung der Tiere und Käfige in der Versuchstierhaltung und die Verblindung während des Experiments.
- iii. *Detection bias* (dt. Verzerrung bei der Erkennung): Diese Art der Verzerrung umfasst die Randomisierung und Verblindung während der Ergebnisbewertung.
- iv. *Attrition bias* (dt. Verzerrung durch Abnutzung): Diese Art der Verzerrung bezieht sich auf das angemessene Berichten von unvollständigen Daten.
- v. *Reporting bias* (dt. Verzerrung der Berichterstattung): Diese Art der Verzerrung umfasst die selektive Ergebnis-Berichterstattung.
- vi. *Other*: Hier werden andere Arten von Verzerrungen beurteilt, die nicht von den oben genannten Punkten abgedeckt wurden.

Wir fügten den folgenden Punkt hinzu: Es wurde bewertet, ob eine *Power*-Analyse oder eine Berechnung des Stichprobenumfangs angegeben wurde. Auf der Grundlage von signalisierenden Fragen (siehe Tabelle 2) wurde jeder Punkt als "JA" (geringes Risiko einer Verzerrung), "NEIN" (hohes Risiko einer Verzerrung) oder "UNKLAR" (unklares Risiko einer Verzerrung) eingestuft.

Number	Signaling Question
Q1	Was the allocation sequence adequately generated and applied?
Q2	Were the groups similar at baseline?
Q3	Was the allocation adequately concealed?
Q4	Were the animals randomly housed during the experiment?
Q5	Were the caregivers and/or investigators blinded during the experiment?
Q6	Were animals selected at random for outcome assessment?
Q7	Was the outcome assessor blinded?
Q8	Were incomplete outcome data adequately addressed?
Q9	Are reports of the study free of selective outcome reporting?
Q10	Was the study apparently free of other bias?
Q11	Was a power analysis or sample size calculation reported?

Table 3. Signalfragen des SYRCLE's *RoB tools*. Frage 11 (Q11) wurde ergänzt.

In einer der Studien wurde nur eine Versuchsgruppe verwendet. In dieser Studie wurden ausgewählte *RoB*-Punkte mit "nicht anwendbar (NA)" bewertet. Bei Frage Q1 musste die Methode der Randomisierung, zum Beispiel *randomizer.org* oder R, definiert werden, um ein geringes Verzerrungsrisiko zu ergeben. Somit war die Angabe "randomisiert" nicht ausreichend. Bei Frage Q10 konzentrierten wir uns auf die Durchführung der Tests in Bezug auf die Hell- und Dunkelphasen, das Vorhandensein von Industriegeldern und andere

suboptimale Methoden wie zum Beispiel die Auswahl des besten Fotos für die Schmerzbewertung. Eine Person führte die Bewertung des Verzerrungspotential von allen Studien durch. Eine zufällige Teilmenge von 10 % der extrahierten Daten wurde von einer zweiten Person auf Qualität geprüft. Diese wurde durch einfache Randomisierung mit R Version 3.6.3. über RStudio Version 1.2.1335 ausgewählt.

1.4. Auswertung der Daten

Die extrahierten Daten wurden für jeden schmerzassoziierten Parameter (*Grimace-Scale*, *Nest-building*, *Burrowing*) separat tabellarisch dargestellt. Dies erfolgte zuerst mit Excel und anschließend mit Word. Daher wird eine Publikation, die mehrere Parameter beschreibt, in mehr als einer Tabelle aufgeführt.

Für die Bewertung von Analgesie und Anästhesie wurde jede Publikation einmal berücksichtigt, mit Ausnahme von einer Publikation, die sowohl Mäuse als auch Ratten verwendete. Zur Analyse und Darstellung der Daten wurden Pivot-Tabellen von Excel verwendet.

Abweichend von unserem Protokoll wurde beschlossen, in dem vorliegenden systematischen *Review* keine Meta-Analysen durchzuführen, da die Heterogenität des experimentellen Designs und der Zielparameter zwischen den eingeschlossenen Studien als zu groß erachtet wurde.

2. Schlafmusterstudie

2.1. Versuchstiere

Es wurden insgesamt 14 weibliche Sprague-Dawley Ratten (Envigo, Horst, Niederlande) für die vorliegende Studie eingesetzt. Die Tiere hatten bei der Ankunft ein Gewicht von 190 bis 210 g und waren 9 bis 11 Wochen alt. Ab dem Tag der Ankunft wurden die Tiere einzeln in Makrolon Typ III Käfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Die Käfige waren mit Weichholzgranulat (Grade 5, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) eingestreut und mit 14 g Nestmaterial (Enviro Dri®, Claus GmbH, Limburgerhof, Deutschland) ausgestattet. Einmal wöchentlich erhielten die Ratten einen sauberen Käfig und neues Nestmaterial. Die Ratten hatten *ad libitum* Zugang zu Futter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser. Die Tiere wurden unter kontrollierten Umweltbedingungen bei 22 bis 24°C und 45 bis 60 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer 12-stündigen Hell-Dunkel-Phase (Hellphase zwischen 5 Uhr morgens und 17 Uhr abends) gehalten. Bei der Ankunft wurden den Tieren zufällig eine Tier-ID basierend auf einer „Einfachen Randomisierung“ mit R, Version 3.6.1 via RStudio, Version 1.2.1335 zugewiesen.

Die Studie wurde von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen: ROB-55.2-2532.Vet_02- 16-105) und wurde gemäß der EU Richtlinie 2010/63/EU durchgeführt. Die Veröffentlichung der Daten und die Durchführung der Versuche wurden in Übereinstimmung mit den ARRIVE-Richtlinien (KILKENNY et al., 2010) und der Basler Erklärung einschließlich des 3R-Konzepts durchgeführt.

2.2. Studiendesign

Die Ratten wurden randomisiert mittels einer stratifizierten Randomisierung unter Verwendung von R, Version 3.6.1. via RStudio, Version 1.2.1335, zwei Versuchsgruppen zugeordnet (nicht-kabel-gebunden, n = 7 Tiere; kabel-gebunden, n = 7 Tiere). Als Tiermerkmal für die stratifizierte Randomisierung, das über beide Gruppen ausgeglichen werden sollte, wurde das Körpergewicht der Tiere gewählt. Die stratifizierte Randomisierung wurde eine Woche vor den telemetrischen Aufzeichnungen mit dem aktuellen Körpergewicht der Tiere durchgeführt.

Nach Ankunft wurde den Tieren eine einwöchige Habituationsphase gewährt. In dieser Phase wurde zweimal täglich ein sanftes *Handling* durchgeführt, wobei die Ratten aus dem Käfig genommen wurden. Durch das *Handling* sollten sich die Ratten an den Versuchsdurchführenden und die geplanten Versuche gewöhnen und durch *Handling* hervorgerufener Stress sollte auf ein Minimum reduziert werden. Zusätzlich wurden

während der Habituationsphase die Basalwerte für den RGS, den Irwin-Score und die Nestbauaktivität ermittelt und Kot gesammelt.

Nach einer dreieinhalb-wöchigen Erholungsphase von dem operativen Eingriff wurden die telemetrischen Basalwerte (EEG, EMG) erhoben. Die Aufnahme der Basalwerte erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 23 Stunde im Heimkäfig. In Stunde 24 wurden die Tiere untersucht, gewogen sowie die Daten gespeichert.

Anschließend wurden die Tiere für vierzehn Tage einzeln in modifizierte Plexiglaskäfige (800 cm²) gesetzt. In diesen Käfigen wurden elektroenzephalographische (EEG), elektromyographische (EMG) und Aktivitätsaufzeichnungen durchgeführt sowie verhaltensbezogene und biochemische Parameter untersucht. Die Ratten in der kabelgebundenen Gruppe wurden mit einem Kabel (Gewicht: 8,5 g, Länge: 42 cm) verbunden, das mit einem Rotationssystem ausgestattet war (Abbildung 1). Das Kabel wurde an einem festen Punkt am Deckel der Glaskammer mit dem Rotationssystem verbunden. Die Länge des Kabels und das Rotationssystem ermöglichten eine freie Bewegung der Tiere innerhalb der Käfige. Da die telemetrischen Aufzeichnungen beider Gruppen von den implantierten Transpondern gewonnen wurden, diente das Kabel nicht zur Aufzeichnung. Um wichtige Informationen über die Gewöhnung an das Kabel zu gewinnen, wurden die Aufzeichnungen unmittelbar nach dem ersten Anschluss an das Kabel begonnen.

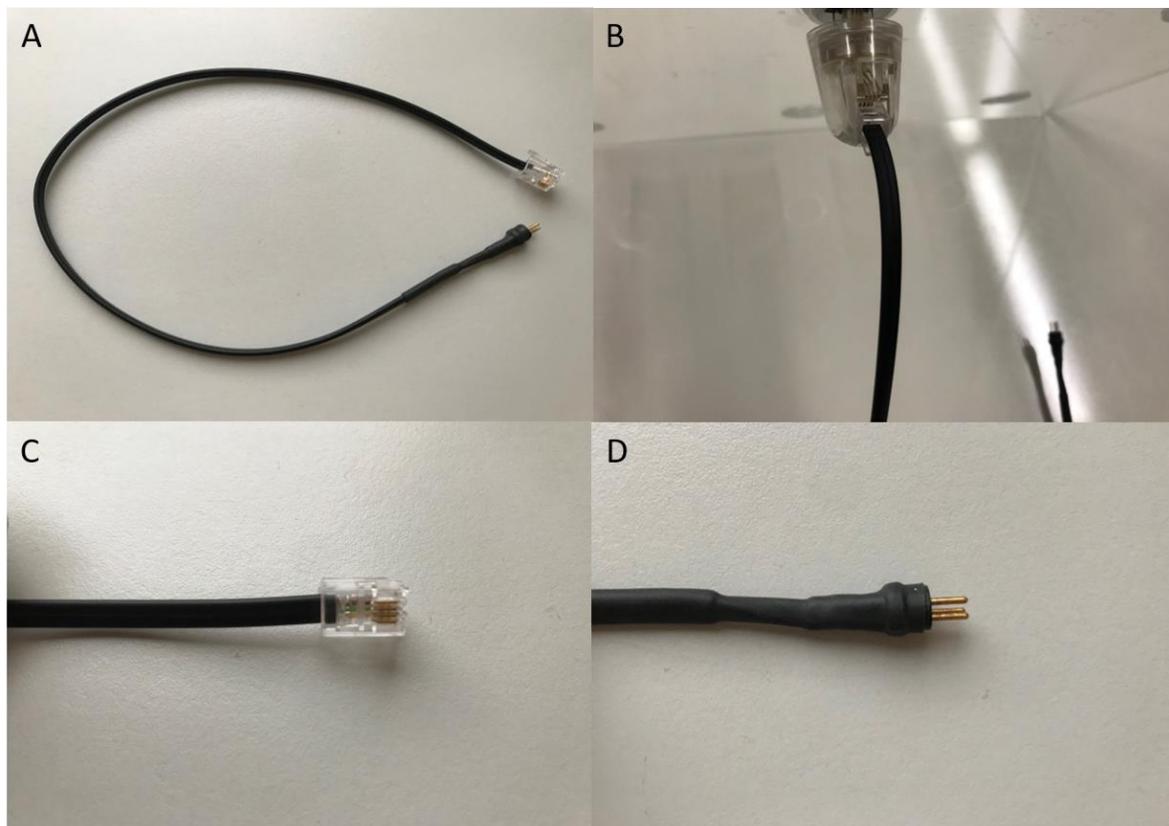


Abbildung 1. Verwendetes Kabel (A) für die kabelgebundene Gruppe. Kabel, das mit dem Rotations-System verbunden ist (B). Distales (C) und proximales (D) Ende des Kabels.

Einen Tag nach dem experimentellen Beobachtungszeitraum wurden die Tiere mit Natrium-Pentobarbital (i.p.; 600 mg/kg Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) euthanasiert. Um Schmerzen während der Euthanasie zu verhindern, wurde den Tieren vorab Metamizol (p.o.; 100 mg/kg, Vetalgin®, MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim, Deutschland), verdünnt mit einer 0,2 %igen Saccharin-Lösung, verabreicht. Anschließend wurden die Blutproben für die Bestimmung der Serum-Corticosteron-Konzentration via Herzpunktion entnommen, woraufhin die Tiere mit einer phosphatgepufferter 0,9 %igen Kochsalzlösung und einer 4 %igen Paraformaldehydlösung perfundiert wurden.

Während der Studiendurchführung war der durchführende Wissenschaftler aufgrund des deutlich sichtbaren Kabels nicht verblindet; die Wissenschaftler waren jedoch bei der Auswertung der Schlafmusterdaten und bei der Auswertung der biochemischen Daten verblindet.

Das Studiendesign und der zeitliche Ablauf der Studie ist in Abb. 2 dargestellt.

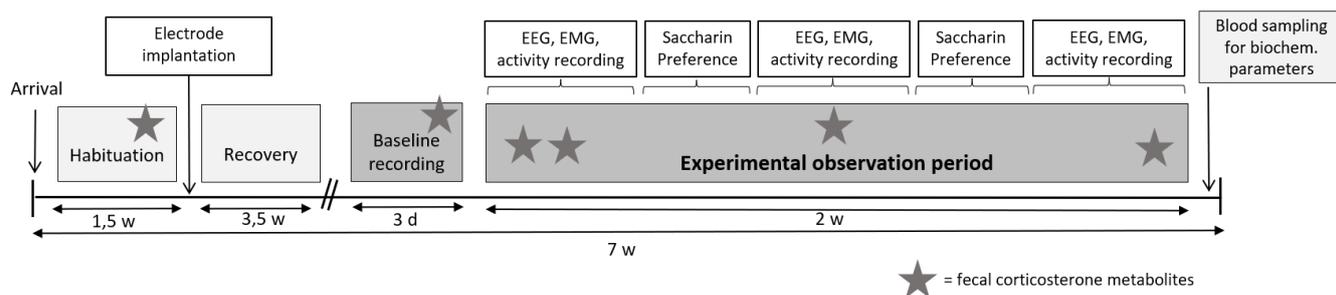


Abbildung 2. Studiendesign. EEG: elektroencephalographisch; EMG: elektromyographisch.

2.3. Elektroden- und Transmitterimplantation

Die Operationen wurden während der Hellphase (08:00 - 15:00 Uhr) unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Die Allgemeinanästhesie wurde mit 4 % Isofluran (Isofluran CP®, Henry Schein Vet, Hamburg, Deutschland) und 1 Liter pro Minute Sauerstoff eingeleitet. Das perioperative Schmerzmanagement bestand aus Meloxicam s.c. (2 mg/kg, Metacam®, Boehringer Ingelheim, Deutschland, 30 min prä- und 24h, 48h, 72h postoperativ) und Metamizol s.c. (100 mg/kg, Vetalgin®, Covetrus, Deutschland, während der Operation). Die Allgemeinanästhesie wurde mit 2 % Isofluran (Isofluran CP®, Henry Schein Vet, Hamburg, Deutschland) und 1/2 Liter pro Minute Sauerstoff erhalten. Ein adäquates Anästhesiemanagement erfolgte durch die regelmäßige Kontrolle des Zwischenzehenreflexes und der Körpertemperatur. Um die Tiere vor Auskühlung während des Eingriffs zu schützen, wurden Wärmematten verwendet.

Zur chirurgischen Implantation des telemetrischen Transponders und der Elektroden wurden die Tiere in sternaler Position in einem stereotaktischen Rahmen fixiert. Die

Operationsstellen wurden vor der Desinfektion mit Jodpovidon (Braunol®, B.Braun, Melsungen, Deutschland) rasiert. Das Lokalanästhetikum Bupivacain (4 mg/kg, 0,5 %, Jenapharm®, Mibe GmbH, Brehna, Deutschland) wurde subkutan an die Stelle der Transponderimplantation injiziert. Bupivacain mit Epinephrin (4 mg/kg, 0,5 % + 0,0005 %, Jenapharm®, Mibe GmbH, Brehna, Deutschland) wurde subkutan in das Operationsgebiet der Elektrodenimplantation am Kopf injiziert.

Nach einer 10-minütigen Einwirkungszeit der Lokalanästhesie wurde eine Inzision der Haut (ca. 1 cm) im Bereich der linken Schulter durchgeführt. Der telemetrische Transponder wurde subkutan paramedian zur Wirbelsäule auf Höhe des Thorax auf der linken Seite implantiert. Zur Implantation der EMG-Elektroden in den Nackenmuskel (Musculus trapezius) wurde das Nackenmuskelgewebe mit einer 21G Kanüle senkrecht zur Längsachse der Faserbündel getunnelt. Das Kabel des telemetrischen Transponders wurde in die Kanüle eingebracht und unter dem getunnelten Muskelgewebe durchgezogen. An der Spitze wurde die Isolierung des Kabels entfernt und etwas hochgeschoben, sodass der Draht sichtbar wurde. Auf beiden Seiten des Muskelgewebes wurden Befestigungsknoten mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial angebracht. Das zweite Kabel wurde mit der gleichen Operationstechnik entlang der gleichen Muskelfasergruppe zwei bis drei Millimeter vom ersten Kabel entfernt implantiert.

Für die Implantation der Oberflächenschraubenelektroden wurde die Haut über dem Schädel eröffnet. Bupivacain mit Epinephrin wurde auf den Schädel getropft, bevor das Periost, im Bereich der Implantationsstellen der Schraubenelektroden, entfernt wurde. Die Oberflächen-Schraubenelektroden wurden nach JYOTI et al. (2010) implantiert, wobei in der vorliegenden Studie nur zwei Oberflächenelektroden verwendet wurden. Die Hippocampus-Koordinaten aus der genannten Studie an Mäusen wurden mit dem Rattengehirnatlas von Paxinos und Watson in Ratten-Koordinaten übersetzt (PAXINOS & WATSON, 2009).

Die Koordinaten für die Schraubenelektroden wurden stereotaktisch ermittelt und markiert. Die Kraniotomie erfolgte mit einem Dentalbohrer. Die beiden Schraubenelektroden wurden in die gebohrten Löcher implantiert, eine über dem Hippocampus (ap +3,9; lat +2,3) und die andere als Referenz über dem Kleinhirn (Bregma ap +10,5). Dabei musste darauf geachtet werden, dass zum einen ein Kontakt zwischen Elektrode und Dura mater bestand und zum anderen Gehirngewebe nicht perforiert wurde.

Mit einem Trokar wurde die Haut im Nackenbereich untertunnelt, sodass die Kabel des telemetrischen Transponders subkutan in den eröffneten Bereich der Schraubenelektrodenimplantation geführt werden konnten. Die unisolierten Drähte der Kabel wurden mit den beiden Schraubenelektroden verbunden.

Die Schrauben wurden mit Dentalzement (Paladur, Heraeus®, Hanau, Deutschland) fixiert. In diesen Aufbau wurde ein Adapter für die Kabelverbindung eingebaut. Die Inzisionen

wurden mit Einzelknopfheften unter Verwendung von nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (MonoPlus 5/0, Smi AG, St. Vith, Belgien) verschlossen.

Um postoperativen Infektionen vorzubeugen, wurde den Tieren zweimal täglich über einen Zeitraum von acht Tagen Marbofloxacin (s.c., Marbofloxacin; Marbocyl, 4 mg/kg, 1%, Covetrus, Hamburg, Deutschland) injiziert. Am Tag vor der Operation wurde mit den Injektionen begonnen.

2.4. Telemetrische Aufzeichnungen

Die telemetrischen Aufzeichnungen wurden mit der Ponemah-Software (Ponemah R, v. 5.2.0, DSI, St. Paul, USA) durchgeführt. Drei Aufzeichnungs-Kanäle, einer für die Aktivität, einer für das EMG und einer für das EEG, wurden für die Erhebung der Daten verwendet. Während der Aufzeichnung der Basalwerte wurde der Heimkäfig von jeder Ratte auf eine DSI-Telemetrieempfängerplatte (DSI, St. Paul, USA) platziert, der mit dem Erfassungscomputer verbunden war. Während der experimentellen Beobachtungszeit wurden die Telemetrieempfängerplatten unter den Plexiglaskäfigen platziert. Hierfür wurde ein Tragesystem für die Plexiglaskäfige angefertigt.

Nach der Erholungsphase wurden die Telemetrie-Transponder (HD-X02; 2,2 g; 1,7 cc) an drei aufeinanderfolgenden Tagen für die telemetrische Aufzeichnung der Basalwerte und an neun Tagen während der vierzehntägigen experimentellen Beobachtungsphase (Tag 1-3, Tag 6-8, Tag 12-14) für die Aufzeichnung ohne bzw. mit Kabel aktiviert. Es wurden die Zeitpunkte am Anfang (Tag 1-3), in der Mitte (Tag 6-8) und am Ende (Tag 12-14) gewählt, um eine Habituation des Kabels über den experimentellen Beobachtungszeitraum zu testen. Die Aktivierung der Transponder erfolgte mit einem Magneten, der in die Nähe des Transponders gebracht wurde. Die erfolgreiche Aktivierung wurde mit einem Radio überprüft. Die telemetrischen Daten wurden an den Aufnahmetagen 23 Stunden lang kontinuierlich aufgezeichnet. Die EEG- und EMG-Daten wurden mit 1000 Hz und die Aktivitätsdaten mit 50 Hz aufgenommen.

Ein Tier aus der kabel-gebundenen Gruppe wurde während der Erholungsphase aufgrund von Wundheilungsproblemen euthanasiert. Daher wurde für dieses Tier keine telemetrische Aufzeichnung durchgeführt.

2.5. Klinischer Score, Irwin-Score, Grimace-Scale, Körpergewicht

Während des gesamten Versuches erfolgte ein intensives Monitoring der Tiere.

Daten für den RGS und für den modifizierten Irwin-Score wurden vor dem operativen Eingriff (*Baseline*) und am ersten bis einschließlich vierten Tag nach dem operativen Eingriff erhoben.

Die vier verschiedenen Aktionseinheiten des RGS wurden für jedes Tier pro Tag gemittelt. Der „*Mean difference score*“ (Mittlere Differenz) wurde durch Subtraktion der individuellen Basalwerte ermittelt.

Für die Bewertung des modifizierten Irwin-Scores wurde der Gesamtscore für jedes Tier pro Tag als Summe aller bewerteten Parameter berechnet, wobei die Vorzeichen (Minus und Plus) nicht berücksichtigt wurden, das heißt alle Abweichungen vom Normalwert wurden berücksichtigt. Parameter, die eine zusätzliche Interaktion mit dem Tier (zum Beispiel durch Berührung) erforderten, wurden bei dem modifizierten Irwin-Score nicht berücksichtigt, um eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch zusätzlichen Stress zu vermeiden.

Im Einklang mit dem Tierversuchsantrag wurden die Tiere anhand des klinischen Standard-Scores intensiv überwacht. Eine tägliche Kontrolle des Körpergewichts fand während der Erhebung der Basaldaten in der ersten Woche, an den fünf aufeinanderfolgenden Tagen nach der Operation und während der experimentellen Beobachtungsphase statt. Während der Erholungsphase wurde das Körpergewicht wöchentlich kontrolliert.

2.6. Auswertung der Schlaf- und Aktivitätsmuster

Die Schlaf- und Aktivitätsmuster wurden nach CROUCH et al. (2018) analysiert. In der vorliegenden Studie erfolgte die Analyse der einzelnen Epochen über die Berechnung des Leistungsdichtespektrums, einer häufig angewandten und etablierten Methode in diesem Forschungsbereich. Das EEG wird dafür als Überlagerung einzelner Sinusschwingungen definierter betrachtet, deren Amplitude und Phasen mithilfe der Fourier Transformation bestimmt wird. Das Leistungsdichtespektrum kann aus der Amplitudeninformation abgeschätzt werden und liefert Informationen über die *Power* (Amplitude) der Oszillation der jeweiligen Frequenz.

Für jeden Aufzeichnungstag wurden die Telemetriedaten für die Analyse mit MATLAB R2020a (MathWorks Inc, USA) in das EDF-Format konvertiert. Die Rohdaten wurden in stündliche Epochen umgewandelt und ein Bandpassfilter wurde auf den relevanten Bereich zwischen 0.75 und 45 Hz angewendet. Anschließend wurden die Daten in 10-Sekunden-Epochen unterteilt. Jede Epoche wurde mit Hilfe der Spektralbandanalyse bewertet und einer von vier Vigilanzstadien zugeordnet: ruhiger Wachzustand (QWAKE), aktiver Wachzustand (AWAKE), NREM-Schlaf und REM-Schlaf. Die entsprechenden Werte waren: 0 (AWAKE), 1 (QWAKE), 2 (NREM-Schlaf) oder 3 (REM-Schlaf). Bei der Artefakt-Entfernung wurden alle Epochen ausgeschlossen, deren *Power* über dem festgelegten Schwellenwert (400 mV) lag. Die interessierenden EEG-Frequenzbänder wurden nach MONDINO et al. (2020) als Delta (1-5 Hz) und Theta (5-9 Hz) definiert. Wenn innerhalb einer Epoche eine hohe Varianz im EMG auftrat, wurde die Epoche als WAKE

(Wachzustand) eingestuft. Die über Ponemah aufgezeichneten Aktivitätsdaten wurden verwendet, um Epochen als AWAKE zu bewerten. Alle anderen Epochen, die als WAKE bewertet wurden, wurden als QWAKE eingestuft. Eine Epoche wurde als REM-Schlaf gewertet, wenn das Theta- zu Deltaband Leistungsverhältnis mehr als 1,75 betrug, während das Tier inaktiv war. Wenn eine hohe Deltafrequenz vorlag und EMG sowie Aktivität niedrig waren, wurde die Epoche als NREM-Schlaf gewertet. Da Artefakte in den aufgezeichneten Signalen zu einer Reihe ungültiger Bewertungen führten, wurden die Aufzeichnungen manuell nachbewertet. Wegen technischer Probleme in den letzten 2 Stunden der Aufzeichnung bei einigen Tieren wurden die Analysen nur für die ersten 22 Stunden (Zeitgeber time 0-22) eines jeden Aufzeichnungstages durchgeführt.

2.7. Auswertung der Schlafarchitektur

Zur Beurteilung der allgemeinen Schlafarchitektur wurden die folgenden Informationen aus den Bewertungsvektoren, die Informationen über die Vigilanzstadien für jedes Tier pro Epoche liefern, abgeleitet: (i) der Anteil der Vigilanzstadien für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden während der 22 Stunden, (ii) die Verteilung der Dauer jedes Vigilanzstadiums (Bout-Längen) und (iii) die Anzahl der Übergänge zwischen Wachzustand (WAKE) und Schlafen (SLEEP), zwischen NREM-Schlaf und REM-Schlaf sowie zwischen QWAKE und AWAKE in der Hell- und Dunkelphase.

Bei der Analyse der Anteile der Vigilanzstadien wurde auf Unterschiede in den Basalwerten zwischen den beiden Gruppen geprüft. Bei der Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen den beiden Gruppen während des zweiwöchigen experimentellen Beobachtungszeitraums lag der Fokus auf dem ersten Tag, auf den ersten drei Tagen (früh) und den letzten drei Tagen (spät).

2.8. Quantitative EEG Analyse der *slow wave activity power*

Die Leistung der *slow wave activity* (SWA) während des NREM-Schlafs ist ein interessanter Marker und wurde gewählt, da sie ein Indikator für die Schlafqualität, abhängig vom vorherigen Wachsein ist (HUBER et al., 2000). Dies bedeutet, dass die Dauer des vorangegangenen Wachseins einer der Hauptfaktoren ist, der die spätere Gesamtschlafdauer und insbesondere die Schlafqualität beeinflusst (HUBER et al., 2000; VYAZOVSKIY & TOBLER, 2005).

Daher wurde die SWA-Power für jedes Tier und jeden Tag ermittelt. Hierfür wurde die spektrale Leistungsdichte für jede 10-s-Episode berechnet, die als NREM bewertet wurde. Die SWA-Power wurde als die kumulative *Power* von 0.5 bis 4 Hz definiert. Die Werte wurden für jedes Tier für die Dunkel- und Hellphase gemittelt.

2.9. Analyse des Verhaltens im Heimkäfig und der Saccharin-Präferenz

Die Bewertung der Nestbauaktivität wurde in Anlehnung an frühere Studien in unserem Institut durchgeführt (MÖLLER et al., 2018; SCHWABE et al., 2020). In der Woche vor der Operation und während des experimentellen Beobachtungszeitraums wurden täglich ein bis drei Stunden nach Beginn der Lichtphase Nest-Fotos gemacht. Anhand der Fotos wurde die Nestkomplexität mit einer Zahl zwischen 0 und 4 bewertet.

Der Saccharin-Präferenztest wurde in Anlehnung an frühere Studien (KLEIN et al., 2015; MÖLLER et al., 2018) aus unserem Institut und unserer Forschungsgruppe durchgeführt. Ein Test dauert normalerweise vier Tage. Am ersten und dritten Tag erhalten die Tiere zwei mit Wasser gefüllte Flaschen, um auf eine Seitenpräferenz zu testen. Am zweiten und vierten Tag erhalten die Tiere zwei Flaschen, die mit einer 0,1 %igen Saccharin-Lösung gefüllt sind. In der vorliegenden Studie wurde der Test auf zwei Tage verkürzt, um die Tiere während der telemetrischen Aufzeichnungen nicht mit der süßen Saccharin-Lösung vom Schlafen abzulenken. Am ersten Tag wurden zwei Wasserflaschen pro Käfig bereitgestellt und die Wasseraufnahme aus beiden Flaschen über 24 Stunden bewertet. Am zweiten Tag wurde die Flasche auf der rechten Seite mit einer 0,1 %igen Saccharin-Lösung (Aldrich Saccharin $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) gefüllt. Die Aufnahme von Wasser und Saccharin-Lösung wurde für 24 Stunden bestimmt. Der Saccharin-Präferenztest wurde in der ersten (Tag 3 und 4) und in der zweiten (Tag 9 und 10) Woche des experimentellen Beobachtungszeitraums durchgeführt.

2.10. Analyse von Corticosteron und dessen Metaboliten

Die ersten Kotproben wurden während der Habituationsphase und der telemetrischen Aufzeichnung der Basalwerte gesammelt. Da sich Stress nach 12 bis 14 Stunden in der Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten widerspiegelt, wie von LEPSCHY et al. (2007) beschrieben wurde, haben wir am ersten und zweiten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums Kotproben gesammelt. Um den Einfluss einer möglichen Gewöhnung zu bewerten, wurden zusätzlich an Tag 8 und 14 des experimentellen Beobachtungszeitraums Kotproben gesammelt. Die Kotproben wurden zur gleichen Zeit um 19 Uhr gesammelt. Für die Analyse wurden die Kotproben getrocknet, zerkleinert und mit 80% Methanol extrahiert. Das Extrakt wurde mittels einem Schüttelinkubator (Stuart SI Orbital Shaking Incubator, Eindhoven, Niederlande) für 30 min geschüttelt und anschließend 15 min lang zentrifugiert. Insgesamt 500 μ l des daraus folgenden Überstands wurden aliquotiert und bis zur Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Analyse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten erfolgte mit einem Enzymimmunoassay (EIA) nach LEPSCHY et al. (2007) durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme in Wien.

Am Ende der Studie wurden Blutproben via Herzpunktion für die quantitative Bestimmung

der Serum-Corticosteron-Konzentration entnommen. Das Blut wurde in Eppendorf-Röhrchen gesammelt, in die vorab je 30 µl Antiprotease (Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) pipettiert wurden. Nach einer 45- bis 60-minütigen Koagulationszeit bei Raumtemperatur wurde das Blut zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abpipettiert und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Für die Analyse des Serum-Corticosterons wurde ein *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA, ELISA kit: Corticosteron rat/mouse ELISA, DEV9922, Demeditec) angewendet. Um die Corticosteron-Konzentration in den „Wells“ der Mikrotiterplatte, welche die einzelnen Proben enthielten, zu bestimmen, wurde die Absorption (das heißt die optische Dichte der einzelnen Proben) bei 450 nm mittels einem Mikroplatten-Spektralphotometers (Epoch 2 microplate reader, Biotek, Germany; Gen 5 Imager Software, Biotek, Germany) gemessen.

2.11. Auswertung der Aktivitätszählung

Um den Einfluss des Kabels auf das Aktivitätslevel (zurückgelegte Distanz, Geschwindigkeit) der Tiere zu untersuchen, wurde das mit Ponemah aufgenommene Aktivitätssignal ausgewertet. Die Aktivität, das heißt die Bewegung des Tieres innerhalb des Käfigs, wurde anhand der Änderung der Position des implantierten telemetrischen Transponders zu den Antennen in der telemetrischen Empfängerplatte in Counts pro Minute (cpm) erfasst. Wenn sich das Tier über die Empfängerplatte bewegte, wurde von der Software eine Count-Zahl abhängig von der zurückgelegten Distanz und der Geschwindigkeit generiert. Je weiter die zurückgelegte Distanz und je höher die Geschwindigkeit ist, desto höher war die generierte Count-Zahl.

Bei der Auswertung der Aktivitätszählung wurde die Gesamtaktivität pro Tier für sich nicht überschneidende, aufeinanderfolgende 2-Stunden-Episoden über die 22-stündige Aufnahmezeit gemittelt. Das Aktivitätssignal wurde, zusammen mit dem EEG- und EMG-Signal, an drei *Baseline*-Tagen unmittelbar vor der experimentellen Beobachtungsphase, am Anfang (erste drei Tage), in der Mitte (Tag 6 bis 8) und am Ende (Tag 12 bis 14) des experimentellen Beobachtungszeitraums aufgenommen.

2.12. Statistische Auswertung

Eine a priori *Power*-Analyse wurde basierend auf bestehenden Literaturdaten mit dem statistischen Programm *G*Power* 3.1.9.4.0 durchgeführt, um die Stichprobengröße (das heißt die Anzahl der Tiere pro Gruppe) für diese Studie zu bestimmen. Dabei wurde der prozentuale Anteil des REM-Schlafs pro Tag als Hauptergebnismaß betrachtet. Der relevante Unterschied wurde auf 2 % REM-Schlaf-Differenz festgelegt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für REM-Schlaf, von einer Gruppe mit Schlafentzug und von einer Kontrollgruppe, wurden aus Tabelle 1 von Guzman-Marin et al., 2008 (GUZMAN-MARIN et

al., 2008) entnommen. Die Bestimmung der Stichprobengröße, mit der berechneten Effektgröße von 2, ergab, dass eine Stichprobengröße von 6 Tieren pro Gruppe erforderlich war, um einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem Signifikanzniveau von 0.05 und einer *Power* von 0.80 festzustellen. Die a priori *Power*-Analyse wurde von Dr. Roelof Maarten van Dijk aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt. Aufgrund der mit dem Shapiro-Wilk-Test festgestellten Nicht-Normalverteilung der Daten und der relativ kleinen Stichprobengröße pro Gruppe, wurden nichtparametrische Tests durchgeführt, mit Ausnahme für Serum-Corticosteron, fäkale Corticosteron-Metaboliten, Körpergewicht und Aktivität.

Zur Bewertung möglicher Unterschiede zwischen den nicht-kabel-gebundenen und den kabel-gebundenen Ratten hinsichtlich des Anteils der Vigilanzstadien über den Beobachtungszeitraum von 22 Stunden wurde die *area under the receiver operating characteristic* (AUC) zusammen mit 10.000-fach gebootstrappten 95%-Konfidenzintervallen berechnet. Liegt der berechnete Wert außerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls (KI) liegt ein signifikanter Unterschied vor (HENTSCHKE & STÜTTGEN, 2011). Für die Berechnung der AUC wurde die *Measures-of-Effect-Size-Toolbox* für MATLAB verwendet (HENTSCHKE & STÜTTGEN, 2011). Um falsch positive Ergebnisse aufgrund von Mehrfachvergleichen zu vermeiden, wurden nur dann signifikante Unterschiede beschrieben, wenn sie in zwei benachbarten 2-Stunden-Episoden auftraten. Dieser Ansatz wurde bereits in ähnlicher Weise verwendet (AKEJU et al., 2014; KREUZER et al., 2020b). Für die Bewertung von Gruppenunterschieden bei der Anzahl der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien und bei der SWA-Power wurde der Mann-Whitney-U-Test (*two-tailed*) verwendet. Wir testeten auf Unterschiede in der Verteilung der Bout-Längen zwischen nicht-kabel-gebundenen und den kabel-gebundenen Ratten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und kumulativen Wahrscheinlichkeitskurven. Dieser Ansatz wurde auch schon früher in der Schlafforschung verwendet (WATSON et al., 2015; KREUZER et al., 2020a). Die statistische Auswertung der Schlafarchitektur und der SWA-Power wurde von unserem Kooperationspartner Dr. Matthias Kreuzer durchgeführt.

Die Werte für das Nestbauverhalten und für das Anhedonie-assoziierte Verhalten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (*two-tailed*) analysiert. Eine *two-way* ANOVA mit den Faktoren "nicht-kabel-gebunden/kabel-gebunden" und "Tage", gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur, wurde für die Bewertung der fäkalen Corticosteron-Metaboliten zwischen den beiden Gruppen innerhalb des experimentellen Beobachtungszeitraums durchgeführt. Zur Analyse der über alle experimentellen Beobachtungstage gemittelten fäkalen Corticosteron-Metaboliten und zur Analyse der Corticosteron-Serumspiegel wurde ein *unpaired* t-Test (*two-tailed*) durchgeführt. Zur Bewertung des Körpergewichts wurde eine *two-way* ANOVA mit den Faktoren " nicht-kabel-gebunden/kabel-gebunden" und "Zeit" durchgeführt, gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur. Für die Bewertung der

Aktivitätszahlen zwischen den beiden Gruppen während des experimentellen Beobachtungszeitraums wurde eine *two-way* ANOVA mit den Faktoren "nicht-kabelgebunden/kabelgebunden" und "Stunden" durchgeführt, gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur. Aktivitätsdaten, Verhaltensdaten und biochemische Daten wurden mit GraphPad Prism (v5.04) ausgewertet. Ein P-Wert von weniger als 0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Um die statistische Auswertung abzuschließen, wurden AUC-Werte und 10.000-fach gebootstrappte 95%-Konfidenzintervalle für die SLEEP/WAKE-Übergänge, die SWA-Power und für verhaltensbezogene und biochemische Parameter berechnet.

Mit der MATLAB-Funktion `fitlm` wurde ein lineares Regressionsmodell für die Anteile von Vigilanzstadien, Aktivität und anderen Verhaltensparametern erstellt, um mögliche Gewöhnungseffekte innerhalb der Gruppe während des gesamten Beobachtungszeitraums zu testen.

V. ERGEBNISSE

1. Systematisches Review

1.1. Identifizierte Publikationen

Bei unserer Suche in den Datenbanken wurden insgesamt 3355 Publikationen gefunden. Ausschluss von Studien vor 2005 ($k = 759$) und Entfernung von Duplikaten und Triplikaten ($k = 712$) ergab 1884 Publikationen für das Screening. Das Screening der Titel und Abstracts ergab 1532 Publikationen und das Screening der Volltexte 64 Publikationen. Die Überprüfung der Literaturlisten ergab 10 zusätzliche Publikationen. Insgesamt wurden 74 Publikationen in die vorliegende systematische Überprüfung inkludiert. Eine Zusammenfassung des Ablaufs zur Auswahl von Publikationen befindet sich in Abb. 3.

Die folgende Anzahl an Publikationen, welche die interessierenden Schmerzparameter bewerten, wurden identifiziert: 18 Publikationen beurteilten den MGS, 29 Publikationen beurteilten den RGS, 20 Publikationen beurteilten das Nestbauverhalten bei Mäusen, 1 Publikation beurteilte das Nestbauverhalten bei Ratten, 10 Publikationen beurteilten das Wühlverhalten bei Mäusen und 7 Publikationen beurteilten das Wühlverhalten bei Ratten. Insgesamt wurden 38 Publikationen mit Mäusen, 35 Publikationen mit Ratten und eine Publikation, in der sowohl Ratten als auch Mäuse als Tiermodell verwendet wurden, eingeschlossen.

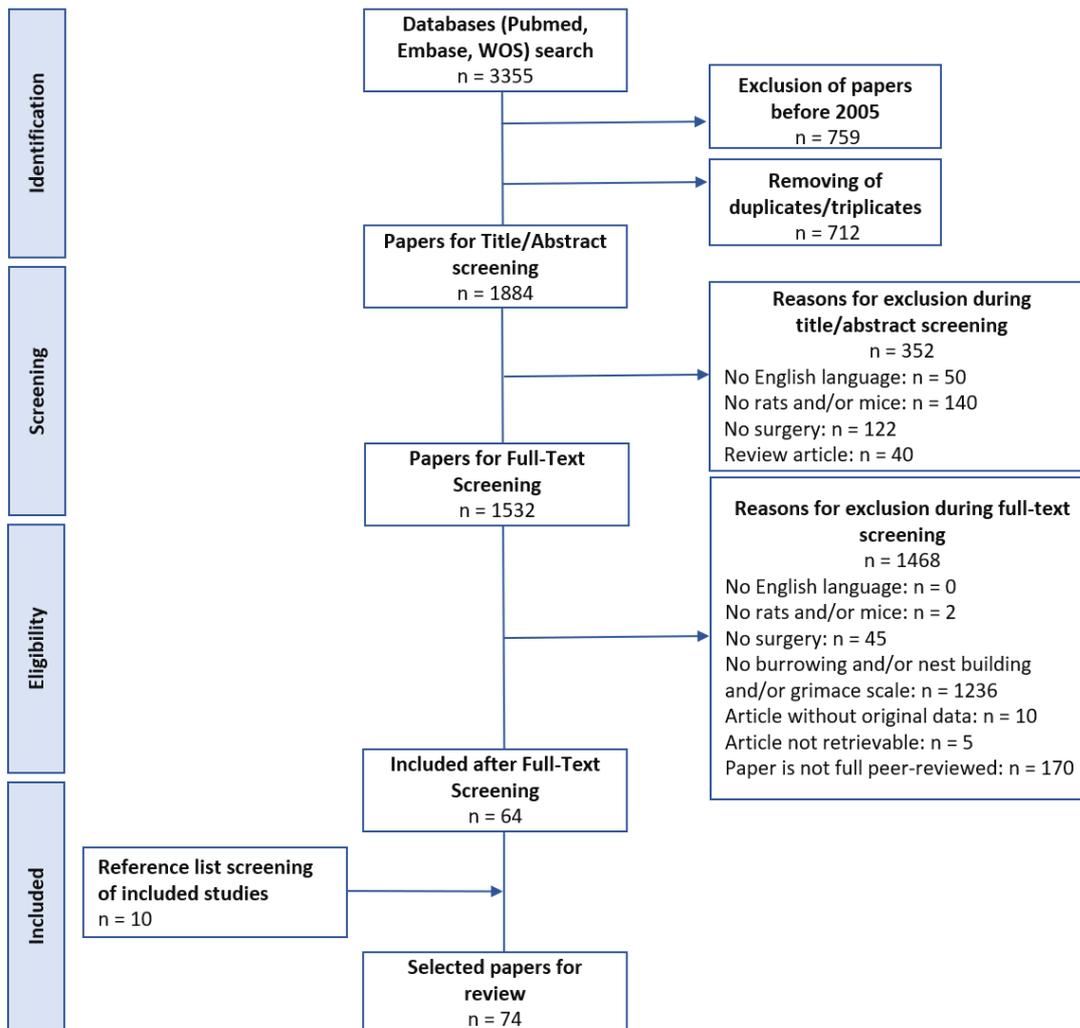


Abbildung 3. Fließdiagramm zum Prozess der Studiauswahl.

Die meisten Publikationen (65/74) bewerteten nur einen schmerzassoziierten Zielparameter. Eine Publikation bewertete sowohl den *Grimace-Scale* als auch die Nestbauaktivität. Zwei Publikationen bewerteten sowohl den *Grimace-Scale* als auch das Wühlverhalten. Fünf Publikationen bewerteten sowohl die Nestbauaktivität als auch das Wühlverhalten und nur eine Publikation bewertete alle drei Schmerzparameter.

Eine Liste mit allen inkludierten Publikationen und bewerteten Schmerzparameter befindet sich in Tabelle 4.

Study ID	Grimace-Scale	Nest-building	Burrowing
Abdelrahman_2019		■	■
Akintola_2017	■		
Andrews_2011			■
Arras_2007		■	
Beninson_2018		■	
Cesarovic_2014		■	
Chaves_2018	■		
Chi_2013	■		
Cho_2019	■		
Clemensen_2018	■		
De Rantere_2016	■		
Deseure_2018			■
Dwivedi_2016	■		
Evangelista-Vaz_2018	■		■
Falkenberg_2019		■	
Faller_2015	■		
Fujita_2018	■		
Gallo_2020	■	■	
Gao_2017	■		
Georgieva_2019			■
Guo_2017	■		
Harikrishnan_2019	■		
Herndon_2016		■	
Hsi_2020	■		
Jeger_2017	■		
Jirkof_2010			■
Jirkof_2012		■	■
Jirkof_2013a		■	■
Jirkof_2013b		■	■
Jirkof_2015	■		■
Jirkof_2018	■	■	■
Katri_2019			■
Kawano_2014	■		
Kawano_2017	■		
Kawano_2018	■		
Kendall_2016		■	
Klune_2019	■		
Korat_2017	■		
Korat_2018	■		
Koyama_2019	■		
Kumstel_2019		■	■
Langford_2010	■		
Lau_2013			■
Leach_2012	■		
Locatelli_2018	■		
Mai_2018	■		
Matsumiya_2012	■		



Tabelle 4. Inkludierte Publikationen und analysierte Schmerzparameter.

1.2. Postoperative Anwendung des *Grimace-Scales*

Beim Screening wurden **18 Studien** an Mäusen, die *Grimace-Scales* in der postoperativen Phase untersuchten, identifiziert (LANGFORD et al., 2010; LEACH et al., 2012; MATSUMIYA et al., 2012; FALLER et al., 2015; JIRKOF et al., 2015; DWIVEDI et al., 2016; MILLER et al., 2016; ROUGHAN et al., 2016; SAUER et al., 2016; AKINTOLA et al., 2017; EVANGELISTA-VAZ et al., 2018; JIRKOF et al., 2018; MAI et al., 2018; TUTTLE et al., 2018; CHO et al., 2019; REDAELLI et al., 2019; GALLO et al., 2020; HSI et al., 2020).

Darüber hinaus wurden beim Screening **29 Studien** an Ratten, die *Grimace-Scales* in der postoperativen Phase untersuchten, identifiziert (SOTOCINAL et al., 2011; MATSUMIYA et al., 2012; CHI et al., 2013; KAWANO et al., 2014; PRÉFONTAINE et al., 2015; WAITE et al., 2015; YOUSEF et al., 2015; DE RANTERE et al., 2016; KAWANO et al., 2016; SAINE et al., 2016; THOMAS et al., 2016; AKINTOLA et al., 2017; GAO et al., 2017; GUO & HU, 2017; JEGER et al., 2017; KORAT & KAPUPARA, 2017; PHILIPS et al., 2017;

SCHNEIDER et al., 2017; YAMANAKA et al., 2017; CHAVES et al., 2018; CLEMENSEN et al., 2018; FUJITA et al., 2018; KAWANO et al., 2018; KORAT & KAPUPARA, 2018; LOCATELLI et al., 2018; NUNAMAKER et al., 2018; KLUNE et al., 2019; KOYAMA et al., 2019; SREELATHA et al., 2019).

Die Studien wurden zwischen 2010 und 2020 veröffentlicht. Die erste Studie zur Analyse des *Grimace-Scales* in der postoperativen Phase bei Mäusen (MGS) wurde im Jahr 2010 veröffentlicht, die erste Studie bei Ratten 2011 (RGS). Für MGS-Studien umfassten die Herkunftsländer des Erstautors das Vereinigte Königreich und verschiedene europäische und nordamerikanische Länder. Bei Studien zum RGS umfasste die entsprechende Länderliste Länder aus Asien, Europa, Nord- und Südamerika (Tabelle 5). Im letzten Jahrzehnt wurde für MGS und RGS eine Zunahme der Anwendung beobachtet (Abbildung 4 A, B). Da die Suche in den Datenbanken Anfang 2020 durchgeführt wurde, wurde das Jahr 2020 nicht in den Grafiken berücksichtigt.

