

Stellungnahme zur Schweregradbeurteilung von Verhaltensexperimenten mit Mäusen und Ratten

Wien, November 2019

Impressum

Medieninhaber, Verleger und Herausgeber:

Kommission für Tierversuchsangelegenheiten gemäß §36 Tierversuchsgesetz 2012, BGBl. I

Nr. 114/2012 idgF

T: +43 1 25077-4920

geschaeftsstelle.kta@vetmeduni.ac.at

Inhalt

Einleitung.....	5
Problemstellung	6
Methodik.....	7
Faktoren mit Einfluss auf Belastung	8
Allgemeine Einflüsse und belastende Faktoren	8
<i>Haltungsbedingungen</i>	8
<i>Parameter des Raumklimas</i>	8
<i>Motivation durch Belohnung</i>	9
<i>Habituation</i>	9
Konditionierung	10
Belastung durch Modell und/oder Test.....	11
Kumulationsfaktor durch multiple Tests	11
Auswirkungen des Tests/Modells	12
Durchführung von Verhaltensexperimenten	12
<i>Allgemeines</i>	12
<i>Standardprotokolle</i>	13
Kurzbeschreibung der Verhaltenstests (ohne Protokollvorgaben).....	14
General behaviour & locomotor activity	14
Motor coordination, strength and balance	15
Cognition	19
Emotional behaviour	23
Sensory perception & nociception.....	25
Social behaviour.....	27
Diverse stressors	29
Stress-induced models	30
Severity classification of behavioural paradigms for mice and rats	32
General behaviour & locomotor activity	32

Motor coordination, strength and balance	34
Cognition	38
Emotional behaviour	40
Sensory perception & nociception.....	41
Social behaviour	43
Diverse stressors	44
Stress-induced models	45
Referenzen.....	46

Einleitung

Das österreichische Tierversuchsgesetz 2012 (TVG 2012), BGBl. I Nr. 114/2012 idgF (1), wie auch die EU-Richtlinie 2010/63/EU (2), erfordern eine Zuordnung von Schweregraden aufgrund der Beurteilung von Schmerzen, Leiden, Ängsten oder dauerhaften Schäden, welche die Tiere im Zuge eines Tierversuchsprojektes erfahren. Bei der Zuordnung von Schweregraden zu Tierversuchen ist jede Intervention oder Manipulation der Tiere im Rahmen der Tierversuche zu berücksichtigen und zwar von der Geburt¹ bis zum Abschluss des Tierversuchs². Vor Projektbeginn muss die zu erwartende Belastung, basierend auf den schwerwiegendsten Auswirkungen am einzelnen Tier, herangezogen werden und eine prozentuelle Verteilung der Schweregrade für alle Versuchstiere im Projekt (Kriterienkatalog) abgeschätzt werden. In der jährlichen Meldung zur Tierversuchsstatistik wird dann jedem verwendeten Tier der tatsächlich aufgetretene Schweregrad zugeordnet.

Im biomedizinischen Bereich wird vorwiegend der Parameter „Schmerz“ als essentielles Kriterium betrachtet. Daneben sind vor allem in Verhaltensuntersuchungen, wie für alle anderen Tierversuche, auch Ängste, Stress- und Leidenssituationen als Faktoren zur Schweregradbeurteilung hinzuzuziehen. Ängste, Stress oder Leiden der Tiere werden oft unterschätzt oder unterbewertet. Bei Verhaltensexperimenten ist diese Einschätzung aufgrund ihrer Vielfalt und Komplexität (3-5) besonders schwierig und daher erscheint eine Angleichung, zumindest für die am häufigsten verwendeten Tiere (Mäuse und Ratten), besonders erforderlich.

¹ ggfs. ab selbständiger Nahrungsaufnahme (Larven), oder Föten ab dem letzten Drittel ihrer normalen Entwicklung (Säugetiere) z.B. Induktion von Rekombinase-Expression durch Tamoxifen

² ggfs. auch dem Lebensende des Tieres

Problemstellung

Während es etablierte, objektiv evaluierbare Indikatoren für das Erfahren von Schmerzen bei Tieren im Tierversuch gibt, sind wenige durch Messungen unterlegte Daten für die Beurteilung von Ängsten und Leiden im Rahmen von Verhaltenstestungen verfügbar. Diese Tatsache hat zu der gegenwärtigen Situation geführt, dass die Einschätzung der Belastungen im Rahmen von Verhaltensuntersuchungen derzeit individuell und subjektiv erfolgt, aufgrund von Literatur und persönlichen Erfahrungen, was zu divergierenden und uneinheitlichen Ergebnissen führen kann.