Während bei den MGS-Studien nur ein geringes Ungleichgewicht zwischen Studien mit ausschließlicher Verwendung männlicher (7/18 Studien) und weiblicher (5/18 Studien) Tiere bestand, wurden die meisten RGS-Studien, insgesamt 62 % (18/29 Studien), an männlichen Tieren durchgeführt (Tabelle 5; Abbildung 4 C, E). Sechs der insgesamt 18 MGS-Studien und vier der insgesamt 29 RGS-Studien verwendeten beide Geschlechter. In zwei Studien zum RGS wurde das Geschlecht nicht berichtet.

Die Analyse der verwendeten Maus- und Rattenstämme (Tabelle 5) ergab, dass C57BL/6J Mäuse am häufigsten (8/18 Studien) in den MGS-Studien eingesetzt wurden, gefolgt von Crl:CD1(ICR) Mäusen als zweithäufigster (5/18 Studien) verwendeter Mausstamm. Bei den weiteren Mausstämmen, über die in den identifizierten MGS Veröffentlichungen berichtet wurde, lag die Zahl der Studien pro Stamm bei eins oder zwei. Alle RGS-Studien haben Wistar-Ratten (k = 16) und/oder Sprague-Dawley-Ratten (k = 12) eingesetzt, mit Ausnahme von zwei Studien, bei denen der Stamm nicht berichtet wurde.

Das Alter bei der Ankunft zeigt, dass die Mehrzahl der MGS-Studien (13/18) an jung-adulten Mäusen durchgeführt wurden (Tabelle 5), wenn man von einer häufig angewandten Habituationsphase von 1-2 Wochen nach der Ankunft ausgeht. Das Körpergewicht zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs oder der Bewertung des MGS Scores wurde nicht in allen Studien angegeben. In nur einer Studie wurden jüngere Mäuse (< 6 Wochen) von einem kommerziellen Züchter bestellt. In dieser Studie waren die Tiere bei der Ankunft 4-5 Wochen und bei der Untersuchung 7-8 Wochen alt (SAUER et al., 2016). In einer anderen Studie wurde ein Alter von 6-18 Wochen bei der Ankunft beschrieben, was daraufhin deutet, dass in einem der Teilprojekte erwachsene Mäuse verwendet wurden (LANGFORD et al., 2010). Eine genaue Bestimmung des Alters, in dem der Eingriff durchgeführt wurde, war in dieser Studie nicht möglich.

Die extrahierten Informationen aus den RGS-Studien über das Alter bei der Ankunft zeigten

bei den Ratten eine breitere Altersspanne von 5-108 Wochen. Dies zeigt, dass die Studien an jungen, an erwachsenen sowie an alten Ratten durchgeführt wurden (Tabelle 5).

Während die meisten RGS-Studien alle Aktionseinheiten berücksichtigten, wurde in mehreren MGS-Studien die „*Veränderung der Vibrissen*“ nicht untersucht (4/18 Studien) oder stattdessen die „*Öffnung des Augenlids*“ und die „*Stellung der Ohren*“ evaluiert (4/18 Studien). Die verbleibenden Studien an Mäusen analysierten alle Aktionseinheiten (10/18 Studien). In CHO et al. (2019) wurden bei CD-1-Mäusen alle Aktionseinheiten analysiert, während bei BL6-Mäusen alle Aktionseinheiten außer die „*Veränderung der Vibrissen*“ untersucht wurden (Abbildung 4 D, F). Eine video- bzw. bildbasierte Analyse wurde in 61 % der MGS-Studien und 72 % der RGS-Studien berichtet (Tabelle 6).

Bezüglich der Art des chirurgischen Eingriffs war die Laparotomie mit 67 % der MGS- und 52 % der RGS-Studien das am häufigsten durchgeführte Verfahren. Weitere chirurgische Eingriffe bei den MGS-Studien waren Kraniotomie, Neurochirurgie, Laminektomie, Thorakotomie, Gefäßchirurgie, Fußsohlen-Inzision und Vasektomie. Zusätzlich zu den bereits genannten Eingriffen umfasste die Liste bei den RGS-Studien die Hemilaminektomie, die Laparoskopie und die subkutane Implantation (Abbildung 4 G, H). Basalwerte wurden in 10 der 18 MGS-Studien und 22 der 29 RGS-Studien erhoben. Ein gruppeninterner Vergleich (*within-subject-design*) wurde in 7 der MGS-Studien und 16 der RGS-Studien beschrieben. Eine signifikante Änderung des Grimace-Scales im gruppeninternen Vergleich wurde in 7 der MGS-Studien und 16 der RGS-Studien festgestellt. Eine Auswirkung des chirurgischen Eingriffs auf MGS und RGS im Vergleich zwischen den Gruppen (*between-subject-design*) wurde in 13 MGS-Studien und 24 RGS-Studien untersucht. Der Vergleich zwischen den Gruppen bestätigte einen Effekt in 11 der MGS-Studien und 20 der RGS-Studien (Tabelle 6).

Ein Einfluss eines einzelnen Analgetikums oder einer Kombination von Analgetika auf die Grimace-Scales im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in 8 von 18 MGS-Studien und 16 von 29 RGS-Studien analysiert. Die Analyse ergab einen Einfluss in 7 MGS-Studien und 16 RGS-Studien (Tabelle 7).

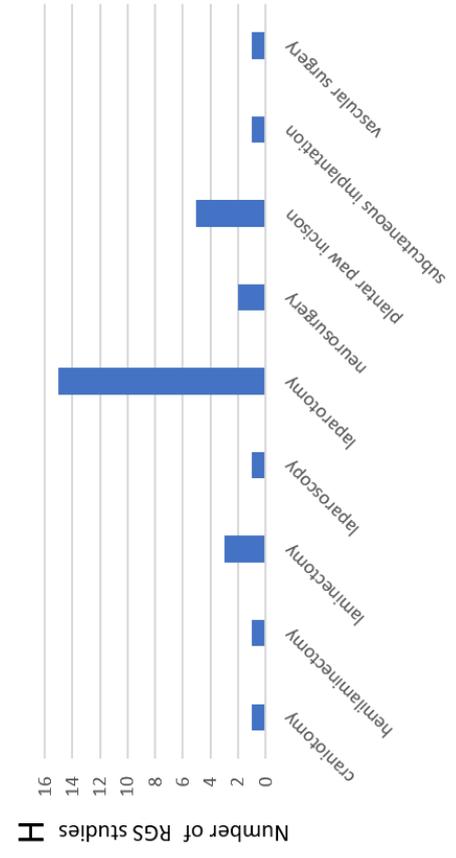
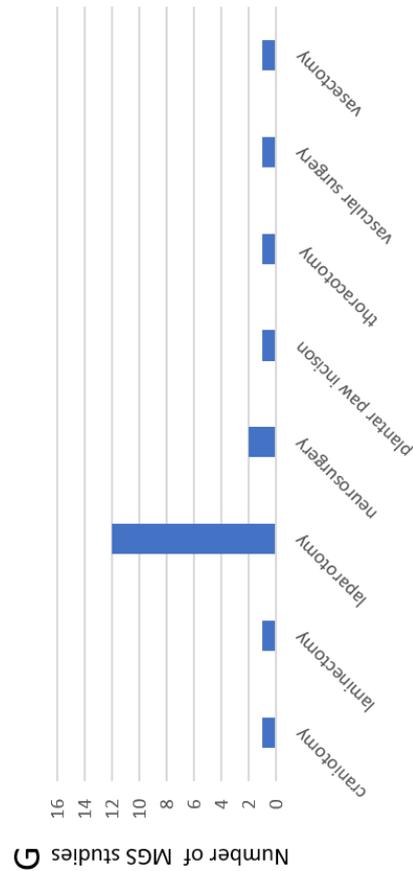
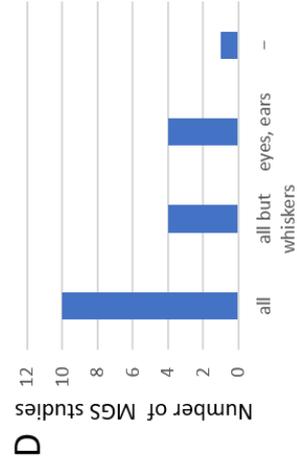
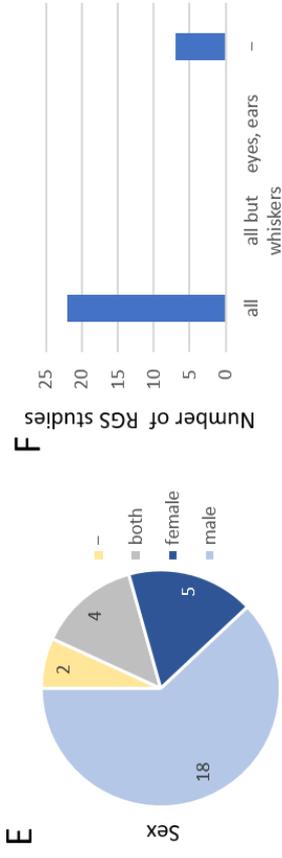
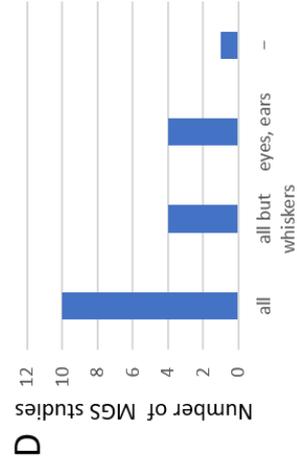
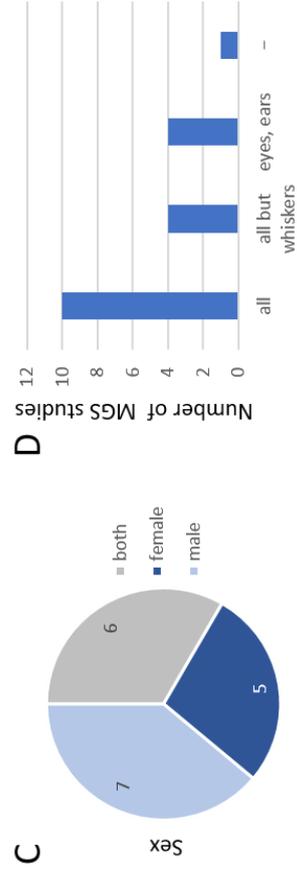
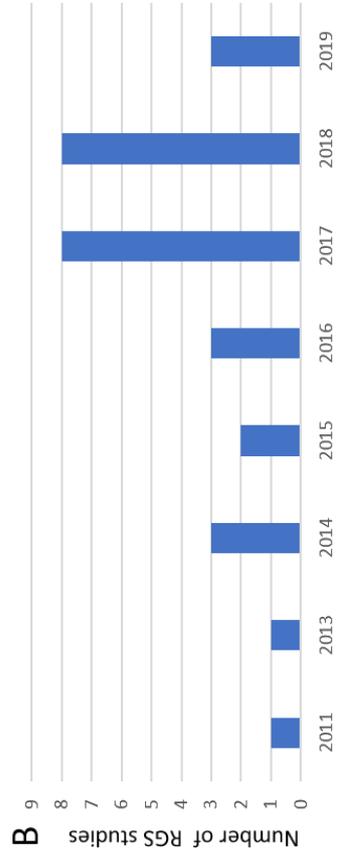
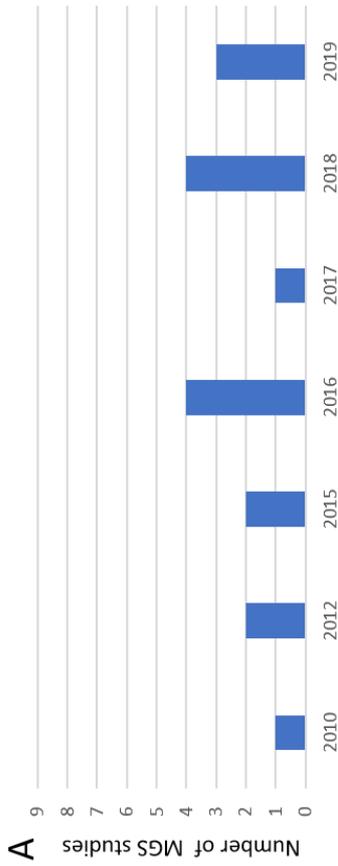


Abbildung 4. Studien-Charakteristika, Tiermodell-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Grimace-Scale* bei Mäusen (n = 18 Studien) und bei Ratten (n = 29 Studien). **A, B.** Anzahl der im letzten Jahrzehnt veröffentlichten Studien, in denen *Grimace-Scale* zur Bewertung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen (A) und Ratten (B) verwendet wurde. Die x-Achse zeigt die Jahre an. **C, E.** Anzahl der *Grimace-Scale* Studien bei Mäusen (C) und Ratten (E), in denen weibliche Tiere, männliche Tiere oder beide Geschlechter verwendet wurden. **D, F.** Bewertete Aktionseinheiten bei Mäusen (D) und Ratten (F). *all*: Alle Aktionseinheiten wurden bewertet. *all but whiskers*: Alle Aktionseinheiten außer der Veränderung der Vibrissen wurden bewertet. *eyes, ears*: Öffnung des Augenlids und Stellung der Ohren wurden bewertet. **G, H.** Art des chirurgischen Eingriffs bei Mäusen (G) und Ratten (H).

Mice:

Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Strain	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]
Akintola_2017	2017	USA	C57BL/6J	Jackson Laboratories	male	10 to 12	-	-
Cho_2019a	2019	Canada	Cri:CD1(ICR)	in-house, Charles River	both	6 to 8	-	-
Cho_2019b	2019	Canada	C57BL/6N	Charles River	both	6 to 8	-	-
Dwivedi_2016*	2016	Canada	C57BL/6J	Jackson Laboratories	both	10 to 12	-	-
Evangelista-Vaz_2018	2018	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	18 to 22	-
Faller_2015	2015	UK	C57BL/6J	Harlan UK	female	-	-	-
Gallo_2020	2019	USA	Cri:CD1(ICR)	Charles River	male	8 to 9	-	-
Hsi_2020	2020	USA	-	-	both	7 to 9	25.5 to 44.7	-
Jirkof_2015	2015	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	-	-
Jirkof_2018	2018	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	-	-
Langford_2010	2010	Canada	Cri:CD1(ICR)	in-house breeding	both	6 to 18	-	-
Leach_2012	2012	UK	Cri:CD1(ICR)	Charles River	male	-	30 to 40	-
Mai_2018	2018	Canada	C57BL/6J	Charles River	male	8 to 12	20 to 25	-
Matsumiya_2012	2012	Canada	Cri:CD1(ICR)	Charles River	both	6 to 8	-	-
Miller_2016	2016	UK	CBA	Charles River	male	-	25.6 to 28.7	-
Redaelli_2019	2019	Italy	C57BL/6N	Charles River	male	8 to 9	25	-
Roughan_2016	2016	UK	BALB/C	Charles River	male	-	25 to 30	-
Sauer_2016*	2016	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	4 to 5	-	-
Tuttle_2018	2018	USA	Cri:CD1(ICR)	Charles River	both	6 to 12	-	-

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Rats:									
Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Strain	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]	
Akintola_2017	2017	USA	SD	Envigo	male	10 to 13	-	-	-
Chaves_2018	2018	Brazil	Wistar	Animal Colony of the Instituto Evandro Chagas	male	13 to 17	250 to 350	-	-
Chi_2013	2013	Japan	Wistar	-	male	52 to 56	550 to 640	-	-
Clemensen_2018	2018	Denmark	SD	Taconic	male	8	296 to 302	-	-
De Rantere_2016	2018	Canada	Wistar	Charles River	male	8	-	-	-
Fujita_2018	2018	Japan	SD	SLC Ltd	male	-	-	246 to 274	-
Gao_2017	2017	China	Wistar	Animal house of Beijing Shijitan Hospital	-	9 to 11	275 to 325	-	-
Guo_2017	2017	China	Wistar	-	male	104 to 108	550 to 640	-	-
Harikrishnan_2019	2019	India	Wistar	Charles River	female	9 to 12	240 to 280	-	-
Jeger_2017*	2017	Switzerland	Wistar	-	male	-	340 to 492	-	-
Kawano_2014	2014	Japan	Wistar	-	male	104 to 108	-	-	-
Kawano_2017	2017	Japan	SD	-	male	-	-	-	-
Kawano_2018a*	2018	Japan	Wistar	-	male	9 to 17	-	-	-
Kawano_2018b*	2018	Japan	Wistar	-	male	83 to 96	-	-	-
Klune_2019	2019	USA	Wistar and SD	Charles River	female	6	150 to 350	-	-
Korat_2017	2017	India	-	in-house	both	-	267 to 310	-	-
Korat_2018	2018	India	-	in-house	both	-	265 to 315	-	-
Koyama_2019a	2019	Japan	Wistar	-	male	9 to 17	-	-	-
Koyama_2019b	2019	Japan	Wistar	-	male	80 to 104	-	-	-
Locatelli_2018*	2018	Japan	Wistar	Alfresa Shinohara Chemicals Corporation	male	83 to 96	-	-	-
Nunamaker_2018	2018	USA	SD	Envigo	female	-	199.6 to 215	-	-
Oliver_2014	2014	Canada	SD	in-house	female	-	284 to 420	-	-
Phillips_2016	2016	USA	SD	Harlan	male	-	275 to 349	-	-
Prefontaine_2014	2014	Canada	SD	Charles River	male	-	275 to 325	-	-
Saine_2016	2016	Canada	SD	Charles River	male	-	300 to 380	-	-
Schneider_2017*	2017	USA	SD	Charles River	male	-	275 to 300	-	-
Sotocinal_2011	2011	Canada	Wistar	Charles River	both	6 to 8	200 to 250	-	-
Thomas_2016	2016	UK	Wistar	Charles River	female	58 to 64	270	-	-
Waite_2015	2015	USA	Wistar	Charles River	both	-	250 to 300	-	-
Yamanka_2017	2017	Japan	Wistar	Charles River	male	5 to 6	135 to 180	-	-
Yousef_2015	2015	Italy	SD	-	-	-	225 to 250	-	-

Tabelle 5. Studien-Charakteristika und Tiermodell-Charakteristika für *Grimace-Scale* bei Mäusen (n = 18 Studien) und Ratten (n = 29 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Cho_2019a und b, Koyama_2019a und b). – nicht berichtet.

Mice:

Study ID	Scored individual action units	Range of scores	Video/Image based evaluation	Time of day during evaluation	Baseline	Significant alteration of grimace scale parameters:		Evaluated parameter/Comments
						within subject comparison	between subject comparison	
Akintola_2017	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	-	Mean score
Cho_2019a	all	-	YES	-	YES	-	YES	Mean difference score
Cho_2019b	all but whiskers	-	YES	-	YES	-	YES	Mean difference score
Dwivedi_2016*	-	0 to 3	-	-	-	-	YES	Mean score
Evangelista-Vaz_2018	orbital tightening, ear position	0 to 2	NO	-	-	-	YES	Composite behavioral score
Faller_2015	all	0 to 2	YES	-	-	-	YES	Mean score
Gallo_2020	all	0 to 2	YES	07 am to 10 am	YES	YES	-	Mean score
Hsi_2020	all	0 to 2	-	-	-	-	NO	Mean score
Jirkof_2015	orbital tightening, ear position	0 to 2	-	-	-	-	YES	Composite behavioral score
Jirkof_2018	orbital tightening, ear position	-	-	-	-	-	YES	Composite behavioral score
Langford_2010	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	-	Mean difference score
Leach_2012	all but whiskers	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Mai_2018	all	0 to 3	-	-	-	-	YES	Mean score
Matsumiya_2012	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean difference score
Miller_2016	all but whiskers	-	YES	-	YES	YES	-	Mean score
Redaelli_2019	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Roughan_2016	all but whiskers	0 to 2	YES	-	YES	YES	NO	Mean score
Sauer_2016*	orbital tightening, ear position	0 to 2	-	-	-	-	-	Composite behavioral score
Tuttle_2018	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean score, Mean difference score

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Rats:

Study ID	Scored individual action units	Range of scores	Video/Image based evaluation	Time of day during evaluation	Baseline	Significant alteration of grimace scale parameters:		Evaluated parameter/Comments
						within subject comparison	between subject comparison	
Akintola_2017	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	NO	Mean score
Chaves_2018	all	0 to 2	YES	-	-	YES	YES	Mean score
Chi_2013	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	-	Mean score
Clemensen_2018	all	0 to 2	NO	-	YES	-	YES	Mean score
De Rantere_2016	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Fujita_2018	all	0 to 8	-	-	-	-	NO	Mean score
Gao_2017	-	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Guo_2017	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean score
Harikrishnan_2019	all	-	YES	09 am to 3 pm	YES	-	YES	Mean difference score
Jeger_2017 ⁺	all	0 to 2	-	-	-	-	YES	Mean score
Kawano_2014	all	0 to 2	-	-	YES	YES	-	Mean score
Kawano_2017	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean score
Kawano_2018 ⁺	-	0 to 2	-	-	-	-	NO	Mean score
Klune_2019	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Korat_2017	-	0 to 4	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Korat_2018	-	0 to 3	YES	-	YES	YES	YES	Total score
Koyama_2019	-	0 to 2	-	-	YES	YES	-	Mean score
Locatelli_2018 ⁺	-	-	-	-	-	-	NO	Mean score
Nunamaker_2018	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean score
Oliver_2014	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	-	Mean score
Philips_2016	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Prefontaine_2014	all	0 to 1	YES	-	-	-	YES	Mean score
Saine_2016	all	0 to 2	YES	-	YES	-	YES	Mean score
Schneider_2017 ⁺	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Sotocinal_2011	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Thomas_2016	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Waite_2015	all	-	YES	-	YES	-	YES	Mean difference score
Yamanka_2017	all	0 to 2	YES	-	YES	YES	YES	Mean score
Yousef_2015	all	0 to 2	-	-	-	-	-	Mean score

Tabelle 6. Informationen zum Zielparameter *Grimace-Scale* bei Mäusen (n = 18 Studien) und Ratten (n = 29 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Cho_2019a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet.

Grimace scale
Mice:

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia*
Akintola_2017	CCI-ION	group	4 to 6	neurosurgery	ketamine and xylazine	-	-	-	-	-	-	-
Cho_2019a	carprofen 10 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	10	-	-	-	YES
Cho_2019b	caprofen 25 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	caprofen	s.c.	25	-	-	-	YES
Cho_2019c	meloxicam 2 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	2	-	-	-	YES
Cho_2019d	meloxicam 5mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	5	-	-	-	YES
Cho_2019e	buprenorphine 0.1 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	YES
Cho_2019f	carprofen 10 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	10	-	-	-	YES
Cho_2019g	caprofen 25 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	caprofen	oral (drinking supply)	25	-	-	-	YES
Cho_2019h	meloxicam 2 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	meloxicam	oral (drinking supply)	2	-	-	-	YES
Cho_2019i	meloxicam 5mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	meloxicam	oral (drinking supply)	5	-	-	-	YES
Cho_2019j	buprenorphine 0.1 mg/kg	single before surgery	1	craniotomy	isoflurane	buprenorphine	oral (drinking supply)	0.1	-	-	-	YES
Dwivedi_2016*	laparotomy + CLP	-	-	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	-
Evangelista-Vaz_2018	surgery + anaesthesia + tramadol injection + drinking supply	group	4 to 8	laparotomy	sevoflurane	tramadol	s.c.	25	tramadol	oral (drinking supply)	25	NO
Faller_2015	myocardial infarction	group	2 to 5	thoracotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.024	-	-	-	-
Gallo_2020	nest material + surgery + analgesia	single before surgery	1	vascular surgery	ketamine and xylazine	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	-	-
Hsi_2020	Surgery + dextrose (Dose Group)	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	2	buprenorphine	s.c.	0.1	-
Jirkof_2015a	OPT3 (surgery + anaesthesia + T3)	group	3 to 6	laparotomy	sevoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	YES
Jirkof_2015b	OPSB (surgery + anaesthesia + SB)	group	3 to 6	laparotomy	sevoflurane	buprenorphine SR	s.c.	2.2	-	-	-	YES
Jirkof_2018	anaesthesia and surgery with T;P in the drinking water	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	tramadol	oral (drinking supply)	-	paracetamol	oral (drinking supply)	-	YES
Langford_2010a	chronic constriction injury (CCI)	group	2	neurosurgery	-	-	-	-	-	-	-	-
Langford_2010b	incision model	group	2	plantar paw incision	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-
Langford_2010c	laparotomy model	group	2	laparotomy	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-
Langford_2010d	spared nerve injury (SNI)	group	2	neurosurgery	-	-	-	-	-	-	-	-
Leach_2012a	surgery + meloxicam	single before surgery	1	vasectomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	20	buprenorphine	s.c.	0.05	YES
Leach_2012b	surgery + bupivacaine	single before surgery	1	vasectomy	isoflurane	bupivacaine	wound infiltration	5	buprenorphine	s.c.	0.05	YES

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Maj_2018	severe CLP	group	3	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Matsumiya_2012a	laparotomy + buprenorphine 0.001	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.001	-	-	YES
Matsumiya_2012b	laparotomy + buprenorphine 0.01	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.01	-	-	YES
Matsumiya_2012c	laparotomy + buprenorphine 0.05	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	YES
Matsumiya_2012d	laparotomy + buprenorphine 0.1	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	YES
Matsumiya_2012e	laparotomy + carprofen 5	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	YES
Matsumiya_2012f	laparotomy + carprofen 10	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	10	-	-	YES
Matsumiya_2012g	laparotomy + carprofen 15	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	15	-	-	YES
Matsumiya_2012h	laparotomy + carprofen 20	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	20	-	-	YES
Matsumiya_2012i	laparotomy + carprofen 25	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	25	-	-	YES
Matsumiya_2012j	laparotomy + ketoprofen 1	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	1	-	-	YES
Matsumiya_2012k	laparotomy + ketoprofen 5	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	5	-	-	YES
Matsumiya_2012l	laparotomy + ketoprofen 10	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	10	-	-	YES
Matsumiya_2012m	laparotomy + ketoprofen 15	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	15	-	-	YES
Matsumiya_2012n	laparotomy + ketoprofen 20	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	20	-	-	YES
Matsumiya_2012o	laparotomy + acetaminophen 100	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	100	-	-	YES
Matsumiya_2012p	laparotomy + acetaminophen 300	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	300	-	-	YES
Matsumiya_2012q	laparotomy + acetaminophen 450	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	450	-	-	YES
Miller_2016	study group	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	meloxicam	s.c.	5
Redaelli_2019a	surgery + buprenorphine (step 2; control for carprofen)	group	2	laminectomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.15	-	-	YES
Redaelli_2019b	surgery + buprenorphine + carprofen (step2)	group	2	laminectomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.15	carprofen	s.c.	5
Roughan_2016a	laparotomy + meloxicam 1mg/kg	group	5	laparotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	1	-	-	-
Roughan_2016b	laparotomy + meloxicam 5 mg/kg	group	5	laparotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	5	-	-	-
Roughan_2016c	laparotomy + meloxicam 20 mg/kg	group	5	laparotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	20	-	-	-
Sauer_2016*	surgery + buprenorphine via 3 injections and via drinking water	group	4 to 8	laparotomy	sevoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	buprenorphine	oral (drinking supply)	-
Tuttle_2018	laparotomy + carprofen	group	5	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	50	-	-	YES

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Grimace scale
Rats:

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia*
Akintola_2017	CCI-ION (RGS post 10 days)	group	2	neurosurgery	ketamine and xylazine	fentanyl	s.c.	0.025	-	-	-	-
Chaves_2018a	laminectomy	single from surgery on	-	laminectomy	ketamine and xylazine	fentanyl	i.p.	0.03	-	-	-	-
Chaves_2018b	laminectomy + tramadol	single from surgery on	-	laminectomy	ketamine and xylazine	fentanyl	i.p.	0.03	tramadol	s.c.	4	-
Chi_2013a	isoflurane + laparotomy + ropivacaine	-	-	laparotomy	isoflurane	ropivacaine	wound infiltration	-	-	-	-	YES
Chi_2013b	isoflurane + laparotomy + morphine	-	-	laparotomy	isoflurane	morphine	s.c.	0.8	-	-	-	YES
Clemensen_2018a	hind-paw incision + low dose fentanyl	single before surgery	1	plantar paw incision	isoflurane	fentanyl	transdermal	0.1	-	-	-	YES
Clemensen_2018b	hind-paw incision + middle dose fentanyl	single before surgery	1	plantar paw incision	isoflurane	fentanyl	transdermal	0.33	-	-	-	YES
Clemensen_2018c	hind-paw incision + high dose fentanyl	single before surgery	1	plantar paw incision	isoflurane	fentanyl	transdermal	1	-	-	-	YES
De Rantere_2016	plantar incision	group	2	plantar paw incision	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-
Fujita_2018	Allopregnanalone	-	-	plantar paw incision	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-
Gao_2017a	treatment	group	2	laparotomy	isoflurane	solution containing Levobupivacaine, Dexibuprofen, Norepinephrine	wound infiltration	-	-	-	-	YES
Gao_2017b	positive control	group	2	laparotomy	isoflurane	solution containing Levobupivacaine, Dexibuprofen, Norepinephrine	systematically	-	-	-	-	YES
Guo_2017a	anesthesia + laparotomy + thalidomide 5 mg/kg	-	-	laparotomy	isoflurane	thalidomide	i.p.	5	-	-	-	YES
Guo_2017b	anesthesia + laparotomy + thalidomide 20 mg/kg	-	-	laparotomy	isoflurane	thalidomide	i.p.	20	-	-	-	YES
Guo_2017c	anesthesia + laparotomy + thalidomide 50 mg/kg	-	-	laparotomy	isoflurane	thalidomide	i.p.	50	-	-	-	YES
Harikrishnan_2019	laminectomy without SCI dental burr assisted (DBA-LAM)	single before surgery	1	laminectomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	meloxicam	s.c.	1	-
Jeger_2017*	long term + surgery + sham + nalbuphine	single from surgery on	3 to 4	vascular surgery	isoflurane	nalbuphine	s.c.	2	nalbuphine	i.v.	1	YES
Kawano_2014a	anesthesia with laparotomy and ketoprofen (IL + ketoprofen)	-	-	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	40	-	-	-	YES
Kawano_2014b	anesthesia with laparotomy and morphine (IL + morphine)	-	-	laparotomy	isoflurane	morphine	s.c.	0.8	-	-	-	YES
Kawano_2017a	surgery + control + ketoprofen 5	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	ketoprofen	i.p.	5	-	-	-	YES

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Kawano_2017b	surgery + control + ketoprofen 10	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	ketoprofen	i.p.	10	-	-	YES
Kawano_2017c	surgery + control + ketoprofen 15	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	ketoprofen	i.p.	15	-	-	YES
Kawano_2017d	surgery + control + ketoprofen 30	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	ketoprofen	i.p.	30	-	-	YES
Kawano_2017e	surgery + control + morphine 0.1	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	morphine	i.p.	0.1	-	-	YES
Kawano_2017f	surgery + control + morphine 0.5	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	morphine	i.p.	0.5	-	-	YES
Kawano_2017g	surgery + control + morphine 1.0	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	morphine	i.p.	1	-	-	YES
Kawano_2017h	surgery + control + morphine 1.5	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	morphine	i.p.	1.5	-	-	YES
Kawano_2017i	surgery + control + ropivacaine	single before surgery	-	plantar paw incision	isoflurane	ropivacaine	wound infiltration	-	-	-	YES
Kawano_2018*	isoflurane with laparotomy	group	-	laparotomy	isoflurane	ropivacaine	-	-	-	-	-
Klune_2019a	laparotomy + meloxicam	group	2	laparotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	2	-	-	YES
Klune_2019b	laparotomy + buprenorphine	group	2	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	YES
Korat_2017	treatment	group	2	laparotomy	isoflurane	solution containing levobupivacaine, ibuprofen and epinephrine	wound infiltration	-	-	-	YES
Korat_2018a	experimental group	group	2	laparotomy	isoflurane	solution containing levobupivacaine, buprenorphine and epinephrine	wound infiltration	-	-	-	YES
Korat_2018b	experimental group	group	2	laparotomy	isoflurane	solution containing levobupivacaine, buprenorphine and epinephrine	i.p.	-	-	-	YES
Koyama_2019a	anesthesia with surgery + ropivacaine	-	-	laparotomy	isoflurane	ropivacaine	wound infiltration	-	-	-	YES
Koyama_2019b	anesthesia with surgery + morphine	-	-	laparotomy	isoflurane	morphine	s.c.	0.8	-	-	YES
Locatelli_2018*	surgery + 80 mg/kg e-RESV + sirtinol	-	-	laparotomy	-	ropivacaine	-	-	-	-	-
Numamaker_2018a	surgery + meloxicam low dose	single before surgery	1	laparotomy	ketamine	meloxicam	s.c.	1	-	-	YES
Numamaker_2018b	surgery + meloxicam high dose	single before surgery	1	laparotomy	ketamine	meloxicam	s.c.	2	-	-	YES
Numamaker_2018c	surgery + buprenorphine low dose	single before surgery	1	laparotomy	ketamine	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	YES
Numamaker_2018d	surgery + buprenorphine high dose	single before surgery	1	laparotomy	ketamine	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	YES
Numamaker_2018e	surgery + SRB	single before surgery	1	laparotomy	ketamine	buprenorphine SR	s.c.	1.2	-	-	YES

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Oliver_2014a	surgery + buprenorphine s.c.	group	2 to 3	subcutaneous implantation	isoflurane	lidocaine	s.c.	2	buprenorphine s.c.	0.05	-
Oliver_2014b	surgery + buprenorphine oral	group	2 to 3	subcutaneous implantation	isoflurane	lidocaine	s.c.	2	buprenorphine p.o.	0.05	-
Oliver_2014c	surgery + meloxicam	group	2 to 3	subcutaneous implantation	isoflurane	lidocaine	s.c.	2	meloxicam s.c.	1	-
Philips_2016	hemilaminectomy + nerve root compression + meloxicam	group	2	hemi-laminectomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	2	-	-	YES
Prefontaine_2014a	laparoscopy	group	2	laparoscopy	isoflurane	-	-	-	-	-	-
Prefontaine_2014b	laparotomy	group	2	laparotomy	isoflurane	-	-	-	-	-	-
Saine_2016a	craniotomy + collagenase i.c. + Fentanyl 5	group	2	craniotomy	isoflurane	fentanyl	s.c.	5	-	-	YES
Saine_2016b	craniotomy + collagenase i.c. + Fentanyl 10	group	2	craniotomy	isoflurane	fentanyl	s.c.	10	-	-	YES
Saine_2016c	craniotomy + collagenase i.c. + Fentanyl 20	group	2	craniotomy	isoflurane	fentanyl	s.c.	20	-	-	YES
Schneider_2017*	laminectomy + cervical SCI	group	2 to 3	laminectomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-
Sotocinal_2011	laparotomy model	group	2	laparotomy	isoflurane	-	-	-	-	-	-
Thomas_2016a	Laparotomy + Morphine s.c.	group	3 to 5	laparotomy	sevoflurane	morphine	s.c.	3	-	-	YES
Thomas_2016b	Laparotomy + Morphine i.t.	group	3 to 5	laparotomy	sevoflurane	morphine	i.t.	0.2	-	-	YES
Waite_2015a	buprenorphine 15 min prior to surgery 0.01	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.01	-	-	YES
Waite_2015b	buprenorphine 15 min prior to surgery 0.025	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.025	-	-	YES
Waite_2015c	buprenorphine intraoperatively 0.01	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.01	-	-	YES
Waite_2015d	buprenorphine intraoperatively 0.025	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.025	-	-	YES
Waite_2015e	buprenorphine intraoperatively 0.05	group	4	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	YES
Waite_2015f	carprofen 15 min prior to surgery 5	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	YES
Waite_2015g	carprofen 15 min prior to surgery 15	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	15	-	-	YES
Waite_2015h	carprofen intraoperatively 5	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	YES
Waite_2015i	carprofen intraoperatively 10	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	10	-	-	YES
Waite_2015j	carprofen intraoperatively 15	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	15	-	-	YES
Waite_2015k	carprofen intraoperatively 25	group	4	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	25	-	-	YES
Waite_2015l	acetaminophen 15 min prior to surgery 50	group	4	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	50	-	-	YES
Waite_2015m	acetaminophen 15 min prior to surgery 100	group	4	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	100	-	-	YES
Waite_2015n	acetaminophen intraoperatively 25	group	4	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	25	-	-	YES
Waite_2015o	acetaminophen intraoperatively 50	group	4	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	50	-	-	YES
Waite_2015p	acetaminophen intraoperatively 100	group	4	laparotomy	isoflurane	acetaminophen	s.c.	100	-	-	YES

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Waite_2015q	ibuprofen 15 min prior to surgery	group	4	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	s.c.	15	-	-	YES
Waite_2015r	ibuprofen 15 min prior to surgery	group	4	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	s.c.	30	-	-	YES
Waite_2015s	ibuprofen intraoperatively 5	group	4	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	s.c.	5	-	-	YES
Waite_2015t	ibuprofen intraoperatively 15	group	4	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	s.c.	15	-	-	YES
Waite_2015u	ibuprofen intraoperatively 30	group	4	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	s.c.	30	-	-	YES
Waite_2015v	ketoprofen 15 min prior to surgery	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	10	-	-	YES
Waite_2015w	ketoprofen 15 min prior to surgery	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	25	-	-	YES
Waite_2015x	ketoprofen intraoperatively 5	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	5	-	-	YES
Waite_2015y	ketoprofen intraoperatively 10	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	10	-	-	YES
Waite_2015z	ketoprofen intraoperatively 15	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	15	-	-	YES
Waite_2015aa	ketoprofen intraoperatively 25	group	4	laparotomy	isoflurane	ketoprofen	s.c.	25	-	-	YES
Yamanka_2017	surgery + LPS + DEX + Atipamezol (Antagonist)	group	2	plantar paw incision	isoflurane	-	-	-	-	-	-
Yousef_2015	Nerve Autografting group	single before surgery	1	neurosurgery	tiletamine and zolazepam	-	-	-	-	-	-

Tabelle 7. Studiendesign-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Grimace-Scale* bei Mäusen (n = 18 Studien) und Ratten (n = 19 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Cho_2019a bis j). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet. * im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um die Wirkung der Analgesie zu testen, wurden die Gruppen mit chirurgischem Eingriff und Analgesie mit einer Kontrollgruppe verglichen, die als Gruppe mit chirurgischem Eingriff ohne Analgesie definiert wurde.

1.3. Postoperative Auswertung der Nestbauaktivität

Beim Screening wurden insgesamt 20 Studien identifiziert, die die Nestbauaktivität (engl. *nest-building*) bei Mäusen in der postoperativen Phase untersuchten (ARRAS et al., 2007; VAN LOO et al., 2007; PHAM et al., 2010; JIRKOF et al., 2012; JIRKOF et al., 2013b; JIRKOF et al., 2013c; CESAROVIC et al., 2014; ROCK et al., 2014; HERNDON et al., 2016; KENDALL et al., 2016; BENINSON et al., 2018; JIRKOF et al., 2018; OLIVER et al., 2018; YUAN et al., 2018; ABDELRAHMAN et al., 2019; FALKENBERG et al., 2019; ROBINSON-JUNKER et al., 2019; STAIB-LASARZIK et al., 2019; GALLO et al., 2020; KUMSTEL et al., 2020). Die Studien wurden zwischen 2007 und 2020 veröffentlicht. Nur eine Studie wurde identifiziert, die die Nestbauaktivität bei Ratten untersuchte (MÖLLER et al., 2018). Diese 2018 veröffentlichte Studie aus unserer Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss des chirurgischen Eingriffs auf die Nestbauaktivität bei weiblichen Sprague-Dawley Ratten nach einer Kraniotomie. Die Herkunftsländer der Erstautoren umfassten bei den Studien mit Mäusen unterschiedliche europäische Länder und die USA (Tabelle 5). Die Anzahl der publizierten Studien, in denen die Nestbauaktivität bei Mäusen in der postoperativen Phase untersucht wurden, stieg gegen Ende des letzten Jahrzehnts leicht an (Abbildung 5 A).

Zehn Studien haben männliche Mäuse und sieben Studien haben weibliche Mäuse für die Analyse der Nestbauaktivität verwendet. Die Verwendung von beiden Geschlechtern wurde in drei Studien beschrieben (Tabelle 8; Abbildung 5 B).

Die Mehrheit der Publikationen berichtete über den verwendeten Mausstamm. Die Analyse ergab eine Dominanz von Studien an C57BL/6J Mäusen mit einer Gesamtanzahl von acht Studien. In vier Publikationen wurde der verwendete C57BL/6-Unterstamm, das heißt J oder N, nicht spezifiziert. Die Anzahl der weiteren Mausstämme über die berichtet wurde betrug ein bis zwei (Tabelle 8).

Unter Berücksichtigung einer häufig angewendeten Habituationsphase von ein bis zwei Wochen nach der Ankunft, zeigt das Alter bei der Ankunft, dass die überwiegende Mehrheit der Studien (15/20) zur Untersuchung der Nestbauaktivität in der postoperativen Phase an jung-adulten Mäusen durchgeführt wurde (Tabelle 8). Die Mäuse waren in allen Studien bei der Ankunft nicht älter als 15 Wochen. Das Körpergewicht zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs oder der Bewertung der Nestbauaktivität wurde nur in zwei Studien berichtet. Jüngere Tiere (< 6 Wochen) wurden in nur zwei Studien vom kommerziellen Züchter bestellt, in der einen Studie im Alter von vier Wochen und in der anderen Studie im Alter von fünf bis acht Wochen (ARRAS et al., 2007; BENINSON et al., 2018). In der Studie von BENINSON et al. (2018) wird das Alter der Mäuse zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs oder der Bewertung der Nestbauaktivität nicht berichtet. In der Studie von ARRAS et al. (2007) wird berichtet, dass die Mäuse im Alter von fünfzehn Wochen einer Laparotomie unterzogen wurden, um die postoperativen Schmerzen an den drei folgenden Tagen zu beurteilen.

Bezüglich der Art des chirurgischen Eingriffs wurden die Tiere am häufigsten einer Laparotomie unterzogen (14/20 Studien). Andere chirurgische Eingriffe an Mäusen umfassten Gefäßchirurgie, Biopsie und Kraniotomie (Abbildung 5 C).

Baumwollquadrate waren das am häufigsten verwendete Nestmaterial bei den Studien mit Mäusen (13/20). Weitere Nestmaterialien umfassten Holzwolle, Knitterpapier, Papierstreifen, Kleenex-Tücher, Papiertücher, Heu und ein Nestpaket mit Knitterpapier (Tabelle 9; Abbildung 5 D). In nur fünf Studien wurde die angebotene Menge an Nestmaterial berichtet. Eine bildbasierte Auswertung der Nestbauaktivität gaben nur zwei Studien an (Table 9).

Die Mehrheit der Studien (12/20) führte die Beurteilung der Nestbauaktivität während der Hellphase durch. Nur eine Studie führte die Beurteilung der Nestbauaktivität während der Hell- und Dunkelphase durch. Insgesamt sieben Studien machten keine Angaben über den Zeitpunkt der Evaluation in Bezug auf die Hell- und Dunkelphase (Table 9).

Die Art der Auswertung und der erhobenen Parameter variierte in den Studien mit der Anwendung des TINT (= time-to-integrate to nest test, deutsch: Zeit bis zur Integration des Nestmaterials) in fünf Studien, der Beurteilung der Nestkonsolidierung in zwei Studien, der Bewertung der Nestkomplexität in elf Studien, dem % an integriertem Nestmaterial in drei Studien und der Dauer der Nestbauaktivität (% des Tages) in zwei Studien. Eine zusätzliche Auswertung des Verschmutzungsgrades wurde in nur einer Studie berichtet.

Die Auswertung von mehr als einem Parameter war eher eine Ausnahme (Tabelle 9; Abbildung 5 E)

Basalwerte wurden in 13 der 20 Studien an Mäusen erhoben. Ein gruppeninterner Vergleich (*within-subject design*) wurde in 8 Studien berichtet. Ein Vergleich zwischen den Gruppen (*between-subject-design*) wurde in zehn Studien berichtet. Der gruppeninterne Vergleich ergab in 8 Studien und der Vergleich zwischen den Gruppen in 7 Studien einen Effekt (Tabelle 9).

Ein Einfluss eines einzelnen Analgetikums oder einer Kombination von Analgetika auf die Nestbauaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in 7 der 20 Studien zur Nestbauaktivität an Mäusen analysiert. Ein Effekt wurde in 3 Studien beschrieben (Tabelle 10).

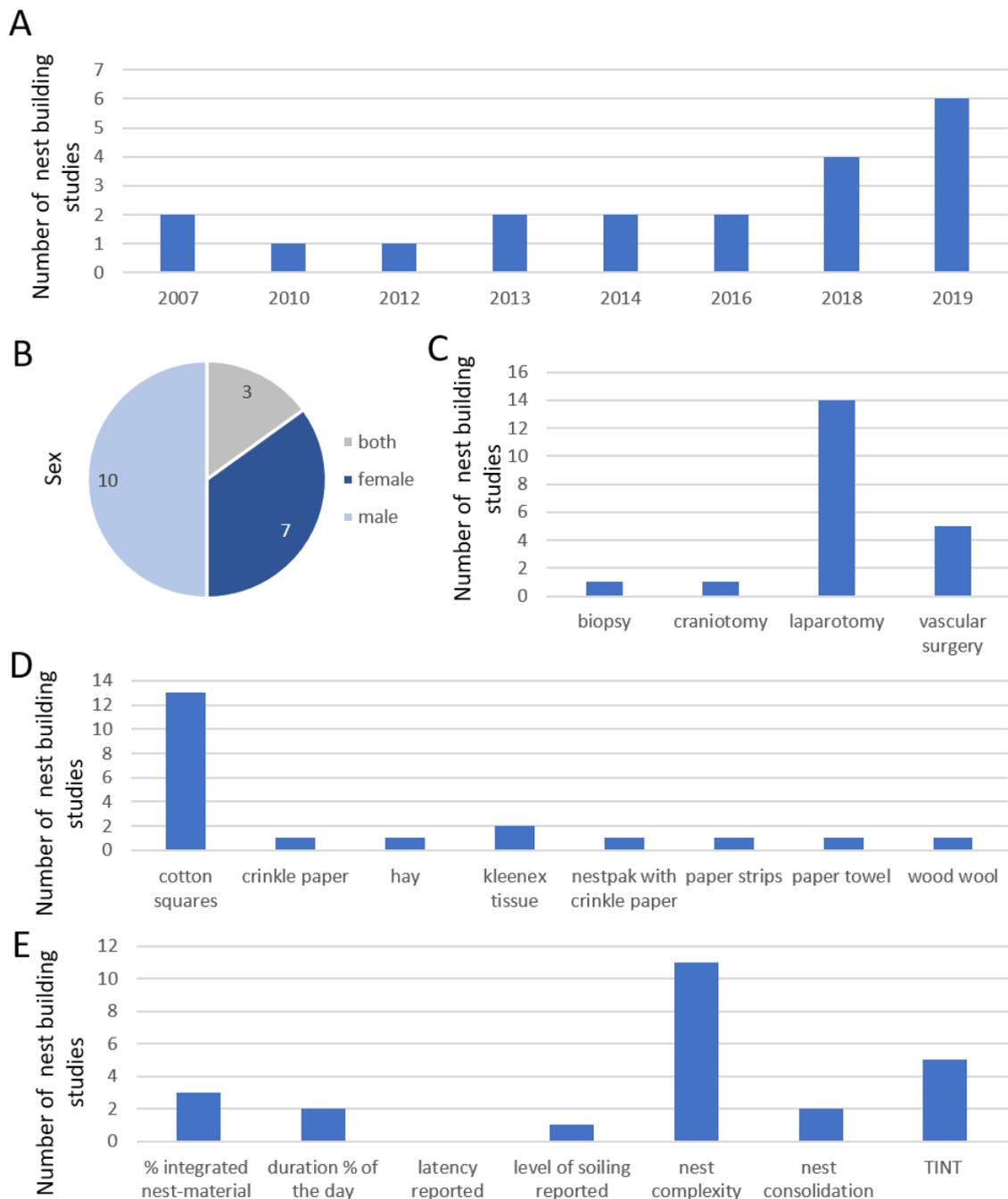


Abbildung 5. Studien-Charakteristika, Tiermodell-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Nest-building* bei Mäusen (n = 20 Studien). **A.** Anzahl der im letzten Jahrzehnt veröffentlichten Studien, in denen *Nest-building* zur Bewertung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen verwendet wurde. Die x-Achse zeigt die Jahre an. **B.** Anzahl der *Nest-building* Studien bei Mäusen, in denen weibliche Tiere, männliche Tiere oder beide Geschlechter verwendet wurden. **C.** Art des chirurgischen Eingriffs bei Mäusen. **D.** Angebotenes Material für den Nestbau bei Mäusen. **E.** Beurteilte Parameter zur Bewertung der Nestbauaktivität bei Mäusen.

Mice:									
Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Strain	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]	
Abdelrahman_2019	2019	Germany	C57BL/6J	-	male	-	-	-	
Arras_2007*	2007	Switzerland	NMRI	Harlan	male	4	-	40 to 54	
Beninson_2018	2018	USA	CFW	Charles River	male	5 to 8	-	28.9	
Cesarovic_2014a*	2014	Switzerland	C57BL/6J	in house-breeding	both	6 to 8	-	-	
Cesarovic_2014b*	2014	Switzerland	DBA/2J	in house-breeding	both	6 to 8	-	-	
Falkenberg_2019	2019	Denmark	NMRI	Taconic	male	6	-	-	
Gallo_2020	2019	USA	CrI:CD1(ICR)	Charles River	male	8 to 9	-	-	
Herndon_2016	2016	USA	C57BL/6	Charles River	male	-	24 to 28	-	
Jirkof_2012	2012	Switzerland	C57BL/6J	in-house breeding	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2013A	2013	Switzerland	C57BL/6J	in house-breeding	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2013B	2013	Switzerland	C57BL/6J	in-house breeding	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2018	2018	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	-	-	
Kendall_2016	2016	USA	CrI:CD1(ICR)	Charles River	female	8 to 10	20 to 30	-	
Kumstel_2019	2019	Germany	C57BL/6J	-	male	13 to 15	-	-	
Oliver_2018a	2018	USA	CrI:CD1(ICR)	Charles River	both	7 to 12	-	-	
Oliver_2018b	2018	USA	C57BL/6	Charles River	both	6 to 12	-	-	
Pham_2010*	2010	Sweden	C57BL/6	B&K Universal AB	female	-	21 to 25	-	
Robinson-Junker_2019	2019	USA	C57BL/6N	Charles River	both	6	-	-	
Rock_2015	2014	USA	-	Jackson Laboratories	male	16	-	-	
Staib-Laszik_2019	2019	Germany	C57BL/6N	Charles River	male	-	18 to 23	-	
Van-Loo_2007	2007	Netherlands	C57BL/6J	Charles River	female	9	-	-	
Yuan_2018*	2018	USA	C57BL/6	Charles River	male	10 to 12	-	-	
Rats:									
Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Strain	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]	
Möller_2018	2018	Germany	SD	Envigo	female	-	200 to 224	-	

Tabelle 8. Studien-Charakteristika und Tiermodell-Charakteristika für *Nest-building* bei Mäusen (n = 20 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Cesarovic_2014a und b, Oliver_2018a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet.

Mice:

Study ID	Nest material	size (cm) material	Amount (g) material	Image based evaluation	Time of evaluation in relation to dark	Baseline	Which scoring system was used?	Significant alteration of nest building parameters:			Evaluated parameter/comments
								within subject comparison	between subject comparison	between subject comparison	
Abdelrahman_2019	cotton squares	5x5	-	-	light phase	YES	0 to 6	YES	-	-	nest complexity
Arras_2007*	hay	-	18 to 20	-	-	YES	0 to 1	-	-	-	nest complexity, descriptive evaluation
Beninson_2018	cotton squares	-	-	-	-	YES	1 to 5	YES	NO	-	nest consolidation
Cesarovic_2014*	cotton squares	5x5	-	YES	light phase	-	-	-	-	-	-
Falkenberg_2019	wood wool	-	6	YES	light phase	YES	0 to 5	-	YES	-	nest complexity; % integrated material
Gallo_2020	crinkle paper	-	10	-	light phase	YES	0 to 5	YES	YES	-	nest complexity, TINT
Herndon_2016	cotton squares	-	3	-	light phase	YES	-	-	NO	-	nest complexity, TINT
Jirkof_2012	cotton squares	5x5	-	-	light phase	-	-	-	-	-	duration % of the day, level of soiling
Jirkof_2013A	cotton squares	5x5	-	-	light phase	YES	0 to 5	YES	YES	-	nest complexity
Jirkof_2013B	cotton squares	5x5	-	-	light phase	-	-	-	-	-	duration % of the day
Jirkof_2018	cotton squares	5x5	-	-	light phase	-	0 to 5	-	YES	-	nest complexity
Kendall_2016	paper strips	-	-	-	-	YES	-	-	YES	-	TINT; % integrated material
Kumstel_2019	cotton squares	5x5	-	-	light phase	-	1 to 6	YES	-	-	nest complexity
Oliver_2018a	cotton squares	-	-	-	both	YES	1 to 5	YES	-	-	nest consolidation
Oliver_2018b	cotton squares, enviropak	-	-	-	both	YES	1 to 5	YES	-	-	nest consolidation
Pham_2010*	kleenex tissue	-	-	-	-	-	-	-	NO	-	nest complexity
Robinson-Junker_2019	cotton squares	-	-	-	light phase	YES	-	YES	YES	-	TINT
Rock_2015	cotton squares	-	-	-	light phase	YES	-	YES	-	-	TINT
Staub-Laszarik_2019	paper towel	-	-	-	-	YES	0 to 2	-	-	-	nest complexity, visual assessment score
Van-Loo_2007	kleenex tissue	-	-	-	-	YES	1 to 4	-	-	-	nest complexity, descriptive evaluation
Yuan_2018*	cotton squares	5x5	2,5	-	-	-	-	-	YES	-	% integrated material

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Rats:

Study ID	Nest material	size (cm)	Amount (g)	Image based evaluation	Time of evaluation in relation to dark light phase	Baseline	Which scoring system was used?	Significant alteration of nest building parameters:		Evaluated parameter/comments
								within subject comparison	between subject comparison	
Möller_2018	crinkle paper	-	14	YES		YES	0 to 3	-	NO	latency, nest complexity, level of soiling

Tabelle 9. Informationen zum Zielparameter *Nest-building* bei Mäusen (n = 20 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Oliver_2018a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet.

Nest-building
Mice:

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anaesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia*
Abdelrahman_2019	pancreatic cancer model	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Arras_2007a*	laparotomy + carprofen	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Arras_2007b*	laparotomy + flunixin	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	flunixin	s.c.	5	-	-	-	-
Beninson_2018a	carprofen	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	5	-	-	-	-	NO
Beninson_2018b	robenacoxib	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	robenacoxib	32	-	-	-	-	NO
Cesarovic_2014*	surgery + anaesthesia + analgesia	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Falkenberg_2019	catheterization common carotid artery + ligation	single before surgery	1	vascular surgery	isoflurane	buprenorphine	oral (nute paste)	1	buprenorphine	s.c.	0.1	-
Gallo_2020	nest material + surgery + analgesia	single before surgery	1	vascular surgery	ketamine and xylazine	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	-	NO
Herndon_2016a	CLP + buprenorphine hydrochloride (Bup HCl)	group	5	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	-
Herndon_2016b	CLP + buprenorphine sustained-release (Bup SR)	group	5	laparotomy	isoflurane	buprenorphine SR	s.c.	1	-	-	-	-
Jirkof_2012a	surgery + anaesthesia + analgesia + single housing	single from surgery on	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Jirkof_2012b	surgery + anaesthesia + analgesia + pair housing	group	2	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Jirkof_2013Aa	surgery + anaesthesia + low dose analgesia	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	NO
Jirkof_2013Ab	surgery + anaesthesia + high dose analgesia	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	50	-	-	-	NO
Jirkof_2013B	surgery + anaesthesia + analgesia + familiar cage after surgery during burrowing	group	3 to 6	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Jirkof_2018	anaesthesia and surgery with T:P in the drinking water	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	tramadol	oral (drinking supply)	-	paracetamol	oral (drinking supply)	-	NO
Kendall_2016a	laparotomy + Bup-HCl	single	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	YES
Kendall_2016b	laparotomy + Bup-SR	single	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine SR	s.c.	0.6	-	-	-	YES
Kumstel_2019	transmitter implantation	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	metamizole	oral (drinking supply)	-	-

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Oliver_2018a	pair housed, anesthesia + buprenorphine, washout, surgery + buprenorphine	group	2	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Oliver_2018b	pair housed, anesthesia + caprofen, washout, surgery + carprofen	group	2	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	-	-	-
Oliver_2018c	pair housed, anesthesia + multimodal, washout, surgery + multimodal	group	2	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	buprenorphine	s.c.	YES
Oliver_2018d	single housed, anesthesia + buprenorphine, washout, surgery + buprenorphine	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Oliver_2018e	single housed, anesthesia + carprofen, washout, surgery + carprofen	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	-	-	-
Oliver_2018f	single housed, anesthesia + multimodal, washout, surgery + multimodal	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	buprenorphine	s.c.	YES
Oliver_2018g	single + nest during baseline, anesthesia + buprenorphine, washout, surgery + buprenorphine	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Oliver_2018h	single + nest during baseline, anesthesia + caprofen, washout, surgery + carprofen	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	-	-	-
Oliver_2018i	single + nest during baseline, anesthesia + multimodal, washout, surgery + multimodal	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	oral (drinking supply)	30	buprenorphine	s.c.	YES
Pham_2010a*	enriched + surgery	group	3	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	oral (drinking supply)	-	-	-	-
Pham_2010b*	enriched + surgery	single from surgery on	1	laparotomy	isoflurane	ibuprofen	oral (drinking supply)	-	-	-	-
Robinson-Junker_2019a	predictable sleep disruption + control (saline)	single before surgery	1	biopsy	isoflurane	lidocaine	topical	-	-	s.c.	YES
Robinson-Junker_2019b	predictable sleep disruption + analgesia	single before surgery	1	biopsy	isoflurane	lidocaine	topical	-	carprofen	s.c.	10 YES
Rock_2015a	Carotid artery injury	single before surgery	1	vascular surgery	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	-
Rock_2015b	Carotid artery injury	group	2 to 5	vascular surgery	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.05	-	-	-
Staub-Laszczik_2019a	subarachnoid hemorrhage + buprenorphine	-	-	vascular surgery	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Staub-Laszczik_2019b	subarachnoid hemorrhage + carprofen	-	-	vascular surgery	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Staib-Laszarik_2019c	subarachnoid hemorrhage + meloxicam	-	-	vascular surgery	isoflurane	meloxicam	s.c.	1	-	-	-
Staib-Laszarik_2019d	controlled cortical impact + buprenorphine	-	-	craniotomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-
Staib-Laszarik_2019e	controlled cortical impact + carprofen	-	-	craniotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-
Staib-Laszarik_2019f	controlled cortical impact + meloxicam	-	-	craniotomy	isoflurane	meloxicam	s.c.	1	-	-	-
Van-Loo_2007a	laparotomy + single housed	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-
Van-Loo_2007b	laparotomy + housed with non-operated cage mate	group	2	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-
Yuan_2018*	MCAO 20 min	single from surgery on	1	vascular surgery	isoflurane	-	-	-	-	-	-

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia*
Möller_2018	craniotomy	single before surgery	1	craniotomy	chloral hydrate	meloxicam	s.c.	1	bupivacaine	s.c.	-	-

Nest building

Rats:

Tabelle 10. Studiendesign-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Nest-building* bei Mäusen (n = 20 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Arras_2007a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet. * im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um die Wirkung der Analgesie zu testen, wurden die Gruppen mit chirurgischem Eingriff und Analgesie mit einer Kontrollgruppe verglichen, die als Gruppe mit chirurgischem Eingriff ohne Analgesie definiert wurde.

1.4. Postoperative Auswertung des Wühlverhaltens

Insgesamt wurden 10 Studien an Mäusen (EVANGELISTA-VAZ et al., 2018; SHEPHERD et al., 2018; SHI et al., 2018; ABDELRAHMAN et al., 2019; KUMSTEL et al., 2020) und 7 Studien an Ratten (ANDREWS et al., 2012; LAU et al., 2013; MURALIDHARAN et al., 2016; DESEURE & HANS, 2018; MÖLLER et al., 2018; GEORGIEVA et al., 2019; KATRI et al., 2019) beim Screening identifiziert, die das Wühlverhalten in der postoperativen Phase untersuchten. Die Studien wurden zwischen 2010 und 2019 veröffentlicht. Die Herkunftsländer der Erstautoren umfassten die Schweiz, Deutschland, die USA und China bei den Studien an Mäusen. Bei den Studien an Ratten umfasste die Länderliste vier europäische Länder, das Vereinigte Königreich und die USA (Tabelle 11). Die erste Studie an Mäusen, die das Wühlverhalten in der postoperativen Phase untersuchte, wurde 2010 veröffentlicht, während die erste Studie an Ratten 2011 veröffentlicht wurde. Ein Trend für eine Zunahme der Anzahl an Publikationen an Mäusen zur Untersuchung des Wühlverhaltens in der postoperativen Phase wurde erkannt (Abbildung 6 A, B).

Während zwei der identifizierten Studien das Wühlverhalten in beiden Geschlechtern untersuchten, fokussierten sich zwei Studien auf männliche Tiere und sechs Studien auf weibliche Tiere. In einer identifizierten Studie zur Untersuchung des Wühlverhaltens bei Ratten wurde das Geschlecht nicht beschrieben. Zwei Studien an Ratten untersuchten das Wühlverhalten in weiblichen Tieren und vier in männlichen Tieren (Tabelle 11; Abbildung 6 C, E).

Alle Studien an Mäusen setzten C57BL/6J-Mäuse als Stamm ein (Tabelle 11). Nur eine Studie untersuchte neben C57BL/6J-Mäusen zusätzlich FVB/NJ Mäuse (SHEPHERD et al., 2018). Die verwendeten Rattenstämme umfassten Sprague-Dawley-Ratten (5/7 Studien), Wistar Ratten (2/7 Studien), und Lewis-Ratten (1/7 Studien). Eine Studie setzte sowohl Sprague-Dawley- als auch Lewis-Ratten ein (ANDREWS et al., 2012).

Unter Berücksichtigung einer häufig angewendeten Habituationsphase von ein bis zwei Wochen nach der Ankunft zeigen das Alter und das Körpergewicht bei der Ankunft, dass die Mehrheit (16/17) der Studien an jung-adulten oder adulten Mäusen und Ratten durchgeführt wurde (Tabelle 11).

Das Körpergewicht zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs oder der Bewertung des

Wühlverhaltens wurde in den meisten Studien nicht berichtet (15/17).

Was das Wühlmaterial bei den Mäusen anbelangt, setzten die meisten identifizierten Studien (8/10) Futterpellets als Material ein. Zwei Studien wurden identifiziert, die Einstreu als Wühlmaterial verwendeten. Die Menge des angebotenen Wühlmaterials bei den Mäusen reichte von 50 bis 201 g und variierte damit stark. Bei Ratten wurde in der Mehrheit der Studien Kies eingesetzt (6/7 Studien), mit Ausnahme von einer Studie, die Futterpellets verwendete. Die Menge an angebotenen Kies betrug 2000 bis 2500 g (Tabelle 12; Abbildung 6 D, F).

Bezüglich der Art des chirurgischen Eingriffs wurden die Mäuse am häufigsten einer Laparotomie unterzogen (8/10 Studien). Die Liste der Interventionen bei Ratten umfasste Neurochirurgie, Kraniotomie, Laminektomie und Meniskektomie (Abbildung 6 G, H).

Die Latenz bis zum Beginn des Wühlens war der am häufigsten beurteilte Parameter (6/10 Studien) bei Mäusen, gefolgt von der Menge des pro Zeit gewühlten Materials (5/10). Bei diesen fünf Studien reichte die Dauer zur Beurteilung des Wühlverhaltens von 10 bis 120 Minuten. Die folgenden weiteren Parameter wurden in jeweils einer Studie an Mäusen analysiert: Zeit bis zum Entleeren der Wühlröhre und Wahrscheinlichkeit des Nicht-Wühlens. Alle Studien an Ratten beurteilten die Menge an gewühltem Material pro Zeit. Die Dauer des Wühltests reichte in diesen Studien von 60 bis 240 Minuten. Nur eine Studie analysierte zusätzlich die Latenz bis zum Beginn des Wühlens (Tabelle 12; Abbildung 6 I, J). Insgesamt fünf Studien führten den Wühltest während der Hellphase durch. Jeweils eine Studie führte den Wühltest während der Dunkelphase und während der Hell- und Dunkelphase durch. Insgesamt drei Studien machten keine Angaben über den Zeitpunkt der Evaluation in Bezug auf die Hell- und Dunkelphase. Bei Ratten analysierten drei Studien das Wühlverhalten während der Hellphase und eine Studie während der Dunkelphase. Insgesamt drei Studien machten keine Angabe hinsichtlich der Tageszeit für die Analyse des Wühlverhaltens (Tabelle 12).

Basalwerte wurden in 4 der 10 Studien an Mäusen und in allen Studien an Ratten ($k = 7$) erhoben. Ein gruppeninterner Vergleich (*within-subject design*) wurde in 4 Studien an Mäusen und 3 Studien an Ratten berichtet. Der gruppeninterne Vergleich ergab in allen dieser 4 Studien an Mäusen und allen dieser drei Studien an Ratten einen Effekt. Ein Vergleich zwischen den Gruppen (*between-subject-design*) wurde in 8 Studien an Mäusen und 6 Studien an Ratten berichtet. Der Vergleich zwischen den Gruppen ergab in allen 8 Studien an Mäusen und 4 der 6 Studien an Ratten einen Effekt (Tabelle 12).

Ein Einfluss eines einzelnen Analgetikums oder einer Kombination von Analgetika auf das Wühlverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde in 6 der 10 Studien an Mäusen analysiert. Ein Effekt wurde in 5 Studien beschrieben. Bei Ratten wurde der Einfluss eines einzelnen Analgetikums oder einer Kombination von Analgetika auf das Wühlverhalten in nur einer Studie analysiert, in der ein Effekt bestätigt wurde (Tabelle 13).

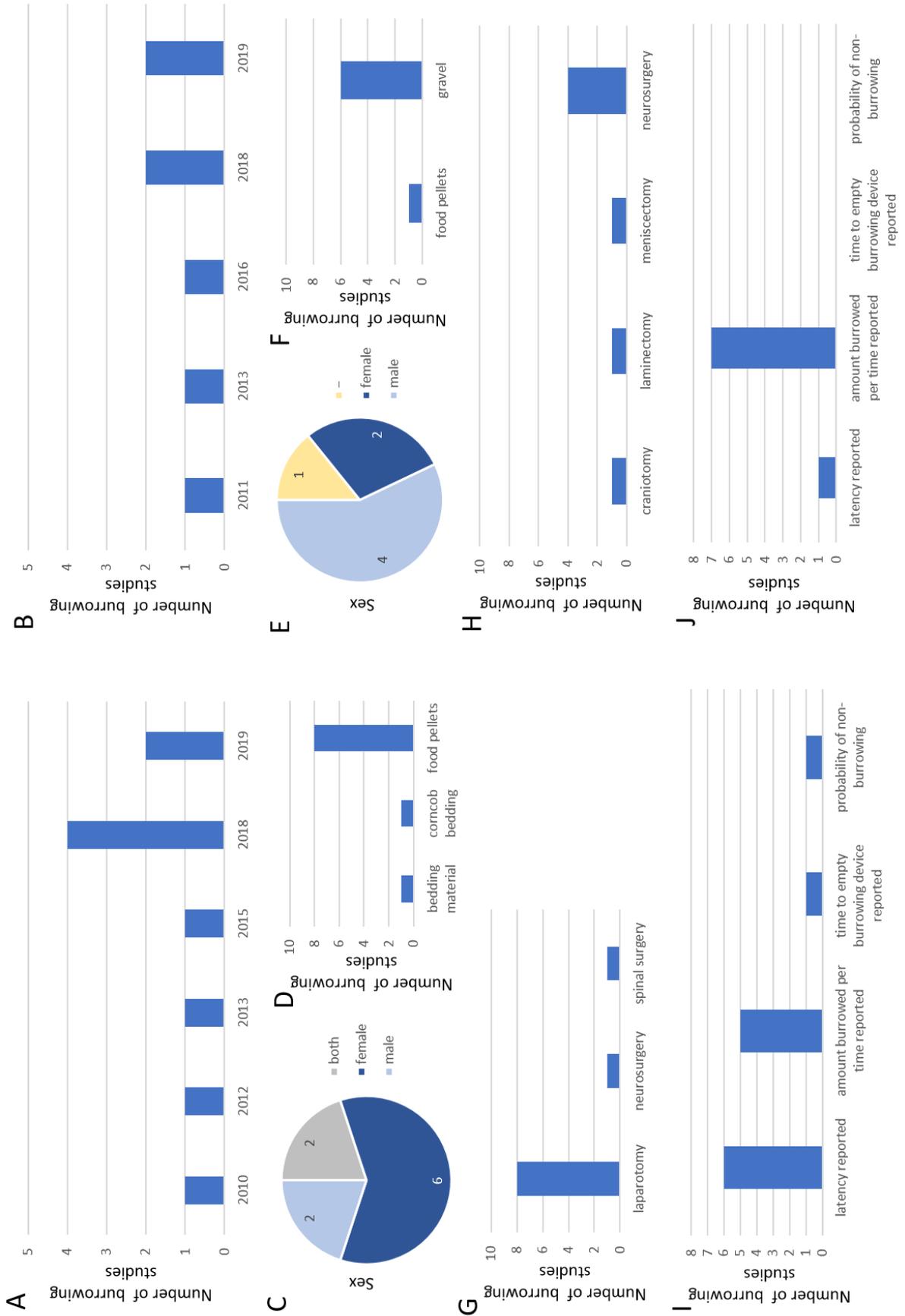


Abbildung 6. Studien-Charakteristika, Tiermodell-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Burrowing* bei Mäusen (n = 10 Studien) und Ratten (n = 7 Studien). **A, B:** Anzahl der im letzten Jahrzehnt veröffentlichten Studien, in denen *Burrowing* zur Bewertung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen (A) und Ratten (B) verwendet wurde. Die x-Achse zeigt die Jahre an. **C, E:** Anzahl der *Burrowing* Studien bei Mäusen (C) und Ratten (E), in denen weibliche Tiere, männliche Tiere oder beide Geschlechter verwendet wurden. **D, F:** Angebotenes Material für *Burrowing* bei Mäusen (D) und Ratten (F). **G, H:** Art des chirurgischen Eingriffs bei Mäusen (G) und Ratten (H). **I, J:** Beurteilte Parameter zur Bewertung von *Burrowing* bei Mäusen (I) und Ratten (J).

Mice:									
Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Journal	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]	
Abdelrahman_2019	2019	Germany	C57BL/6J	-	male	-	-	-	
Evangelista-Vaz_2018	2018	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	18 to 22	-	
Jirkof_2010	2010	Switzerland	C57BL/6J	in-house breeding facility	both	6 to 8	-	-	
Jirkof_2012	2012	Switzerland	C57BL/6J	in-house breeding facility	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2013B	2013	Switzerland	C57BL/6J	in-house breeding facility	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2015	2015	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	-	-	
Jirkof_2018	2018	Switzerland	C57BL/6J	Charles River	female	6 to 8	-	-	
Kumstel_2019	2019	Germany	C57BL/6J	-	male	13 to 15	-	-	
Shepherd_2018a	2018	USA	C57BL/6J	Jackson Laboratories	both	8 to 14	-	-	
Shepherd_2018b	2018	USA	FVB/NJ	Jackson Laboratories	both	8 to 14	-	-	
Shi_2018	2018	China	C57BL/6J	in-house breeding facility	female	-	20 to 25	-	
Rats:									
Study ID	Year of publication	Country of origin first author	Strain	Breeder	Sex	Age arrival [weeks]	Body weight on arrival [g]	Body weight on evaluation [g]	
Andrews_2011a	2011	UK	SD	Charles River Ltd UK	-	-	175 to 200	-	
Andrews_2011b	2011	UK	Wistar	B&K Universal Ltd UK	-	-	175 to 200	-	
Deseure_2018	2018	Belgium	SD	Charles River	male	-	225 to 250	-	
Georgieva_2019	2019	UK	Wistar	Charles River	male	-	180 to 200	-	
Katri_2019	2019	Denmark	Lewis	Envigo	female	6 to 8	170 to 200	-	
Lau_2013	2013	Canada	SD	Charles River	male	8	-	200 to 230	
Möller_2018	2018	Germany	SD	Envigo	female	-	200 to 224	-	
Muralidharan_2016	2016	Australia	SD	Animal Resources Centre	male	-	180 to 200	200 to 250	

Tabelle 11. Studien-Charakteristika und Tiermodell-Charakteristika für *Burrowing* bei Mäusen (n = 10 Studien) und Ratten (n = 7 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Shepherd_2018a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet.

Mice:									
Study ID	Burrowing material	Amount burrowing material (g)	Duration of test (min)	Video/Image based evaluation	Time of evaluation in relation to dark	Significant alteration of burrowing parameters:			Evaluated parameter
						Baseline	within subject comparison	between subject comparison	
Abdelrahman_2019	food pellets	199 to 201	120	-	light phase	YES	YES	-	Amount burrowed per time
Evangelista-Vaz_2018	food pellets	-	720	YES	dark phase	-	-	YES	Latency
Jirkof_2010	food pellets	138 to 142	120	YES	light phase	YES	YES	YES	Latency; Amount burrowed per time; Time to empty burrowing device
Jirkof_2012	food pellets	138 to 142	360 to 1440	YES	light phase	-	-	YES	Latency
Jirkof_2013B	food pellets	138 to 142	360 to 1440	YES	light phase	-	-	YES	Latency
Jirkof_2015	food pellets	138 to 142	720	YES	-	-	-	YES	Latency
Jirkof_2018	food pellets	-	1440	YES	both	-	-	YES	Latency, Probability of non-burrowing
Kumstel_2019	food pellets	200	120	-	light phase	-	YES	-	Amount burrowed per time
Shepherd_2018	corncob bedding	50	15	-	-	YES	YES	YES	Amount burrowed per time
Shi_2018	bedding material	200	10	-	-	YES	-	YES	Amount burrowed per time

Rats:									
Study ID	Burrowing material	Amount burrowing material (g)	Duration of test (min)	Video/Image based evaluation	Time of evaluation in relation to dark	Significant alteration of burrowing parameters:			Evaluated parameter
						Baseline	within subject comparison	between subject comparison	
Andrews_2011a	gravel	2500	60	-	-	YES	YES	YES	Amount burrowed per time
Andrews_2011b	gravel	2500	120	-	-	YES	YES	YES	Amount burrowed per time
Deseure_2018	food pellets	1000	240	-	-	YES	YES	YES	Amount burrowed per time
Georgieva_2019	gravel	2500	120	-	light phase	YES	-	YES	Amount burrowed per time
Lau_2013	gravel	2500	60	-	dark phase	YES	-	YES	Amount burrowed per time
Katri_2019	gravel	-	-	-	-	YES	-	NO	Amount burrowed per time
Möller_2018	gravel	2500	60	YES	light phase	YES	-	NO	Latency, Amount burrowed per time
Muralidharan_2016	gravel	2000	60	NO	light phase	YES	YES	-	Amount burrowed per time

Tabelle 12. Informationen zum Zielparameter *Burrowing* bei Mäusen (n = 10 Studien) und Ratten (n = 7 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Andrews_2011a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. – nicht berichtet.

**Burrowing
Mice:**

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia*
Abdelrahman_2019	Pancreatic cancer model	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Evangelista-Vaz_2018	surgery + anaesthesia+tramadol injection + drinking supply	group	4 to 8	laparotomy	sevoflurane	tramadol	s.c.	25	tramadol	oral (drinking supply)	25	NO
Jirkof_2010	surgery + anaesthesia + analgesia	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	YES
Jirkof_2012a	surgery + anaesthesia + analgesia + single housing	single from surgery on group	1	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	YES
Jirkof_2012b	surgery + anaesthesia + analgesia + pair housing	group	2	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	YES
Jirkof_2013B	surgery + anaesthesia + analgesia + familiar cage after surgery during burrowing	group	3 to 6	laparotomy	sevoflurane	carprofen	s.c.	5	-	-	-	-
Jirkof_2015a	OPTI (surgery + anaesthesia + T1)	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	buprenorphine	s.c.	0.1	-	-	-	YES
Jirkof_2015b	OPSB (surgery + anaesthesia + SB)	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	buprenorphine SR	s.c.	2.2	-	-	-	YES
Jirkof_2018	anesthesia and surgery with T:P in the drinking water	single before surgery	1	laparotomy	sevoflurane	tramadol	oral (drinking supply)	-	paracetamol	oral (drinking supply)	-	YES
Kumstel_2019	transmitter implantation	single before surgery	1	laparotomy	isoflurane	carprofen	s.c.	5	metamizole	oral (drinking supply)	-	-
Shepherd_2018	SNI + Gabapentin	group	5	neurosurgery	isoflurane	gabapentin	i.p.	10	-	-	-	YES
Shi_2018	disc degeneration disease	-	-	neurosurgery	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite

Burrowing

Rats:

Study ID	Groups	Housing	n/home cage	Type of Surgery	Type of anesthesia	Type of analgesia 1	Route	Dose (mg/kg)	Type of analgesia 2	Route	Dose (mg/kg)	Effect of analgesia *
Andrews_2011a	TNT + gabapentin low dose (SD rats)	group	4	neurosurgery	isoflurane	gabapentin	s.c.	30	-	-	-	YES
Andrews_2011b	TNT + gabapentin high dose (SD rats)	group	4	neurosurgery	isoflurane	gabapentin	s.c.	100	-	-	-	YES
Andrews_2011c	L5 SNT -> neurosurgery + strain2 (Wistar rats)	group	4	neurosurgery	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-
Deseure_2018	IoN ligation	-	-	neurosurgery	pentobarbital	-	-	-	-	-	-	-
Georgieva_2019	Acute DHA treatment	group	2 to 3	laminectomy	isoflurane	buprenorphine	s.c.	0.3	carprofen	s.c.	50	-
Katri_2019	meniscectomy + Naproxen	group	3 to 4	meniscectomy	isoflurane	xylocain	topical	-	carprofen	-	-	-
Lau_2013	SNI	group	2	neurosurgery	ketamine and xylazine	-	-	-	-	-	-	-
Möller_2018	craniotomy	single before surgery	1	craniotomy	chloral hydrate	meloxicam	s.c.	1	bupivacaine	s.c.	-	-
Muralidharan_2016	CCI sciatic nerve	group	2 to 3	neurosurgery	isoflurane	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 13. Studiendesign-Charakteristika und Interventions-Charakteristika für *Burrowing* bei Mäusen (n = 10 Studien) und Ratten (n = 7 Studien). Alphabetische Zeichen in der Studien-ID (*Study ID*) weisen auf Gruppen innerhalb einzelner Studien hin (erste Spalte der Tabelle; z. B. Jirkof_2012a und b). + diese Publikationen wurden beim Screening der Literaturlisten identifiziert. –nicht berichtet. * im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um die Wirkung der Analgesie zu testen, wurden die Gruppen mit chirurgischem Eingriff und Analgesie mit einer Kontrollgruppe verglichen, die als Gruppe mit chirurgischem Eingriff ohne Analgesie definiert wurde.

1.5. Anästhesie und Analgesie

Im Zusammenhang mit chirurgischen Eingriffen wurde bei beiden Tierarten am häufigsten eine Inhalationsanästhesie durchgeführt. Als Narkotikum wurde am häufigsten Isofluran verwendet, gefolgt von Sevofluran. Weitere Arten von Anästhetika und Arzneimittelkombinationen umfassten Ketamin/Xylazin bei Mäusen, sowie Ketamin, Ketamin/Xylazin, Tiletamin/Zolazepam, Pentobarbital und Chloralhydrat bei Ratten (Tabelle 7, Tabelle 10, Tabelle 13).

Perioperative Analgetika wurden in der großen Mehrheit der Studien verabreicht (62/75). Allerdings wendeten fast alle Studien einen monotherapeutischen Ansatz an.

Die Verwendung eines Opioids wurde in 38 % der Studien an Mäusen (15/39) und 39 % der Studien an Ratten (14/36) berichtet (Abbildung 7). Die Liste der angewendeten Opioiden umfasste Buprenorphin und Tramadol bei Mäusen. Bei Ratten umfasste die Liste der Opioiden zusätzlich zu den bereits erwähnten Nalbuphin, Morphin und Fentanyl (Tabelle 7, Tabelle 10, Tabelle 13).

Über die Anwendung eines nichtsteroidalen Antiphlogistikums (NSAID, engl. non-steroidal anti-inflammatory drug) wurde in 44 % der Studien an Mäusen (17/39) und 36 % der Studien an Ratten (13/36) berichtet (Abbildung 7). Die Liste der eingesetzten NSAIDs umfasste Carprofen, Ibuprofen, Ketoprofen, Meloxicam, Flunixin, Robenacoxib bei Mäusen und Carprofen, (Dex)Ibuprofen, Ketoprofen und Meloxicam bei Ratten (Tabelle 7, Tabelle 10, Tabelle 13).

Ein multimodaler Ansatz wurde in 13 % der Studien an Mäusen (5/39) und 6 % der Studien an Ratten (2/36) angewendet (Abbildung 7).

Die Anwendung einer Lokalanästhesie wurde in 5 % der Studien an Mäusen (2/39) und 33 % der Studien an Ratten (12/36) berichtet. Die Liste der angewandten Lokalanästhetika umfasste Lidocain und Bupivacain bei Mäusen und Lidocain, Ropivacain, (Levo)Bupivacain, Xylocain bei Ratten (Tabelle 7, Tabelle 10, Tabelle 13).

Über die Anwendung des analgetisch-antipyretischen Wirkstoffs Paracetamol (alternative Bezeichnung in den USA: Acetaminophen) wurde in zwei Studien an Mäusen und einer Studie an Ratten berichtet (MATSUMIYA et al., 2012; WAITE et al., 2015; JIRKOF et al., 2018).

Die Liste der weiteren eingesetzten Wirkstoffe umfasste Metamizol und Gabapentin bei Mäusen sowie Thalidomid und Gabapentin bei Ratten (Tabelle 7, Tabelle 10, Tabelle 13).

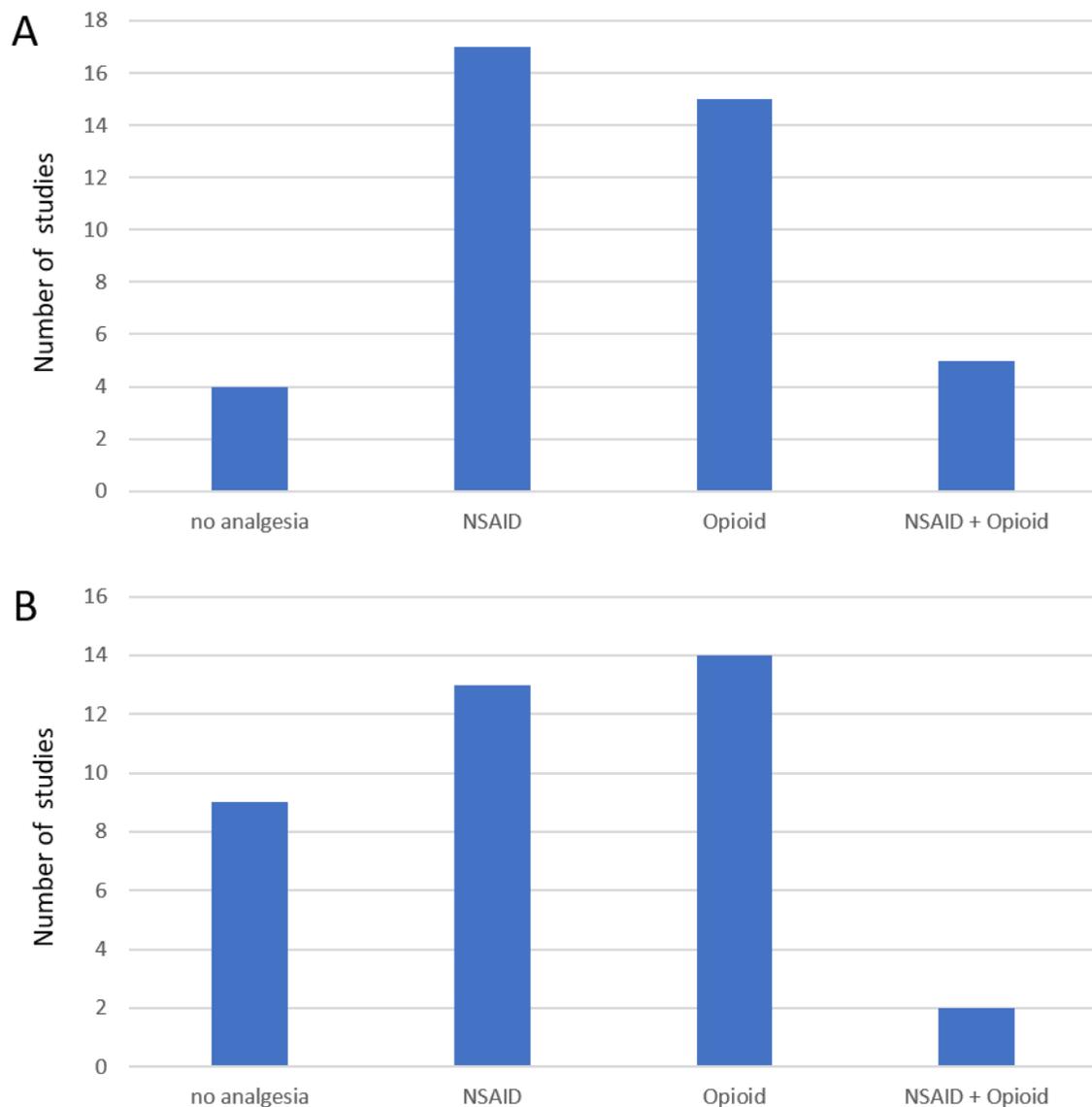


Abbildung 7. Art der Analgesie gepoolt für *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing*. **A.** Art der Analgesie bei Mäusen (n = 39 Studien). **B.** Art der Analgesie bei Ratten (n = 36 Studien).

1.6. Verzerrungspotential

Für jede inkludierte Studie und jeden Schmerzparameter wurde das Risiko einer Verzerrung (engl. *bias*) mithilfe des SYRCLE's *RoB tools* bewertet (Abbildung 8).

In Hinblick auf den *selection bias* (dtsh. Selektionsverzerrung) wurden nur in wenigen Publikationen (14 %) Details über den Randomisierungsansatz für die Sequenzerstellung berichtet. Angaben zu den Basalwerten der Studiengruppen fehlten in 99 % und zu den Verfahren zur Verblindung der Studiengruppenzuweisung in 96 % der Publikationen.

Die Bewertung des *performance bias* (dtsh. Durchführungsverzerrung) umfasste die

Randomisierung der Tiere und Käfige in der Versuchstierhaltung und die Verblindung während des Experiments. In 98 % der identifizierten Publikationen fehlte die Information über die randomisierte Verteilung der Tiere und Käfige in der Versuchstierhaltung. Die Verblindung der Tierpfleger und/oder Wissenschaftler in Bezug auf das Wissen über die Intervention während des Experiments wurde in 40 % der Veröffentlichungen berichtet, während 5 % der Veröffentlichungen angaben, dass keine Verblindung der Tierpfleger und/oder Wissenschaftler durchgeführt wurde. Bei der Bewertung des RoBs fiel uns auf, dass nur selten Angaben über eine mögliche Verblindung der Tierpfleger gemacht wurden. Die Bewertung des *detection bias* (dtsh. Verzerrung bei der Erkennung) umfasste die Randomisierung und Verblindung während der Ergebnisbewertung. Eine Randomisierung der Videos und Bilder für die Auswertung der Ergebnisse oder der Tiere für die Tests wurde in 50% der Studien zur Bewertung des *Grimace-Scales*, in keiner der Veröffentlichungen zur Bewertung der Nestbauaktivität und in keiner der Studien zur Bewertung des Wühlverhaltens angegeben. Angaben zur Verblindung von Wissenschaftlern während der Auswertung der Ergebnisse wurden in 70 % der *Grimace-Scale* Studien, in 48 % der Studien zur Nestbauaktivität und in 29 % der Studien zum Wühlverhalten gemacht.

Was den *attrition bias* (dtsh. Verzerrung durch Abnutzung) anbelangt, blieb die Vollständigkeit der bereitgestellten Daten in 76 % der identifizierten Publikationen unklar. In nur 15 % der Publikationen wurde über das Fehlen von Daten angemessen berichtet. In Hinblick auf den *reporting bias* (dtsh: Verzerrung der Berichterstattung), blieb in 94 % der Publikationen unklar, ob die Berichte frei von selektiver Ergebnisberichterstattung waren.

Andere Arten von Verzerrungen wurden in 8 % der Publikationen festgestellt. Was die *Power-Analyse* betrifft, so berichteten 77 % der Studien nicht, ob eine *Power-Analyse* durchgeführt wurde.

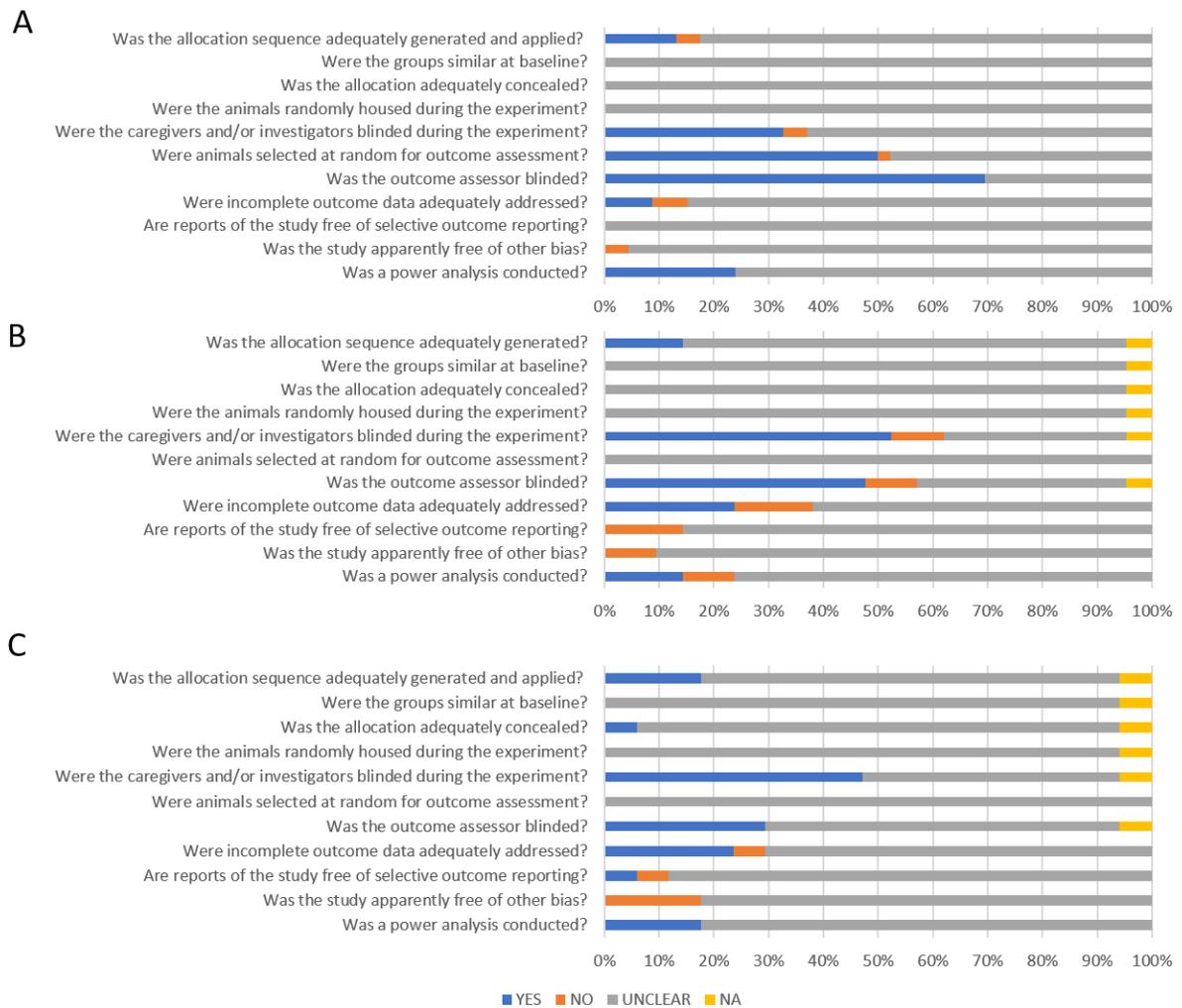


Abbildung 8. Bewertung des Verzerrungspotentials für den *Grimace-Scale* (A), die Nestbauaktivität (B) und das Wühlverhalten (C). Pro Schmerzparameter wurden Mäuse und Ratten gepoolt. **YES:** Geringes Risiko der Verzerrung. **NO:** Hohes Risiko der Verzerrung. **UNCLEAR:** Unklares Risiko der Verzerrung. **NA:** RoB-Punkt war nicht anwendbar, da nur eine Gruppe in der Studie verwendet wurde.

2. Schlafmusterstudie

2.1. Einfluss des chirurgischen Eingriffes auf das Tier-Wohlbefinden

Der RGS, der allgemeine klinische Score und Irwin-Score, sowie das Körpergewicht der Tiere wurden erhoben, um den Einfluss der Elektroden- und Transponderimplantation auf das Wohlbefinden der Tiere zu untersuchen.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem chirurgischen Eingriff stieg der RGS geringfügig an. Das Maximum lag bei einem mittleren Differenzwert von 0.421 (Wert von Minimum 0 bis Maximum 2). An den folgenden postoperativen Tagen nahm der RGS stetig ab (Abbildung 9 A).

In den ersten 72 Stunden nach dem chirurgischen Eingriff war der Irwin-Score leicht erhöht und erreichte am ersten postoperativen Tag ein Maximum von 1,07 (Score von Minimum 0 bis Maximum 61). Am dritten postoperativen Tag ging der Score auf ein normales Niveau zurück. Folgende Parameter waren als Folge des chirurgischen Eingriffs verändert: Piloerektion und lokomotorische Aktivität (Abbildung 9 B).

Die entsprechenden Veränderungen wurden auch durch den klinischen Standard-Score erfasst, der täglich in Übereinstimmung mit der von der örtlichen Regierung genehmigten Erlaubnis bewertet wurde (Abbildung 9 C).

Wichtig ist zu betonen, dass beide Gruppen in der postoperativen Phase identisch behandelt wurden. Daher wurden die Tiere gepoolt dargestellt.

Bei der Analyse des Körpergewichts der Tiere während der postoperativen Phase wurden keine signifikanten Änderungen festgestellt (Abbildung 9 D).

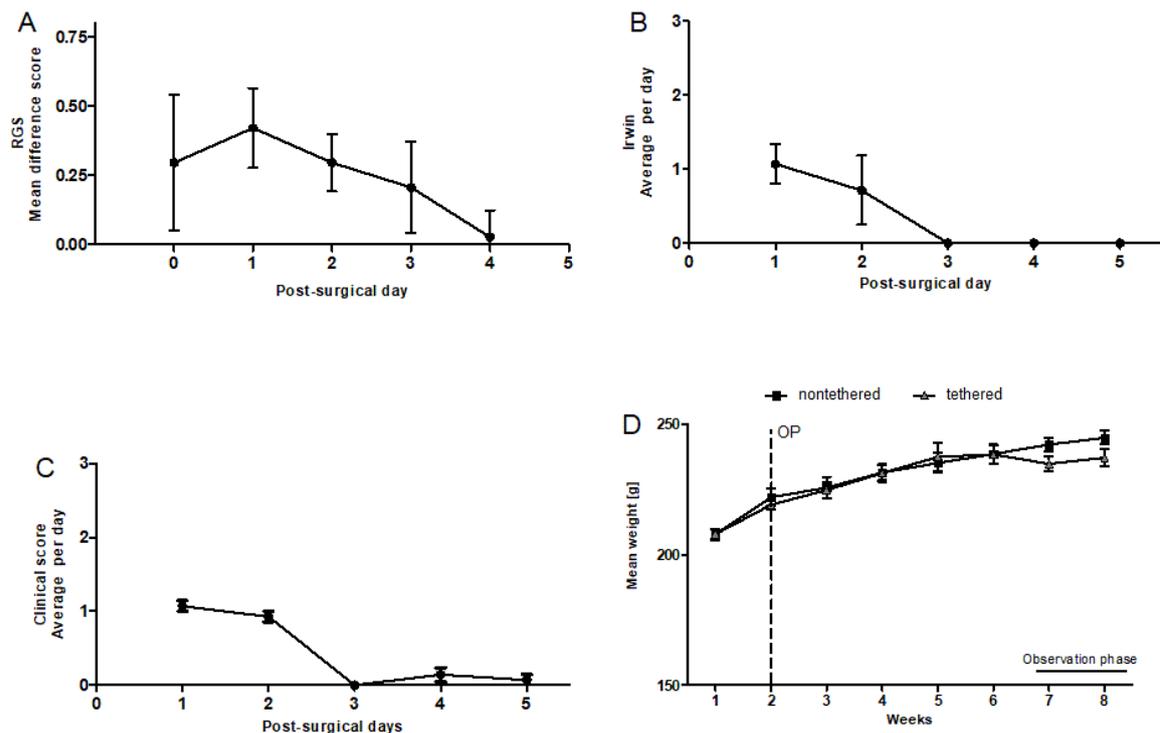


Abbildung 9. *Rat-Grimace-Scale*, Irwin-Score, klinischer Standard-Score und Körpergewicht. *nontethered*: nicht-kabel-gebundene Gruppe. *tethered*: kabel-gebundene Gruppe. **A:** *Rat-Grimace-Scale* an den postoperativen Tagen 0 bis 4 (n = 14). **B:** Irwin-Score an den postoperativen Tagen 1 bis 5 (n = 14). **C:** Klinischer Standard-Score an den postoperativen Tagen 1 bis 5 (n = 14). **D:** Körpergewicht der kabel-gebundenen (n = 6) und nicht-kabel-gebundenen Tiere (n = 7) während der gesamten Studie von der Ankunft der Tiere bis zum Ende des experimentellen Beobachtungszeitraums.