Um eine schnelle, einheitliche und objektive Einstufung von Verhaltensexperimenten (an Mäusen und Ratten) in Tierversuchsprojekten zu erreichen, hat die Kommission für Tierversuchsangelegenheiten gemäß § 36 TVG 2012 (i.d.F. „Kommission“ genannt) unterstützt von einer Arbeitsgruppe nationaler Experten einen Leitfaden als Hilfestellung erarbeitet. Aufgrund oftmals fehlender objektiv messbarer Indikatoren basiert die Zuordnung von Schweregraden gemäß § 3 TVG 2012 der einzelnen Verhaltenstests/Modelle auf langjähriger praktischer Erfahrung und einer ausreichend breiten Kenntnis der relevanten Literatur und kann daher nur als Grundlage dienen. Dieses Dokument soll sowohl den Projektleiterinnen und Projektleitern als auch der Kommission eine Hilfestellung bei der Zuordnung von Schweregraden bieten und somit eine einheitlichere Schweregradbeurteilung bei Verhaltensexperimenten ermöglichen.

Methodik

Die Arbeitsgruppe erfasste zunächst die in Österreich angewandten Verhaltenstest und Test-basierten Modelle (siehe Tabelle „Severity classification of behavioural paradigms for mice and rats“). Die im Anhang VIII, Abschnitt III der EU-Richtlinie 2010/63/EU genannten Beispiele von Tierversuchen dienten bei der Schweregradzuordnung als Orientierungshilfe. Die weitere Zuordnung der Schweregrade durch die Expertinnen und Experten erfolgte durch ihre Einschätzung aufgrund langjähriger Erfahrungen und Durchsicht relevanter Literatur, sofern vorhanden. Im Speziellen wurden Studien herangezogen, die den Einfluss zuvor definierter Test-relevanter Faktoren (siehe Tabelle „Severity classification of behavioural paradigms for mice and rats“) auf objektive physiologische Parameter (wie z.B. auf Plasmacorticosteronspiegel) und längerfristige Beeinträchtigung des Wohlergehens und/oder Allgemeinzustands des Tiers untersuchten. Letzteres stellt ein wesentliches Kriterium für die Abtrennung zwischen den Schweregraden „mittel“ und „schwer“ dar. Für die weitere Diskussion wurden auch veröffentlichte Empfehlungen anderer Nationen einschließlich der „Advisory Notes on Recording and Reporting the Actual Severity of Regulated Procedures“ (UK government, 2014), die „Einteilung von Tierversuchen nach Schweregraden vor Versuchsbeginn (Belastungskategorien)“ durch das eidgenössische Bundesamt für Veterinärwesen sowie die „Categories of Invasiveness in Animal Experiments“ des Canadian Council on Animal Care (1991) herangezogen. Selbst wenn in den genannten Stellungnahmen vergleichbare Schweregradkategorien verwendet und Beispiele genannt wurden, sind detaillierte Auflistungen der Verhaltenstests und ihre Faktor-relevante Zuordnung zu verschiedenen Kategorien, wie sie diese Empfehlung beinhaltet, nicht vorhanden.

Faktoren mit Einfluss auf Belastung

Allgemeine Einflüsse und belastende Faktoren

Unter den kontrollierten Laborbedingungen, die grundsätzlich wenig/keine situationsabhängigen Verhaltensadaptationen des Tieres erfordern, ist die Untersuchung eines bestimmten Verhaltens nur durch die gezielte Exposition von Tieren gegenüber definierten Reizen möglich. Diese Reize, welche den natürlichen nachempfunden werden, jedoch von diesen aufgrund des spezifischen Versuchsaufbaus abweichen, können das Wohlbefinden der Tiere beeinflussen. Unter diesen Umständen sind verschiedene modulatorische Faktoren bei der Beurteilung der Schweregrade von Verhaltenstests abzuwägen.