2.2. Einfluss des Kabels auf die Schlafmikroarchitektur und auf den Anteil der Vigilanzstadien

Die Hypnogramme zeigten die charakteristischen polyphasischen Schlafmuster der nachtaktiven Nagetiere. Diese charakteristischen Muster waren in den Hypnogrammen sowohl am Tag 3 der *Baseline* (Abbildung 10) als auch am ersten Tag der experimentellen Beobachtungsphase (Abbildung 11) sichtbar. Während der Dunkelphase zeigten die Ratten längere Wachphasen, welche durch kurze Schlafphasen unterbrochen werden. Während der Hellphase zeigten die Tiere längere NREM-Schlafphasen, die wiederholt in REM-Schlafphasen übergehen, und kürzere Wachphasen.

Eines der kabel-gebundenen Tiere zeigte eine auffällige Verringerung der Schlafepisoden während der Dunkel- und Hellphase am Tag eins des experimentellen Beobachtungszeitraums (Abbildung 11; Tier Nr. 6).

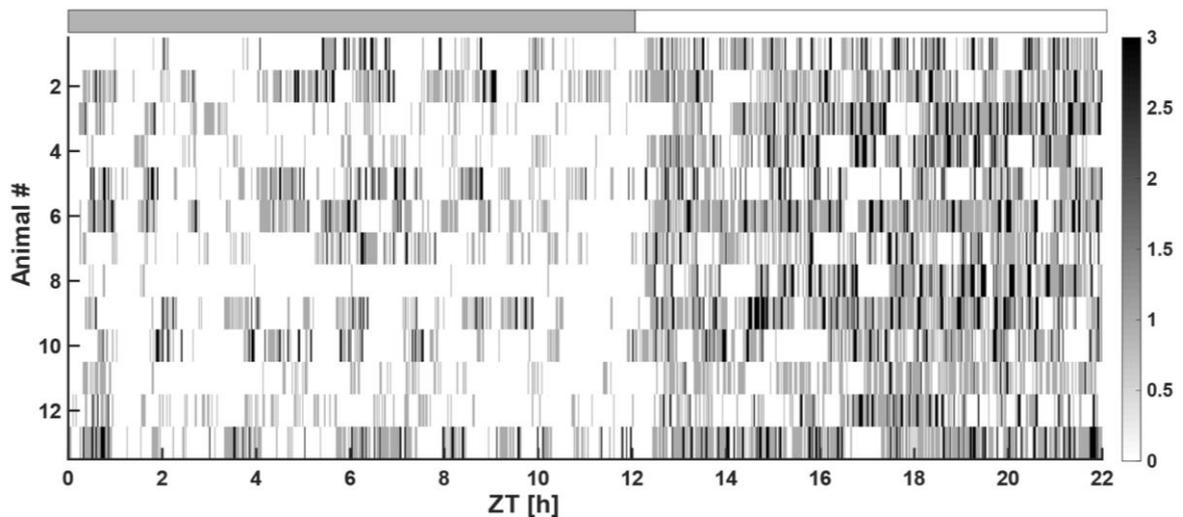


Abbildung 10. Hypnogramm *Baseline* Tag 3 während des 22-stündigen experimentellen Beobachtungszeitraums. Nach 12 Stunden wurde das Licht eingeschaltet. Das graue Rechteck symbolisiert die Dunkelphase, das weiße Rechteck die Hellphase. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). **Weiß:** Wachzustand. **Hellgrau:** NREM-Schlaf. **Dunkelgrau:** REM-Schlaf. #: Nummer des einzelnen Tieres.

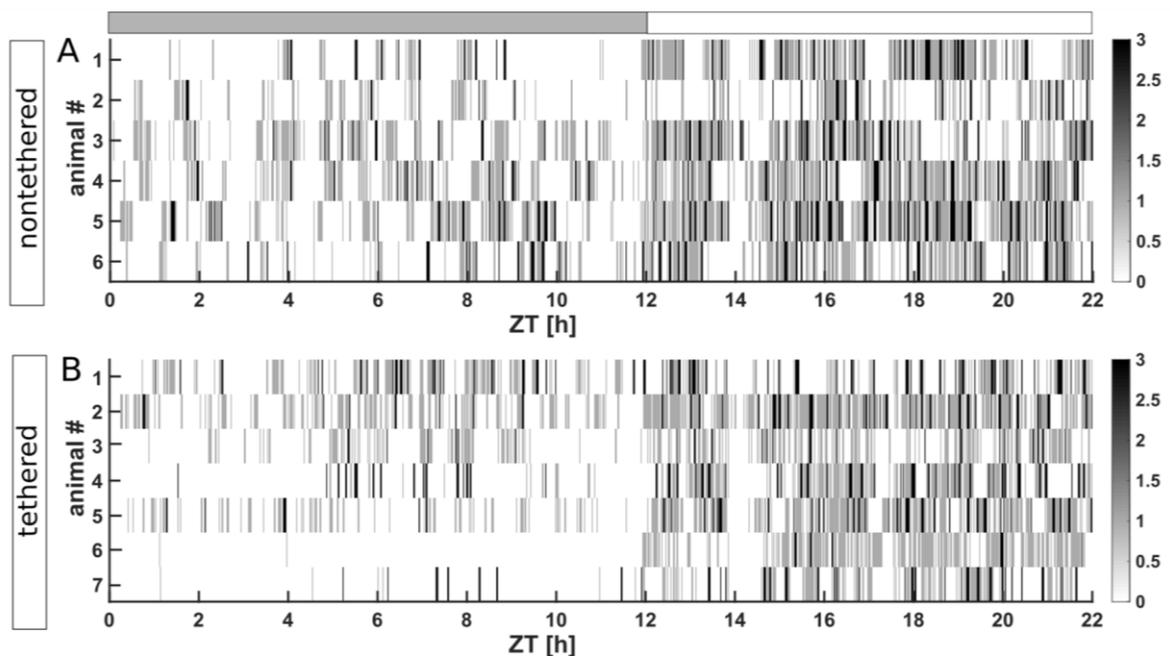


Abbildung 11. Hypnogramm der nicht-kabelgebundenen (A) und der kabelgebundenen (B) Tiere während des 22-stündigen experimentellen Beobachtungszeitraums. *nontethered*: nicht-kabelgebunden. *tethered*: kabelgebunden. Nach 12 Stunden wurde das Licht eingeschaltet. Das graue Rechteck symbolisiert die Dunkelphase, das weiße Rechteck die Hellphase. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). **Weiß:** Wachzustand. **Hellgrau:** NREM-Schlaf. **Dunkelgrau:** REM-Schlaf. Die synchrone Unterbrechung des Schlafes zu Beginn der Hellphase bei H14 (ZT) fällt mit dem Betreten des Tierraums am Morgen zum Fotografieren der Nester zusammen. Die synchrone Unterbrechung zu dieser Zeit ist während des gesamten experimentellen Beobachtungszeitraums sichtbar. #: Nummer des einzelnen Tieres.

Die Hypnogramme zeigten bei H14 (ZT) eine synchrone Unterbrechung des Schlafs bei allen Tieren während der experimentellen Beobachtungsphase (Abbildung 11). Die synchrone Unterbrechung des Schlafs fiel mit dem Beginn der menschlichen Aktivität in der Tieranlage zusammen. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Nestfotos gemacht, wobei versucht wurde, die Tiere so wenig wie möglich zu stören.

Der Anteil der Vigilanzstadien (WAKE, NREM-Schlaf, REM-Schlaf) während des 22-stündigen Beobachtungszeitraums für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden wurde wie folgt analysiert: um Unterschiede zwischen den Gruppen in den Basalwerten auszuschließen, wurde der Anteil der Vigilanzstadien unter Berücksichtigung aller *Baseline*-Tage analysiert. Die neun experimentellen Aufzeichnungstage wurden gemittelt, um den prozentualen Anteil der Vigilanzstadien zwischen den Gruppen über den gesamten experimentellen Beobachtungszeitraum zu vergleichen. Um einen Einfluss des Kabels zu Beginn und zum Ende zu untersuchen, wurden Mittelwerte aus den ersten und den letzten drei Tagen des Beobachtungszeitraums gebildet. Zusätzlich wurde Tag eins analysiert, um einen direkten Einfluss des Kabels während der ersten 24 Stunden auf die Tiere im Gruppenvergleich zu analysieren.

Während der Aufzeichnung der Basalwerte (Abbildung 12 A, B, C) wurden keine signifikanten Unterschiede im Anteil der Vigilanzstadien zwischen den Tieren, die später der Gruppe mit Kabelverbindung und ohne Kabelverbindung zugehörten, sichtbar. Bei der Beurteilung von Unterschieden zwischen den Gruppen in den *Baseline*-Schlafaufzeichnungen wurde der Fokus auf die Anteile der Vigilanzstadien gelegt. Da hier keine Unterschiede gefunden wurden, kann davon ausgegangen werden, dass auch bei den anderen Auswertungen der Schlafarchitektur keine Unterschiede zwischen den Gruppen in den *Baseline*-Schlafaufzeichnungen zu erwarten sind.

An Tag eins (Abbildung 12 D, E, F) des experimentellen Beobachtungszeitraums wurde kein signifikanter Unterschied im Anteil der Vigilanzstadien zwischen der Gruppe mit Kabelverbindung und der Gruppe ohne Kabelverbindung sichtbar.

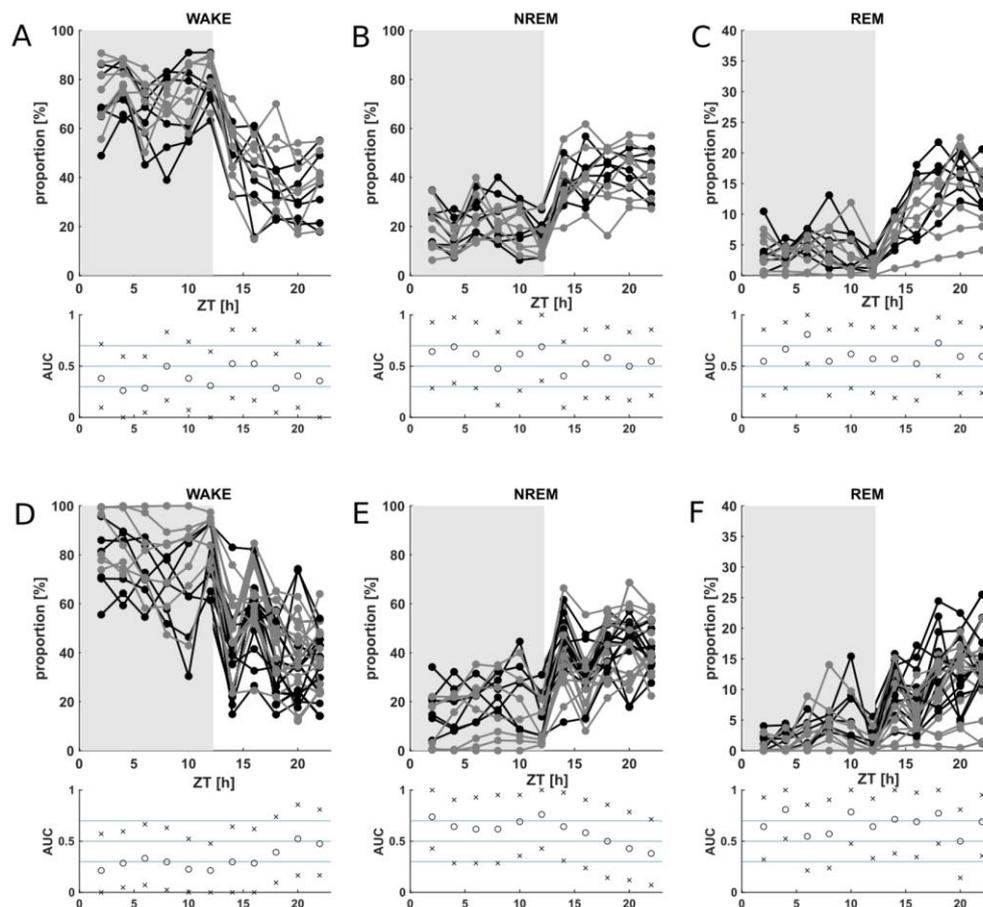


Abbildung 12. Anteil der Vigilanzstadien der nicht-kabelgebundenen (schwarz, $n = 6$) und kabelgebundenen (grau, $n = 7$) Tiere für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden während der 22 Stunden. Die Lichter wurden nach 12 Stunden eingeschaltet. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). Grau (ZT[h]: 0 – 12) zeigt die Dunkelphase, weiß (ZT[h]: 12 – 22) zeigt die Hellphase. Die Kreise stellen die berechnete AUC-Werte dar. Die Grenzen der 95%-Konfidenzintervalle sind durch den Buchstaben x dargestellt. WAKE: Wachzustand. NREM: NREM-Schlaf. REM: REM-Schlaf. **A, B, C:** Gemittelte *Baseline*-Tage für Wachzustand (A), NREM-Schlaf (B) und REM-Schlaf (C). Die Berechnung der AUC-Werte ergab keinen Unterschied zwischen den nicht-kabelgebundenen (schwarz) und den kabelgebundenen (grau) Tieren. **D, E, F:** Werte für den ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (D), NREM-Schlaf (E) und REM-Schlaf (F). Die Berechnung der AUC-Werte ergab keinen Unterschied zwischen den nicht-kabelgebundenen (schwarz) und den kabelgebundenen (grau) Tieren. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt.

Der Anteil der Vigilanzstadien zwischen der Gruppe mit Kabelverbindung und der Gruppe ohne Kabelverbindung unterschied sich nicht signifikant, sowohl unter Berücksichtigung aller neun Beobachtungstage (Abbildung 13 A, B, C), als auch zu Beginn (Tag 1 bis 3, Abbildung 13 D, E, F) und am Ende (Tag 12 bis 14, Abbildung 13 G, H, I) des experimentellen Beobachtungszeitraums.

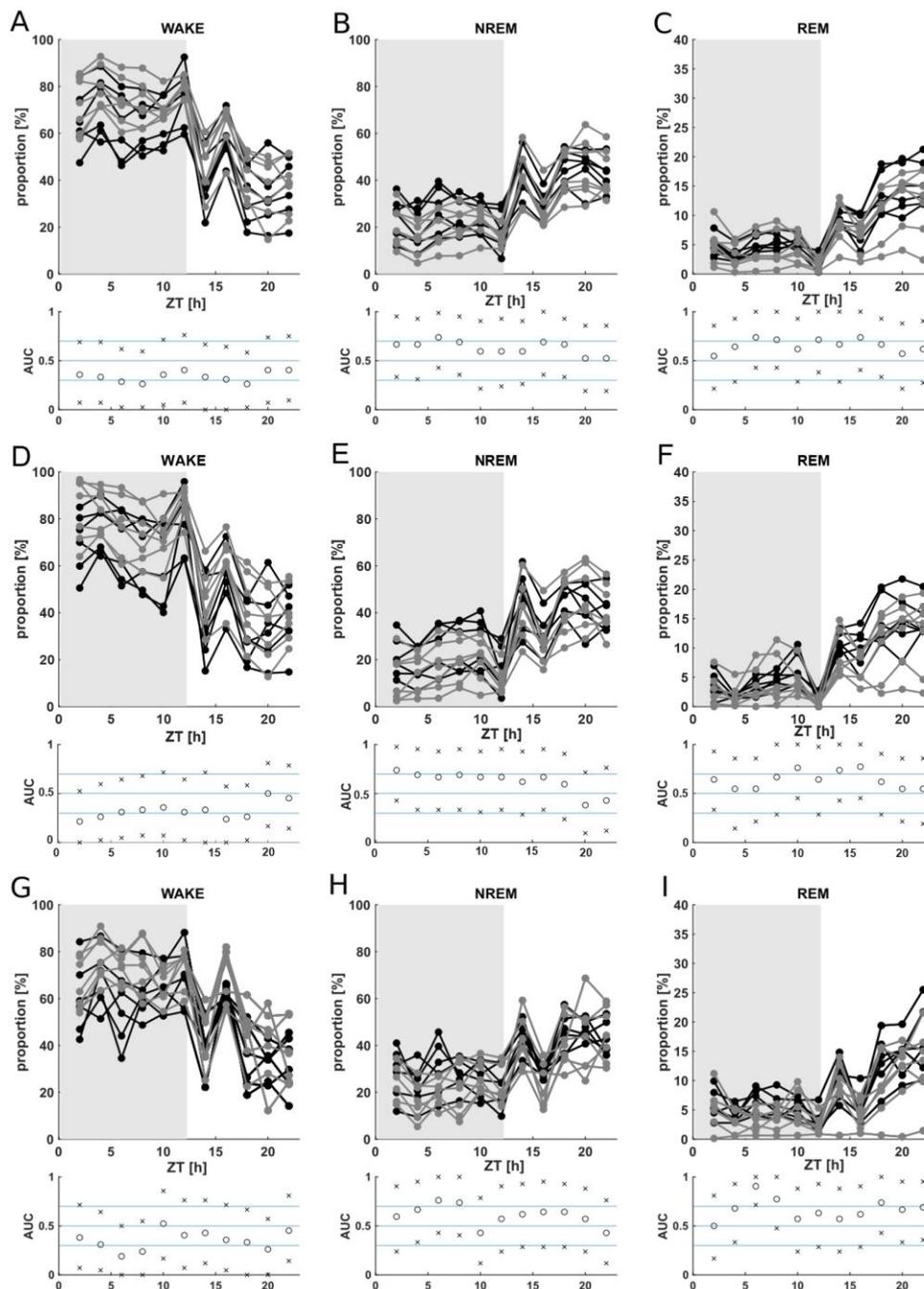


Abbildung 13. Anteil der Vigilanzstadien der nicht-kabel-gebundenen (schwarz, $n = 6$) und kabel-gebundenen (grau, $n = 7$) Tiere für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden während des 22-stündigen experimentellen Beobachtungszeitraums. Das Licht wurde nach 12 Stunden eingeschaltet. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). Grau (ZT[h]: 0 – 12) zeigt die Dunkelphase, weiß (ZT[h]: 12 – 22) zeigt die Hellphase. Die Kreise stellen die berechnete AUC-Werte dar. Die Grenzen der 95%-Konfidenzintervalle sind durch den Buchstaben x dargestellt. WAKE: Wachzustand. NREM: NREM-Schlaf. REM: REM-Schlaf. **A, B, C:** Gemittelte Werte für alle 9 Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (A), NREM-Schlaf (B) und REM-Schlaf (C). Die Berechnung der AUC-Werte ergab keinen Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und den kabel-gebundenen (grau) Tieren. **D, E, F:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage (früh) des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (D),

NREM-Schlaf (E) und REM-Schlaf (F). Die Berechnung der AUC-Werte ergab keinen Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und den kabel-gebundenen (grau) Tieren. **G, H, I:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage (spät) des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (G), NREM-Schlaf (H) und REM-Schlaf (I). Die AUC-Analyse ergab keinen Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und den kabel-gebundenen (grau) Tieren. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt.

Um zur Beurteilung einer Habituation an das Kabel einen Vergleich innerhalb der Gruppe zu analysieren, haben wir die lineare Regression für den Anteil der Vigilanzstadien für jedes Tier im Tagesdurchschnitt im Verlauf der neun Beobachtungstage berechnet. Weder in der kabel-gebundenen noch in der nicht-kabel-gebundenen Gruppe unterschied sich der Anteil des aktiven Wachzustands (active WAKE) signifikant im zeitlichen Verlauf der Beobachtungstage (Abbildung 14 A, B), wohingegen in beiden Gruppen eine signifikante Abnahme des ruhigen Wachzustands (quiet WAKE; nicht-kabel-gebunden: $p = 0.014$, kabel-gebunden: $p = 0.028$) und eine signifikante Zunahme des NREM-Schlafs (nicht-kabel-gebunden: $p = 0.045$, kabel-gebunden: $p = 0.020$) von der frühen zur späten experimentellen Beobachtungsphase festgestellt wurde (Abbildung 14 C, D, E, F). In beiden Gruppen unterschied sich der Anteil des REM-Schlafs nicht signifikant im zeitlichen Verlauf innerhalb der Gruppe während der Beobachtungsphase (Abbildung 14 G, H).

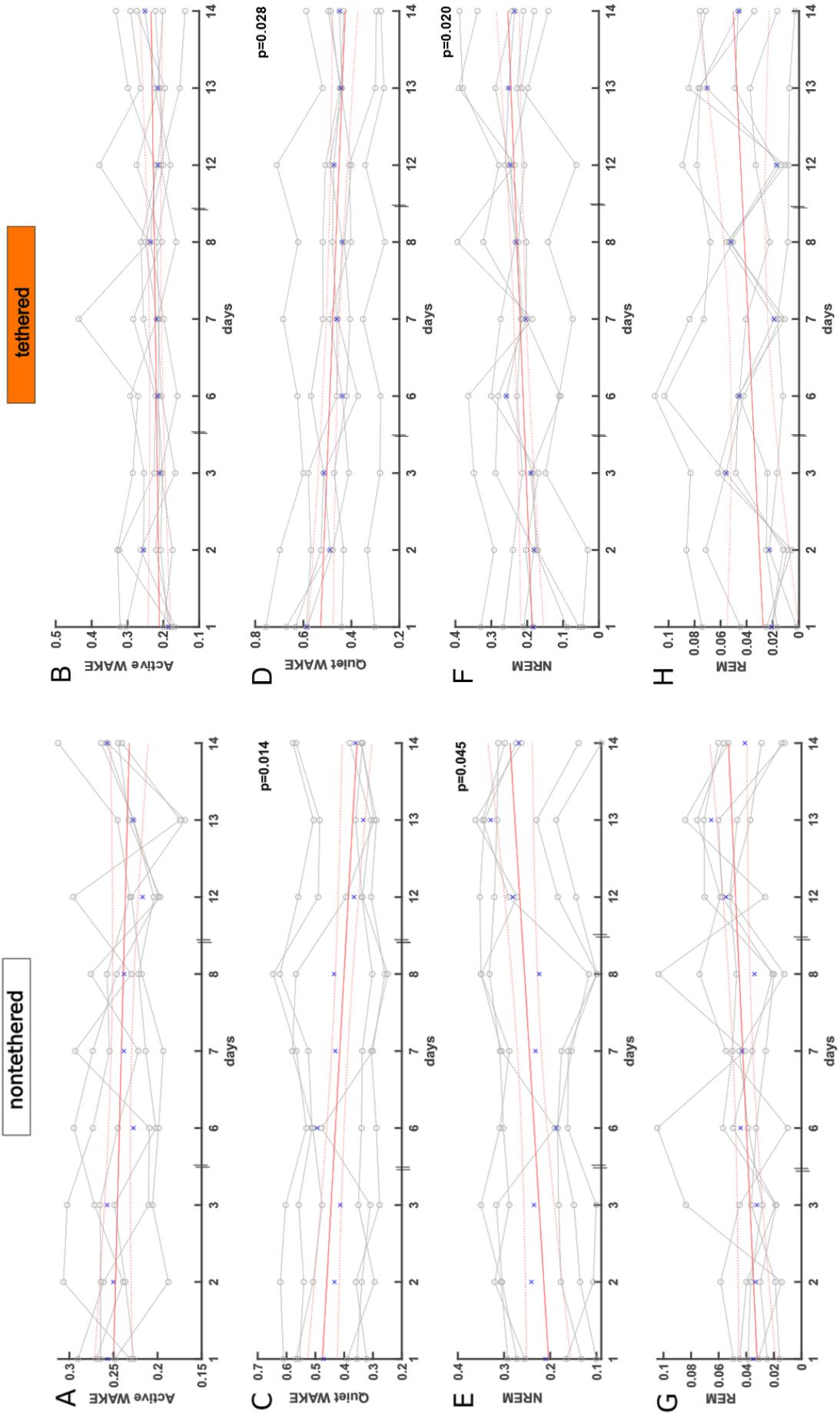


Abbildung 14. Lineares Regressionsmodell der Vigilanzstadien der nicht-kabel-gebundenen (schwarz, $n = 6$) und kabel-gebundenen (grau, $n = 7$) Tiere während der experimentellen Beobachtungsphase. Für jedes Tier wurde der Durchschnitt pro Tag berechnet. Die x-Achse gibt die Tage an. WAKE: Wachzustand, NREM: NREM-Schlaf, REM: REM-Schlaf. **A, C, E, G:** Lineares Regressionsmodell für die nicht-kabel-gebundenen Tiere für aktiven Wachzustand (A), ruhigen Wachzustand (C), NREM-Schlaf (E) und REM-Schlaf (G). Es wurde eine signifikante Abnahme des ruhigen Wachzustands ($p = 0.014$) und eine signifikante Zunahme des NREM-Schlafs ($p = 0.045$) von der frühen zur späten experimentellen Beobachtungsphase festgestellt. **B, D, F, H:** Lineares Regressionsmodell für die kabel-gebundenen Tiere für aktiven Wachzustand (B), ruhigen Wachzustand (D), NREM-Schlaf (F) und REM-Schlaf (H). Es wurde eine signifikante Abnahme des ruhigen Wachzustands ($p = 0.028$) und ein signifikanter Anstieg des NREM-Schlafs ($p = 0.020$) von der frühen zur späten experimentellen Beobachtungsphase festgestellt. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt.

2.3. Auswirkung des Kabels auf die Bout-Längen und auf die Übergänge zwischen den Vigilanzstadien

Die kumulative Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen wurde zu Beginn (Tag 1 bis 3) und am Ende (Tag 12 bis 14) des experimentellen Beobachtungszeitraums gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert, um eine mögliche Gewöhnung an das Kabel zu untersuchen.

Eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere WAKE-Episoden zeigte sich sowohl in der Dunkelphase zu Beginn ($p = 0.004$; erste drei Tage) und am Ende ($p < 0.001$; letzte drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums (Abbildung 15 A, Abbildung 15 G) als auch in der Hellphase am Ende (letzte drei Tage; $p < 0.001$) des experimentellen Beobachtungszeitraums (Abbildung 15 J). Mit einer flacheren Steigung der kumulativen Wahrscheinlichkeitskurve haben kabel-gebundene Tiere eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere Wachphasen als nicht-kabel-gebundene Tiere.

Bei den kabel-gebundenen Tieren zeigte sich eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere NREM-Schlaf-Episoden in der Hellphase am Ende (letzte drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums ($p < 0.001$; Abbildung 15 K). Die flachere Steigung in der kumulativen Wahrscheinlichkeitskurve weist darauf hin, dass kabel-gebundene Tiere eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere NREM-Schlafphasen haben als nicht-kabel-gebundene Tiere. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit der Längen der REM-Schlaf-Bouts deutlich.

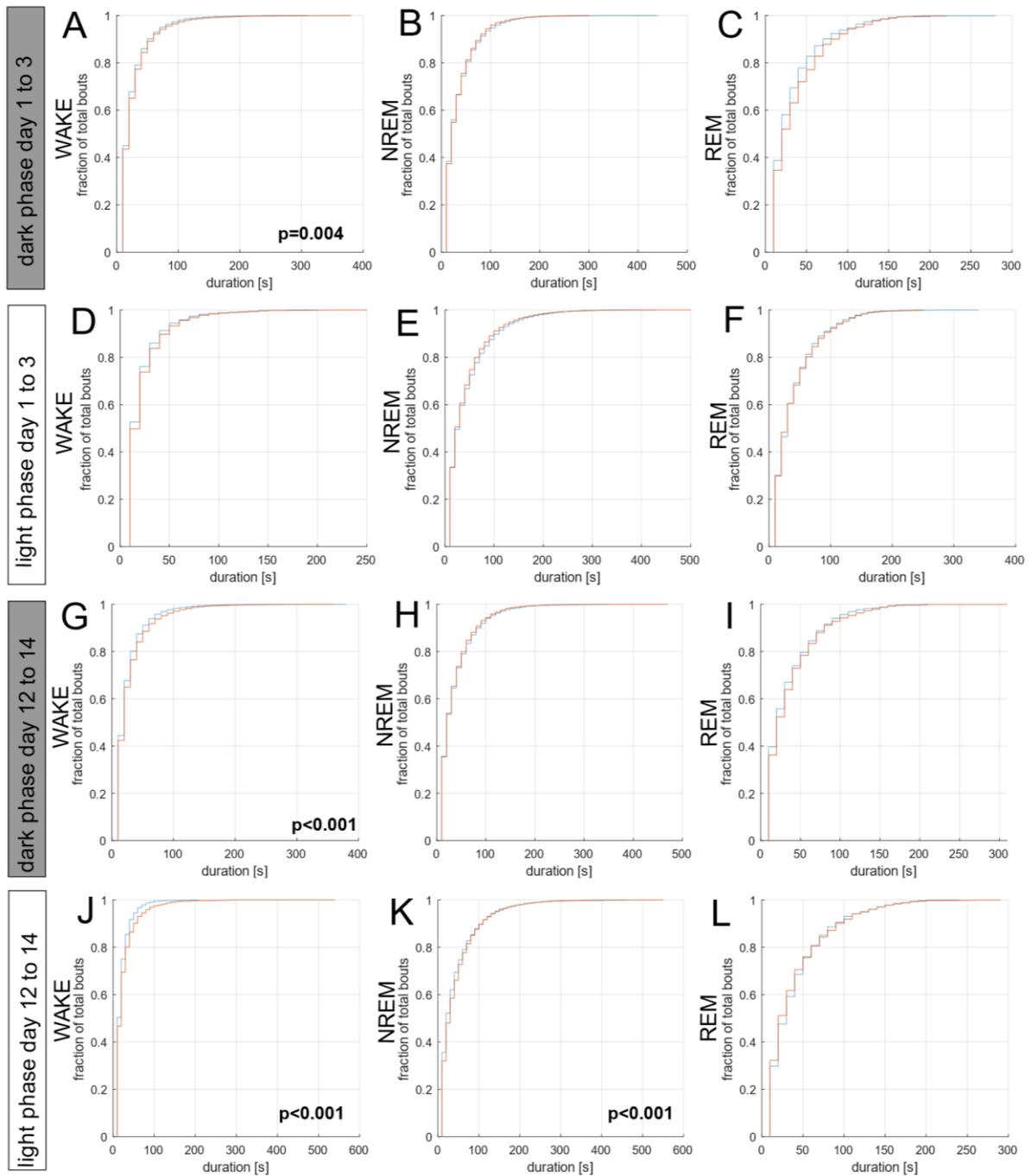


Abbildung 15. Bout-Längen Verteilung der Vigilanzstadien der nicht-kabel-gebundenen (gestrichelte blaue Linien, n = 6) und der kabel-gebundenen (durchgezogene rote Linien, n = 7) Tiere, gepoolt für die Dunkel- und Hellphase. **A, B, C:** Bout-Längen der Dunkelphase zu Beginn (erste drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (A), NREM-Schlaf (B) und REM-Schlaf (C). Es wurden Unterschiede in den Bout-Längen für den Wachzustand festgestellt ($p = 0.004$). **D, E, F:** Bout-Längen der Hellphase zu Beginn (erste drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (D), NREM-Schlaf (E) und REM-Schlaf (F). **G, H, I:** Bout-Längen der Dunkelphase am Ende (letzte drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums für WAKE (G), NREM-Schlaf (H) und REM-Schlaf (I). Es wurden Unterschiede in den Bout-Längen für den Wachzustand festgestellt ($p < 0.001$). **J, K, L:** Bout-Längen der Hellphase am Ende (letzte

drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (J), NREM-Schlaf (K) und REM-Schlaf (L). Es wurden Unterschiede in den Bout-Längen für den Wachzustand ($p < 0.001$) und den NREM-Schlaf ($p < 0.001$) festgestellt. Es wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und kumulativen Wahrscheinlichkeitsdiagrammen auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Um einen direkten Einfluss des Kabels zu analysieren, wurde zusätzlich der erste Tag, ebenfalls gepoolt für die Dunkel- und Hellphase, ausgewertet (Abbildung 16).

Bei der Analyse der kumulativen Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen am ersten Tag waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für den Wachzustand und für REM-Schlaf, sowohl für die Dunkel- als auch für die Hellphase, und für NREM-Schlaf während der Hellphase erkennbar, wohingegen die kabel-gebundenen Tiere am ersten Tag während der Dunkelphase eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für längere NREM Bout-Längen zeigten ($p = 0.035$; Abbildung 16 B). Dies wurde durch die flachere Steigung der kumulativen Wahrscheinlichkeitskurve der kabel-gebundenen Tiere erkennbar.

Aufgrund der signifikanten Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit der WAKE Bout-Längen wurden zusätzlich die Bout-Längen für AWAKE und QWAKE am ersten Tag der Beobachtungsphase gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert (Abbildung 16).

In der Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für den aktiven Wachzustand, sowohl für die Dunkel- als auch für die Hellphase, und für den ruhigen Wachzustand in der Hellphase erkennbar. Die signifikant flachere Steigung der kumulativen Wahrscheinlichkeitskurve des ruhigen Wachzustands in der Dunkelphase an Tag eins von den kabel-gebundenen Tieren ($p < 0.001$; Abbildung 16 H), weist auf eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere QWAKE-Bout-Längen in den kabel-gebundenen Tieren hin.

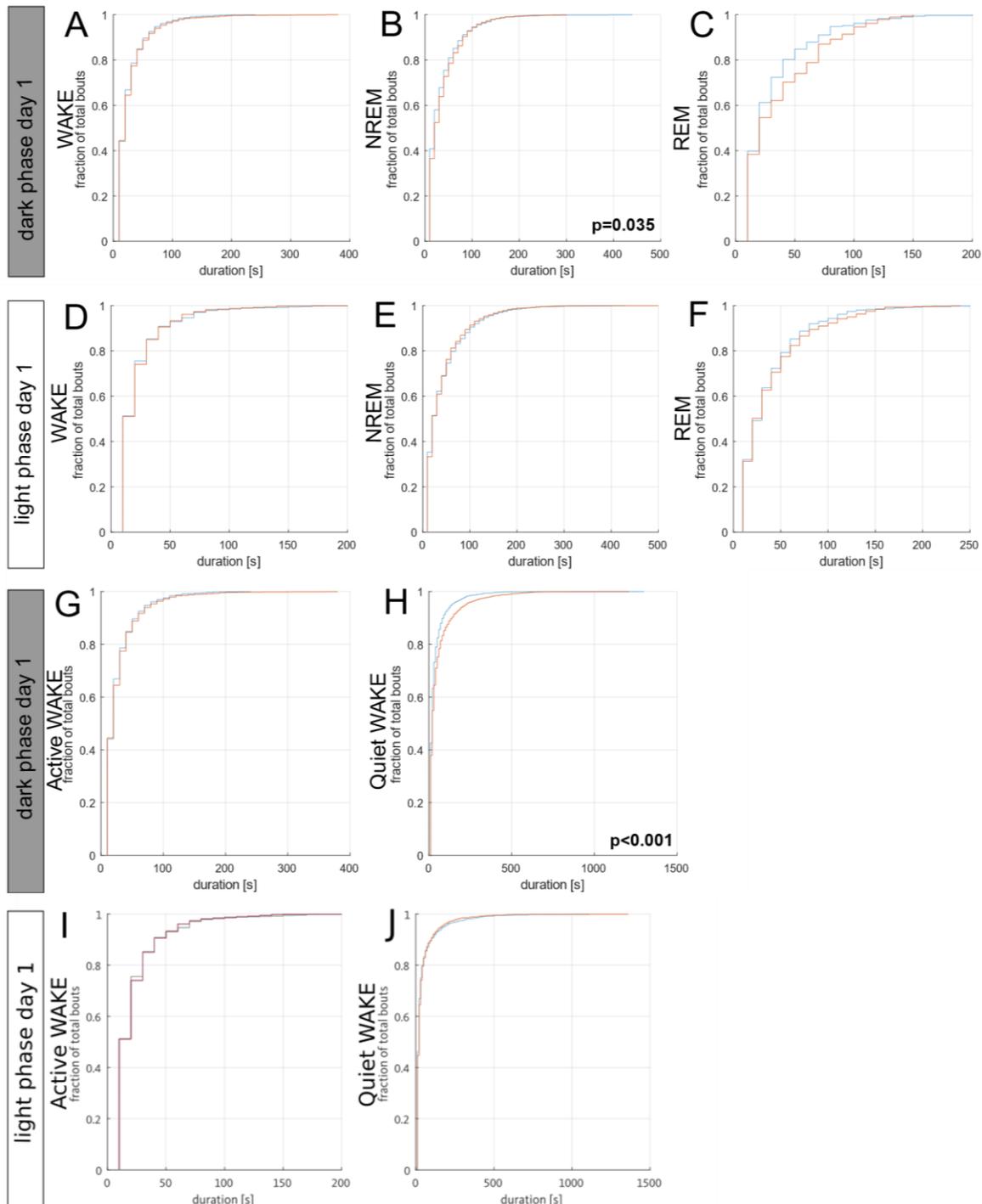


Abbildung 16. Bout-Längen Verteilung der Vigilanzstadien der nicht-kabel-gebundenen (gestrichelte blaue Linien, $n = 6$) und der kabel-gebundenen (durchgezogene rote Linien, $n = 7$) Tiere, gepoolt für die Dunkel- und Hellphase. **A, B, C:** Bout-Längen der Dunkelphase am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (A), NREM-Schlaf (B) und REM-Schlaf (C). Für den NREM-Schlaf wurden Unterschiede in den Bout-Längen festgestellt ($p = 0.035$). **D, E, F:** Bout-Längen der Hellphase am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums für Wachzustand (D), NREM-Schlaf (E) und REM-Schlaf (F). **G, H:** Bout-Längen der Dunkelphase am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums für aktiven Wachzustand (G) und ruhigen Wachzustand (H). Es wurden Unterschiede in den Bout-Längen für den ruhigen Wachzustand

festgestellt ($p < 0.001$). **I, J:** Bout-Längen der Hellphase am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums für aktiven Wachzustand (I), und ruhigen Wachzustand (J). Es wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test und kumulativen Wahrscheinlichkeitsdiagrammen auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Die Anzahl der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien wurde an Tag eins, zu Beginn (erste drei Tage) und am Ende (letzte drei Tage) des Beobachtungszeitraums in den Glaskäfigen gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert.

Die Analyse der Anzahl der Übergänge zwischen Wachzustand (WAKE) und Schlafen (SLEEP) ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder zu Beginn noch am Ende des Beobachtungszeitraums (Abbildung 17 C, D).

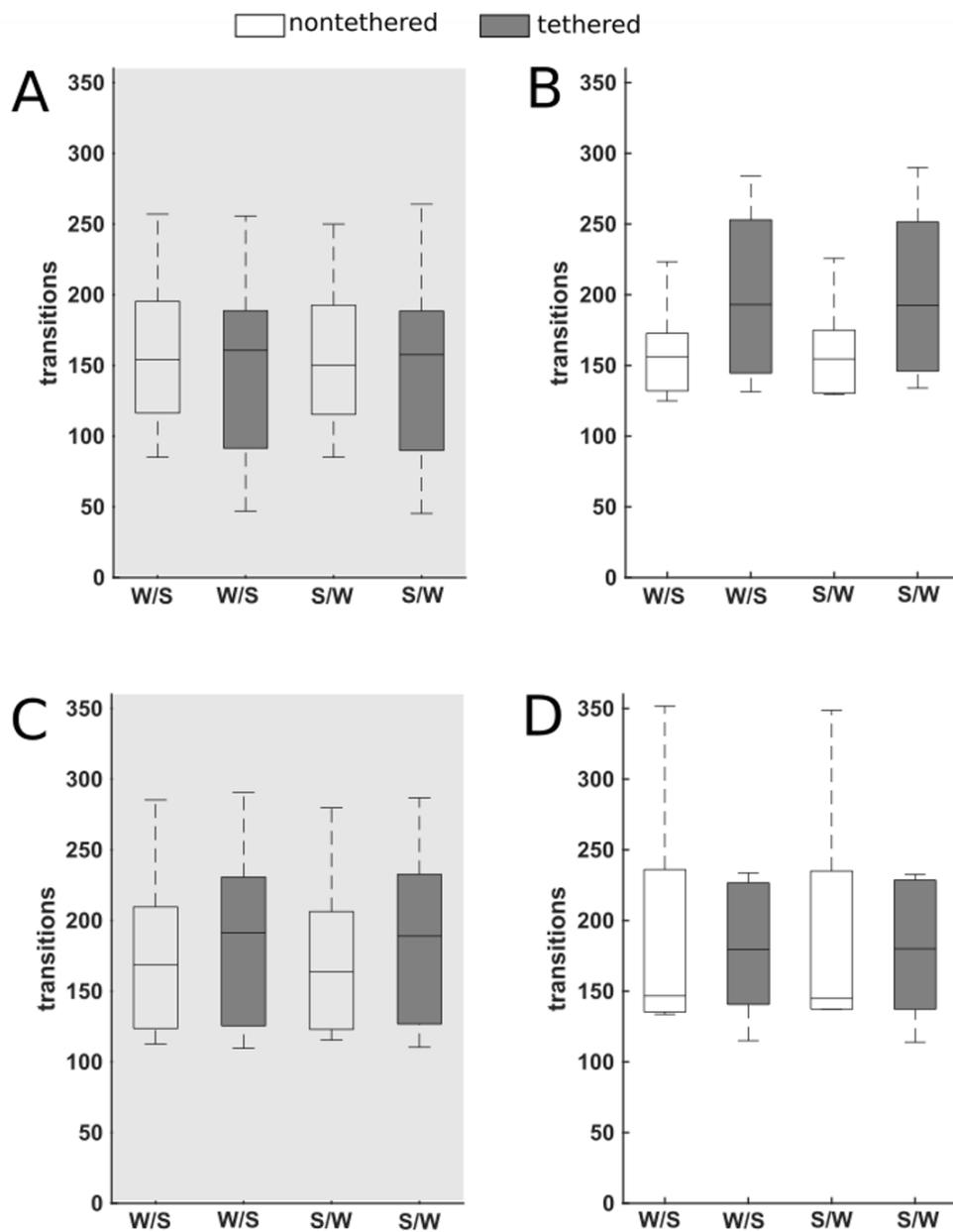


Abbildung 17. Übergänge zwischen Wachzustand (WAKE) und Schlafen (SLEEP) der nicht-kabelgebundenen ($n = 6$) und kabelgebundenen ($n = 7$) Tiere. W/S = Übergänge von WAKE zu SLEEP. S/W = Übergänge von SLEEP zu WAKE. **A, B:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (früh) für die Dunkelphase (A) und die Hellphase (B). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabelgebundenen und kabelgebundenen Tieren in (A) der Dunkelphase und in (B) der Hellphase. **C, D:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (spät) für die Dunkelphase (C) und die Hellphase (D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabelgebundenen und kabelgebundenen Tieren (C) in der Dunkelphase und (D) in der Hellphase festgestellt. Box-Plots zeigen die Minimal- und Maximalwerte mit Median. Es wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Die Analyse der Übergänge zwischen NREM-Schlaf und REM-Schlaf ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder zu Beginn (Abbildung 18 A, B) noch am Ende des Beobachtungszeitraums (Abbildung 18 C, D).

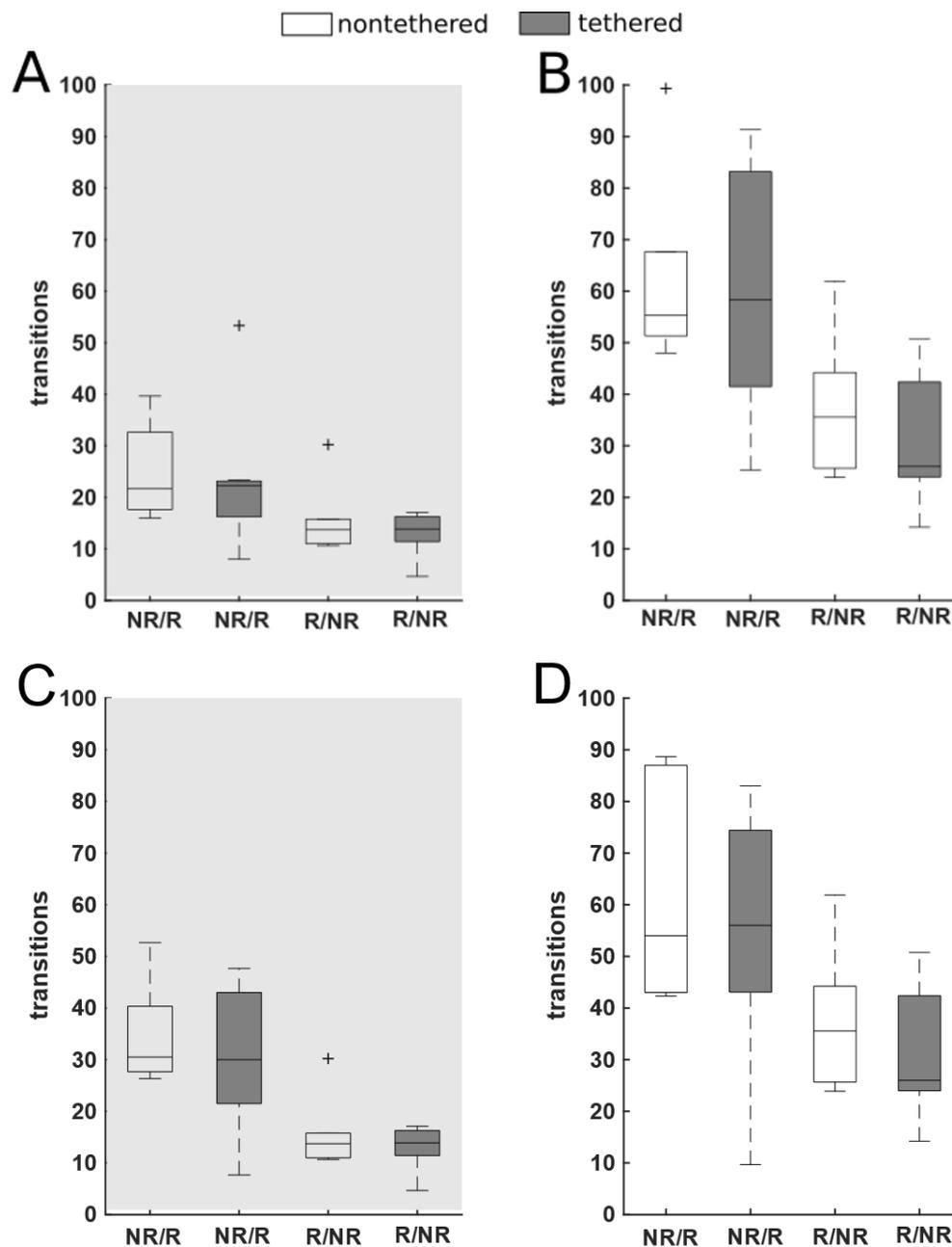


Abbildung 18. Übergänge zwischen NREM-Schlaf und REM-Schlaf der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere. NR/R = Übergänge vom NREM-Schlaf zum REM-Schlaf. R/NR = Übergänge vom REM-Schlaf zum NREM-Schlaf. "+" zeigt Ausreißer an. **A, B:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (früh) für die Dunkelphase (A) und die Hellphase (B). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (A) der Dunkelphase und in (B) der Hellphase. **C, D:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (spät) für die Dunkelphase (C) und die Hellphase (D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (C) der Dunkelphase und in (D) der Hellphase festgestellt. Box-Plots zeigen die Minimal- und Maximalwerte mit Median. Es wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Die Analyse der Übergänge zwischen QWAKE und AWAKE ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede, weder zu Beginn (Abbildung 19 A, B) noch am Ende des Beobachtungszeitraums (Abbildung 19 C, D).

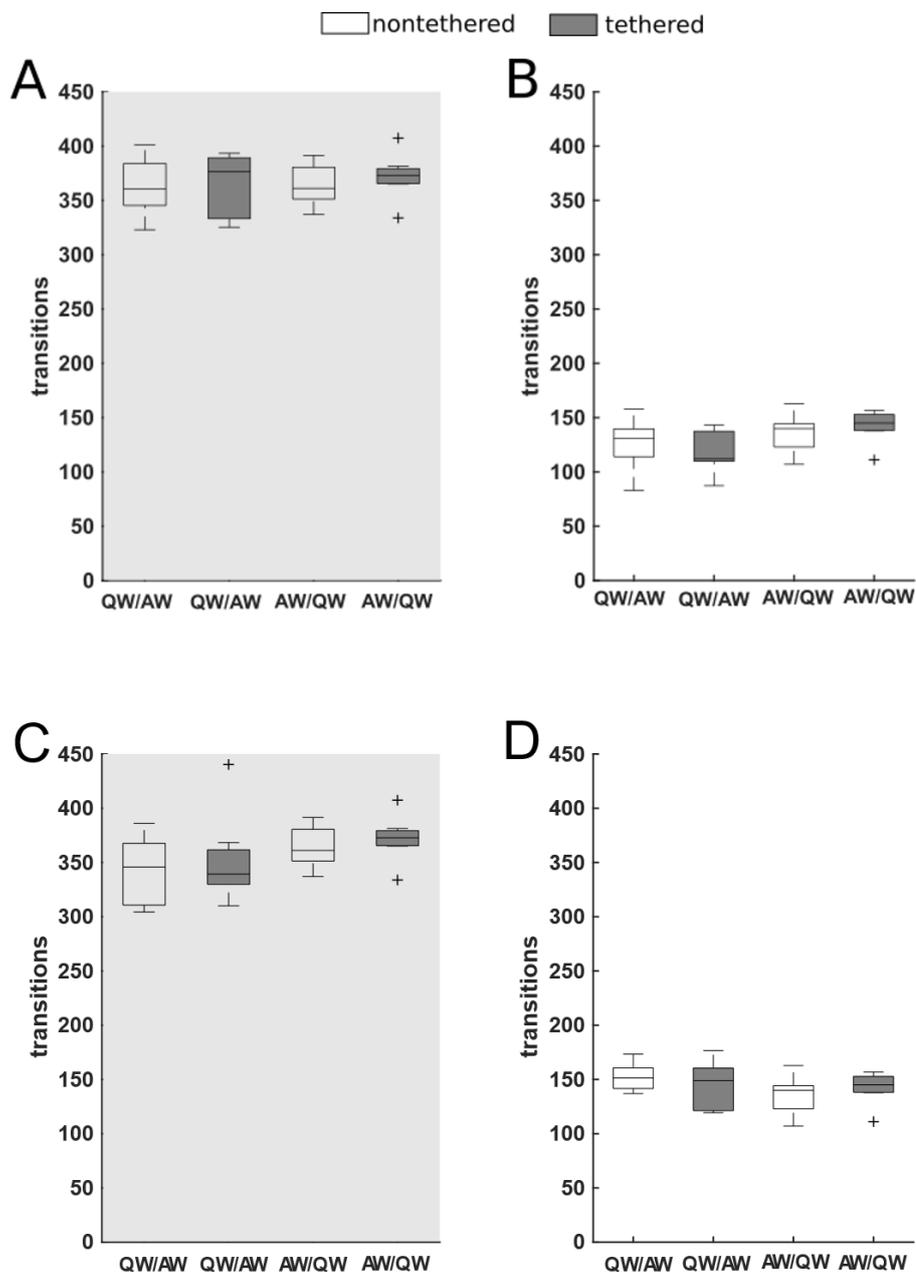


Abbildung 19. Übergänge zwischen QWAKE (ruhiger Wachzustand) und AWAKE (aktiver Wachzustand) der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere. QW/AW = Übergänge von ruhigem Wachzustand zu aktivem Wachzustand. AW/QW = Übergänge von aktivem Wachzustand zu ruhigem Wachzustand. "+" zeigt Ausreißer an. **A, B:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (früh) für die Dunkelphase (A) und die Hellphase (B). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (A) der Dunkelphase und in (B) der Hellphase. **C, D:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (spät) für die Dunkelphase (C) und die Hellphase (D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (C) der Dunkelphase und in (D) der Hellphase festgestellt. Box-Plots zeigen die Minimal- und Maximalwerte mit Median. Es wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Die Analyse der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums der nicht-kabel-gebundenen (n = 6) und kabel-gebundenen (n = 7) Tiere ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 20).

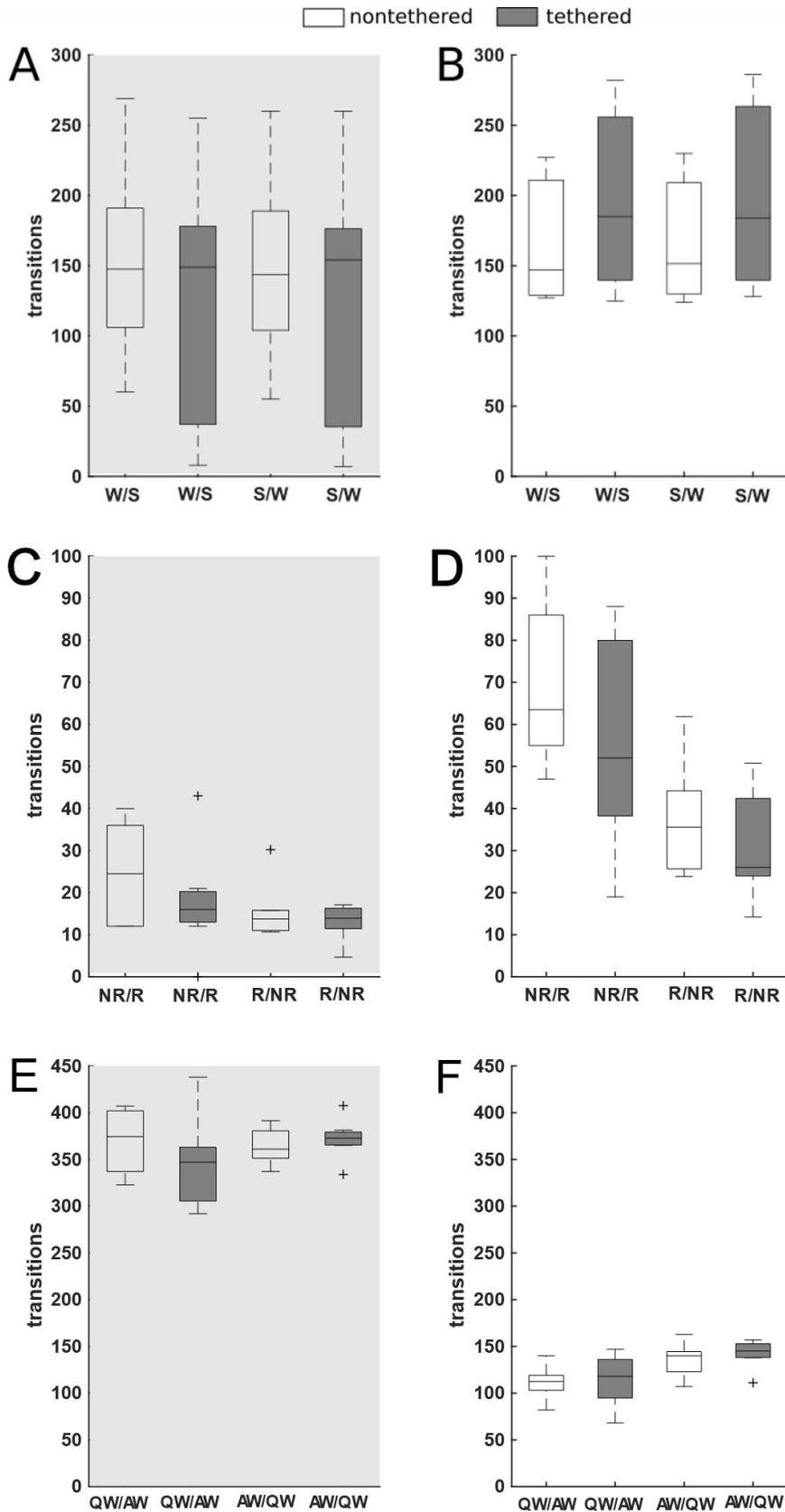


Abbildung 20. Übergänge zwischen den Vigilanzstadien am ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere. W/S = Übergänge von WAKE zu SLEEP. S/W = Übergänge von SLEEP zu WAKE. NR/R = Übergänge vom NREM-Schlaf zum REM-Schlaf. R/NR = Übergänge vom REM-Schlaf zum NREM-Schlaf. QW/AW = Übergänge von QWAKE zu AWAKE. AW/QW = Übergänge von AWAKE zu QWAKE. "+" zeigt Ausreißer an. **A, B:** Übergänge zwischen WAKE und SLEEP für die Dunkelphase (A) und die Hellphase (B). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (A) der Dunkelphase und in (B) der Hellphase festgestellt. **C, D:** Übergänge zwischen NREM-Schlaf und REM-Schlaf für die Dunkelphase (C) und die Hellphase (D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (C) der Dunkelphase und in (D) der Hellphase festgestellt. **E, F:** Übergänge zwischen ruhigem Wachzustand (QWAKE) und aktivem Wachzustand (AWAKE) für die Dunkelphase (E) und die Hellphase (F). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (E) der Dunkelphase und in (F) der Hellphase festgestellt. Box-Plots zeigen die Minimal- bis Maximalwerte mit Median. Die Unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet.

Die fehlenden signifikanten Gruppenunterschiede bei der Anzahl der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien bestätigten damit nicht die signifikanten Unterschiede in der Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen.

2.4. Quantitative EEG Auswertung *slow wave activity power*

Die SWA-Power wurde zu Beginn (Tag 1 bis 3) und am Ende (Tag 12 bis 14) des Beobachtungszeitraums gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert. Zu keinem der Zeitpunkte wurde ein signifikanter Unterschied in der SWA zwischen den beiden Gruppen festgestellt (Abbildung 21).

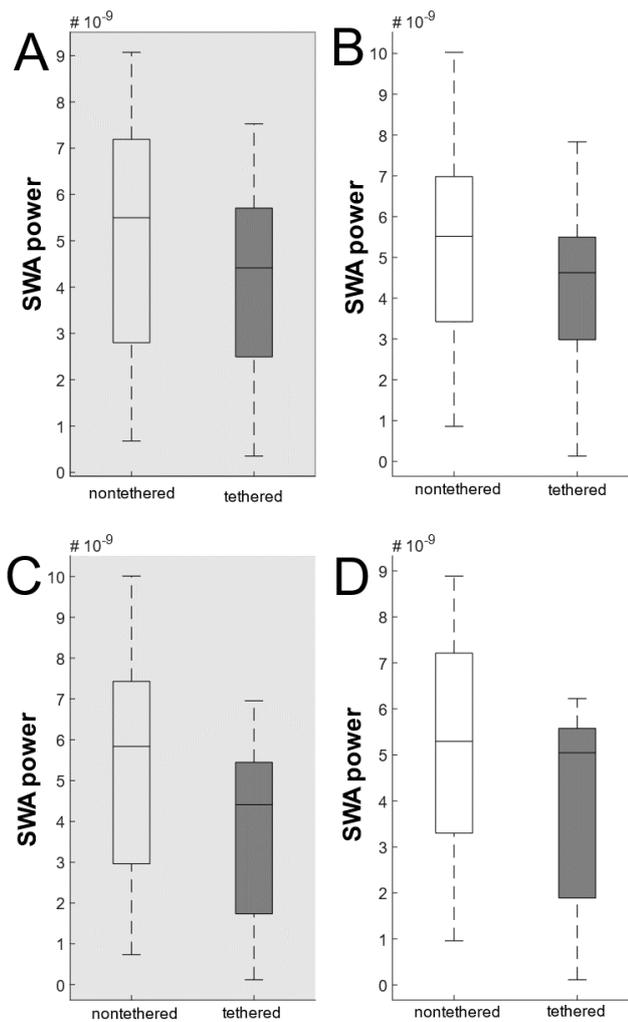


Abbildung 21. SWA-Power der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere für jede 10-Sekunden-Episode, die als NREM bewertet wurde. **A, B:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (früh) für die Dunkelphase (A) und die Hellphase (B). Die Auswertung ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (A) der Dunkelphase und in (B) der Hellphase. **C, D:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums (spät) für die Dunkelphase (C) und die Hellphase (D). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren in (C) der Dunkelphase und in (D) der Hellphase festgestellt. Box-Plots zeigen die Minimal- und Maximalwerte mit Median. Es wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

Zusätzlich wurde die SWA-Power für den ersten Tag des Beobachtungszeitraums gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert. Es wurde kein signifikanter Unterschied in der SWA zwischen den beiden Gruppen festgestellt (Abbildung 22).

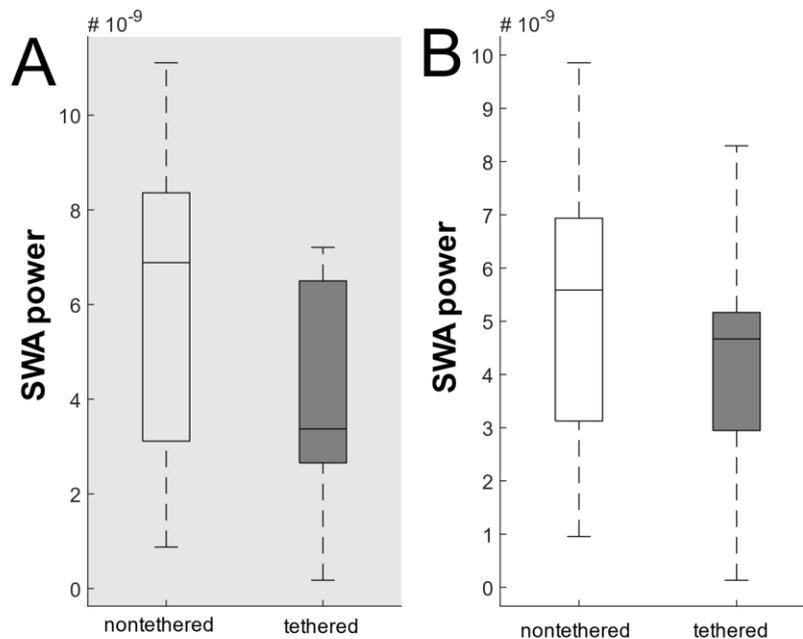


Abbildung 22. SWA-Power der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere für jede 10-Sekunden-Episode, die als NREM bewertet wurde. **A:** SWA-Power in der Dunkelphase. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und den kabel-gebundenen Tieren festgestellt. **B:** SWA-Power für die Hellphase. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und den kabel-gebundenen Tieren festgestellt. Die Box-Plots zeigen die minimalen bis maximalen Werte mit Median. Es wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen getestet.

2.5. Einfluss des Kabels auf Nestbauverhalten und Saccharin-Präferenz

Die Nestbauaktivität wurde als Indikator für das Wohlbefinden von Labornagern empfohlen (JIRKOF, 2014). Frühere Studien unseres Instituts haben gezeigt, dass sich die Werte für die Nestkomplexität vier Tage nach der Bereitstellung von neuem Nestmaterial stabilisieren, ein Plateau erreichen und am siebten Tag wieder abnehmen (MÖLLER et al., 2018; SCHWABE et al., 2020). Daher wurde die Nestkomplexität am vierten bis sechsten Tag nach der Bereitstellung von neuem Nestmaterial bewertet. Die Bewertung der Nestkomplexität während des experimentellen Beobachtungszeitraums ergab keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 23). In beiden Wochen war ein progressiver Anstieg der Nestwerte in der nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Gruppe zu beobachten. Die Maximalwerte bei nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Ratten waren vergleichbar und erreichten in beiden Gruppen den Wert 3. Die Medianwerte der Gruppen lagen gegen Ende der ersten Woche (Abbildung 23 A) und gegen Ende der zweiten Woche (Abbildung 23 B) in einem vergleichbaren Bereich.

Die Bewertung der Nestkomplexität innerhalb der Gruppen während des

Beobachtungszeitraums ergab keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 24 A, B). Die Saccharin-Präferenz wurde zweimal während der Phase in den Glaskäfigen untersucht. Anhand der Daten von Tagen, an denen die Tiere zwei identische Wasserflaschen erhielten, konnten wir eine Seiten-Präferenz als mögliche Verzerrung ausschließen. Die kontinuierliche Verbindung mit Kabel schien keinen Einfluss auf die relative Menge an Saccharin zu haben, welche während der ersten (Abbildung 23 C) und zweiten Woche (Abbildung 23 D) des experimentellen Beobachtungszeitraums im Vergleich zu der nicht-kabel-gebundenen Gruppe konsumiert wurde.

Ein gruppeninterner Vergleich ergab einen signifikanten Anstieg des Saccharin-Konsums ($p = 0.031$) bei den nicht-kabel-gebundenen Tieren zwischen Woche eins und zwei, während die kabel-gebundenen Tiere keinen signifikanten Unterschied zeigten (Abbildung 24 C, D). Bei der Betrachtung der einzelnen Daten war es jedoch interessant, dass in der 2. Woche die Ergebnisse für nicht-kabel-gebundene Ratten eher homogen waren, während bei drei kabel-gebundenen Ratten eine hohe Varianz mit einem eher geringen Saccharin-Konsum zu beobachten war.

2.6. Auswirkungen des Kabels auf Corticosteron und seine Metaboliten

Die Analyse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten bietet die Möglichkeit, die Aktivität der Nebenniere ohne invasive Probenahmeverfahren zu beurteilen. Dreieinhalb Wochen nach der Operation, das heißt vor dem Transfer der Ratten in die Glaskäfige, unterschieden sich die fäkalen Corticosteron-Metaboliten nicht signifikant von den Basalwerten vor der Operation (Abbildung 23 E). Die Verbringung in den Überwachungskäfig hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der fäkalen Corticosteron-Metaboliten im Vergleich zu den Basalwerten und zu den Werten vor der Verbringung (Abbildung 23 E).

Darüber hinaus waren während der Phase in den Überwachungskäfigen keine Gruppenunterschiede zwischen Tieren mit und ohne Kabel erkennbar (Abbildung 23 E, F). Die fäkalen Corticosteron-Metaboliten unterschieden sich während dieser Versuchsphase an Tag 1, 2, 8 und 14 nicht signifikant zwischen diesen Gruppen (Abbildung 23 E).

Beim gruppeninternen Vergleich wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten in beiden Gruppen festgestellt (Abbildung 24 E, F).

Ein weiterer Beleg für das Fehlen von Gruppenunterschieden bei der Aktivität der HPA-Achse war, dass das am Ende des Versuchs analysierte Serum-Corticosteron bei Tieren mit und ohne zweiwöchige Kabelverbindung im gleichen Bereich lag (Abbildung 23 G).

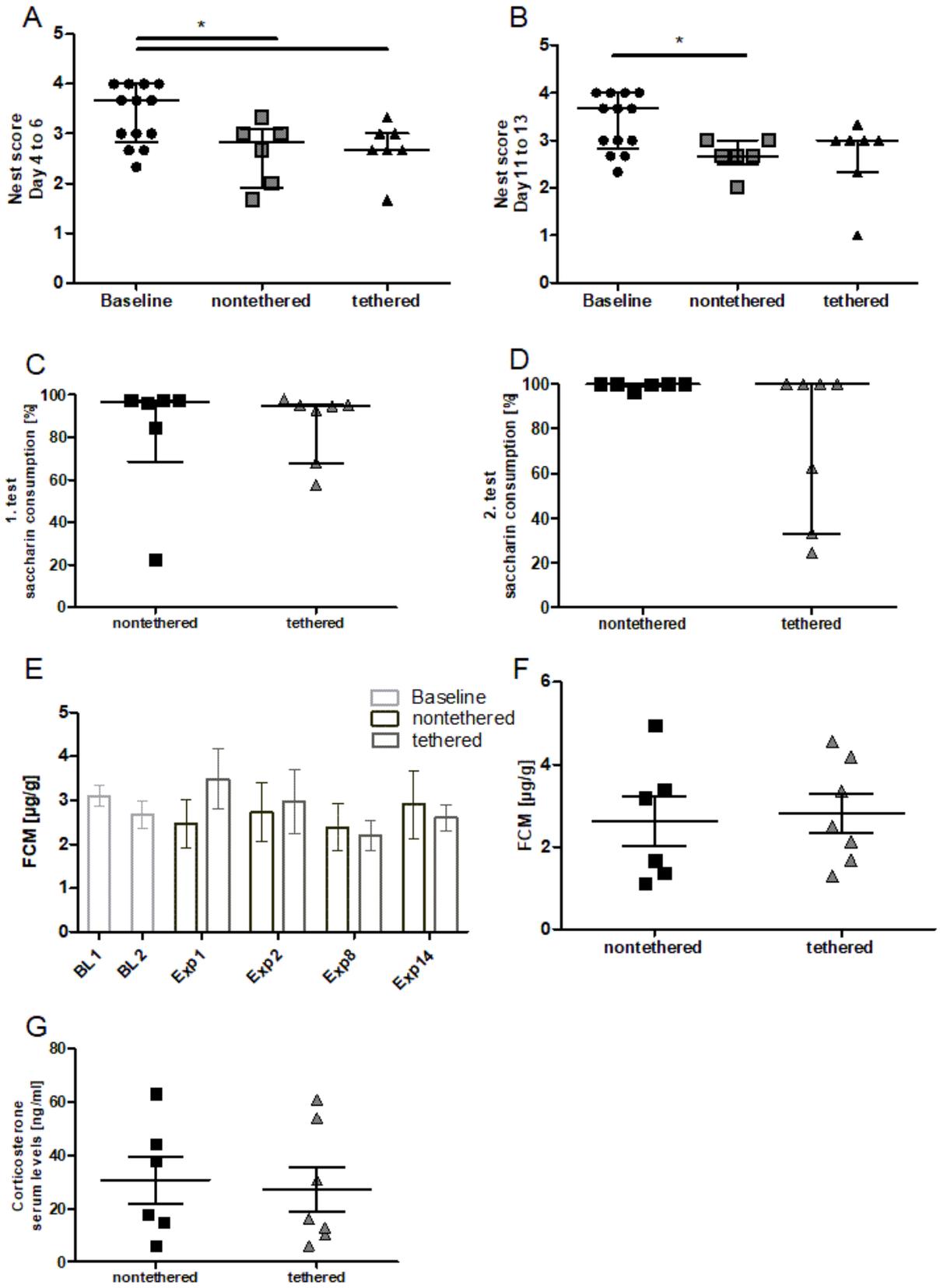


Abbildung 23. Nestbauaktivität, anhedonie-assoziiertes Verhalten, fäkale Corticosteron-Metaboliten (FCM) und Serum-Corticosteron-Spiegel der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere. Basalwerte: $n = 13$ Tiere. **A, B:** Gemittelte Werte Tag 4 bis 6 (A) und Tag 11 bis 13 (B) für die Nestbauaktivität während des experimentellen Beobachtungszeitraums. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren festgestellt. **C, D:** Anhedonie-assoziiertes Verhalten in der ersten Woche (C) und in der zweiten Woche (D) während des experimentellen Beobachtungszeitraums. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren festgestellt. **A-D:** Die Daten sind als Median (Interquartilabstand) angegeben. Es wurde auf Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test getestet. * weist auf einen signifikanten Unterschied hin. **E:** Fäkale Corticosteron-Metaboliten (FCM) für *Baseline 1* (BL1), *Baseline 2* (BL2), sowie Tag 1 (Exp1), Tag 2 (Exp2), Tag 8 (Exp8) und Tag 14 (Exp14) der experimentellen Beobachtungsphase. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Es wurde auf Unterschiede zwischen den Gruppen anhand einer *two-way* ANOVA mit den Faktoren "nicht-kabel-gebunden/kabel-gebunden" und "Tage" getestet, gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur. **F:** Durchschnittliche Werte der fäkalen Corticosteron-Metaboliten während des experimentellen Beobachtungszeitraums. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren festgestellt. **G:** Für Serum-Corticosteron wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Tieren festgestellt. **F, G:** Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. Es wurde mit einem *unpaired t-Test (two tailed)* auf Unterschiede getestet.

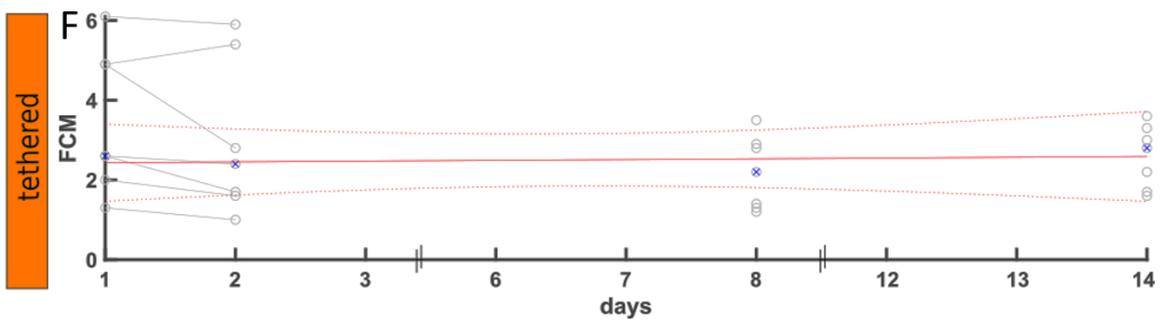
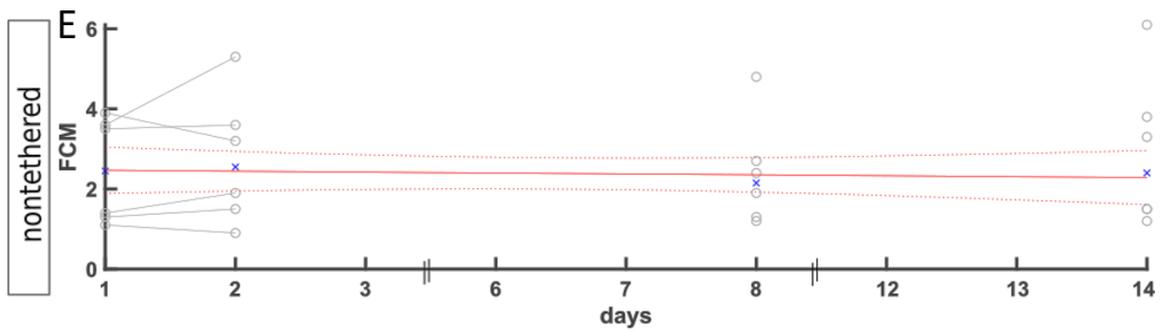
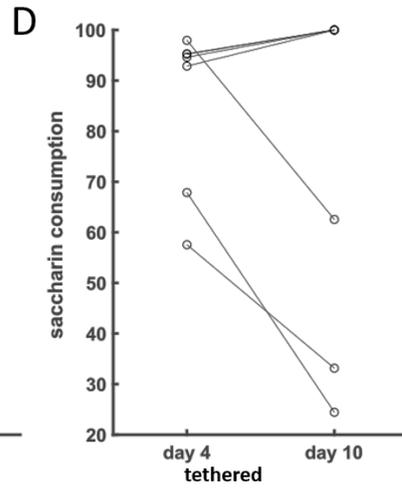
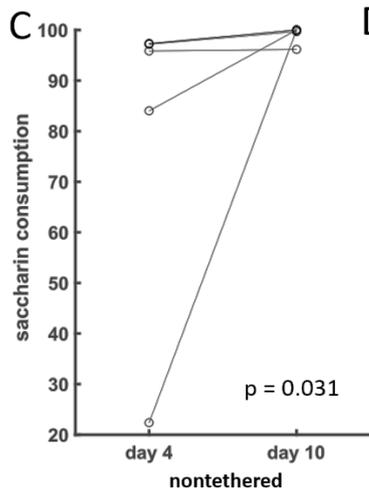
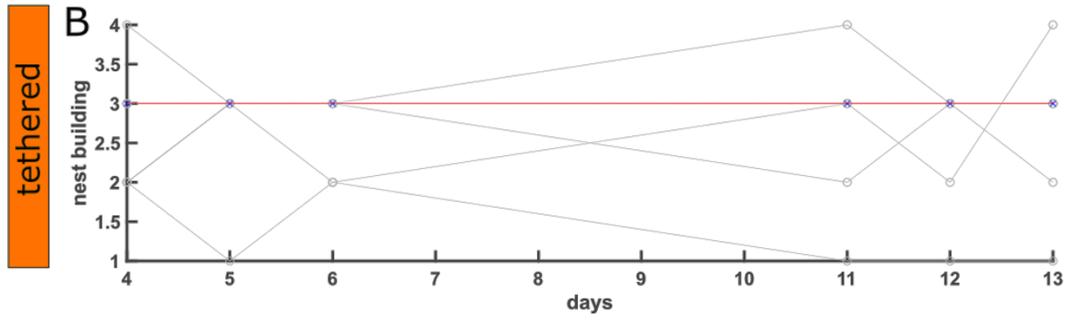
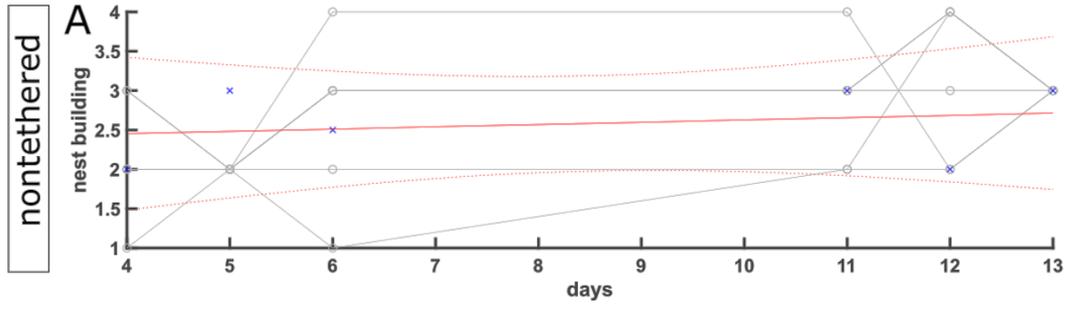


Abbildung 24. Lineares Regressionsmodell der verhaltensbezogenen und biochemischen Parameter der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere während der experimentellen Beobachtungsphase. Die x-Achse stellt die Tage dar. **A, B:** Lineares Regressionsmodell der Nestbauaktivität für nicht-kabel-gebundenen (A) und kabel-gebundenen (B) Tiere. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Beobachtungsphase festgestellt. **C, D:** Lineares Regressionsmodell für den Saccharin-Konsum für nicht-kabel-gebundene (C) und kabel-gebundene (D) Tiere. Der Saccharin-Konsum der nicht-kabel-gebundenen Tiere stieg zwischen Woche eins und zwei signifikant an ($p = 0.031$). **E, F:** Lineares Regressionsmodell für die fäkalen Corticosteron-Metaboliten (FCM) der nicht-kabel-gebundenen (E) und kabel-gebundenen (F) Tiere. Es wurden keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Beobachtungsphase festgestellt. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt.

2.7. Einfluss des Kabels auf das Aktivitätslevel

Man kann vermuten, dass Tiere, die durch ein Kabel in ihren Bewegungen und in ihrem Verhalten beeinträchtigt werden, sich weniger aktiv bewegen und mehr Zeit im ruhigen Wachzustand verbringen. Deswegen haben wir eine Auswertung der Aktivität für jedes Tier durchgeführt.

Die Aktivitätszählung (Anzahl der Counts) für sich nicht überschneidende, aufeinander folgende 2-stündige Beobachtungsepisoden während des 22-stündigen Beobachtungszeitraums wurden unter Berücksichtigung aller experimentellen Beobachtungstage analysiert. Darüber hinaus wurden die Daten von Tag eins, den ersten drei (Beginn des Beobachtungszeitraums) und den letzten drei Tagen (Ende des Beobachtungszeitraums) separat analysiert.

Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Aktivitätszählung zwischen den Tieren mit und ohne Kabelverbindung während der Aufzeichnung der Basalwerte (Abbildung 25 A,) und zu keinem Zeitpunkt während der experimentellen Beobachtungsphase (Abbildung 25 B; Abbildung 26 A, B, C) gefunden.

Bei den nicht-kabel-gebundenen Tieren unterschied sich die durchschnittliche Anzahl der Aktivitätszählungen zwischen Beginn und Ende des Beobachtungszeitraums sowohl in der Dunkel- als auch in der Hellphase nicht signifikant (Abbildung 26 D, E). Bei den kabel-gebundenen Tieren war während des gesamten Beobachtungszeitraums ein signifikanter Anstieg der durchschnittlichen Anzahl der Aktivität sowohl in der Dunkelphase ($p = 0.043$) als auch in der Lichtphase ($p = 0.014$) zu beobachten (Abbildung 26 F, G).

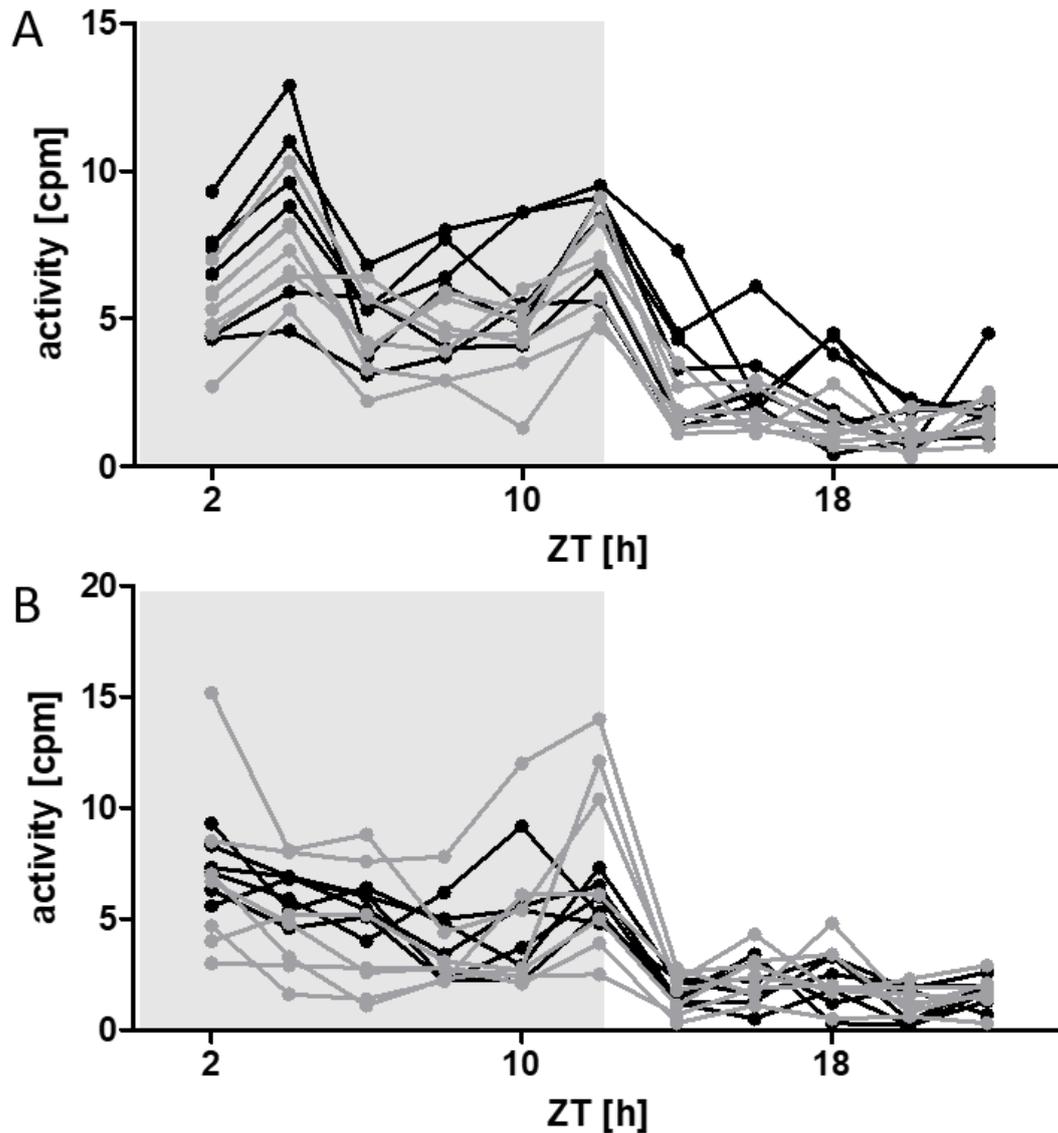


Abbildung 25. Auswertung des Aktivitätslevels der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden während der 22 Stunden. Die Lichter wurden nach 12 Stunden eingeschaltet. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). Grau (ZT[h]: 0 – 12) zeigt die Dunkelphase, weiß (ZT[h]: 12 – 22) zeigt die Hellphase. *cpm* = *counts per minute*. **A:** Gemittelte *Baseline*-Tage für die nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und die kabel-gebundenen (grau) Tiere. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. **B:** Gemittelte Werte der nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und kabel-gebundenen (grau) Tiere für den ersten Tag des experimentellen Beobachtungszeitraums. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt. Es wurde auf Unterschiede zwischen den Gruppen anhand einer *two-way* ANOVA mit den Faktoren "nicht-kabel-gebunden/kabel-gebunden" und "Stunden" getestet, gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur.

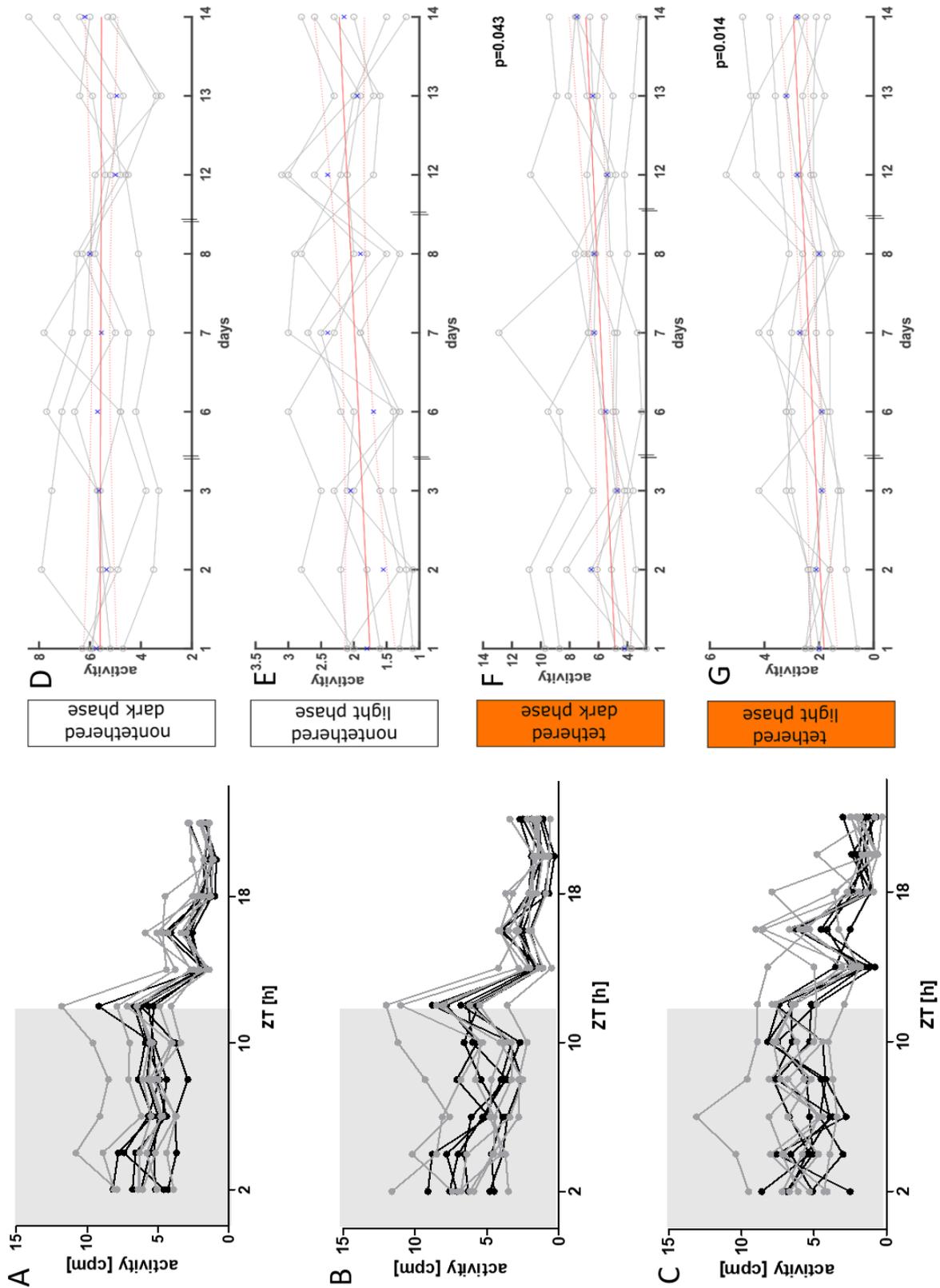


Abbildung 26. Auswertung des Aktivitätslevels der nicht-kabel-gebundenen ($n = 6$) und kabel-gebundenen ($n = 7$) Tiere. **A, B, C:** Aktivitätszählungen der nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und der kabel-gebundenen (grau) Tiere für sich nicht überschneidende 2-stündige Beobachtungsepisoden während der 22 Stunden. Das Licht wurde nach 12 Stunden eingeschaltet. Die x-Achse zeigt Zeitgeber time (ZT). Grau (ZT[h]: 0 – 12) zeigt die Dunkelphase, weiß (ZT[h]: 12

– 22) zeigt die Hellphase. *cpm* = *counts per minute*. **A:** Gemittelte Werte für alle 9 Tage des experimentellen Beobachtungszeitraums. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und kabel-gebundenen (grau) Tieren. **B:** Gemittelte Werte für die ersten drei Tage (früh) des experimentellen Beobachtungszeitraums. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und kabel-gebundenen (grau) Tieren. **C:** Gemittelte Werte für die letzten drei Tage (spät) des experimentellen Beobachtungszeitraums. Die Auswertung ergab zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und kabel-gebundenen (grau) Tieren. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt. Es wurde auf Unterschiede zwischen den Gruppen anhand einer *two-way* ANOVA mit den Faktoren "nicht-kabel-gebunden/kabel-gebunden" und "Stunden" getestet, gefolgt von einer post-hoc Bonferroni-Korrektur. **D, E, F, G:** Lineare Regressionsmodelle der Aktivitätszählungen der nicht-kabel-gebundenen (schwarz) und der kabel-gebundenen (grau) Tiere während der experimentellen Beobachtungsphase. Für jedes Tier wurde der Durchschnitt pro Tag für die Dunkelphase und die Hellphase berechnet. **D, E:** Lineares Regressionsmodell der Aktivitätszählungen der nicht-kabel-gebundenen Tiere für die Dunkelphase (D) und die Hellphase (E). Das Aktivitätsniveau war über den experimentellen Beobachtungszeitraum hinweg nicht signifikant unterschiedlich. **F, G:** Lineares Regressionsmodell der Aktivitätszählungen der kabel-gebundenen Tiere für die Dunkelphase (F) und die Hellphase (G). Es wurde ein signifikanter Anstieg der Aktivitätszahlen über den zeitlichen Verlauf des experimentellen Beobachtungszeitraums für die Dunkelphase ($p = 0.043$) und die Hellphase ($p = 0.014$) analysiert. Die Daten sind für jedes Tier einzeln dargestellt.

2.8. Berechnung der *Area under the receiver operating characteristic*

Um die statistische Auswertung abzuschließen, wurden *Area under the receiver operating characteristic* (AUC)-Werte und 10.000-fach gebootstrappte 95%-Konfidenzintervalle für die SLEEP/WAKE-Übergänge, die SWA-Power und für verhaltensbezogene und biochemische Parameter berechnet. Die Auswertung zielte darauf ab, die Trennung zwischen der nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Gruppen zu untersuchen, um eine Aussage über die Stärke des Effekts der Aufzeichnungstechniken auf die erhobenen Parameter treffen zu können.

Kein AUC-Wert (orange, Abbildung 27), mit Ausnahme der SLEEP/WAKE-Übergänge in der Hellphase zu Beginn des experimentellen Beobachtungszeitraums, war >0.7 oder <0.3 . Das bedeutet, dass die Effekt-Stärke, welche die Aufzeichnungstechniken auf die Parameter hatten, höchstens gering war (Abbildung 27, Tabelle 14).

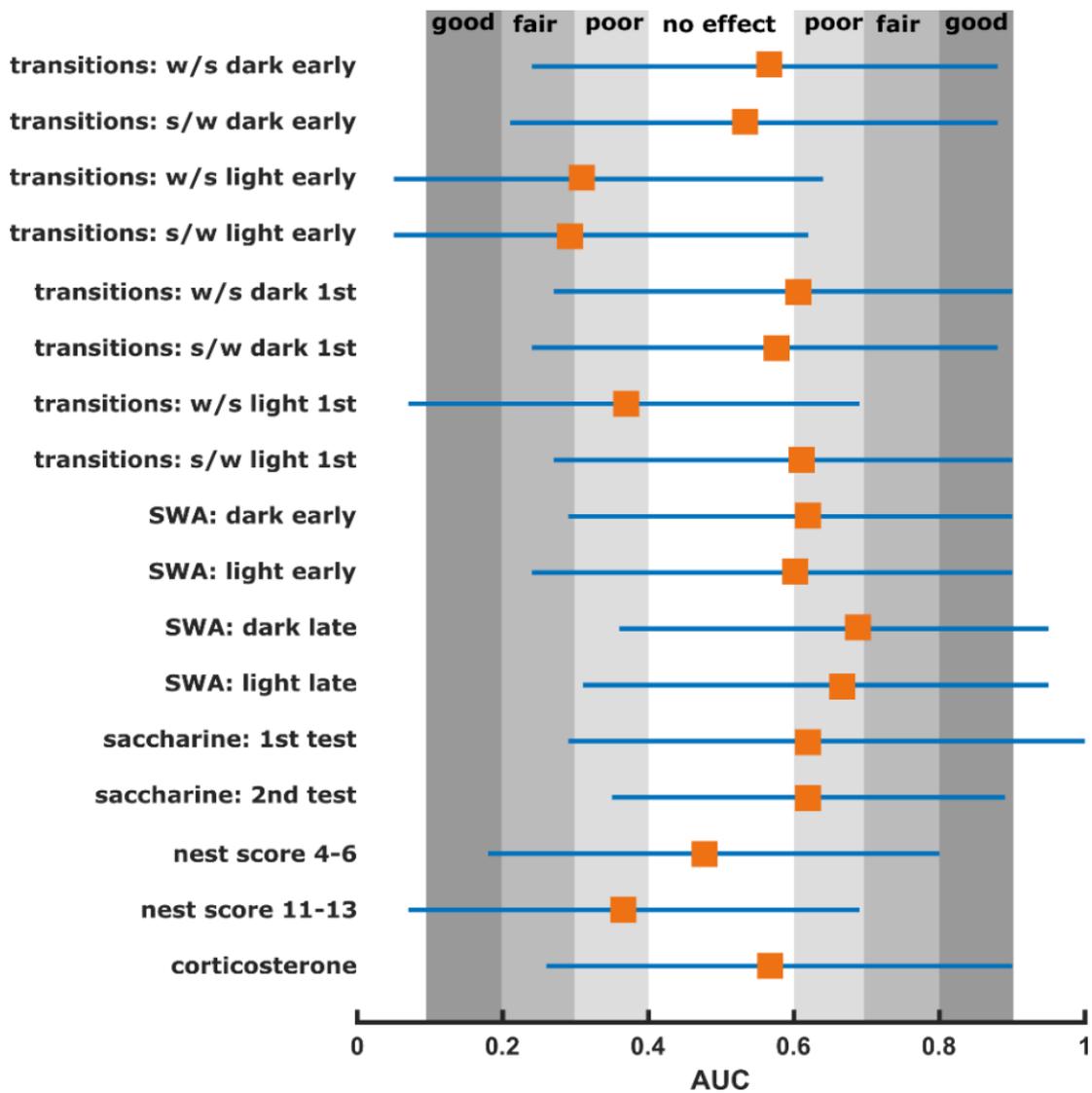


Abbildung 27. Area under the receiver operating characteristic (AUC) zusammen mit 10.000-fach gebootstrappten 95%-Konfidenzintervallen für SLEEP/WAKE-Übergänge, SWA-Power, verhaltensbezogene und biochemische Parameter. *Transitions: w/s dark early, transitions: s/w dark early*: SLEEP/WAKE-Übergänge zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase während der Dunkelphase. *Transitions: w/s light early, transitions: s/w light early*: SLEEP/WAKE-Übergänge zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase während der Hellphase. *Transitions: w/s dark 1st, Transitions: s/w dark 1st*: SLEEP/WAKE-Übergänge am ersten Tag der experimentellen Beobachtungsphase während der Dunkelphase. *Transitions: w/s light 1st, Transitions: s/w light 1st*: SLEEP/WAKE-Übergänge am ersten Tag der experimentellen Beobachtungsphase während der Hellphase. *SWA: dark early, SWA: light early*: SWA-Power zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase in der Dunkel/Hellphase. *SWA: dark late, SWA: light late*: SWA-Power am Ende der experimentellen Beobachtungsphase in der Dunkel/Hellphase. *saccharine: 1st test, saccharine: 2nd test*: Saccharin-Konsum in der ersten/zweiten Woche der experimentellen Beobachtungsphase. *nest score 4-6, nest 11-13*: Nestkomplexität in der ersten/zweiten Woche der experimentellen Beobachtungsphase. *corticosterone*: Serum-Corticosteron am Ende der experimentellen Beobachtungsphase. Orange Rechtecke: AUC-Werte. Blau: Konfidenzintervalle.