Haltungsbedingungen

Die allgemeinen Anforderungen an Einrichtungen sowie Pflege und Unterbringung von Tieren sind für Mäuse und Ratten hinsichtlich Unterbringung, Fütterung, Tränken, Ruhe und Schlafbereiche in der Tierversuchs-Verordnung 2012 (TVV 2012), BGBl. II Nr. 522/2012 (6), geregelt. Üblicherweise werden den Tieren Unterschlupfmöglichkeiten und Nagehölzer zur Verfügung gestellt. Neben diesen Standardhaltungsbedingungen ist es möglich, den Tieren eine davon abweichende Umgebung zu bieten. Durch Bereitstellung von größeren Käfigen, Spielzeug, ... können die Haltungskäfige für die Tiere abwechslungsreicher gestaltet werden, was unter dem Synonym „environmental enrichment“ bekannt ist. Diese angereicherten Haltungsbedingungen wirken sich primär positiv auf das Verhalten von Nagern aus (z.B. Reduktion des angst- und depressionsartigen Verhaltens) (7, 8). Im Gegensatz dazu kann durch Einzelhaltung und andere Einschränkungen der Standardhaltung (bekannt unter „environmental deprivation“) ein negativer Einfluss auf das Wohlbefinden und das Verhalten von Nagern erzielt werden. Die Auswirkungen der abweichenden Standardhaltungsbedingungen sind bei der Zuordnung von Schweregraden zu berücksichtigen.

Parameter des Raumklimas

Üblicherweise werden Verhaltenstests in einem Raumklima durchgeführt, das entspricht den Haltungsbedingungen hinsichtlich Licht (≤ 200 lux; 12h:12h Tag/Nachtzyklus), Temperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), Luftfeuchtigkeit (45-65 %) und Lärm (Hintergrundlärm von ca. 65 dB) (6). Unter diesen Bedingungen geht man davon aus, dass die primäre Homöostase der Tiere nicht beeinträchtigt ist. Somit stellen diese Bedingungen keinen Einfluss auf die Bewertung des Schweregrads dar. Weichen diese Faktoren im Testparadigma von den genannten Standardbedingungen ab, so

besteht die Möglichkeit, dass das Wohlbefinden der Tiere beeinträchtigt ist und sind daher bei der Schweregradzuordnung entsprechend den Tabellen zu berücksichtigen.

Motivation durch Belohnung

Verhalten hängt sehr oft von Motivation ab. Daher ist eine entsprechende Motivation des Versuchstieres Grundvoraussetzung, um die gestellte Aufgabe im Testparadigma zu bewältigen, und kann durch die Darbietung einer Belohnung gesteigert werden. Als Belohnung eignet sich grundsätzlich jedes für das Wohlbefinden des Tieres wesentliche Bedürfnis, sofern dieser positiv zu wertende Anreiz (z.B. Futter von hohem hedonischen Wert) für das Tier ausreichend ist und die gewählte Belohnung mit dem eigentlichen Versuchsziel (Aussage des Tests) nicht interferiert. Unter Umständen ist dies nicht ausreichend, und es kann die Deprivation eines Bedürfnisses in der Vorbereitungsphase erforderlich sein, damit das Tier im Test die Erfüllung dieses Bedürfnisses als ausreichend belohnend empfinden kann.

Als sehr gut geeignet dient die Deprivation von grundlegenden Bedürfnissen wie Futter (9), Wasser, Schlaf oder Sozialpartnern (10). Für die Schweregradbeurteilung (iSd TVG 2012 und der EU-Richtlinie 2010/63/EU) ist entscheidend, in welcher Weise dem Tier dadurch physisches oder psychisches Leid/Schmerz zugefügt wird. Hierfür sind die Art, der Grad und die Dauer der Deprivation, sowie die Spezies, das Alter und das Geschlecht (11, 12) relevant. Es sind daher die Belastungen durch den Verhaltenstest und durch die Deprivation sowie eine Kumulation der beiden Faktoren zu berücksichtigen. Eine kumulative Bewertung ist dann bei Verhaltensuntersuchungen heranzuziehen, wenn die Deprivation zu einer negativen Beeinflussung des für den Test kritischen Faktors kommt (z.B. Herabsetzung der Schmerzschwelle). Auch kann Deprivation zu Verhaltensänderungen führen, die den eigentlichen Test beeinflussen. In diesem Fall ist die Deprivation selbst als Modell mit Belastung entsprechend der beiliegenden Tabellen zu werten.