	Abbildung	AUC	95% KI	
Abbildung 17 A	Transitions: w/s dark early	0.57	0.24	0.88
	Transitions: s/w dark early	0.54	0.21	0.88
Abbildung 17 B	Transitions: w/s light early	0.31	0.05	0.64
	Transitions: s/w light early	0.29	0.05	0.62
Abbildung 20 A	Transitions: w/s dark 1st	0.61	0.27	0.9
	Transitions: s/w dark 1st	0.58	0.24	0.88
Abbildung 20 B	Transitions: w/s light 1st	0.36	0.07	0.69
	Transitions: s/w light 1st	0.61	0.27	0.9
Abbildung 21 A	SWA: dark early	0.62	0.29	0.9
Abbildung 21 B	SWA: light early	0.6	0.24	0.9
Abbildung 21 C	SWA: dark late	0.69	0.36	0.95
Abbildung 21 D	SWA: light late	0.67	0.31	0.95
Abbildung 23 A	Nest score 4-6	0.48	0.18	0.8
Abbildung 23 B	Nest score 11-13	0.36	0.07	0.69
Abbildung 23 C	Saccharine: 1st test	0.62	0.29	1
Abbildung 23 D	Saccharine: 2st test	0.62	0.35	0.89
Abbildung 23 G	Corticosterone	0.58	0.26	0.9

Tabelle 14. Area under the receiver operating characteristic (AUC) zusammen mit 10.000-fach gebootstrappten 95%-Konfidenzintervallen (KI) für SLEEP/WAKE-Übergänge, SWA-Power, verhaltensbezogene und biochemische Parameter. *Transitions: w/s dark early, transitions: s/w dark early.* SLEEP/WAKE-Übergänge zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase während der Dunkelphase. *Transitions: w/s light early, transitions: s/w light early.* SLEEP/WAKE-Übergänge zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase während der Hellphase. *Transitions: w/s dark 1st, Transitions: s/w dark 1st.* SLEEP/WAKE-Übergänge am ersten Tag der experimentellen Beobachtungsphase während der Dunkelphase. *Transitions: w/s light 1st, Transitions: s/w light 1st.* SLEEP/WAKE-Übergänge am ersten Tag der experimentellen Beobachtungsphase während der Hellphase. *SWA: dark early, SWA: light early.* SWA-Power zu Beginn der experimentellen Beobachtungsphase in der Dunkel/Hellphase. *SWA: dark late, SWA: light late.* SWA-Power am Ende der experimentellen Beobachtungsphase in der Dunkel/Hellphase. *saccharine: 1st test, saccharine: 2nd test.* Saccharin-Konsum in der ersten/zweiten Woche der experimentellen Beobachtungsphase. *nest score 4-6, nest 11-13.* Nestkomplexität in der ersten/zweiten Woche der experimentellen Beobachtungsphase. *corticosterone.* Serum-Corticosteron am Ende der experimentellen Beobachtungsphase.

VI. DISKUSSION

1. Systematisches Review

Durch eine vorherige Registrierung des Protokolls werden die Methoden vorher festgelegt und damit die Wahrscheinlichkeit für eine methodische Verzerrung reduziert (LEENAARS et al., 2020; RIX et al., 2021). Deshalb wurde das Protokoll in der vorliegenden Studie vorab mit SyRF registriert, um die Wahrscheinlichkeit für einen methodischen Bias zu minimieren. Bei traditionellen narrativen Übersichtsarbeiten besteht das Risiko, dass sie nur einen Teil der für das Thema relevanten Literatur enthalten, die dem durchführenden Autor bekannt ist, und können damit eine auf der Meinung und dem Netzwerk des Autors beruhende Verzerrung enthalten (LEENAARS et al., 2021; RIX et al., 2021). Im Gegensatz dazu haben systematische *Reviews* das Ziel die gesamte relevante Literatur zu einer vordefinierten Forschungsfrage zu analysieren, neue Daten (zum Beispiel bestehende Wissenslücken) zu generieren und idealerweise die Ergebnisse mit einer Meta-Analyse zusammenzufassen (RIX et al., 2021). Systematische Übersichten beantworten eine definierte Forschungsfrage unter den verschiedenen Arten von *Reviews* am zuverlässigsten, da sie am wenigsten anfällig für Verzerrungen sind (LEENAARS et al., 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein systematisches *Review* auf der Grundlage einer systematischen Suche durchgeführt. Es wurde ein umfassender systematischer Suchfaden entwickelt und eine Suche in verschiedenen Datenbanken durchgeführt. Die Methodik wurde in einem vorher publizierten Protokoll transparent beschrieben. Die Studien wurden basierend auf vordefinierten Zulassungskriterien in zwei Screening-Phasen ausgewählt. Die Qualität der Studien wurde unter Verwendung des *SYRCLE's RoB tools* überprüft. Die generierten Daten aus den inkludierten Studien wurden in tabellarischer Form präsentiert und analysiert. Es wurde keine Meta-Analyse durchgeführt, da die Heterogenität in der Versuchsplanung und in den Ergebnissen der eingeschlossenen Studien als zu groß erachtet wurde.

Obwohl die Suche umfassend war, wurden 10 relevante Publikationen beim Screening der Literaturlisten gefunden. In diesen Publikationen wurde entweder der schmerzassoziierte Zielparameter nicht im Titel, Abstract oder den Schlüsselwörtern beschrieben, oder sie wurden nicht gefunden, da relevante Synonyme (Heimkätfigverhalten, Laminektomie) im Suchfaden fehlten.

Die Anzahl der pro schmerzassoziierten Zielparameter und Jahr identifizierten Studien stieg in der zweiten Hälfte des letzten Jahrzehnts leicht an. Allerdings ist die Gesamtzahl der Studien zu niedrig, um eine Aussage über eine verstärkte Anwendung der Zielparameter zur Beurteilung von postoperativen Schmerzen treffen zu können.

In kürzlich veröffentlichten *Reviews* wurde festgestellt, dass die Mimik bei Labornagern als Parameter zur Schmerzbeurteilung weit verbreitet ist (MOTA-ROJAS et al., 2020; EVANGELISTA et al., 2021). Unsere Ergebnisse stehen damit im Einklang. Bei den Studien an Ratten war der *Rat-Grimace-Scale* (RGS), mit insgesamt 29 identifizierten Publikationen, der am häufigsten eingesetzte schmerzassoziierte Zielparameter. Die erste Beschreibung des RGS wurde 2011 veröffentlicht (SOTOCINAL et al., 2011). Bei Mäusen war die Nestbauaktivität mit 20 identifizierten Publikationen der am häufigsten eingesetzte schmerzassoziierte Zielparameter, gefolgt von dem *Mouse-Grimace-Scale* mit 18 Publikationen. Während die erste Beschreibung des MGS im Jahr 2010 veröffentlicht wurde, wurde die erste Beurteilung der Nestbauaktivität in der postoperativen Phase im Jahr 2007 durchgeführt (ARRAS et al., 2007).

Allerdings hat die Analyse der Herkunftsländer des ersten Autors gezeigt, dass wir von einer globalen Anwendung der schmerzassoziierten Zielparameter weit entfernt sind.

Da Tiere nicht verbal kommunizieren liefern gängige Schmerzbewertungsmethoden nur eine Annäherung an den tatsächlichen Schmerzzustand. Hinzu kommt, dass die meisten Schmerzbewertungsmethoden, zum Beispiel das Körpergewicht, indirekt sind und auch durch andere Faktoren als Schmerz beeinflusst sein können (TURNER et al., 2019). In diesem Zusammenhang wurde betont, dass mehrdimensionale zusammengesetzte Bewertungsschemata für eine zuverlässige Erkennung von Schmerzen bei Menschen und bei Tieren erforderlich sind (YOUNGER et al., 2009; FLECKNELL, 2018; TURNER et al., 2019). Daher ist es bedauerlich, dass die meisten Publikationen (65/74) in der vorliegenden Studie nur einen schmerzassoziierten Zielparameter bewerteten und nur eine kleine Anzahl der Publikationen zwei oder drei der Zielparameter kombinieren.

Grimace-Scale

In 2010 waren Langford und Kollegen (LANGFORD et al., 2010) die Ersten, die Mimik als Maß von Schmerz bei Mäusen systematisch untersuchten und den *Mouse-Grimace-Scale* (MGS) entwickelten. Anhand von anatomisch basierten Aktionseinheiten, den „*action units*“, können schmerzbedingte Abweichungen von dem physiologischen Zustand untersucht werden. Die anfängliche Entwicklung des MGS wurde an weiblichen und männlichen Crl:CDI-Mäusen durchgeführt und umfasste eine Bewertung in den folgenden Schmerzmodellen: *Laparotomie*, chronische Konstriktionsverletzung, Nerv Verletzung mit Verschonung eines Nervs (*spared nerve injury*). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MGS viszerale und somatische Schmerzen nach einer Laparotomie erkennen kann, neuropathische Schmerzen jedoch nicht. In den folgenden Jahren wurden 17 weitere Studien veröffentlicht, die den MGS nach chirurgischen Eingriffen analysierten.

Die Analyse der identifizierten Publikationen ergab, dass die Mehrheit der Studien in jung-adulten C57BL/6J oder Crl:CD1(ICR) Mäusen durchgeführt wurden. Daher gibt es offensichtliche Wissenslücken in Hinblick auf die Anwendung des MGS nach einem chirurgischen Eingriff bei anderen Mausstämmen sowie bei jüngeren und älteren Mäusen. Eine vergleichbare Situation wurde für den RGS analysiert. Die Analyse der Publikationen ergab, dass die Mehrheit der Studien in jung-adulten Wistar oder Sprague-Dawley Ratten durchgeführt wurden. Daher gibt es Wissenslücken in Hinblick auf die Anwendung des RGS bei anderen Rattenstämmen und bei jungen Ratten. Allerdings wurden Studien identifiziert, die den RGS nach einem chirurgischen Eingriff bei älteren Ratten untersuchten (CHI et al., 2013; KAWANO et al., 2014; THOMAS et al., 2016; GUO & HU, 2017; KOYAMA et al., 2019).

Die Liste der identifizierten Publikationen zur Untersuchung des *Grimace-Scales* an Mäusen und Ratten ergab, dass für die Laparotomie ein höheres Erfahrungsniveau im Vergleich zu den anderen angewendeten Interventionen erreicht wurde. Der zweithäufigste Eingriff, bei Studien zur Untersuchung des RGS, war eine Inzision in die Fußsohle (DE RANTERE et al., 2016; KAWANO et al., 2016; YAMANAKA et al., 2017; CLEMENSEN et al., 2018; FUJITA et al., 2018).

Ein kürzlich veröffentlichter *scoping review* untersuchte die Evidenzbasis von *Grimace-Scales* zur Schmerzbeurteilung bei verschiedenen nichtmenschlichen Säugetieren im Allgemeinen. Die Ergebnisse wiesen auf ein hohes Level an Evidenz für MGS und RGS hin (EVANGELISTA et al., 2021).

Die vorliegende Studie fokussierte sich auf die Untersuchung des *Grimace-Scales* in der postoperativen Phase nach einem Eingriff. Die Analyse der identifizierten Studien ergab, dass die Mehrheit der Studien alle Aktionseinheiten untersuchte. Allerdings wurden Studien an Mäusen identifiziert, die alle Aktionseinheiten exklusive der „Veränderung der Vibrissen“ untersuchten oder sich auf die „Stellung der Ohren“ und „Öffnung des Augenlids“ konzentrierten. In CHO et al. (2019) wurden bei BL6-Mäusen alle Aktionseinheiten außer die „Veränderung der Vibrissen“ untersucht. Dies wird durch die schlechte Sichtbarkeit der Vibrissen bei dunklen Tieren begründet. Dieses Ergebnis entspricht den Schwierigkeiten, die im Rahmen einer zuverlässigen Beurteilung der Vibrissen berichtet wurden (LEACH et al., 2012; OLIVER et al., 2014; TURNER et al., 2019) und zu einem Ausschluss dieser Aktionseinheit führten.

In Hinblick auf methodische Aspekte berichten die meisten Studien über eine bild- oder videobasierte Analyse des MGS und RGS. Dies ist ein Beweis dafür, dass viele Wissenschaftler versucht haben, das Verzerrungspotential im Zusammenhang mit einer direkten Auswertung von *Grimace-Scales* zu begrenzen.

Ein entsprechendes Verzerrungspotential kann sich aus dem Einfluss der Anwesenheit eines Wissenschaftlers ergeben, da Nagetiere als Beutetiere dazu neigen Schmerzen nicht

zu zeigen (STASIAK et al., 2003; JIRKOF et al., 2010; TURNER et al., 2019). In einer Studie von MILLER and LEACH (2015) wurde ein solcher Einfluss untersucht und beschrieben. In dieser Studie wurde festgestellt, dass die Live-Bewertungen niedriger ausfielen als die retrospektiven videobasierten Bewertungen.

Ein weiterer wichtiger Faktor, den es zu berücksichtigen gilt, ist, dass live- oder videobasierte Bewertungen den sich verändernden Gesichtsausdruck besser erkennen können als bildbasierte Bewertungen, so dass vorübergehendes Blinzeln nicht zu veränderten Bewertungen führt. Daher müssen bei der Interpretation der Ergebnisse immer die jeweiligen Einflüsse von live-, video- und bildbasierten Bewertungssystemen berücksichtigt werden. Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass weitere Forschungsarbeit notwendig ist, um die unterschiedlichen Beurteilungsansätze im direkten Vergleich zu validieren.

Verschiedene Studien haben basierend auf einem gruppeninternen Vergleich und einem Vergleich zwischen den Gruppen gezeigt, dass der *Grimace-Scale* sensitiv ist, um Schmerzen nach einem chirurgischen Eingriff zu erkennen. Der Einfluss eines Analgetikums auf die *Grimace-Scales* im Vergleich zur Kontrollgruppe in der postoperativen Phase wurde in den meisten Studien bestätigt. Dies bestätigte ebenfalls die Sensitivität des *Grimace-Scales* postoperative Schmerzen zu erkennen.

Nestbauverhalten

Eine kürzlich im Rahmen unserer Forschungsgruppe durchgeführte Multicenter-Studie (SCHWABE et al., 2020) wies darauf hin, dass die Leistung der Nestbauaktivität von Ratten im Vergleich zu Mäusen allgemein schlecht ist. Im Gegensatz dazu zeichnen sich Mäuse durch eine höhere intrinsische Motivation für den Nestbau aus (SHERWIN, 1997; JIRKOF, 2014). Die Tatsache, dass wir nur eine Studie identifiziert haben, in der das Nestbauverhalten bei Ratten in unserer Arbeitsgruppe nach einer Kraniotomie untersucht wurde (MÖLLER et al., 2018), spiegelt die Schwierigkeit wider, die Nestbauaktivität bei Ratten im Rahmen komplex gebauter Nester zu beurteilen. Die Nestbauaktivität als Parameter für das Wohlbefinden und zur Schmerzbeurteilung wurde intensiver bei Mäusen untersucht (JIRKOF, 2014). In einem frühen Bericht von ARRAS et al. (2007), wurde eine postoperative Reduktion der Nestqualität bei Mäusen nach einer Laparotomie beschrieben. Folgestudien derselben Gruppe untersuchten die Nestbauaktivität bei Mäusen als Parameter zur Erkennung von postoperativem Schmerz in beiden Geschlechtern und unterschiedlichen Stämmen (JIRKOF et al., 2013c; DURST et al., 2021).

Die Analyse der identifizierten Publikationen, die das Nestbauverhalten bei Mäusen nach einem operativen Eingriff untersuchten, ergab, dass die Mehrheit der Studien in jung-adulten Mäusen durchgeführt wurde. Der am häufigsten eingesetzte Stamm war C57BL/6J.

Der am häufigsten angewandte chirurgische Eingriff war eine Laparotomie. Daher gibt es offensichtliche Wissenslücken in Bezug auf die Analyse der Nestbauaktivität als Schmerzparameter in jungen und alten Mäusen. Des Weiteren bestehen Wissenslücken in Hinblick auf die Untersuchung der Nestbauaktivität als Schmerzparameter in anderen chirurgischen Interventionen als Laparotomie und in anderen Mausstämmen als C57BL/6. In Hinblick auf methodische Aspekte, wurden die Mehrheit der Analysen in der Hellphase durchgeführt. Es wurde bereits in einem narrativen Review dargelegt, dass Baumwollquadrate eines der am häufigsten verwendeten Materialien zur systematischen Beurteilung der Nestbauaktivität sind (JIRKOF, 2014). Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen, bei welchen die Mehrheit der Studien Baumwollquadrate als Nestmaterial einsetzen. Interessanterweise wurde eine große Varianz bei der Art der Parameter festgestellt, die im Rahmen des Nestbauverhaltens bewertet wurden. Die folgenden Parameter wurden erhoben: Zeit bis zur Integration des Nestmaterials, Nestkonsolidierung, Bewertung der Nestkomplexität, % an integriertem Nestmaterial, Dauer der Nestbauaktivität (% des Tages). Daher wird empfohlen diese Parameter systematisch miteinander zu vergleichen, um Informationen über Unterschiede in der Sensitivität, der *Inter-Rater*- und *Intra-Rater*-Reliabilität sowie der Robustheit zu erhalten.

Ein Einfluss eines Analgetikums auf die Nestbauaktivität wurde in sieben der zwanzig Studien an Mäusen analysiert. Ein Effekt wurde allerdings nur in drei Studien bestätigt. Daher wird basierend auf dem aktuellen Wissenstand empfohlen, die Nestbauaktivität mit weiteren Schmerzparametern zu kombinieren und im Rahmen eines zusammengesetzten Bewertungsschemas zu beurteilen.

Nagetiere bauen in ihrer natürlichen Umgebung Nester zum Schutz vor Feinden und zum Zweck der Thermoregulation (KINDER, 1927; DEACON, 2006). Bei der Beurteilung der Nestbauaktivität muss daher berücksichtigt werden, dass die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die Nestbauaktivität ausüben kann (KINDER, 1927). Daher sollte die Beurteilung der Nestbauaktivität als Schmerzparameter unter standardisierten Bedingungen, mit einer kontrollierten Umgebungstemperatur, erfolgen. Dies ist wichtig, um differenzieren zu können, ob die Tiere Nester aufgrund von Wohlbefinden oder zum Zweck der Thermoregulation bauen.

Wühlverhalten

JIRKOF und Kollegen (2010) veröffentlichten die erste Studie, die eine nachteilige Auswirkung von Schmerzen auf das Wühlverhalten nach einer Laparotomie bei Mäusen beschrieb. Das Interesse von Versuchstierforschern sowie von Unternehmen und akademischen Gruppen, die sich mit der Entwicklung und Bewertung neuartiger analgetischer Arzneimittelkandidaten befassen, wurde von dieser Studie und von

Folgestudien derselben Gruppe geweckt (JIRKOF et al., 2015; EVANGELISTA-VAZ et al., 2018; JIRKOF et al., 2018).

Daraufhin wurden Studien veröffentlicht, die darauf abzielten das Wühlverhalten als potenziellen Schmerzbewertungsparameter bei Ratten zu beurteilen (BRYDEN et al., 2015; GOULD et al., 2016; WODARSKI et al., 2016).

Die Gesamtzahl der identifizierten Publikationen, in denen das Wühlverhalten in der postoperativen Phase untersucht wurde, war mit 7 Studien an Mäusen und 10 Studien an Ratten hingegen eher gering. Dies deutet darauf hin, dass das Wühlverhalten als Parameter zur Schmerzerkennung in der postoperativen Phase noch nicht gut charakterisiert worden ist. Schlussfolgerungen über die allgemeine Evidenz sind zum einen aufgrund der geringen Zahl an identifizierten Publikationen limitiert und zum anderen aufgrund der Tatsache, dass die Mehrheit der Studien an jung-adulten oder adulten C57BL/6J Mäusen und Sprague-Dawley Ratten durchgeführt wurden. Des Weiteren hat die Mehrheit der Studien an Mäusen das Wühlverhalten in der Phase nach einer Laparotomie analysiert.

Daher besteht eine offensichtliche Wissenslücke über die Anwendung des Wühlverhaltens als Schmerzparameter in der postoperativen Phase bei jungen sowie bei alten Mäusen und Ratten. Des Weiteren bestehen Wissenslücken über die Anwendung des Wühlverhaltens bei anderen Stämmen und nach anderen chirurgischen Eingriffen.

Die meisten identifizierten Studien (8/10) setzten Futterpellets als Wühlmaterial bei Mäusen ein. Bei Ratten wurde in der Mehrheit der Studien Kies eingesetzt (6/7 Studien), mit Ausnahme von einer Studie, die Futterpellets verwendete. Diese Ergebnisse entsprechen bereits publizierten narrativen *Reviews*, in denen beschrieben wurde, dass sich bei Mäusen und Ratten vor allem Futterpellets und Kies als Wühlmaterial eignen (JIRKOF, 2014; TURNER et al., 2019).

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, dass eine Multicenter-Studie von WODARSKI et al. (2016), die den Wühltest in einem Modell für entzündliche Schmerzen untersucht hat, feststellte, dass der Test sensitiver war, wenn Material mit einer kleineren Partikelgröße angeboten wurde. Diese Erkenntnis spiegelt sich nicht in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wider, im Rahmen derer die fortgesetzte Verwendung von Kies bei Ratten analysiert wurde.

Die Latenz bis zum Beginn des Wühlens war der am häufigsten beurteilte Parameter bei Mäusen, während es bei Ratten die Menge des pro Zeit gewühlten Materials war. Da weitere Parameter, wie zum Beispiel die Zeit bis zum Entleeren der Wühlröhre, nur in einigen Studien untersucht wurden, wird erneut empfohlen diese Parameter in künftiger Forschungsarbeit systematisch miteinander zu vergleichen.

Interessanterweise ergab der gruppeninterne Vergleich in allen Studien an Mäusen und Ratten und der Vergleich zwischen den Gruppen in allen Studien an Mäusen einen Effekt. Ein Effekt eines einzelnen Analgetikums oder einer Kombination von Analgetika wurde in

sechs Studien an Mäusen untersucht und in fast allen an Studien bestätigt. Somit scheinen die vorliegenden Daten die Sensitivität des Wühlverhaltens als Parameter zur Schmerzbeurteilung in der postoperativen Phase zu bestätigen.

Angesichts der geringen Anzahl an Studien, die im Rahmen des Systematischen *Reviews* identifiziert wurden, sind mehr Daten erforderlich, um den Wert des Wühlverhaltens als postoperativen Schmerzparameter bei Ratten zu beurteilen.

Analgesie

Es wurde wiederholt berichtet, dass der Einsatz von Analgetika bei Nagetieren auf einem niedrigen Niveau liegt, was auf fehlende analgetische Ansätze in vielen experimentellen Studien hindeutet (FLECKNELL, 2018). Eine von STOKES et al. (2009) durchgeführte literaturbasierte Umfrage ergab, dass weniger als 25 % der Nagetiere Analgetika nach chirurgischen Eingriffen erhalten. Eine interessante Frage ist, ob sich diese Situation im vergangenen Jahrzehnt verbessert hat. Daher haben wir, obwohl dies nicht im Mittelpunkt der vorliegenden systematischen Übersichtsarbeit stand, zusätzlich Informationen über die verwendeten Analgetika und Anästhetika extrahiert. Interessanterweise wurde in der großen Mehrheit der identifizierten Studien über die Verabreichung von perioperativen Analgetika (62/75) berichtet, wobei häufig Opioide oder NSAIDs angewendet wurden. Die Anwendung eines multimodalen Ansatzes stellte mit einer Anwendung in 10 % der Studien an Mäusen (4/39) und 6 % der Studien an Ratten (2/36) eher eine Ausnahme dar.

Über die Anwendung einer Lokalanästhesie wurde in wenigen Studien an Ratten (12/75) und nur selten bei Mäusen (2/75) berichtet. Dies ist bedauerlich, da eine Lokalanästhesie die Übertragung von nozizeptiven Signalen effizient blockieren kann (DURST et al., 2021). Bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch Vorsicht geboten. Es könnte ein *selection bias* vorliegen, da sich die Gruppen, die wir mit unserer systematischen Übersichtsarbeit identifiziert haben, häufig auf die Versuchstierkunde und auf das Tierwohlbefinden konzentriert haben. Diese Gruppen wählen möglicherweise vorsichtiger ein geeignetes Analgetikum in ihrer experimentellen Planung aus. Andererseits zielten Studien auf die Validierung von Schmerzparametern oder den Vergleich von Analgetikaregimen ab. In diesen Studien könnte ein wirksamerer analgetischer Ansatz in Untergruppen von Tieren absichtlich vermieden worden sein.

Verzerrungspotential

Eine Schlüsselfunktion einer systematischen Überprüfung besteht darin, das Verzerrungspotential der eingeschlossenen Studien zu bewerten, um je nach Zuverlässigkeit der Daten zuverlässige Schlussfolgerungen ziehen zu können

(HOOIJMANS et al., 2014; LEENAARS et al., 2021). Bei Schlussfolgerungen über die Evidenzbasis von Schmerzparametern, die in den inkludierten Publikationen der vorliegenden systematischen Übersichtsarbeit bewertet wurde, müssen daher die Qualität der Berichterstattung und das Risiko einer Verzerrung berücksichtigt werden. Deswegen wurde die Qualität der Berichterstattung und das Verzerrungspotential mithilfe des SYRCLE's RoB tools beurteilt (HOOIJMANS et al., 2014).

Folgende Punkte fielen hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den interessierenden Schmerzparametern auf. Während 50 % der Studien zur Bewertung des *Grimace-Scales* eine Randomisierung der Videos und Bilder für die Auswertung der Ergebnisse angaben, wurde darüber in keiner der Veröffentlichungen zur Bewertung der Nestbauaktivität und in keiner der Studien zur Bewertung des Wühlverhaltens berichtet. Angaben zur Verblindung von Wissenschaftlern während der Auswertung der Ergebnisse wurden in 70 % der *Grimace-Scale* Studien, in 48 % der Studien zur Nestbauaktivität und in 29 % der Studien zum Wühlverhalten gemacht. Dies lässt sich durch die frequentere Durchführung einer bild- oder videobasierten Auswertung bei den *Grimace-Scales* im Vergleich zu den anderen schmerzassoziierten Zielparametern erklären. Für die bild- oder videobasierte Auswertung des *Grimace-Scales* wurden die Bilder/Videos in einigen identifizierten Studien randomisiert und der Wissenschaftler verblindet. Insbesondere die Durchführung einer Verblindung während der Ergebnisbewertung und die Durchführung einer Randomisierung können, neben weiteren Maßnahmen zur Minimierung des Verzerrungspotential im Studiendesign, zu zuverlässigeren Ergebnissen in experimentellen Studien führen (SENA et al., 2010; MACLEOD et al., 2015). Es wurde beschrieben, dass Studien, welche Aspekte zur Minimierung des Verzerrungspotential nicht konsequent berichteten, überhöhte Effekte enthielten (MACLEOD et al., 2015; MCCANN et al., 2016). So wurde beispielsweise in einer Studie von SENA et al. (2010) berichtet, dass Publikationen zur Untersuchung eines ischämischen Schlaganfalls mit einer konsequenteren Anwendung dieser wichtigen Aspekte eher geringere Schätzungen des Behandlungseffekts lieferten. In einer Perspektive von MACLEOD et al. (2015) wurde ein randomisiertes Set an Publikationen aus Pubmed generiert. Die Analyse ergab, dass 20 % der Publikationen über eine Randomisierung berichteten und 3 % über eine Verblindung. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit stehen mit diesen Daten im Einklang. Schlüsselprinzipien wie die Durchführung einer Verblindung und Randomisierung wurden nicht in allen Studien konsequent berichtet.

Bereits bei der Datenextraktion fielen in mehreren der einbezogenen Publikationen Mängel in der Berichterstattung auf. Es wurden Publikationen identifiziert, die keine Angaben über den verwendeten C57BL/6-Unterstamm, das Körpergewicht bei der Ankunft und über andere methodische Details machten. Dies kann die Schlussfolgerung der Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit erheblich beeinträchtigen.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich einige Studien nicht an die ARRIVE-Leitlinien, die als Grundlage für eine umfassende und transparente Berichterstattung dienen, gehalten haben (PERCIE DU SERT et al., 2020). Die Ergebnisse aus der Bewertung des Verzerrungspotentials deuten ebenfalls auf Mängel in der Berichterstattung und in Hinblick auf das Verzerrungspotential hin. Bei vielen Studien war es nicht möglich, eine Aussage über das Verzerrungspotential zu treffen, da die entsprechenden Informationen nicht angegeben wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verzerrungspotential der meisten Studien unklar oder hoch zu sein scheint.

2. Schlafmusterstudie

Verschiedene Autoren haben die kabel-gebundene Aufzeichnung als eine Methode, welche die Tiere partiell in ihrer Bewegung eingeschränkt, beschrieben, die das Tierwohlbefinden negativ beeinflussen könnte (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; ZAYACHKIVSKY et al., 2015; LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016). Es wurde vorgeschlagen, kabel-gebundene Aufzeichnungen durch telemetrische Aufzeichnungen zu ersetzen (KRAMER & KINTER, 2003; WEIERGRÄBER et al., 2005; LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016).

Daher zielte die vorliegende *in vivo* Studie an weiblichen Ratten darauf ab, den Einfluss der kabel-gebundenen Aufzeichnung auf das Aktivitäts- und Schlafmuster und auf ausgewählte verhaltensbezogene und biochemische Parameter zu untersuchen. Dabei fokussierten wir uns auf den Vergleich zwischen der kabel-gebundenen und nicht-kabel-gebundenen Gruppe innerhalb des 14-tägigen experimentellen Beobachtungszeitraums. Um eine Habituation an das Kabel zu untersuchen, verglichen wir die Aktivitäts- und Schlafmuster der ersten drei (Beginn des Beobachtungszeitraums) mit den letzten drei Tagen (Ende des Beobachtungszeitraums) des experimentellen Beobachtungszeitraums.

Als häufig angewendete Methodik in experimentellen Studien werden Versuchstiere eine bestimmte Zeit an eine neue Versuchsumgebung und an ein Set-up habituiert bevor mit der ersten Aufzeichnung begonnen wird, um zu vermeiden, dass ausgelöster Stress die Aufzeichnungsergebnisse beeinflusst. Die vorliegende Studie wurde so geplant, dass auch wichtige Informationen über die Gewöhnung an das Kabel gewonnen werden sollten. Daher wurden die Aufzeichnungen unmittelbar nach dem ersten Anschluss an das Kabel begonnen, um akut ausgelöste Veränderungen und den Verlauf der Veränderungen während der gesamten Expositionsphase zu erfassen.

Nestbauaktivität und Saccharin-Präferenz

Die Nestbauaktivität wurde als Indikator für das Wohlbefinden von Labornagern empfohlen. Bei einer Reduktion des Wohlbefindens wird dieses nicht-essentielle Verhalten als erstes eingestellt (JIRKOF, 2014). Verschiedene Studien haben über eine eingeschränkte Nestbauaktivität als Folge von unterschiedlichen Beeinträchtigungen, einschließlich Distress und Schmerz, berichtet (ARRAS et al., 2007; JIRKOF et al., 2013c; JIRKOF, 2014; GREENBERG et al., 2016; HOHLBAUM et al., 2018).

Die Auswertung der Nestbauaktivität zwischen den kabel-gebundenen und nicht-kabel-gebundenen Tieren während des experimentellen Beobachtungszeitraums in den Überwachungskäfigen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Des

Weiteren ergab die gruppeninterne Auswertung der Nestbauaktivität über den zeitlichen Verlauf des Beobachtungszeitraums vom Beginn bis zum Ende keine signifikanten Unterschiede, sowohl innerhalb der kabel-gebundenen als auch der nicht-kabel-gebundenen Gruppe.

Diese Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen des zweiten Verhaltenstests, der in den Überwachungskäfigen der Tiere erhoben wurde. Der Verlust oder die Verringerung der natürlichen Präferenz für süße Lösungen wurde bei Nagetieren als Anhedonie-assoziiertes Verhalten interpretiert, das möglicherweise depressionsassoziierte Verhaltensmuster beim Menschen widerspiegelt (HOFFMAN, 2016). Sowohl in Studien mit Post-Status-Epilepticus-Modellen an Ratten (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019), als auch in einer Studie mit einem Kindling-Epilepsie-Modell an Mäusen (BOLDT et al., 2021), welche im Rahmen unserer Forschungsgruppe durchgeführt wurden, wurde eine verminderte Präferenz für die Saccharin-Lösung beschrieben. Mittels Hauptkomponentenanalyse von Verhaltens-, physiologischen und biochemischen Daten, die in verschiedenen Epilepsiemodellen bei Ratten erhoben wurden, wurde die Saccharin-Präferenz als einer der besten Kandidaten identifiziert, der Unterschiede im affektiven Zustand von experimentellen Tieren und naiven Kontrolltieren zeigen kann (VAN DIJK et al., 2020). In der aktuellen Studie wurde kein signifikanter Unterschied in der konsumierten Menge an Saccharin zwischen den beiden Gruppen sowohl in der ersten als auch in der zweiten Woche des Beobachtungszeitraums festgestellt. Die gruppeninterne Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg des Saccharin-Konsums bei den nicht-kabel-gebundenen Tieren zwischen der ersten und zweiten Woche des experimentellen Beobachtungszeitraums, während die kabel-gebundenen Tiere keinen signifikanten Unterschied zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der Nestbauaktivität und der Saccharin-Präferenz gegen einen Einfluss einer kontinuierlichen Kabelverbindung auf den affektiven Zustand der Tiere sprechen. Bei der Betrachtung der einzelnen Daten der Saccharin-Präferenz war es jedoch interessant, dass die kabel-gebundenen Ratten in der zweiten Woche eine hohe interindividuelle Varianz mit einem eher geringen Saccharin-Konsum zeigten. Eine Erklärung dafür können inter-individuelle Unterschiede sein, sich an die kabel-gebundene Aufzeichnung zu gewöhnen und mit dem damit verbundenen Stress umzugehen.

Schlafarchitektur

Bei der kabelbasierten Aufzeichnung müssen das auf die Kopfhalterung wirkende Drehmoment und die damit verbundene Bewegungseinschränkung aus Tierschutzgründen und aufgrund der Datenqualität berücksichtigt werden. Die technische Optimierung des

Setups durch die Anbringung eines Schwenk-Systems und durch die Anpassung der Länge des Kabels können das Gewicht und den Zug auf den Kopf minimieren und damit die Bewegungseinschränkung reduzieren (LIDSTER et al., 2016). Nichtsdestotrotz kann ein negativer Einfluss der kabel-gebundenen Aufzeichnung durch die verbleibenden Zugkräfte auf das Schlafmuster und die Schlafqualität der Tiere nicht ausgeschlossen werden. Daher zielte die vorliegende Studie darauf ab, entsprechende Einflüsse auf den Anteil der Vigilanzstadien, auf die Bout-Längen und auf die Übergänge zwischen den Vigilanzstadien zu untersuchen.

Der Anteil der Vigilanzstadien zwischen der Gruppe mit Kabelverbindung und der Gruppe ohne Kabelverbindung unterschied sich nicht signifikant, sowohl unter Berücksichtigung aller neun Beobachtungstage als auch am ersten Tag, zu Beginn und am Ende des experimentellen Beobachtungszeitraums.

Folglich wurde die Gesamtzeit, die mit Schlafen verbracht wurde, sowie die Gesamtzeit in REM-Schlaf und NREM-Schlaf, nicht von der Kabelverbindung beeinflusst. Dies deutet auf einen fehlenden Einfluss der kabel-gebundenen Aufzeichnung auf die Gesamtschlafzeit hin.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings die begrenzte Aussagekraft des Anteils der Vigilanzstadien berücksichtigt werden, da Schlaf homöostatisch reguliert wird (RASCH & BORN, 2013). Durch den Stress, der durch die kabel-gebundene Ableitung ausgelöst wird, kann Schlaf in einer Schlafepisode weniger auftreten. Aufgrund der homöostatischen Kompensation kann es zu einem negativen Rebound kommen, wobei der Schlaf in der darauffolgenden Schlaf-Episode nachgeholt wird (BORBÉLY & ACHERMANN, 1999). Somit können gestörte Schlafmuster durch die Schlafhomöostase ausgeglichen werden, so dass eine Kompensation über den analysierten Zeitraum stattfinden kann. Daher wurden zusätzlich die Übergänge zwischen den Vigilanzstadien und die Bout-Längen der Vigilanzstadien untersucht.

Im Gegensatz zum Menschen zeigen Ratten ein polyphasisches Schlaf-Wach-Muster während der Dunkel- und der Hellphase mit häufigen Wechsel/Übergängen zwischen den verschiedenen Vigilanzstadien (SIMASKO & MUKHERJEE, 2009). Um eine genauere Aussage über die Schlafarchitektur der Ratten treffen zu können, ist es daher wichtig weitere Auswertungen durchzuführen, um gestörte Aktivitäts- und Wach-/Schlafmuster mit einer erhöhten Schlafragmentierung, die durch ein experimentelles Verfahren ausgelöst wurde, zu erkennen. Deswegen wurden die Bout-Längen der unterschiedlichen Vigilanzstadien und die Anzahl der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien untersucht.

Die kumulative Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen wurde gepoolt für die Dunkel- und Hellphase zu Beginn der Beobachtungsphase (Tag 1, Tag 1 bis 3) und am Ende (Tag 12 bis 14) des Beobachtungszeitraums separat analysiert, um Informationen über eine mögliche Gewöhnung an die Kabelverbindung zu erhalten.

Wenn man sich den Beginn des experimentellen Beobachtungszeitraums anschaut, wurde interessanterweise eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere NREM-Schlaf-Episoden in der Dunkelphase des ersten Tages bei den kabel-gebundenen Tieren festgestellt. Außerdem zeigte sich bei den kabel-gebundenen Tieren eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere WAKE-Episoden in der Dunkelphase zu Beginn (erste drei Tage) des experimentellen Beobachtungszeitraums.

Deshalb wurde zusätzlich die kumulative Wahrscheinlichkeit der Bout-Längen für AWAKE und QWAKE am ersten Tag der Beobachtungsphase gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert. Die Analyse ergab eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere QWAKE-Bout-Längen bei den kabel-gebundenen Tieren in der Dunkelphase des ersten Beobachtungstages.

Diese Ergebnisse sprechen gegen ein zugkraft-vermitteltes Aufwachen während der Schlafphasen und deuten eher auf einen Einfluss der kabel-gebundenen Ableitung auf die Vigilanzzyklen hin, mit einer Tendenz länger in ausgewählten Vigilanzstadien zu verweilen. Andererseits könnte es sein, dass die Zugkräfte die Schlafinduktion verzögern, was dann im Einklang mit den längeren WAKE-Episoden und der schlafhomöostatischen Kompensation durch längere NREM-Schlafphasen stehen würde.

Gegen Ende des experimentellen Beobachtungszeitraums wurden weiterhin geringfügige Gruppenunterschiede festgestellt, wobei die kabel-gebundenen Ratten eine höhere Wahrscheinlichkeit für längere NREM-Schlafphasen während der Hellphase und für längere WAKE-Phasen während der Hell- und Dunkelphase zeigten.

Diese Ergebnisse deuten zwar auf eine leichte Auswirkung der kabel-gebundenen Ableitung auf die Vigilanzzyklen hin, jedoch bestätigte die Analyse der Anzahl der Übergänge zwischen den Vigilanzstadien einen entsprechenden Einfluss nicht, da keine signifikanten Gruppenunterschiede vorlagen.

SWA-Power

Die *Power* der *slow wave activity* (SWA) während des NREM-Schlafs ist ein interessanter Marker und wurde gewählt, da sie ein Indikator für die Schlafqualität, abhängig vom vorherigen Wachsein ist (HUBER et al., 2000). Die SWA-Power wurde für den ersten Tag, zu Beginn (Tag 1 bis 3) und am Ende (Tag 12 bis 14) des Beobachtungszeitraums gepoolt für die Dunkel- und Hellphase analysiert.

Es wurde bei Ratten und anderen Nagetieren nachgewiesen, dass die Dauer des vorangegangenen Wachseins einer der Hauptfaktoren ist, der die spätere Gesamtschlafdauer und insbesondere die Schlafqualität beeinflusst (HUBER et al., 2000; VYAZOVSKIY & TOBLER, 2005). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu den Übergängen zwischen den Vigilanzstadien, ergab die Analyse der SWA-Power zu keinem

der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen den kabelgebundenen und den nicht-kabelgebundenen Tieren.

Die Berechnung der AUC für die SWA-Power ergab einen geringen Effekt (siehe Abbildung 27). Dies deutet auf eine geringe Trennung der nicht-kabelgebundenen und der kabelgebundenen Gruppe hin. Der Zugang zu einem Laufrad führte bei Ratten tendenziell zu mehr, wenn auch nicht signifikant mehr, *slow wave sleep* (HANAGASIOGLU & BORBÉLY, 1982), während die SWA selbst beispielsweise bei Menschen (ARITAKE-OKADA et al., 2019) und Ratten (BLANCO-CENTURION & SHIROMANI, 2006) nach körperlicher Aktivität anstieg. Deshalb könnte es sein, dass die kabelgebundenen Tiere etwas weniger motorische Aktivität (entspricht körperlicher Aktivität) als die nicht-kabelgebundenen Tiere zeigten.

Auch Schlafentzug erhöhte die SWA bei Ratten und anderen Tierarten (VYAZOVSKIY & TOBLER, 2005). Wenn man davon ausgeht, dass eine erhöhte Dauer des ruhigen Wachzustands, wie in den Bout-Längen bei kabelgebundenen Ratten festgestellt wurde, eine ähnliche Wirkung auf die Schlafhomöostase hat wie Schlafentzug, könnte man argumentieren, dass kabelgebundene Ratten eine erhöhte SWA haben sollten.

Aufgrund von den nicht signifikanten Unterschieden in der SWA zwischen beiden Versuchsgruppen gehen wir allerdings davon aus, dass die Qualität des *slow wave sleeps* bei kabelgebundenen und nicht-kabelgebundenen Tieren, zumindest im vorliegenden Versuch, ähnlich ist.

Corticosteron

Die Analyse der Aktivität der HPA-Achse ist ein interessanter Marker für Stress, insbesondere für akuten Stress (SCORRANO et al., 2015). Die Analyse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten ist eine nicht-invasive Methode zur Beurteilung der Nebennierenrindenaktivität, die Rückschlüsse auf die Aktivität der HPA-Achse und den Stresshormonspiegel erlaubt (LEPSCHY et al., 2007).

In einer Studie von KROLL et al. (2021) wurde beispielsweise bereits nachgewiesen, dass Schlafentzug durch motorisierte Laufräder zu einer Erhöhung der Corticosteron-Metaboliten bei Ratten führen kann.

In der vorliegenden Studie unterschieden sich die fäkalen Corticosteron-Metaboliten zwischen den Gruppen mit und ohne zweiwöchige Kabelverbindung zu keinem der analysierten Zeitpunkte. Auch der gruppeninterne Vergleich ergab keinen signifikanten Unterschied im zeitlichen Verlauf während des experimentellen Beobachtungszeitraums.

Ein weiterer Beleg für das Fehlen von Gruppenunterschieden in Bezug auf die Aktivität der HPA-Achse war der fehlende Gruppenunterschied im Serum-Corticosteron, das am Ende des Versuchs analysiert wurde.

Das Fehlen eines relevanten Einflusses auf die fäkalen Corticosteron-Metaboliten und auf Serum-Corticosteron deuten auf keine relevanten Unterschiede zwischen den kabelgebunden und nicht-kabelgebundenen Tieren in Bezug auf das Angst- oder Stressniveau hin.

Aktivitätslevel

Bei Mäusen, die chronischem Stress ausgesetzt waren, wurde eine Verringerung der auf dem Laufrad zurückgelegten Strecke nachgewiesen, wobei die größte Auswirkung zu Beginn des Experiments zu beobachten war (DEVALLANCE et al., 2017). Die Ergebnisse unserer Aktivitätszählungen bestätigten ebenfalls eine Auswirkung auf die zurückgelegte Strecke nach der Exposition gegenüber dem Kabel. Es wurde ein signifikanter Anstieg des durchschnittlichen Aktivitätsniveaus vom Beginn bis zum Ende der experimentellen Beobachtungsphase bei den kabelgebundenen Tieren festgestellt. Es ist jedoch interessant, dass der durchschnittliche Anteil der Epochen in AWAKE während der Beobachtungsphase nicht signifikant anstieg. Daraus folgt, dass wir zwar keinen Einfluss des Kabels auf den Anteil in AWAKE feststellen konnten, das Ausmaß der Aktivität, das heißt die Geschwindigkeit und die zurückgelegte Strecke, jedoch durch das Kabel beeinflusst wird.

Es bleibt jedoch unklar, ob die Gewöhnung an die durch das Kabel verursachte Bewegungseinschränkung, die Gewöhnung an den durch das Kabel verursachten Stress oder eine Kombination aus beiden Faktoren zu einem Anstieg des Aktivitätsniveaus und der zurückgelegten Strecke führte.

3. Schlussfolgerung

Die Anzahl der inkludierten Publikationen, in denen die schmerzassoziierten Zielparameter in der postoperativen Phase bei Mäusen oder Ratten analysiert wurden, ist immer noch recht gering. Die umfassendste Datenlage existiert für den *Grimace-Scale*, der häufiger zur Bewertung postoperativer Schmerzen bei Mäusen und Ratten eingesetzt wurde als die anderen untersuchten Verhaltensparameter. Grundsätzlich weisen unsere Ergebnisse auf relevante Wissenslücken hinsichtlich der postoperativen Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* bei verschiedenen Stämmen, Altersstufen und nach verschiedenen chirurgischen Eingriffen hin. Weitere Analysen sind erforderlich, um die Sensitivität und Robustheit verschiedener Parameter direkt zu vergleichen, die für die Messung von *Nest-building* und *Burrowing* verwendet werden können. Die Analyse des Verzerrungspotentials zeigte, dass Maßnahmen zur Kontrolle des Risikos einer Verzerrung nicht einheitlich angewandt wurden.

Die Datensätze von nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Ratten während des zweiwöchigen experimentellen Beobachtungszeitraums sprechen eher gegen eine ausgeprägte Beeinträchtigung der Schlafmuster und Schlafqualität von kabel-gebundenen Ratten. Im Einklang mit diesen Ergebnissen steht das Fehlen eines Einflusses auf verhaltensbezogene und biochemische Daten. Dies spricht gegen einen Einfluss einer kontinuierlichen Kabelverbindung auf den affektiven Zustand der Tiere. Allerdings deuten unsere Ergebnisse auf einen Einfluss des Kabels auf das Aktivitätsniveau hin. Eine längere Exposition gegenüber dem Kabel führte zu einem gruppeninternen Anstieg der Aktivität. Ein Einfluss wurde allerdings nicht durch signifikante Gruppenunterschiede bestätigt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *Refinement*-Effekt telemetrischer Aufzeichnungen gegenüber kabel-gebundener Aufzeichnung, relativ gering sein könnte oder bei Ratten möglicherweise gar nicht existiert. In diesem Zusammenhang muss bedacht werden, dass studien- und laborspezifische Einflussfaktoren bei der Bewertung des Schweregrads zu beachten sind und die Bewertung des Schweregrads daher grundsätzlich immer eine Einzelfallanalyse erfordert. Die in der vorliegenden Arbeit gelieferten Daten können als Orientierung dienen.

4. Ausblick und Limitation

Systematisches Review

Bei der Entwicklung einer Suchstrategie muss bedacht werden, dass nicht alle Studien ihre Zielparameter im Titel und Abstract beschreiben. Daher besteht die Möglichkeit, die Zielparameter nicht als Komponente für den Suchfaden zu berücksichtigen (LEENAARS et al., 2012). Obwohl unsere Suche umfassend war, wurden 10 relevante Publikationen beim Screening der Literaturlisten gefunden und daher wurden wahrscheinlich auch weitere relevante Publikationen nicht identifiziert. Ein Grund weswegen Publikationen nicht gefunden wurden war, dass der schmerzassoziierte Zielparameter nicht im Titel, Abstract und den Schlüsselwörtern beschrieben wurde. Wir haben die Zielparameter als Suchkomponente in die Suchstrategie aufgenommen, da andernfalls die Zahl der Publikationen schwer von einer Person zu bewältigen gewesen wäre.

Schlafmuster

Bei der Schlussfolgerung der Daten muss berücksichtigt werden, dass es nicht möglich war, eine aussagekräftige Kontrollgruppe, beispielsweise eine naive Gruppe, in das Studiendesign aufzunehmen, da die Auswertung der wichtigsten Parameter, der Aktivitäts- und Schlafmuster, eine Transponderimplantation erforderte. Daher sollten die vorliegenden Ergebnisse nicht in dem Sinne fehlinterpretiert werden, dass eine chirurgische Implantation und experimentelle Aufzeichnungen keinen Einfluss auf das Tierwohlbefinden haben. Daher lassen die Ergebnisse der vorliegenden Studie nur Rückschlüsse auf den Vergleich zwischen dem kabel-gebunden und nicht-kabel-gebunden Zustand zu.

In diesem Zusammenhang muss auch berücksichtigt werden, dass beide Versuchsgruppen einer Transponderimplantation unterzogen wurden. Dies ist bei der kabel-gebundenen Aufzeichnung generell nicht notwendig, da die Elektroden über einen Hautschnitt im Kopfbereich implantiert werden. Daher muss bei Tieren, die für die Telemetrie vorbereitet werden, die Notwendigkeit eines zusätzlichen Transponderimplantats beachtet werden.

Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits einen Einfluss auf das Wohlbefinden bei Ratten und Mäusen nach einer Transmitter- und Elektrodenimplantation mit einem vorübergehenden Anstieg des Grimace-Scales, des allgemeinen klinischen Scores und Irwin-Scores. Dies entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Studie, mit einem transienten postoperativen Anstieg des RGS, des allgemeinen klinischen Scores und Irwin-Scores. Die Ergebnisse deuten auf einen vorübergehenden Einfluss der Transmitter- und Elektrodenimplantation auf das Wohlbefinden der Ratten hin.

Ratten sind soziale Tiere, die einen Großteil ihrer Schlafzeit gemeinsam verbringen. Daher können die in dieser Studie erhobenen Daten durch die Einzelhaltung der Tiere beeinflusst

sein. Basierend auf früheren Erfahrungswerten aus unserer Forschungsgruppe, besteht ein Risiko, dass sich in Gruppen gehaltene Ratten gegenseitig an den Implantatbereichen nagen, was zu einem Verlust der Implantate und zu einem Eintritt von Krankheitserregern führen kann. Des Weiteren muss eine Lösung für das Setup zur Aufnahme der telemetrischen Daten, das aktuell nur ein Tier pro Käfig erlaubt, gefunden werden. Wenn diese Probleme gelöst würden, wäre es interessant, das Schlafmuster unter den natürlichen Bedingungen in Gruppen gehaltener Tiere zu untersuchen.

Verschiedene Faktoren, wie Geschlecht, Alter, *Handling*, Zyklusstand und genetischer Hintergrund können einen Einfluss auf die Fähigkeit von Versuchstieren haben, den mit dem Versuch und Eingriffen verbundenen Stress zu bewältigen.

Die vorliegende Studie wurde an weibliche Sprague-Dawley durchgeführt, die bei der Ankunft ein Gewicht von 190 bis 210 g und ein Alter von 9 bis 11 Wochen hatten. Daher wäre es interessant diese Studie idealerweise im Rahmen einer multizentrischen Studie unter Verwendung von beiden Geschlechtern zu wiederholen, wobei der Einfluss des Geschlechts durch einen direkten Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Tieren analysiert werden kann.

Die vorliegende Studie zielte nicht darauf ab, ein Modell für neurologische Erkrankungen zu untersuchen. Darüber hinaus waren die Tiere genetisch nicht verändert. Allerdings werden Aufzeichnungen häufig in Tiermodellen für neurologische Erkrankungen durchgeführt (LIDSTER et al., 2016; LUNDT et al., 2016). Diese Tiermodelle sind *per se* durch ein verändertes Schlafmuster und homöostatischen Reaktionen charakterisiert (JYOTI et al., 2010; KREUZER et al., 2020a; SMYK & VAN LUIJTELAAR, 2020), was auch die Anpassungsfähigkeit der Tiere an die Versuchsbedingung beeinflussen kann. Daher ist es in zukünftiger Forschungsarbeit bedeutend, die Auswirkung kabel-gebundener Aufzeichnung im Vergleich zu telemetrischen Aufzeichnungen in verschiedenen neurologischen Tiermodellen zu untersuchen.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass das Alter und der Zyklus einen Einfluss auf die homöostatische Schlafregulation haben können (SCHWIERIN et al., 1998; MENDELSON & BERGMANN, 1999; FRANK et al., 2017; SOLTANI et al., 2019). Die vorliegende Studie wurde an jung-adulten Ratten durchgeführt. Daher wäre es interessant den Einfluss einer kabel-gebundenen Aufzeichnung in jungen Ratten sowie in alten Ratten, in denen der Schlaf generell mehr fragmentiert ist, zu untersuchen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollten auch die inter-individuellen Unterschiede in der Fähigkeit mit stressvollen Situationen umzugehen berücksichtigt werden. Daher sollten die Tiere auch in zukünftigen Studien täglich kontrolliert und intensiv überwacht werden, um schnellstmöglichst belastende Veränderungen, die nicht mehr mit dem Versuchsziel vereinbar sind, zu erkennen.

Die Nestbauaktivität, der *Grimace-Scale* und der Irwin-Score wurden von einem Forscher

an einzelnen Tagen erhoben und ausgewertet. Im Unterschied zu kontinuierlich aufgezeichneten Parametern, die über einen längeren Zeitraum aufgenommen werden und maschinell ausgewertet werden (zum Beispiel Aktivität), ist die alleinige Auswertung durch einen Forscher anfälliger für Fehler. Dies sollte bei der Interpretation dieser Daten berücksichtigt werden.

Der Corticosteronspiegel im Serum ist eher ein Marker für akuten Stress. Daher ist es nicht ideal, wenn er nach dem Ende eines Experiments verwendet wird. Aus diesem Grund haben wir uns bei der Interpretation der Daten auf die Analyse der fäkalen Corticosteron-Metaboliten konzentriert, die auch eine wiederholte Bewertung ermöglicht. Wir haben jedoch beschlossen, während der Perfusion zusätzliche Serumproben für einen direkten Vergleich zu entnehmen, da das Serum während der Perfusion leicht und ohne zusätzliche Belastung der Tiere gewonnen werden kann. Wir hielten die parallele Analyse für interessant, weil anhaltender chronischer Stress auch zu einer Herunterregulierung der HPA-Achse führen kann, was sich in einer Abnahme sowohl des Serum-Corticosterons als auch der fäkalen Corticosteron-Metaboliten widerspiegeln würde.

Der Einfluss des Kabels auf das Wohlbefinden der Tiere, welcher von verschiedenen Autoren beschrieben worden ist, ist von dem technischen Setup abhängig. In der vorliegenden Studie wurde ein Rotations-System verwendet. Ein Gegengewicht, welches nochmal Zug von dem Kopf der Tiere nimmt, wurde nicht eingesetzt. Deswegen wäre es interessant herauszufinden, ob dieses Gegengewicht den Einfluss auf die Schlaf- und Aktivitätsmuster der Tiere weiter reduzieren kann.

Bei der Aktivitätsaufzeichnung mit Ponemah wurde eine Countzahl, abhängig von der zurückgelegten Strecke und der Geschwindigkeit, generiert. Die exakt zurückgelegte Strecke und die Geschwindigkeit wurden somit nicht ermittelt. Die Ausstattung der Tiere mit einem Beschleunigungsmesser oder die Durchführung einer videobasierten Analyse würde eine solche genaue Messung der zurückgelegten Strecke und der Geschwindigkeit ermöglichen. Daher wäre es von Interesse, die Aktivität in Folgestudien genauer zu untersuchen.

Die Generalisierbarkeit von unseren Ergebnissen muss weiterführend, idealerweise im Rahmen einer multizentrischen Studie, untersucht werden. Dabei sollten Faktoren wie Geschlecht, Alter, Stamm, Versuchs- und Umweltbedingungen berücksichtigt werden. Des Weiteren müssen die Auswirkungen kabel-gebundener Aufzeichnungen in verschiedenen Tiermodellen für neurologische Erkrankungen von Fall zu Fall gründlich analysiert werden.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Auf europäischer Ebene wird durch die *Richtlinie 2010/63/EU* eine Einstufung des Schweregrads von Tierversuchen vorgeschrieben. In diesem Zusammenhang ist die gezielte Erkennung von (postoperativen) Schmerzen eine Voraussetzung für eine evidenzbasierte Bewertung des Schweregrads. Nagetiere, als Beutetiere, neigen dazu Schmerzen nicht zu zeigen. Aus diesem Grund sind gute Parameter für die Bewertung von Schmerzen von entscheidender Bedeutung. Mittels *Grimace-Scales* können Schmerzen bei Mäusen und Ratten anhand der Mimik erkannt und bewertet werden. Verhaltensparameter, die für die Bewertung von Schmerzen bei Mäusen und Ratten vorgeschlagen wurden, sind *Burrowing* und *Nest-building*. Verschiedene Studien haben die verfügbaren Informationen zu diesen Parametern als Schmerzparameter informativ zusammengefasst. Allerdings besteht nach wie vor eine Wissenslücke in Bezug auf das Ausmaß der Anwendung dieser Parameter für die Beurteilung postoperativer Schmerzen. Daher wurde ein systematisches *Review* durchgeführt, das die folgende Forschungsfrage untersuchte: Was ist die aktuelle Evidenzbasis für die Verwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building* und *Burrowing* für die Bewertung von postoperativen Schmerzen bei Mäusen und Ratten?

Pubmed, *Embase via Ovid* und *Web of Science* wurden nach relevanten Publikationen durchsucht. Es wurden durch *Peer Review* geprüfte Publikationen berücksichtigt, die *Grimace-Scale*, *Burrowing* und/oder *Nest-building* als Schmerzparameter in der postoperativen Phase bei Mäusen und/oder Ratten beschrieben. Aus den identifizierten Publikationen wurden Informationen zu Studiendesign-Charakteristika, Tiermerkmal-Charakteristika und Interventions-Charakteristika sowie zu den Zielparametern extrahiert. Das Verzerrungs-potential wurde mithilfe des *SYRCLE's RoB tools* bewertet.

Bei der Suche in den Datenbanken wurden insgesamt 3355 Publikationen gefunden. Nach einer zweiphasigen Überprüfung der Titel und Abstracts sowie der Full-Texte und nach Überprüfung der Literaturlisten wurden insgesamt 74 Publikationen in die vorliegende systematische Überprüfung inkludiert. Die meisten Studien wurden an jungen-adulten C57BL/6J-Mäusen sowie Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten durchgeführt. Während es offensichtliche Wissenslücken hinsichtlich der Anwendung der analysierten Schmerzparameter bei jungen Tieren gibt, wurden einige Studien identifiziert, welche die *Grimace-Scales* bei älteren Ratten analysierten. Die meisten Studien führten eine Laparotomie als chirurgischen Eingriff durch. Über die Anwendung der Parameter zur Erfassung postoperativer Schmerzen bei anderen Arten von chirurgischen Eingriffen liegen nur wenige Informationen vor. Die Analyse der verwendeten Analgetika zeigte, dass in der Mehrheit der Studien ein monotherapeutischer Ansatz gewählt wurde. Das

Verzerrungspotential scheint bei den meisten inkludierten Studien unklar oder hoch zu sein. Über wichtige Schlüsselprinzipien wie Randomisierung und Verblindung wurde nicht konsistent berichtet.

Sensitive Parameter zur Belastungseinschätzung erlauben eine evidenzbasierte Beurteilung von *Refinement*-Maßnahmen. Dies ist von enormer Bedeutung für eine konsequente Umsetzung des *Refinements* im Rahmen des rechtlich verankerten 3R-Prinzips. Elektrophysiologische Aufzeichnungen werden häufig als Technik in der tiergestützten neurowissenschaftlichen Forschung eingesetzt. Verschiedene Autoren haben die kabel-gebundene Aufzeichnung als eine Methode, welche die Tiere partiell in ihrer Bewegung einschränkt, beschrieben, die das Tierwohlbefinden negativ beeinflussen könnte. Trotz der Verwendung eines *Swivel*-Systems können Zugkräfte auftreten, die unter Umständen einen Einfluss auf Ruhe- und Schlafphasen, aber auch auf das Aktivitätsmuster haben könnten. Dementsprechend wurde die telemetrische Aufzeichnung als potentielle *Refinement*-Maßnahme für kontinuierliches Monitoring gegenüber der kabel-gebundenen Aufzeichnung vorgeschlagen. Mit einem experimentellen Ansatz wurde daher im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Hypothese überprüft, dass kabel-gebundene Aufzeichnungen relevante Auswirkungen auf die Verhaltens-, Aktivitäts-, und Schlafmuster von Sprague-Dawley-Ratten haben.

Im Rahmen der experimentellen Studie wurde eine EEG/EMG-basierte telemetrische Auswertung der Schlaf- und Aktivitätsmuster durchgeführt, bei der eine nicht-kabel-gebundene Gruppe mit einer kabel-gebundenen Gruppe über einen zweiwöchigen experimentellen Beobachtungszeitraum verglichen wurde. Außerdem wurden verhaltensbezogene und biochemische Parameter erhoben, um die Auswirkung der experimentellen Techniken auf den affektiven Zustand der Tiere zu untersuchen.

Die Datensätze von nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Ratten zeigten keinen Einfluss des Kabels auf den Anteil in den Vigilanzstadien während des zweiwöchigen experimentellen Beobachtungszeitraums. Die Analyse der Bout-Längen ergab Unterschiede mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für längere Phasen im Wachzustand und im NREM-Schlaf bei kabel-gebundenen Tieren. Ein entsprechender Einfluss wurde allerdings nicht durch die Analyse der Anzahl der SLEEP/WAKE- und WAKE/SLEEP-Übergänge bestätigt. Bei der Auswertung der *slow wave activity power* wurden keine Gruppenunterschiede festgestellt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen stehen die fehlenden Gruppenunterschiede bei den verhaltensbezogenen (Nestkomplexität, Saccharin-Präferenz) und biochemischen Daten (Serum-Corticosteron, fäkale Corticosteron-Metaboliten). Dies spricht gegen einen Einfluss einer kontinuierlichen Kabelverbindung auf den affektiven Zustand der Tiere. Es wurden keine Gruppenunterschiede bei der Analyse der Aktivität bestätigt. Eine längere Exposition gegenüber dem Kabel führte allerdings zu einem gruppeninternen Anstieg der Aktivität.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Anzahl der inkludierten Publikationen, in denen die schmerzassoziierten Zielparameter in der postoperativen Phase bei Mäusen oder Ratten analysiert wurden, immer noch recht gering ist. Die umfassendste Datenlage existiert für den *Grimace-Scale*, der häufiger zur Bewertung postoperativer Schmerzen bei Mäusen und Ratten verwendet wurde als die anderen untersuchten Verhaltensparameter. Unsere Ergebnisse weisen auf relevante Wissenslücken hinsichtlich der postoperativen Anwendung von *Grimace-Scale*, *Nest-building*, und *Burrowing* bei verschiedenen Stämmen, Altersstufen und nach verschiedenen chirurgischen Eingriffen hin. Weitere Analysen sind erforderlich, um die Sensitivität und Robustheit verschiedener Parameter, welche für die Messung von *Nest-building* und *Burrowing* verwendet werden können, direkt zu vergleichen.

Hinsichtlich der experimentellen Studie lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Datensätze der nicht-kabel-gebundenen und kabel-gebundenen Ratten keine größeren Gruppenunterschiede zeigten. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *Refinement*-Effekt telemetrischer Aufzeichnungen relativ schwach sein könnte oder bei Ratten möglicherweise gar nicht existiert. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass studien- und laborspezifische Einflussfaktoren bei der Bewertung des Schweregrads berücksichtigt werden müssen und die Bewertung des Schweregrads daher grundsätzlich immer eine Einzelfallanalyse erfordert. Die in der vorliegenden Arbeit gelieferten Daten können als Orientierung dienen.

VIII. SUMMARY

At the European level, Directive 2010/63/EU requires a classification of the severity of animal experiments. In this context, the precise detection of (postoperative) pain is a prerequisite for an evidence-based severity assessment. Rodents, as prey animals, tend to hide pain. Against this background, good pain assessment parameters are crucial. Grimace scales can be used to detect and assess pain in mice and rats through facial expressions. Nesting building and burrowing were proposed as behavioral parameters to assess pain in mice and rats. Several studies have summarized the available information on these parameters as pain parameters. However, there is still a gap in knowledge regarding the extent of implementation of these parameters to assess postoperative pain. Thus, a systematic review was conducted investigating the following research question: What is the current evidence base for using grimace scale, burrowing and nest building for the assessment of postsurgical pain in rats and mice?

Pubmed, Embase via Ovid, and Web of Science were searched for relevant publications. Peer-reviewed publications that reported grimace scale, burrowing, and/or nesting building as pain parameters in the postsurgical period in mice and/or rats were considered. The following information was extracted from the identified publications: study design, animal characteristics, intervention characteristics, and outcome measures. The risk of bias was evaluated using SYRCLE's risk of bias tool.

The search of the databases yielded 3355 publications. Screening comprised an initial title and abstract screening phase followed by a full text screening phase. Thereafter, the reference lists of all included studies were screened. Consequently, 74 studies were included in the present systematic review. Most studies were performed in young adult C57BL/6J mice as well as Sprague-Dawley and Wistar rats. There are obvious knowledge gaps regarding the application of the analyzed pain parameters in young animals. However, some publications were identified in which the grimace scale was evaluated in aged rats. In the majority of studies, laparotomy was performed as the surgical procedure. There is limited information on the use of the analyzed parameters to assess postoperative pain in other types of surgical interventions. Analysis of the analgesics used showed that a monotherapeutic approach was applied in the majority of studies. For most included studies, the risk of bias was unclear or high. Important key principles such as blinding and randomization were not consistently reported.

Sensitive parameters for severity assessment allow an evidence-based assessment of refinement measures. This is of enormous importance for consistent implementation of refinement within the framework of the 3Rs principle enshrined in law. Electrophysiological recordings are frequently applied in animal-based neuroscientific research. Different

authors have described tethered recording as a method that partially restricts the animals' freedom of movement, which could negatively affect animal welfare. Despite the use of a swivel system, traction forces may occur that could possibly influence activity, rest and sleep patterns. Accordingly, telemetric recording was suggested as a potential refinement measure for continuous monitoring over tethered recording. In the second part of the present work, an experimental approach was used to test the hypothesis that tethered recordings have effects on the behavior, activity, and sleep patterns of Sprague-Dawley rats.

The experimental study involved an EEG/EMG-based telemetric analysis of activity and sleep patterns comparing a non-tethered group with a tethered group over a two-week experimental observation phase. Behavioral and biochemical parameters were measured to investigate the effect of the experimental techniques on the affective state of the animals. Data sets from non-tethered and tethered rats showed no effect of the cable on the proportion of vigilance states during the two-week experimental observation period. Analysis of bout lengths revealed differences with a higher probability for longer periods in NREM sleep and WAKE in tethered animals. However, an evaluation of the transitions from SLEEP to WAKE and WAKE to SLEEP could not confirm an influence. No group differences were found in the slow wave activity power. Consistent with these results is the lack of group differences in behavioral (nest complexity, saccharin preference) and biochemical data (serum corticosterone, fecal corticosterone metabolites). This argues against an influence of continuous cable connection on the affective state of the animals. No group differences were detected in the activity analysis. However, prolonged exposure to the cable was found to increase activity within the tethered group during the experimental observation period.

In conclusion, the number of included publications analyzing pain-associated outcome parameters in the postsurgical phase is still rather scarce. The most comprehensive data are available for grimace scales, which have been used to evaluate postoperative pain in mice and rats more often than the other behavioral parameters of interest. Our results indicate relevant knowledge gaps regarding the post-surgical application of grimace scale, nest-building, and burrowing in different age levels, strains, and after different surgical procedures. Further analyses are needed to evaluate and compare the sensitivity and robustness of parameters used to measure nesting and burrowing.

Concerning the experimental study, the data sets of the non-tethered and the tethered rats showed no greater group differences. Our results suggest that the refinement effect associated with telemetric recordings is relatively weak or possibly even absent in rats. In this context, it must be kept in mind that study- and laboratory-specific influencing factors must be taken into account when assessing severity, and therefore, severity assessment always requires a case-by-case analysis. The data provided in the present work can serve as orientation.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Abdelrahman A, Kumstel S, Zhang X, Liebig M, Wendt EHU, Eichberg J, Palme R, Thum T, Vollmar B, Zechner D. A novel multi-parametric analysis of non-invasive methods to assess animal distress during chronic pancreatitis. *Sci Rep* 2019; 9: 14084.

Akeju O, Westover MB, Pavone KJ, Sampson AL, Hartnack KE, Brown EN, Purdon PL. Effects of sevoflurane and propofol on frontal electroencephalogram power and coherence. *Anesthesiology* 2014; 121: 990-8.

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

Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, Pheby T, Huang W, Burgess G, Machin I, Rice AS. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain* 2012; 16: 485-95.

Aritake-Okada S, Tanabe K, Mochizuki Y, Ochiai R, Hibi M, Kozuma K, Katsuragi Y, Ganeko M, Takeda N, Uchida S. Diurnal repeated exercise promotes slow-wave activity and fast-sigma power during sleep with increase in body temperature: a human crossover trial. *J Appl Physiol (1985)* 2019; 127: 168-77.

Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders)* 2006; 5: 485-501.

Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC veterinary research* 2007; 3: 1-10.

Barkus C, Dawson L, Sharp T, Bannerman D. GluN1 hypomorph mice exhibit wide-ranging behavioral alterations. *Genes, Brain and Behavior* 2012; 11: 342-51.

Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature neuroscience* 2010; 13: 76-83.

Beninson JA, Lofgren JL, Lester PA, Hileman MM, Berkowitz DJ, Myers Jr DD. Analgesic efficacy and hematologic effects of robenacoxib in mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2018; 57: 258-67.

Blakemore C, Clark Judy M, Nevalainen T, Oberdorfer M, Sussman A. Implementing the 3Rs in Neuroscience Research: A Reasoned Approach. *Neuron* 2012; 75: 948-50.

Blanco-Centurion CA, Shiromani PJ. Beneficial effects of regular exercise on sleep in old F344 rats. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 1859-69.

Boldt L, Koska I, van Dijk RM, Talbot SR, Miljanovic N, Palme R, Bleich A, Potschka H.

Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsy & Behavior* 2021; 115: 107689.

Borbély AA, Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *J Biol Rhythms* 1999; 14: 557-68.

Bouyer JJ, Deminière JM, Mayo W, Le Moal M. Inter-individual differences in the effects of acute stress on the sleep-wakefulness cycle in the rat. *Neurosci Lett* 1997; 225: 193-6.

Bryden LA, Nicholson JR, Doods H, Pekcec A. Deficits in spontaneous burrowing behavior in the rat bilateral monosodium iodoacetate model of osteoarthritis: an objective measure of pain-related behavior and analgesic efficacy. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23: 1605-12.

Cesarovic N, Arras M, Jirkof P. Impact of inhalation anaesthesia, surgery and analgesic treatment on home cage behaviour in laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science* 2014; 157: 137-45.

Chaves RHF, Souza CC, Furlaneto IP, Teixeira RKC, Oliveira CP, Rodrigues EM, Santos D, Silva RC, Penha N, Lima AR. Influence of tramadol on functional recovery of acute spinal cord injury in rats. *Acta Cir Bras* 2018; 33: 1087-94.

Chi H, Kawano T, Tamura T, Iwata H, Takahashi Y, Eguchi S, Yamazaki F, Kumagai N, Yokoyama M. Postoperative pain impairs subsequent performance on a spatial memory task via effects on N-methyl-D-aspartate receptor in aged rats. *Life Sci* 2013; 93: 986-93.

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

Cirelli C, Tononi G. Is sleep essential? *PLoS Biol* 2008; 6: e216.

Cleary SJ, Pitchford SC, Amison RT, Carrington R, Robaina Cabrera CL, Magnen M, Looney MR, Gray E, Page CP. Animal models of mechanisms of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 pathology. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 4851-65.

Clemensen J, Rasmussen LV, Abelson KSP. Transdermal Fentanyl Solution Provides Long-term Analgesia in the Hind-paw Incisional Model of Postoperative Pain in Male Rats. *In vivo (Athens, Greece)* 2018; 32: 713-9.

Coimbra B, Domingues AV, Soares-Cunha C, Correia R, Pinto L, Sousa N, Rodrigues AJ. Laterodorsal tegmentum–ventral tegmental area projections encode positive reinforcement signals. *Journal of Neuroscience Research* 2021; 99: 3084-100.

Cook DJ, Mulrow CD, Haynes RB. Systematic reviews: synthesis of best evidence for clinical decisions. *Ann Intern Med* 1997; 126: 376-80.

Corbett KS, Flynn B, Foulds KE, Francica JR, Boyoglu-Barnum S, Werner AP, Flach B, O'Connell S, Bock KW, Minai M, Nagata BM, Andersen H, Martinez DR, Noe AT, Douek N, Donaldson MM, Nji NN, Alvarado GS, Edwards DK, Flebbe DR, Lamb E, Doria-Rose NA, Lin BC, Louder MK, O'Dell S, Schmidt SD, Phung E, Chang LA, Yap C, Todd J-PM, Pessaint L, Van Ry A, Browne S, Greenhouse J, Putman-Taylor T, Strasbaugh A, Campbell

T-A, Cook A, Dodson A, Steingrebe K, Shi W, Zhang Y, Abiona OM, Wang L, Pegu A, Yang ES, Leung K, Zhou T, Teng I-T, Widge A, Gordon I, Novik L, Gillespie RA, Loomis RJ, Moliva JI, Stewart-Jones G, Himansu S, Kong W-P, Nason MC, Morabito KM, Ruckwardt TJ, Ledgerwood JE, Gaudinski MR, Kwong PD, Mascola JR, Carfi A, Lewis MG, Baric RS, McDermott A, Moore IN, Sullivan NJ, Roederer M, Seder RA, Graham BS. Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *New England Journal of Medicine* 2020a; 383: 1544-55.

Corbett KS, Edwards DK, Leist SR, Abiona OM, Boyoglu-Barnum S, Gillespie RA, Himansu S, Schäfer A, Ziwawo CT, DiPiazza AT, Dinnon KH, Elbashir SM, Shaw CA, Woods A, Fritch EJ, Martinez DR, Bock KW, Minai M, Nagata BM, Hutchinson GB, Wu K, Henry C, Bahl K, Garcia-Dominguez D, Ma L, Renzi I, Kong WP, Schmidt SD, Wang L, Zhang Y, Phung E, Chang LA, Loomis RJ, Altaras NE, Narayanan E, Metkar M, Presnyak V, Liu C, Louder MK, Shi W, Leung K, Yang ES, West A, Gully KL, Stevens LJ, Wang N, Wrapp D, Doria-Rose NA, Stewart-Jones G, Bennett H, Alvarado GS, Nason MC, Ruckwardt TJ, McLellan JS, Denison MR, Chappell JD, Moore IN, Morabito KM, Mascola JR, Baric RS, Carfi A, Graham BS. SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness. *Nature* 2020b; 586: 567-71.

Cressant A, Muller RU, Poucet B. Failure of centrally placed objects to control the firing fields of hippocampal place cells. *Journal of Neuroscience* 1997; 17: 2531-42.

Crouch B, Sommerlade L, Veselcic P, Riedel G, Schelter B, Platt B. Detection of time-, frequency- and direction-resolved communication within brain networks. *Sci Rep* 2018; 8: 1825.

Cunningham C, Deacon R, Wells H, Boche D, Waters S, Diniz CP, Scott H, Rawlins J, Perry V. Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *European Journal of Neuroscience* 2003; 17: 2147-55.

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

Darwin C. *The expression of the emotions in man and animals*, New York: D. Appleton and Company 1872.

Das V, Kroin JS, Moric M, Buvanendran A. Biochemical and pharmacological characterization of a mice model of complex regional pain syndrome. *Regional Anesthesia & Pain Medicine* 2017; 42: 507-16.

De Rantere D, Schuster CJ, Reimer JN, Pang DS. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. *Eur J Pain* 2016; 20: 417-26.

De Sousa AA, Reis R, Bento-Torres J, Trévia N, Lins NAdA, Passos A, Santos Z, Diniz JAP, Vasconcelos PFdC, Cunningham C. Influence of enriched environment on viral encephalitis outcomes: behavioral and neuropathological changes in albino Swiss mice. *PLoS One* 2011; 6: e15597.

De Vries RB, Hooijmans CR, Langendam MW, van Luijk J, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Wever KE. A protocol format for the preparation, registration and publication of

systematic reviews of animal intervention studies. *Evidence-based Preclinical Medicine* 2015; 2: 1-9.

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

Deacon RM, Reisel D, Perry VH, Nicholas J, Rawlins P. Hippocampal scrapie infection impairs operant DRL performance in mice. *Behavioural brain research* 2005; 157: 99-105.

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

Deboer T. Sleep homeostasis and the circadian clock: Do the circadian pacemaker and the sleep homeostat influence each other's functioning? *Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms* 2018; 5: 68-77.

Denton DA, McKinley MJ, Farrell M, Egan GF. The role of primordial emotions in the evolutionary origin of consciousness. *Conscious Cogn* 2009; 18: 500-14.

Deseure K, Hans G. Orofacial neuropathic pain reduces spontaneous burrowing behavior in rats. *Physiol Behav* 2018; 191: 91-4.

Désiré L, Boissy A, Veissier I. Emotions in farm animals:: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behavioural Processes* 2002; 60: 165-80.

Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2017; 10: 284.

DeVallance E, Riggs D, Jackson B, Parkulo T, Zaslau S, Chantler PD, Olfert IM, Bryner RW. Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. *PLoS One* 2017; 12: e0184829.

Dispersyn G, Sauvet F, Gomez-Merino D, Ciret S, Drogou C, Leger D, Gallopin T, Chennaoui M. The homeostatic and circadian sleep recovery responses after total sleep deprivation in mice. *J Sleep Res* 2017; 26: 531-8.

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

Dwivedi DJ, Grin PM, Khan M, Prat A, Zhou J, Fox-Robichaud AE, Seidah NG, Liaw PC. Differential expression of PCSK9 modulates infection, inflammation, and coagulation in a murine model of sepsis. *Shock: Injury, Inflammation, and Sepsis: Laboratory and Clinical Approaches* 2016; 46: 672-80.

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

European Commission (2012) Working document on a severity assessment framework. European Commission Brussels

Evangelista-Vaz R, Bergadano A, Arras M, Jirkof PD. Analgesic Efficacy of Subcutaneous-Oral Dosage of Tramadol after Surgery in C57BL/6J Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS 2018; 57: 368-75.

Evangelista MC, Watanabe R, Leung VS, Monteiro BP, O'Toole E, Pang DS, Steagall PV. Facial expressions of pain in cats: the development and validation of a Feline Grimace Scale. *Scientific reports* 2019; 9: 1-11.

Evangelista MC, Monteiro BP, Steagall PV. Measurement properties of grimace scales for pain assessment in non-human mammals: a systematic review. *Pain* 2021.

Falkenberg MK, Teilmann AC, Henriksen T, Hau J, Poulsen HE, Abelson KS. Clinical, Physiologic, and Behavioral Evaluation of Permanently Catheterized NMRI Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS 2019; 58: 380-9.

Faller KME, McAndrew DJ, Schneider JE, Lygate CA. Refinement of analgesia following thoracotomy and experimental myocardial infarction using the Mouse Grimace Scale. *Experimental physiology* 2015; 100: 164-72.

Feinberg I, March JD, Floyd TC, Jimison R, Bossom-Demitrack L, Katz PH. Homeostatic changes during post-nap sleep maintain baseline levels of delta EEG. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology* 1985; 61: 134-7.

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

Fonck C, Easter A, Pietras MR, Bialecki RA. CNS adverse effects: From functional observation battery/Irwin tests to electrophysiology. *Principles of safety pharmacology* 2015: 83-113.

Frank MG, Ruby NF, Heller HC, Franken P. Development of circadian sleep regulation in the rat: a longitudinal study under constant conditions. *Sleep* 2017; 40.

Fujita M, Fukuda T, Sato Y, Takasusuki T, Tanaka M. Allopregnanolone suppresses mechanical allodynia and internalization of neurokinin-1 receptors at the spinal dorsal horn in a rat postoperative pain model. *The Korean journal of pain* 2018; 31: 10-5.

Gallo MS, Karas AZ, Pritchett-Corning K, Garner Guy Mulder JP, Gaskill BN. Tell-tale TINT: Does the Time to Incorporate into Nest Test Evaluate Postsurgical Pain or Welfare in Mice? *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : JAALAS 2020; 59: 37-45.

Gao Z, Cui F, Cao X, Wang D, Li X, Li T. Local infiltration of the surgical wounds with levobupivacaine, dexibuprofen, and norepinephrine to reduce postoperative pain: A randomized, vehicle-controlled, and preclinical study. *Biomed Pharmacother* 2017; 92: 459-67.

Georgieva M, Wei Y, Dumitrascuta M, Pertwee R, Finnerup NB, Huang W. Fatty acid suppression of glial activation prevents central neuropathic pain after spinal cord injury. *Pain* 2019; 160: 2724-42.

Gould SA, Doods H, Lamla T, Pekcec A. Pharmacological characterization of intraplantar

Complete Freund's Adjuvant-induced burrowing deficits. *Behav Brain Res* 2016; 301: 142-51.

Greenberg GD, Huang L, Spence S, Schlumbohm J, Metten P, Ozburn A, Crabbe JC. Nest building is a novel method for indexing severity of alcohol withdrawal in mice. *Behavioural brain research* 2016; 302: 182-90.

Guo P, Hu SP. Thalidomide alleviates postoperative pain and spatial memory deficit in aged rats. *Biomed Pharmacother* 2017; 95: 583-8.

Guzman-Marin R, Suntsova N, Bashir T, Nienhuis R, Szymusiak R, McGinty D. Rapid eye movement sleep deprivation contributes to reduction of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of the adult rat. *Sleep* 2008; 31: 167-75.

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser M-B, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 2005; 436: 801-6.

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

Halene TB, Ehrlichman RS, Liang Y, Christian EP, Jonak GJ, Gur TL, Blendy JA, Dow HC, Brodtkin ES, Schneider F, Gur RC, Siegel SJ. Assessment of NMDA receptor NR1 subunit hypofunction in mice as a model for schizophrenia. *Genes Brain Behav* 2009; 8: 661-75.

Hanagasioglu M, Borbély AA. Effect of voluntary locomotor activity on sleep in the rat. *Behav Brain Res* 1982; 4: 359-68.

Hentschke H, Stüttgen MC. Computation of measures of effect size for neuroscience data sets. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 1887-94.

Herndon NL, Bandyopadhyay S, Hod EA, Prestia KA. Sustained-Release Buprenorphine Improves Postsurgical Clinical Condition but Does Not Alter Survival or Cytokine Levels in a Murine Model of Polymicrobial Sepsis. *Comp Med* 2016; 66: 455-62.

Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2008; 47: 25-31.

Higgins J. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Version 5.1. 0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration. www.cochrane-handbook.org 2011.

Hoffman KL. New dimensions in the use of rodent behavioral tests for novel drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2016; 11: 343-53.

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. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2018.

Hooijmans CR, Rovers MM, de Vries RB, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol* 2014; 14: 43.

Hsi ZY, Stewart LA, Lloyd KCK, Grimsrud KN. Hypoglycemia after Bariatric Surgery in Mice and Optimal Dosage and Efficacy of Glucose Supplementation. *Comp Med* 2020; 70: 111-8.

Huber R, Deboer T, Tobler I. Effects of sleep deprivation on sleep and sleep EEG in three mouse strains: empirical data and simulations. *Brain research* 2000; 857: 8-19.

Iber C. The AASM manual for the scoring of sleep and associated events: Rules, Terminology and Technical Specification 2007.

Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, Gal B, Aivar P, Uzcategui YG, Sandi C, Menendez de la Prida L. Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS One* 2011; 6: e22372.

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.

Jeger V, Arrigo M, Hildenbrand FF, Müller D, Jirkof P, Hauffe T, Seifert B, Arras M, Spahn DR, Bettex D. Improving animal welfare using continuous nalbuphine infusion in a long-term rat model of sepsis. *Intensive care medicine experimental* 2017; 5: 1-13.

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

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

Jirkof P, Leucht K, Cesarovic N, Caj M, Nicholls F, Rogler G, Arras M, Hausmann M. Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Laboratory animals* 2013a; 47: 274-83.

Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Arras M. Housing of female mice in a new environment and its influence on post-surgical behaviour and recovery. *Applied Animal Behaviour Science* 2013b; 148: 209-17.

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* 2013c; 47: 153-61.

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

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

Jirkof P, Arras M, Cesarovic N. Tramadol:Paracetamol in drinking water for treatment of post-surgical pain in laboratory mice. *Applied Animal Behaviour Science* 2018; 198: 95-100.

Jirkof P, Rudeck J, Lewejohann L. Assessing Affective State in Laboratory Rodents to

Promote Animal Welfare-What Is the Progress in Applied Refinement Research? *Animals (Basel)* 2019; 9: 1026.

Jirkof P, Potschka H. Effects of Untreated Pain, Anesthesia, and Analgesia in Animal Experimentation. In: *Experimental Design and Reproducibility in Preclinical Animal Studies*: Springer 2021: 105-26.

Jyoti A, Plano A, Riedel G, Platt B. EEG, activity, and sleep architecture in a transgenic A β PPswe/PSEN1A246E Alzheimer's disease mouse. *J Alzheimers Dis* 2010; 22: 873-87.

Kanner AM. Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biological Psychiatry* 2003; 54: 388-98.

Kanner AM, Schachter SC, Barry JJ, Hersdorffer DC, Mula M, Trimble M, Hermann B, Ettinger AE, Dunn D, Caplan R. Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence. *Epilepsy & Behavior* 2012; 24: 156-68.

Kant GJ, Pastel RH, Bauman RA, Meininger GR, Maughan KR, Robinson TN, 3rd, Wright WL, Covington PS. Effects of chronic stress on sleep in rats. *Physiol Behav* 1995; 57: 359-65.

Katri A, Dąbrowska A, Löfvall H, Karsdal MA, Andreassen KV, Thudium CS, Henriksen K. A dual amylin and calcitonin receptor agonist inhibits pain behavior and reduces cartilage pathology in an osteoarthritis rat model. *Osteoarthritis Cartilage* 2019; 27: 1339-46.

Kawano T, Takahashi T, Iwata H, Morikawa A, Imori S, Waki S, Tamura T, Yamazaki F, Eguchi S, Kumagai N, Yokoyama M. Effects of ketoprofen for prevention of postoperative cognitive dysfunction in aged rats. *Journal of Anesthesia* 2014; 28: 932-6.

Kawano T, Eguchi S, Iwata H, Yamanaka D, Tateiwa H, Locatelli FM, Yokoyama M. Effects and underlying mechanisms of endotoxemia on post-incisional pain in rats. *Life Sci* 2016; 148: 145-53.

Kawano T, Yamanaka D, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Nishigaki A, Iwata H, Locatelli FM, Yokoyama M. Involvement of acute neuroinflammation in postoperative delirium-like cognitive deficits in rats. *Journal of Anesthesia* 2018; 32: 506-17.

Keating SC, Thomas AA, Flecknell PA, Leach MC. Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: changes in physiological, behavioural and facial expression responses. 2012.

Kendall LV, Wegenast DJ, Smith BJ, Dorsey KM, Kang S, Lee NY, Hess AM. Efficacy of Sustained-Release Buprenorphine in an Experimental Laparotomy Model in Female Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* : *JAALAS* 2016; 55: 66-73.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000412.

Kinder EF. A study of the nest-building activity of the albino rat. *Journal of Experimental Zoology* 1927;

Klein S, Bankstahl JP, Löscher W, Bankstahl M. Sucrose consumption test reveals pharmacoresistant depression-associated behavior in two mouse models of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2015; 263: 263-71.

Klune CB, Larkin AE, Leung VS, Pang D. Comparing the Rat Grimace Scale and a composite behaviour score in rats. *PLoS One* 2019; 14: e0209467.

Kohl C, McIntosh E, Unger S, Haddaway N, Kecke S, Schiemann J, Wilhelm R. Online tools supporting the conduct and reporting of systematic reviews and systematic maps: A case study on CADIMA and review of existing tools. *Environmental Evidence* 2018; 7.

Korat PS, Kapupara PP. Local infiltration of the surgical wound with levobupivacaine, ibuprofen, and epinephrine in postoperative pain: An experimental study. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 96: 104-11.

Korat PS, Kapupara P. Analgesic Effect of Local Infiltration of the Surgical Wound Containing Levobupivacaine, Ibuprofen, and Epinephrine in Rats Undergoing Laparotomy. *Folia Med (Plovdiv)* 2018; 60: 254-60.

Koska I, van Dijk RM, Seiffert I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 2114-27.

Koyama T, Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Eguchi S, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M. Acute postoperative pain exacerbates neuroinflammation and related delirium-like cognitive dysfunction in rats. *J Anesth* 2019; 33: 482-6.

Kramer K, Kinter LB. Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiological genomics* 2003; 13: 197-205.

Kreuzer M, Keating GL, Fenzl T, Härtner L, Sinon CG, Hajjar I, Ciavatta V, Rye DB, García PS. Sleep/Wake Behavior and EEG Signatures of the TgF344-AD Rat Model at the Prodromal Stage. *Int J Mol Sci* 2020a; 21.

Kreuzer M, Stern MA, Hight D, Berger S, Schneider G, Sleigh JW, García PS. Spectral and Entropic Features Are Altered by Age in the Electroencephalogram in Patients under Sevoflurane Anesthesia. *Anesthesiology* 2020b; 132: 1003-16.

Kroll T, Kornadt-Beck N, Oskamp A, Elmenhorst D, Touma C, Palme R, Bauer A. Additional Assessment of Fecal Corticosterone Metabolites Improves Visual Rating in the Evaluation of Stress Responses of Laboratory Rats. *Animals (Basel)* 2021; 11.

Kumstel S, Vasudevan P, Palme R, Zhang X, Wendt EHU, David R, Vollmar B, Zechner D. Benefits of non-invasive methods compared to telemetry for distress analysis in a murine model of pancreatic cancer. *Journal of advanced research* 2020; 21: 35-47.

Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao

J, Klassen-Ross T, LaCroix-Fralish ML. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nature methods* 2010; 7: 447-9.

Larson CM, Wilcox GL, Fairbanks CA. The study of pain in rats and mice. *Comparative medicine* 2019; 69: 555-70.

Lau W, Dykstra C, Thevarkunnel S, Silenieks LB, de Lannoy IA, Lee DK, Higgins GA. A back translation of pregabalin and carbamazepine against evoked and non-evoked endpoints in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2013; 73: 204-15.

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

Leemburg S, Vyazovskiy VV, Olcese U, Bassetti CL, Tononi G, Cirelli C. Sleep homeostasis in the rat is preserved during chronic sleep restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 15939-44.

Leenaars C, Stafleu F, de Jong D, van Berlo M, Geurts T, Coenen-de Roo T, Prins JB, Kempkes R, Elzinga J, Bleich A, de Vries R, Meijboom F, Ritskes-Hoitinga M. A Systematic Review Comparing Experimental Design of Animal and Human Methotrexate Efficacy Studies for Rheumatoid Arthritis: Lessons for the Translational Value of Animal Studies. *Animals (Basel)* 2020; 10.

Leenaars C, Tsaïoun K, Stafleu F, Rooney K, Meijboom F, Ritskes-Hoitinga M, Bleich A. Reviewing the animal literature: how to describe and choose between different types of literature reviews. *Laboratory animals* 2021; 55: 129-41.

Leenaars M, Hooijmans CR, van Veggel N, ter Riet G, Leeflang M, Hooft L, van der Wilt GJ, Tillema A, Ritskes-Hoitinga M. A step-by-step guide to systematically identify all relevant animal studies. *Lab Anim* 2012; 46: 24-31.

Lepschy M, Touma C, Hruby R, Palme R. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats. *Laboratory animals* 2007; 41: 372-87.

Lidster K, Jefferys JG, Blümcke I, Crunelli V, Flecknell P, Frenguelli BG, Gray WP, Kaminski R, Pitkänen A, Ragan I. Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 2-25.

Locatelli FM, Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Eguchi S, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Yokoyama M. Resveratrol-loaded nanoemulsion prevents cognitive decline after abdominal surgery in aged rats. *Journal of pharmacological sciences* 2018; 137: 395-402.

Louis RP, Lee J, Stephenson R. Design and validation of a computer-based sleep-scoring algorithm. *J Neurosci Methods* 2004; 133: 71-80.

Lundt A, Wormuth C, Siwek ME, Müller R, Ehninger D, Henseler C, Broich K, Papazoglou A, Weiergräber M. EEG Radiotelemetry in Small Laboratory Rodents: A Powerful State-of-the Art Approach in Neuropsychiatric, Neurodegenerative, and Epilepsy Research. *Neural Plast* 2016; 2016: 8213878.

Macleod MR, Fisher M, O'collins V, Sena ES, Dirnagl U, Bath PM, Buchan A, Van Der Worp HB, Traystman R, Minematsu K. Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench. *Stroke* 2009; 40: e50-e2.

Macleod MR, Lawson McLean A, Kyriakopoulou A, Serghiou S, de Wilde A, Sherratt N, Hirst T, Hemblade R, Bahor Z, Nunes-Fonseca C. Risk of bias in reports of in vivo research: a focus for improvement. *PLoS biology* 2015; 13: e1002273.

Mai SHC, Sharma N, Kwong AC, Dwivedi DJ, Khan M, Grin PM, Fox-Robichaud AE, Liaw PC. Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis. *Intensive Care Med Exp* 2018; 6: 20.

Matsumiya LC, Sorge RE, Sotocinal SG, Tabaka JM, Wieskopf JS, Zaloum A, King OD, Mogil JS. Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2012; 51: 42-9.

McCann SK, Cramond F, Macleod MR, Sena ES. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke: an update. *Translational stroke research* 2016; 7: 395-406.

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

Mellor DJ, Beausoleil NJ. Extending the 'Five Domains' model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states. *Anim. Welf* 2015; 24: 241.

Mellor DJ. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living". *Animals (Basel)* 2016; 6.

Mendelson WB, Bergmann BM. Age-related changes in sleep in the rat. *Sleep* 1999; 22: 145-50.

Mendl M, Burman OH, Paul ES. An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 2010; 277: 2895-904.

Miller AL, Leach MC. The Mouse Grimace Scale: A Clinically Useful Tool? *PLoS One* 2015; 10: e0136000.

Miller AL, Kitson GL, Skalkoyannis B, Flecknell PA, Leach MC. Using the mouse grimace scale and behaviour to assess pain in CBA mice following vasectomy. *Appl Anim Behav Sci* 2016; 181: 160-5.

Mogil JS, Pang DS, Dutra GGS, Chambers CT. The development and use of facial grimace scales for pain measurement in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2020.

Moher D, Cook D, Jadad AR, Tugwell P, Moher M, Jones A, Pham B, Klassen T. Assessing the quality of reports of randomised trials: implications for the conduct of meta-analyses. *Health Technology Assessment (Winchester, England)* 1999; 3: i-98.

Möller C, Wolf F, van Dijk RM, Di Liberto V, Russmann V, Keck M, Palme R, Hellweg R, Gass P, Otzdorff C, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia* 2018; 59: 765-77.

Molony V, Kent J. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *Journal of animal science* 1997; 75: 266-72.

Mondino A, Cavelli M, González J, Osorio L, Castro-Zaballa S, Costa A, Vanini G, Torterolo P. Power and Coherence in the EEG of the Rat: Impact of Behavioral States, Cortical Area, Lateralization and Light/Dark Phases. *Clocks Sleep* 2020; 2: 536-56.

Morton D, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I. Refining procedures for the administration of substances. *Laboratory animals* 2001; 35: 1-41.

Mota-Rojas D, Olmos-Hernández A, Verduzco-Mendoza A, Hernández E, Martínez-Burnes J, Whittaker AL. The utility of grimace scales for practical pain assessment in laboratory animals. *Animals* 2020; 10: 1838.

Muñoz-Fontela C, Dowling WE, Funnell SG, Gsell P-S, Riveros-Balta AX, Albrecht RA, Andersen H, Baric RS, Carroll MW, Cavaleri M. Animal models for COVID-19. *Nature* 2020; 586: 509-15.

Muralidharan A, Kuo A, Jacob M, Lourdesamy JS, Carvalho LMSPD, Nicholson JR, Corradini L, Smith MT. Comparison of burrowing and stimuli-evoked pain behaviors as endpoints in rat models of inflammatory pain and peripheral neuropathic pain. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2016; 10: 88.

National Research Council. Recognition and alleviation of distress in laboratory animals. 2008.

Nunamaker EA, Goldman JL, Adams CR, Fortman JD. Evaluation of analgesic efficacy of meloxicam and 2 formulations of buprenorphine after laparotomy in female Sprague–Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2018; 57: 498-507.

O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental neurology* 1976; 51: 78-109.

Oliver V, De Rantere D, Ritchie R, Chisholm J, Hecker KG, Pang DS. Psychometric assessment of the Rat Grimace Scale and development of an analgesic intervention score. *PLoS One* 2014; 9: e97882.

Oliver VL, Thurston SE, Lofgren JL. Using cageside measures to evaluate analgesic efficacy in mice (*Mus musculus*) after surgery. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2018; 57: 186-201.

Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic reviews* 2016; 5: 1-10.

Palme R. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiol*

Behav 2019; 199: 229-43.

Papale LA, Andersen ML, Antunes IB, Alvarenga TA, Tufik S. Sleep pattern in rats under different stress modalities. *Brain Res* 2005; 1060: 47-54.

Pappenheimer J, Koski G, Fencel V, Karnovsky M, Krueger J. Extraction of sleep-promoting factor S from cerebrospinal fluid and from brains of sleep-deprived animals. *Journal of neurophysiology* 1975; 38: 1299-311.

Paxinos G, Watson C (2009) *The rat brain in stereotaxic coordinates: compact sixth edition*. New York: Academic Press.

Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* 2020; 18: e3000411.

Pfeiffenberger U, Yau T, Fink D, Tichy A, Palme R, Egerbacher M, Rülcke T. Assessment and refinement of intra-bone marrow transplantation in mice. *Laboratory animals* 2015; 49: 121-31.

Pham T, Hagman B, Codita A, Van Loo P, Strömmer L, Baumans V. Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiology & behavior* 2010; 99: 663-8.

Philips BH, Weisshaar CL, Winkelstein BA. Use of the Rat Grimace Scale to Evaluate Neuropathic Pain in a Model of Cervical Radiculopathy. *Comparative medicine* 2017; 67: 34-42.

Pijlman FT, Wolterink G, Van Ree JM. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. *Behavioural brain research* 2003; 139: 131-8.

Plaźnik A, Stefański R, Kostowski W. Restraint stress-induced changes in saccharin preference: the effect of antidepressive treatment and diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 33: 755-9.

Poole T. Happy animals make good science. *Laboratory animals* 1997; 31: 116-24.

Préfontaine L, Hélie P, Vachon P. Postoperative pain in Sprague Dawley rats after liver biopsy by laparotomy versus laparoscopy. *Lab Anim (NY)* 2015; 44: 174-8.

Rampin C, Cespuglio R, Chastrette N, Jouvet M. Immobilisation stress induces a paradoxical sleep rebound in rat. *Neurosci Lett* 1991; 126: 113-8.

Rasch B, Born J. About sleep's role in memory. *Physiol Rev* 2013; 93: 681-766.

Rattenborg NC, Martinez-Gonzalez D, Lesku JA. Avian sleep homeostasis: Convergent evolution of complex brains, cognition and sleep functions in mammals and birds. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2009; 33: 253-70.

Rechtschaffen A, Bergmann BM. Sleep deprivation in the rat: an update of the 1989 paper. *Sleep* 2002; 25: 18-24.

Redaelli V, Papa S, Marsella G, Grignaschi G, Bosi A, Ludwig N, Luzi F, Vismara I, Rimondo S, Veglianesi P. A refinement approach in a mouse model of rehabilitation research. Analgesia strategy, reduction approach and infrared thermography in spinal cord injury. *PLoS One* 2019; 14: e0224337.

Riedel G, Casabona G, Reymann KG. Inhibition of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG. *Journal of Neuroscience* 1995; 15: 87-98.

Rix A, Girbig R, Porte C, Lederle W, Leenaars C, Kiessling F. Development of a Systematic Review Protocol and a Scoping Review of Ultrasound-Induced Immune Effects in Peripheral Tumors. *Molecular Imaging and Biology* 2021: 1-10.

Robinson-Junker A, O'Hara B, Durkes A, Gaskill B. Sleeping through anything: The effects of unpredictable disruptions on mouse sleep, healing, and affect. *PLoS One* 2019; 14: e0210620.

Rock ML, Karas AZ, Rodriguez KB, Gallo MS, Pritchett-Corning K, Karas RH, Aronovitz M, Gaskill BN. The time-to-integrate-to-nest test as an indicator of wellbeing in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2014; 53: 24-8.

Roughan JV, Bertrand HGMJ, Isles HM. Meloxicam prevents COX-2-mediated post-surgical inflammation but not pain following laparotomy in mice. *European journal of pain (London, England)* 2016; 20: 231-40.

Russell JA. A circumplex model of affect. *Journal of personality and social psychology* 1980; 39: 1161.

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

Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ, Christoph T. Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 2014; 18: 204-12.

Sager TN, Kirchhoff J, Mørk A, Van Beek J, Thirstrup K, Didriksen M, Lauridsen JB. Nest building performance following MPTP toxicity in mice. *Behavioural brain research* 2010; 208: 444-9.

Saine L, Hélie P, Vachon P. Effects of fentanyl on pain and motor behaviors following a collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Journal of pain research* 2016; 9: 1039.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine reviews* 2000; 21: 55-89.

Sauer M, Fleischmann T, Lipiski M, Arras M, Jirkof P. Buprenorphine via drinking water and

combined oral-injection protocols for pain relief in mice. *Applied Animal Behaviour Science* 2016; 185: 103-12.

Schneider LE, Henley KY, Turner OA, Pat B, Niedzielko TL, Floyd CL. Application of the rat grimace scale as a marker of supraspinal pain sensation after cervical spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* 2017; 34: 2982-93.

Schwabe K, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Häger C, Nowakowska M, Riedesel AK, Schönhoff K, Struve B, Wittek J, Potschka H. Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Lab Anim* 2020; 54: 17-25.

Schwierin B, Borbély AA, Tobler I. Sleep homeostasis in the female rat during the estrous cycle. *Brain research* 1998; 811: 96-104.

Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, Armario A. 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.

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

Sena ES, van der Worp HB, Bath PM, Howells DW, Macleod MR. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy. *PLoS Biol* 2010; 8: e1000344.

Shepherd AJ, Cloud ME, Cao Y-Q, Mohapatra DP. Deficits in burrowing behaviors are associated with mouse models of neuropathic but not inflammatory pain or migraine. *Frontiers in behavioral neuroscience* 2018; 12: 124.

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

Shi C, Das V, Li X, Kc R, Qiu S, O-Sullivan I, Ripper RL, Kroin JS, Mwale F, Wallace AA. Development of an in vivo mouse model of discogenic low back pain. *Journal of cellular physiology* 2018; 233: 6589-602.

Simasko SM, Mukherjee S. Novel analysis of sleep patterns in rats separates periods of vigilance cycling from long-duration wake events. *Behav Brain Res* 2009; 196: 228-36.

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

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8: 383-95.

Smyk MK, van Luijelaar G. Circadian Rhythms and Epilepsy: A Suitable Case for Absence Epilepsy. *Front Neurol* 2020; 11: 245.

Soltani S, Chauvette S, Bukhtiyarova O, Lina J-M, Dubé J, Seigneur J, Carrier J, Timofeev I. Sleep–wake cycle in young and older mice. *Frontiers in systems neuroscience* 2019; 51.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011; 7: 55.

Špinka M. Social dimension of emotions and its implication for animal welfare. *Applied Animal Behaviour Science* 2012; 138: 170-81.

Sreelatha H, Krishnan L, Abelson K. A novel technique to develop thoracic spinal laminectomy and a methodology to assess the functionality and welfare of the contusion spinal cord injury (SCI) rat model. *PLoS One* 2019; 14: e0219001.

Staib-Laszczik I, Nagel N, Sebastiani A, Griemert E-V, Thal SC. Analgesic treatment limits surrogate parameters for early stress and pain response after experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC neuroscience* 2019; 20: 1-7.

Stasiak KL, Maul D, French E, Hellyer PW, Vandewoude S. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2003; 42: 13-20.

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

Tappe-Theodor A, King T, Morgan MM. Pros and cons of clinically relevant methods to assess pain in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2019; 100: 335-43.

Tappe-Theodor A, Kuner R. Studying ongoing and spontaneous pain in rodents—challenges and opportunities. *European Journal of Neuroscience* 2014; 39: 1881-90.

Teeling J, Felton L, Deacon R, Cunningham C, Rawlins J, Perry V. Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines. *Brain, behavior, and immunity* 2007; 21: 836-50.

Thomas A, Miller A, Roughan J, Malik A, Haylor K, Sandersen C, Flecknell P, Leach M. Efficacy of intrathecal morphine in a model of surgical pain in rats. *PLoS One* 2016; 11: e0163909.

Tobler I, Borbély AA. The effect of 3-h and 6-h sleep deprivation on sleep and EEG spectra of the rat. *Behavioural brain research* 1990; 36: 73-8.

Turner PV, Pang DS, Lofgren JL. A review of pain assessment methods in laboratory rodents. *Comparative medicine* 2019; 69: 451-67.

Tuttle AH, Molinaro MJ, Jethwa JF, Sotocinal SG, Prieto JC, Styner MA, Mogil JS, Zylka MJ. A deep neural network to assess spontaneous pain from mouse facial expressions. *Mol Pain* 2018; 14: 1744806918763658.

Ung K, Arenkiel BR. Fiber-optic implantation for chronic optogenetic stimulation of brain tissue. *J Vis Exp* 2012; e50004.

Ursin R. Differential effect of sleep deprivation on the two slow wave sleep stages in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica* 1971; 83: 352-61.

Van der Mierden S, Tsaïoun K, Bleich A, Leenaars CH. Software tools for literature screening in systematic reviews in biomedical research. *Altex* 2019; 36: 508-17.

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

Van Loo P, Baumans V. The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Laboratory animals* 2004; 38: 17-24.

Van Loo PL, Kuin N, Sommer R, Avsaroglu H, Pham T, Baumans V. Impact of 'living apart together' on postoperative recovery of mice compared with social and individual housing. *Lab Anim* 2007; 41: 441-55.

Vyazovskiy VV, Tobler I. Theta activity in the waking EEG is a marker of sleep propensity in the rat. *Brain Res* 2005; 1050: 64-71.

Waite ME, Tomkovich A, Quinn TL, Schumann AP, Dewberry L, Totsch SK, Sorge RE. Efficacy of common analgesics for postsurgical pain in rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 2015; 54: 420-5.

Watanabe S, Saito M, Soma M, Miyaoka H, Takahashi M. A novel device for continuous long-term electroencephalogram recording and drug administration in mice with a nice, powerful and sophisticated wired system. *Journal of Neuroscience Methods* 2017; 286: 22-30.

Watson AJ, Henson K, Dorsey SG, Frank MG. The truncated TrkB receptor influences mammalian sleep. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2015; 308: R199-R207.

Webster J. Assessment of animal welfare: the five freedoms. *Animal Welfare: A Cool Eye Towards Eden*; Blackwell Science: Oxford, UK 1994: 10-4.

Weiergräber M, Henry M, Hescheler J, Smyth N, Schneider T. Electroencephalographic and deep intracerebral EEG recording in mice using a telemetry system. *Brain research protocols* 2005; 14: 154-64.

Whitlock JR, Pfuhl G, Dagslott N, Moser M-B, Moser EI. Functional split between parietal and entorhinal cortices in the rat. *Neuron* 2012; 73: 789-802.

Whittaker AL, Howarth GS. Use of spontaneous behaviour measures to assess pain in laboratory rats and mice: How are we progressing? *Applied Animal Behaviour Science* 2014; 151: 1-12.

Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, Morland R, Andrews N, Bastrup C, Bryden LA, Caspani O, Christoph T, Gardiner NJ, Huang W, Kennedy JD, Koyama S, Li D, Ligocki M, Lindsten A, Machin I, Pekcec A, Robens A, Rotariu SM, Vo BS, Segerdahl M, Stenfors C, Svensson CI, Treede RD, Uto K, Yamamoto K, Rutten K, Rice AS. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain* 2016; 157: 2350-65.

Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M. The preventive effects of dexmedetomidine on endotoxin-induced exacerbated post-incisional pain in rats. *Journal of Anesthesia* 2017; 31: 664-71.

Younger J, McCue R, Mackey S. Pain outcomes: a brief review of instruments and techniques. *Curr Pain Headache Rep* 2009; 13: 39-43.

Yousef MAA, Dionigi P, Marconi S, Calligaro A, Cornaglia AI, Alfonsi E, Auricchio F. Successful reconstruction of nerve defects using distraction neurogenesis with a new experimental device. *Basic and clinical neuroscience* 2015; 6: 253.

Yuan D, Liu C, Wu J, Hu B. Nest-building activity as a reproducible and long-term stroke deficit test in a mouse model of stroke. *Brain and behavior* 2018; 8: e00993.

Zayachkivsky A, Lehmkuhle MJ, Ekstrand JJ, Dudek FE. Ischemic injury suppresses hypoxia-induced electrographic seizures and the background EEG in a rat model of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of neurophysiology* 2015; 114: 2753-63.

X. ANHANG

1. Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage CPA 1245-OCE	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Beobachtungskäfige	Domes Aquaristik, München, Deutschland
Dentalbohrer	Fa. Karl Fischer, Pforzheim, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte, VMS C7	VWR International GmbH, USA
Matrix 2.0	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Mikroplatten-Spektralphotometers (Epoch 2 microplate reader)	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Perfusionspumpe	Werkstatt des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
Personal Computer	Diverse
Schüttelinkubator Stuart SI Orbital Shaking Incubator	Industriële Veiling Eindhoven, Eindhoven, Niederlande
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Tischzentrifuge „Mikro 200“	Fa. Hettich, Tuttlingen
Transmitter HD-X02	Data Sciences International, St.Paul, MN, USA
Universalschrank UN	Memmert GmbH+Co.KG, Schwabach
Videokameras	Conrad Elektronik, München CCTV Camera, Panasonic, Suzhou, China Axis M1144-L Network Camera, Axis Communications AB, Lund, Schweden

2. Software

Software	Hersteller
EndNote Version X9.2	Clarivate Analytics, USA
Gen 5 Imager Software	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Graph Pad Prism Version 5.04	GraphPad, San Diego, CA, USA
MATLAB R2020a	MathWorks Inc, USA
Microsoft Office für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NeuroScore™ Version 3.0 Ponemah® 5.20 und 6.41	Data Sciences International, St. Paul, MN, USA
R Version 3.6.3. über RStudio Version 1.2.1335	RStudio Team, Boston, MA, USA

3. Lösungen und Substanzen

Lösungen

30-prozentig Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (pro Gehirn)

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

8-prozentiges Paraformaldehyd

- 800 ml Aqua dest. auf 60–70 °C erhitzen
- 80 g Paraformaldehyd zugeben
- Tropfenweise 6 M NaOH zugeben, bis die Lösung klar wird
- abkühlen lassen
- mit Aqua. dest. auf 1000 ml auffüllen
- anschließend filtrieren

4-prozentiges Paraformaldehyd

- 200 ml 8-prozentiges Paraformaldehyd
- mit 200 ml 0,2 M Phosphatpuffer verdünnen

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

- 45,43 g/l Na₂HPO₄ (wasserfrei)
- 12,48 g/l Na₂HPO₄ x H₂O
- In Aqua dest. Lösen und mit 1 M NaOH auf pH 7,4 einstellen

0,01 M phosphatgepufferte 0,9-prozentige Kochsalzlösung (pH 7,4)

- 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl zugeben
- Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen

Saccharin-Lösung (0,1-prozentig)

- 0,1 g Saccharin \geq 98%
- 100 ml Wasser

Saccharin-Lösung (0,2-prozentig)

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

Substanzen

Substanz	Hersteller
Actril [®] , cold sterilant	Medivators Inc. Minneapolis, USA
Antiprotease	Aprotinin from bovine lung lyophilized powder, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA
Bepanthen [®] Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland
Bupivacain	Jenapharm [®] , Mibe GmbH, Brehna, Deutschland
Essigsäure 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Gefriermedium (Tissue Tek Freezing Medium)	Sakure Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Isofluran CP [®]	Henry Schein Vet, Hamburg, Deutschland
Marbofloxacin (Marbocyl [®])	Covetrus, Hamburg, Deutschland
Meloxicam (Metacam [®])	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Metamizol (Vetalgin [®])	Covetrus, Hamburg, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid-Lösung (isoton)	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,

	Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Ringer-Lactat-Lösung	B. Braun Vet Care GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Linde AG Gases Division, Pullach, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Zahnzement (Paladur®)	Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland

Verwendete Kits

Corticosteron rat/mouse ELISA, DEV9922	Demeditec, Kiel, Deutschland
--	------------------------------

4. Modifizierter Irwin-Score

Parameter des modifizierten Irwin-Scores:

1. Körperlage (im Käfig):

- 2 flach, liegend auf der Seite oder auf dem Bauch, kein Muskeltonus
- 1 teilweise konservierter Muskeltonus, gelegentliche posturale Korrekturen
- 0 normale Haltung
- +1 starre oder verkrampfte Haltung (z.B. Ophisthotonus)
- +2 Tiere zeigen keine Ruheposition, können daher nicht ausgewertet werden

2. Ptosis (Lidschluss):

- 0 Augenlider geöffnet
- +1 Augenlider partiell geöffnet
- +2 Augenlider geschlossen

3. Lokomotorische Aktivität

- 2 keine Aktivität
- 1 verminderte Bewegung, gelegentliches Putzverhalten
- 0 normale Aktivität
- +1 erhöhte, kraftvolle, winklige Bewegungen
- +2 ruheloser Bewegungstyp

4. Berührungsreaktion

- 2 Ausfall, auch stärkere Reize bleiben ohne Reaktion
- 1 nach mehrfachem oder verstärktem Stimulus langsame, abgeschwächte Reaktion (Ducken, Entweichen)
- 0 normale Reaktion auf leichte Berührung
- +1 Ausweichen oder Ducken auf leichte Berührung
- +2 Flucht über größere Distanz, Angriffsverhalten, Vokalisierung auf leichte Berührung

5. Reizbarkeit (Beißneigung)

- 0 keine
- +1 leichte
- +2 deutliche

6. Neugier (auf Zeigen eines Objektes hin)

- 2 keine Reaktion

- 1 verminderte Neugier
- 0 normal, Interesse an präsentiertem Objekt
- +1 ruckartige Verfolgung, keine Anpassung auch bei wiederholtem Entzug
- +2 Angriffsverhalten

7. Freezing

- 0 kein Freezing
- +1 leichtes Freezing sichtbar
- +2 deutliches, abruptes Freezing

8. Vokalisation

- 0 keine Vokalisation
- +1 zeitweise spontan auftretendes, leises Piepsen
- +2 häufiges spontan auftretendes, stärkeres Piepsen

9. Harnabsatz (während des *Handlings*)

- 0 kein Harnabsatz
- +1 vorhanden

10. Kotabsatz (während des *Handlings*)

- 0 kein Kotabsatz
- +1 vorhanden

11. Lidreflex

- 0 normal
- +1 beeinträchtigt

12. Cornealreflex

- 0 normal
- +1 beeinträchtigt

13. Schreckhaftigkeit

- 2 keine Reaktion
- 1 verzögerte oder weniger Reaktion
- 0 normal
- +1 Flucht
- +2 starke Reaktion, Zukneifen der Augen, Anlegen der Ohren, Drücken auf dem Boden oder vorübergehendes Einfrieren

14. Beckenhöhe

- 1 abgeflacht
- 0 kaum verändert
- +1 etwas erhöht

15. Schwanzhöhe

- 1 Nachschleifen des Schwanzes beim Gehen
- 0 normale Schwanzposition
- +1 aufgestellter Schwanz (max. 90 ° Winkel) während Ruhe und Aktivitätsperiode, teilweise Schwanzschlagen
- +2 Schwanz über dem Körper aufgestellt (Straub-Phänomen)

16. Beinrotation (nach außen)

- 0 nicht vorhanden
- +1 leicht
- +2 deutlich

17. Körpertonus (während des Handlings)

- 2 völlig schlaff
- 1 reduzierter Tonus
- 0 normaler Muskeltonus
- +1 erhöhter Tonus
- +2 steif

18. Bauchdeckenspannung

- 1 reduzierter Muskeltonus
- 0 normal
- +1 erhöhte Muskelspannung

19. Stellreflex (wenn das Tier kontinuierlich liegt)

- 1 nicht vorhanden
- 0 reduziert
- +1 keine Änderung

20. Ataxie

- 0 keine Ataxie
- +1 Koordinationsprobleme beim Laufen
- +2 Verlust der Bewegungskoordination

21. Exophthalmus

- 0 kein Exophthalmus
- +1 leichter Exophthalmus
- +2 ausgeprägter Exophthalmus

22. Hypersalivation

- +1 keine Hypersalivation
- +2 vorhanden

23. Tränenfluss

- +1 kein Tränenfluss
- +2 vorhanden

24. Faeces

- 1 kein oder kaum Kot im Käfig
- 0 Kotbeschaffenheit und Menge normal
- +1 Kotmenge deutlich erhöht
- +2 fast flüssiger Kot, Durchfall

25. Piloerektion

- 0 nicht vorhanden
- +2 vorhanden

26. Hautdurchblutung

- 2 Schwanz und Pfoten bläulich verfärbt: Zyanose
- 1 fast weiße Ohrmuschel, Pfoten oder Schwanz mit kaum sichtbaren Gefäßen
- 0 normale Hautdurchblutung
- +1 Pfoten dunkelrosa, Schwanz stark hellrosa
- +2 Pfoten, Ohrmuschel oder Schwanz rot

27. Atemfrequenz

- 2 Schnappatmung, akute Atemnot
- 1 verminderte, unregelmäßige, angespannte Atmung
- 0 normale Atmung
- +1 erhöhte Atemfrequenz
- +2 erhöhte Atemfrequenz, aber auch während der Ruheperiode

28. Zittern

- 0 kein Zittern
- +2 vorhanden

29. Zuckungen

- 0 keine
- +2 vorhanden

30. Krämpfe

- 0 keine
- +2 vorhanden

31. Implantatbereich

- 2 hochgradige nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
- 1 leichte nekrotische Veränderungen im Implantatbereich
- 0 unauffällige Implantatfläche
- +1 kleine Entzündung im Implantatbereich
- +2 hochgradige Entzündung im Implantatbereich

32. Stereotypien

- 0 keine
- +2 vorhanden

33. Körpertemperatur (falls die generelle Konstitution des Tieres abweicht):

- 1 Temperatur von 2 ° C oder mehr gegen die Kontrolle
- 0 Temperatur normal

5. Systematic Review Protocol



SYSTEMATIC REVIEW PROTOCOL FOR ANIMAL INTERVENTION STUDIES

FORMAT BY SYRCLE (WWW.SYRCLE.NL)

VERSION 2.0 (DECEMBER 2014)

Item #	Section/Subsection/Item	Description	Check for approval
A. General			
1.	Title of the review	Grimace scale, burrowing and nest building for the assessment of postsurgical pain in mice and rats – a systematic review	
2.	Authors (names, affiliations, contributions)	<p>Katharina Aulehner Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy Ludwig-Maximilians-University Munich</p> <p>Cathalijn Leenaars Radboud University Medical Centre & Utrecht University & Hanover Medical School</p> <p>Paulin Jirkof Department Animal Welfare, University of Zurich</p> <p>Verena Buchecker Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy Ludwig-Maximilians-University Munich</p> <p>Ines Koska Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy Ludwig-Maximilians-University Munich</p> <p>Andre Bleich Inst. for Laboratory Animal Science Hanover Medical School</p> <p>Marion Bankstahl Inst. for Laboratory Animal Science Hanover Medical School</p> <p>Heidrun Potschka Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy Ludwig-Maximilians-University Munich</p>	
3.	Other contributors (names, affiliations, contributions)	None	
4.	Contact person + e-mail address	Katharina Aulehner katharina.aulehner@pharmtox.vetmed.uni-muenchen.de	
5.	Funding sources/sponsors	DFG, FOR2591	
6.	Conflicts of interest	None	

7.	Date and location of protocol registration	18-03-2020, SYRF website	
8.	Registration number (if applicable)	-	
9.	Stage of review at time of registration	Study selection piloted on preliminary searches. Final searches completed. Formal screening for inclusion not yet started.	
B. Objectives			
Background			
10.	What is already known about this disease/model/intervention? Why is it important to do this review?	<p>Mice and Rats represent widespread animal models in research; therefore, assessing and improving their wellbeing is important for ethical and scientific reasons. As prey animals, mice and rats tend to hide pain. Taking this into account good parameters for assessment of pain, distress and suffering are crucial.</p> <p>The grimace scale is a method for detecting and assessing pain in mice and rats through facial expressions. The Mouse Grimace Scale (MGS) consists of five facial "action units" including orbital tightening, nose bulge, cheek bulge, ear position and whisker change. The Rat Grimace Scale (RGS) consists of four facial "action units" including orbital tightening, nose/cheek flattening, ear changes and whisker change. These action units were scored on a 0-2 scale (0 "not present", 1 "moderate", 2 "severe/obvious").</p> <p>Useful behavioral parameters to assess pain in mice and rats are nest building and burrowing performance. Both constitute non-essential behavioral patterns under laboratory conditions. Therefore, animal show alterations in these behavioral parameters before deviations in essential behavior can be observed. Considering this, these parameters can be useful to assess reduced wellbeing in these animals. Moreover, these parameters are easy to assess and – except for burrowing behavior of rats – can be investigated in their home cage.</p> <p>To assess nest building, there have been different protocols published. Parameters for assessment of nest building behavior are the nest complexity, the amount of used nest material and the time-to-integrate-to-nest-test (TINT). The most frequently used material for nest building in mice are nestlets and paper cloth.</p> <p>Burrowing behavior is assessed with tubes – imitating the natural burrowed tunnels – placed in home or separate cages. Following the burrowing period, the amount of burrowed material can be measured. Furthermore, the latency to start burrowing and the time to empty the burrowing device can be measured.</p> <p>Many studies have demonstrated the utility of quantifying pain in rats and mice via behavioral and grimace scale parameters. However, the current state of validation of</p>	

		these parameters for detection and assessment of post-surgical pain is not clearly described.	
Research question			
11.	Specify the disease/health problem of interest	Postsurgical pain	
12.	Specify the population/species studied	Mouse, Rat	
13.	Specify the intervention/exposure	Surgery	
14.	Specify the control population	Any non-surgical within-or between subject control	
15.	Specify the outcome measures	Burrowing, Nest building, Grimace scale	
16.	State your research question (based on items 11-15)	What is the current evidence base for using grimace scale, burrowing and nest building for the assessment of post-surgical pain in rats and mice?	
C. Methods			
Search and study identification			
17.	Identify literature databases to search (e.g. Pubmed, Embase, Web of science)	<input checked="" type="checkbox"/> MEDLINE via PubMed <input checked="" type="checkbox"/> Web of Science <input type="checkbox"/> SCOPUS <input checked="" type="checkbox"/> EMBASE <input type="checkbox"/> Other, namely: <input type="checkbox"/> Specific journal(s), namely:	
18.	Define electronic search strategies (e.g. use the step by step search guide ¹⁵ and animal search filters ^{20, 21})	The search consists of the following elements: Tests (grimace scale, burrowing, nest building), Surgery, Pain, and Rodents The full search is described below the protocol table.	
19.	Identify other sources for study identification	<input checked="" type="checkbox"/> Reference lists of included studies <input type="checkbox"/> Books <input type="checkbox"/> Reference lists of relevant reviews <input type="checkbox"/> Conference proceedings, namely: <input type="checkbox"/> Contacting authors/ organisations, namely: <input type="checkbox"/> Other, namely:	
20.	Define search strategy for these other sources		
Study selection			
21.	Define screening phases (e.g. pre-screening based on title/abstract, full text screening, both)	Phase 1: title/abstract screening Phase 2: full text screening	
22.	Specify (a) the number of reviewers per screening phase and (b) how discrepancies will be resolved	Two observers will independently screen for relevant studies. Discrepancies will be resolved by discussion including a third person.	
<i>Define all inclusion and exclusion criteria based on:</i>			
23.	Type of study (design)	Inclusion criteria: primary study Exclusion criteria: not a primary study with primary data	
24.	Type of animals/population (e.g. age, gender, disease model)	Inclusion criteria: laboratory mice/rats Exclusion criteria: other species	

25.	Type of intervention (e.g. dosage, timing, frequency)	Inclusion criteria: surgery, defined as skin incision (including biopsy) under general anaesthesia Exclusion criteria: procedures without skin incision (e.g. injection, blood sampling, tattooing)	
26.	Outcome measures	Inclusion criteria: burrowing and/or nest building and/or grimace scale as pain parameters Exclusion criteria: neither burrowing nor nest building nor grimace scale analysed	
27.	Language restrictions	Inclusion criteria: English language Exclusion criteria: other languages	
28.	Publication date restrictions	Inclusion criteria: 2005 - 2020 Exclusion criteria: dates up to 2004	
29.	Other	Inclusion criteria: full peer-reviewed publication Exclusion criteria: conference abstract, other types of literature	
30.	Sort and prioritize your exclusion criteria per selection phase	Selection phase: title-abstract screening 1. no English language 2. no rats and/or mice 3. no surgery, defined as skin incision (including biopsy) under general anaesthesia performed 4. review article Selection phase: full-text screening 1. no English language 2. no rats and/or mice 3. no surgery, defined as skin incision (including biopsy) under general anaesthesia performed 4. no burrowing and/or nest building and/or grimace scale data described 5. article without original data 6. article not retrievable 7. paper is not a full peer-reviewed journal article	
Study characteristics to be extracted (for assessment of external validity, reporting quality)			
31.	Study ID (e.g. authors, year)	First Author, year of publication, title, journal, pages, if available: doi	
32.	Study design characteristics (e.g. experimental groups, number of animals)	Single or group housing, n per homepage, groups, number of animals per group, type of control	
33.	Animal model characteristics (e.g. species, gender, disease induction)	Species (rat/mouse), strain, breeder, sex, age, weight	
34.	Intervention characteristics (e.g. intervention, timing, duration)	Type of surgery, duration of surgery, time of day, type of anaesthesia, concentration/dose, type of analgesia, dose, route of administration	
35.	Outcome measures	Grimace scale: video/image based evaluation; time of day; days of evaluation in relation to surgery; significant alteration of total score, orbital tightening, nose bulge, cheek bulge, ear position and whisker change (MGS) or significant alteration of total score, orbital tightening, nose/cheek flattening, ear changes and whisker change (RGS)	

		<p>Burrowing: burrowing material; duration of test; time of day; time in relation to dark; Days of evaluation in relation to surgery; significant alteration of latency, amount burrowed per time and time to empty burrowing device</p> <p>Nest building: nest material; time of evaluation in relation to dark; days of evaluation in relation to surgery; TINT; significant alterations of nest complexity and level of soiling</p>	
36.	Other (e.g. drop-outs)	Number of drop-outs per group	
Assessment risk of bias (internal validity) or study quality			
37.	Specify (a) the number of reviewers assessing the risk of bias/study quality in each study and (b) how discrepancies will be resolved	One reviewer will assess risk of bias and study quality. A random subset of at least 5% of the studies will be checked by a second reviewer for quality.	
38.	Define criteria to assess (a) the internal validity of included studies (e.g. selection, performance, detection and attrition bias) and/or (b) other study quality measures (e.g. reporting quality, power)	<input type="checkbox"/> By use of SYRCLE's Risk of Bias tool⁴ <input checked="" type="checkbox"/> By use of SYRCLE's Risk of Bias tool, adapted as follows: 1.) power analysis will be added 2.) for within subject comparisons, only the relevant items will be scored <input type="checkbox"/> By use of CAMARADES' study quality checklist, e.g.²² <input type="checkbox"/> By use of CAMARADES' study quality checklist, adapted as follows: <input type="checkbox"/> Other criteria, namely:	
Collection of outcome data			
39.	For each outcome measure, define the type of data to be extracted (e.g. continuous/dichotomous, unit of measurement)	<p>Grimace scale: MGS: total score, orbital tightening, nose bulge, cheek bulge, ear position and whisker change; RGS: total score, orbital tightening, nose/cheek flattening, ear changes and whisker change</p> <p>Burrowing: latency to start in seconds, amount burrowed per time in gram, time to empty burrowing device in seconds</p> <p>Nest building: time-to-integrate-to-nest-test in seconds, nest complexity in scores from one to three, level of soiling in scores</p>	
40.	Methods for data extraction/retrieval (e.g. first extraction from graphs using a digital screen ruler, then contacting authors)	Numerical data we will extract from tables, text or graphs. If there are missing data, we will attempt to contact the authors.	
41.	Specify (a) the number of reviewers extracting data and (b) how discrepancies will be resolved	One reviewer will extract the data. A random subset of at least 5% of the extracted data will be checked by a second reviewer for quality.	
Data analysis/synthesis			
42.	Specify (per outcome measure) how you are planning to combine/compare the data (e.g. descriptive summary, meta-analysis)	We will draw up a descriptive summary of all included studies and their outcome measures.	
43.	Specify (per outcome measure) how it will be decided whether a meta-analysis will be performed	If greater or equal to 3 studies with a comparable control condition report on a specific outcome measure, a meta-analysis will be performed to analyse the effect of surgery compared to control on this outcome.	
<i>If a meta-analysis seems feasible/sensible, specify (for each outcome measure):</i>			

44.	The effect measure to be used (e.g. mean difference, standardized mean difference, risk ratio, odds ratio)	Standardized mean difference	
45.	The statistical model of analysis (e.g. random or fixed effects model)	Random effect model	
46.	The statistical methods to assess heterogeneity (e.g. I^2 , Q)	I^2	
47.	Which study characteristics will be examined as potential source of heterogeneity (subgroup analysis)	If sufficient data are available: species, type of surgery, type of anaesthesia	
48.	Any sensitivity analyses you propose to perform	-	
49.	Other details meta-analysis (e.g. correction for multiple testing, correction for multiple use of control group)	Relevant corrections will be performed following "Borenstein, M., Hedges, L. V., Higgins, J. P., & Rothstein, H. R. (2011). <i>Introduction to meta-analysis</i> . John Wiley & Sons.."	
50.	The method for assessment of publication bias	Funnel plots will be created if ≥ 10 studies are included in a meta-analysis.	
Final approval by (names, affiliations):		Katharina Aulehner, Cathalijn Leenaars, Paulin Jirkof, Heidrun Potschka	Date: 18.03.20

Search Strategy:

Pubmed

1. Specific tests

"Nesting behavior"[MeSH Terms] OR nesting[tiab] OR nest building[tiab] OR burrowing[tiab] OR grimace[tiab] OR facial grimacing[tiab] OR facial expression[tiab] OR face expression[tiab] OR "facial pain"[MeSH Terms] OR (facial[tiab] AND pain[tiab]) OR (pain[tiab] AND face[tiab]) OR (faces[tiab] AND pain[tiab] AND scale[tiab]) OR (faces[tiab] AND pain[tiab] AND scales[tiab]) OR (face[tiab] AND pain[tiab] AND scale[tiab]) OR (face[tiab] AND pain[tiab] AND scales[tiab]) OR pain assessment[tiab] OR pain assessments[tiab] OR assessment of pain[tiab] OR "pain measurement"[MeSH Terms] OR pain measurement[tiab] OR pain measurements[tiab] OR (experimental[tiab] AND pain[tiab] AND test[tiab]) OR (experimental[tiab] AND pain[tiab] AND tests[tiab]) OR pain evaluation[tiab]

2. Surgery

"surgical procedures, operative"[MeSH Terms] OR "general surgery"[MeSH Terms] OR surgery[tiab] OR surgeries[tiab] OR surgical[tiab] OR surgically[tiab] OR postsurgical[tiab] OR postsurgically[tiab] OR postoperative[tiab] OR postoperatively[tiab] OR "surgical wound"[MeSH Terms] OR incision[tiab] OR incisions[tiab] OR incisional[tiab] OR operation[tiab] OR operative[tiab] OR operations[tiab] OR laparotomy[tiab] OR laparotomies[tiab] OR laparoscopy[tiab] OR laparoscopies[tiab] OR craniotomy[tiab] OR craniotomies[tiab] OR amputation[tiab] OR amputations[tiab] OR transplantation[tiab] OR transplantations[tiab] OR graft[tiab] OR grafts[tiab] OR grafting[tiab] OR implantation[tiab] OR implantations[tiab] OR hysterotomy[tiab] OR hysterectomy[tiab] OR hysterectomies[tiab] OR "neurosurgery"[MeSH Terms] OR neurosurgery[tiab] OR neurosurgical[tiab] OR

neurosurgically[tiab] OR "orthopedics"[MeSH Terms] OR orthopedic[tiab] OR orthopaedic[tiab] OR orthopedics[tiab] OR orthopaedics[tiab]

3. Pain

"Pain"[MeSH Terms] OR pain[tiab] OR pains[tiab] OR physical suff*[tiab] OR "nociception"[MeSH Terms] OR nociception[tiab] OR allodynia[tiab] OR "hyperalgesia"[MeSH Terms] OR hyperalgesia[tiab] OR "neuralgia"[MeSH Terms] OR neuralgia[tiab] OR neuralgias[tiab] OR sore[tiab] OR soreness[tiab] OR ache[tiab] OR aches[tiab] OR discomfort[tiab] OR distress[tiab] OR hurt[tiab] OR hurts[tiab] OR hurting[tiab]

4. Rodents

"mice"[MeSH Terms] OR mice[tiab] OR mus[tiab] OR mouse[tiab] OR murine[tiab] OR murines[tiab] OR muridae[tiab] OR m. musculus[tiab] OR "rats"[MeSH Terms] OR rats[tiab] OR rat[tiab] OR rattus[tiab] OR "rodentia"[MeSH Terms] OR rodentia[tiab] OR rodent[tiab] OR rodents[tiab]

Embase

1. Specific tests

Nesting/ OR (nesting OR nest building).ti,ab,kw. OR burrowing.ti,ab,kw. OR facial expression/ OR (facial expression OR face expression OR grimace).ti,ab,kw. OR facial grimacing/ OR facial grimacing.ti,ab,kw. OR face pain/ OR ((facial AND pain) OR (pain AND face)).ti,ab,kw. OR faces pain scale/ OR ((faces AND pain AND scale) OR (faces AND pain AND scales) OR (face AND pain AND scale) OR (face AND pain AND scales)).ti,ab,kw. OR pain assessment/ OR (pain assessment OR pain assessments OR assessment of pain).ti,ab,kw. OR pain measurement/ OR (pain measurement OR pain measurements OR pain evaluation).ti,ab,kw. OR experimental pain test/ OR ((experimental AND pain AND test) OR (experimental AND pain AND tests)) .ti,ab,kw.

2. Surgery

Surgery/ OR (surgery OR surgeries OR surgical OR surgically OR postsurgical OR postsurgically OR postoperative OR postoperatively OR operation OR operative OR operations).ti,ab,kw. OR surgical wound/ OR incision/ OR (incision OR incisions OR incisional).ti,ab,kw. OR laparotomy/ OR (laparotomy OR laparotomies OR laparoscopy OR laparoscopies).ti,ab,kw. OR craniotomy/ OR (craniotomy OR craniotomies).ti,ab,kw. OR amputation/ OR (amputation OR amputations).ti,ab,kw. OR transplantation/ OR (transplantation OR transplantations OR graft OR grafts OR grafting).ti,ab,kw. OR implantation/ OR (implantation OR implantations).ti,ab,kw. OR hysterotomy.ti,ab,kw. OR (hysterectomy OR hysterectomies).ti,ab,kw. OR neurosurgery/ OR (neurosurgery OR neurosurgical OR neurosurgically).ti,ab,kw. OR orthopedics/ OR (orthopedic OR orthopedics OR orthopaedic OR orthopaedics).ti,ab,kw.

3. Pain

Pain/ OR (pain OR pains OR physical suff* OR sore OR soreness OR ache OR aches OR discomfort OR distress OR hurt OR hurts OR hurting).ti,ab,kw. OR nociception/ OR nociception.ti,ab,kw. OR allodynia/ OR allodynia.ti,ab,kw. OR hyperalgesia/ OR hyperalgesia.ti,ab,kw. OR neuralgia/ OR (neuralgia OR neuralgias).ti,ab,kw.

4. Rodents

Mouse/ OR (mouse OR mice).ti,ab,kw. OR mus musculus/ OR mus musculus.ti,ab,kw. OR murine/ OR (murine OR murines).ti,ab,kw. OR muridae/ OR muridae.ti,ab,kw. OR rat/ OR (rat OR rats OR rattus).ti,ab,kw. OR rodent/ OR (rodent OR rodents OR rodentia).ti,ab,kw.

Web of science**1. Specific test**

TS=(nesting OR "nest building" OR burrowing OR grimace OR "facial grimacing" OR "facial expression" OR "face expression" OR facial pain OR pain face OR faces pain scale OR faces pain scales OR face pain scale OR face pain scales OR "pain assessment" OR "pain assessments" OR "assessment of pain" OR "pain measurement" OR "pain measurements" OR experimental pain test OR experimental pain tests OR "pain evaluation")

2. Surgery

TS=(surgery OR surgeries OR surgical OR surgically OR postsurgical OR postsurgically OR postoperative OR postoperatively OR incision OR incisions OR incisional OR operation OR operative OR operations OR laparotomy OR laparotomies OR laparoscopy OR laparoscopies OR craniotomy OR craniotomies OR amputation amputations OR transplantation OR transplantations OR graft OR grafting OR implantations OR implantations OR hysterotomy OR hysterectomy OR hysterectomies OR neurosurgery OR neurosurgical OR neurosurgically OR orthopedic OR orthopaedic OR orthopedics OR orthopaedics)

3. Pain

TS=(Pain OR pains OR "physical suff*" OR nociception OR allodynia OR hyperalgesia OR neuralgia OR neuralgias OR sore OR soreness OR ache OR aches OR discomfort OR distress OR hurt OR hurts OR hurting)

4. Rodents

TS=(mice OR mus OR mouse OR murine OR murines OR muridae OR "m. musculus" OR rats OR rat OR rattus OR rodent OR rodents OR rodentia)

XI. PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden bei dem Journal *Scientific Reports* veröffentlicht:

Aulehner K, Bray J, Koska I, Pace C, Palme R, Kreuzer M, Platt B, Fenzl T, Potschka H.
The impact of tethered recording techniques on activity and sleep patterns in rats. *Sci Rep*
2022; 12: 3179.

Teile dieser Arbeit werden unter dem folgenden Titel veröffentlicht (manuscript submitted):

**Grimace scale, burrowing and nest building for the assessment of postsurgical pain
in mice and rats – a systematic review**

Aulehner K, Leenaars C, Buchecker V, Stirling H, Schönhoff K, King H, Häger C, Koska I,
Jirkof P, Bleich A, Bankstahl M, Potschka H.

XII. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Professorin Heidrun Potschka, die sich um die Förderung der Projekte bemüht hat und diese Arbeit mit ihrer fachlichen Kompetenz unterstützt hat. Vielen Dank für die gute Betreuung, für die Möglichkeit Erfahrungen im wissenschaftlichen und versuchstierkundlichen Bereich zu sammeln sowie für die Förderung meiner Aus- und Weiterbildung.

Ein weiterer Dank gilt Cathalijn Leenaars, die mir bei der Durchführung des systematischen Reviews geholfen hat. Vielen Dank für die vielen hilfreichen Erklärungen und Tipps und für das schöne Meeting ganz am Anfang meiner Dissertation in Hannover, wo ich mit systematischen *Reviews* vertraut gemacht wurde.

Ich möchte mich bei unseren Kooperationspartner Jack Bray, Dr. Matthias Kreuzer und PD. Dr. Thomas Fenzl bedanken. Vielen Dank für die Unterstützung bei der Auswertung der Schlafmusterdaten im Rahmen der experimentellen Studie und für die hilfreichen Ratschläge und Gespräche.

Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen bedanken, die mich während der letzten drei Jahre begleitet haben. Ines Koska danke ich für die Unterstützung und die vielen Ratschläge zu Beginn meiner Doktorarbeit. Mein Dank gilt auch Claudia Pace für die Unterstützung bei der Planung der Schlafmusterstudie und für die Einführung in die Versuchstierkunde. Katharina Schönhoff, möchte ich für die hilfreiche Tipps zum Schreiben einer Doktorarbeit und für das Korrekturlesen von einigen Teilen der Arbeit ganz herzlich danken. Anna Munk, Maria Reiber, Dr. Verena Buchecker, Dr. Lena Boldt, Nina Miljanović, Dr. Marta Nowakowska und Dr. Isabel Seiffert möchte ich für die gute Zusammenarbeit am Institut danken und für die schönen Gespräche im Doktorandenzimmer.

Sarah Glisic, Helen Stirling, Anke Bettenbrock, Sieglinde Fischlein, und Claudia Siegl danke ich für die technische Unterstützung. Ein großer Dank gilt hier Sarah Glisic für die Unterstützung während der Operationen und Helen Stirling für das Korrekturlesen meiner Manuskripte.

Weiterhin danke ich Katharina Gabriel, Sabine Vican und Uwe Roßberg für die gute Versorgung meiner Tiere. Isabella Waclawczyk, Grazyna Langer, Susanne Legat und Andreas Kutschka danke ich für die gute Zusammenarbeit am Institut.

Vielen Dank an unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Rupert Palme für die Auswertung der Proben.

Ein großer Dank richtet sich an meine Familie. Ich möchte meinen Eltern danken, die mir eine sorgenfreie Ausbildung ermöglicht haben, mich in jeder Lebensphase gefördert haben und mir während schwierigen Phasen mit vielen Gesprächen und Spaziergängen zur Seite standen. Vielen Dank an meine Oma, die mir ebenfalls eine sorgenfreie Ausbildung ermöglicht hat und mit der ich viele schöne Momente verbringen durfte.

Katharina, Christina und meiner Mutter danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.
Meinen Freunden:innen möchte ich für die vielen schönen Momente und für die Rücksichtnahme in arbeitsintensiven Phasen während der letzten drei Jahre danken.