Habituation

Versuchstiere (Nager) können durch die Konfrontation mit für sie unbekanntem Objekten/ Personen/ Situationen in eine Stress-Situation gelangen, die ihr Wohlbefinden wesentlich verändern kann. Es ist daher notwendig und sinnvoll, die Tiere vor Versuchsbeginn an die Person, die die Versuche durchführt (13), und an die neue Umgebung (Aufbau und Raum des Verhaltenstests) zu gewöhnen, um unspezifische Stressreaktionen zu minimieren und so die Belastung der Tiere zu reduzieren (14). Ebenso kann durch diese Maßnahme eine störende Interaktion mit dem eigentlichen Testziel verhindert/reduziert werden.

Konditionierung

In der Verhaltensforschung versteht man unter Konditionierung eine Form des Lernens, bei der eine Assoziation zwischen einem Reiz und einem zweiten Reiz, der ein spezifisches Verhalten auslöst, hergestellt wird. Im Konzept der klassischen Konditionierung hat das Tier keinen Einfluss auf den auslösenden Reiz und die Reaktion. Im Gegensatz dazu findet vor allem in der Suchtforschung oft die instrumentelle bzw. operante Konditionierung Anwendung, wo das Tier z.B. durch Drücken eines Hebels die Verabreichung einer belohnenden Substanz auslösen kann. Wichtig für die Konditionierung ist, dass der Auslösereiz vor der Konditionierung „neutral“ empfunden wird, also selbst nicht aversiv oder attraktiv ist (=konditionierter Stimulus, CS) und daher keinen negativen Einfluss auf das Tier hat. Wie oft dieser neutrale Reiz mit einem zweiten Reiz (=unkonditionierter Stimulus, US) für eine erfolgreiche Konditionierung gepaart werden muss, hängt vor allem von der Stärke des US ab, weniger davon ob dieser als positiv oder negativ empfunden wird. Der US kann aversiv (elektrische Reizung, Übelkeit, negative Wirkung psychotroper Substanzen etc.) oder positiv (Futter, positive Wirkung psychotroper Substanzen, etc.) sein. Bei aversiven Reizen hängt die Zuordnung zu einem Schweregrad davon ab, ob dem Tier dabei Schmerzen zugefügt werden und wie lange und heftig der/das ausgelöste Schmerz / Stress / Schreck / Unwohlsein andauert [z.B. positive Korrelation der Stromstärke des Elektroschocks mit Plasmacorticosteronspiegel (15-17)]. Ob in diesen Konditionierungsparadigmen eine räumliche Fluchtmöglichkeit³ besteht oder nicht, scheint jedoch keinen Einfluss auf die physiologische Stressantwort zu haben (16) und wurde daher zur Beurteilung der Schweregrade nicht herangezogen [siehe auch (18)]. Da es keine Hinweise darauf gibt, dass diese Konditionierungs-basierten Paradigmen das Wohlbefinden der Tiere im Haltungskäfig beeinflusst, sind sie klar vom Modell der erlernten Hilflosigkeit (19-21) kategorisch zu unterscheiden (22, 23). Bei positiv gelagerten US (z.B. Gabe von Suchtmitteln) ist zu berücksichtigen, dass nach mehrfacher Gabe Entzugserscheinungen auftreten können, welche bei der Schweregradbeurteilung abzuwägen sind. Da der US oftmals eine zu untersuchende Substanz ist oder der Versuchsaufbau einen aversiven Reiz voraussetzt, besteht hier wenig Spielraum für den alternativen Einsatz positiver Reize.

Die gelernte Assoziation kann durch Extinktion wieder verschwinden. Das ist jedoch kein Vergessen, sondern ein neuer, inhibitorischer Lernprozess. Lernt also ein Tier, dass ein bestimmter Ton ein bestimmtes Ereignis ankündigt, so kann durch wiederholtes Setzen des Reizes ohne Einsetzen des erwarteten Ereignisses dazu führen, dass die Assoziation nicht mehr sichtbar ist.

³ Anmerkung: sog. Fluchtsprünge („escape jumps“) vom aversiven Stimulus sind jederzeit möglich

Belastung durch Modell und/oder Test

Verhaltensuntersuchungen werden vor allem dazu herangezogen, um die Auswirkungen eines endogenen (genetisch) oder exogenen (Umwelt, pharmakologische/ chemische Substanzen, chirurgische Interventionen, Nahrungsmittel etc...) modulatorischen Faktors auf eine oder mehrere Verhaltensmuster im Vergleich zum Wildtyp bzw. zu unbehandelten Tieren zu beurteilen. Diese Manipulationen können den individuellen Schweregrad, welchem das Tier im Rahmen eines Verhaltenstests ausgesetzt ist, verändern. Tier-Modelle für (menschliche) Erkrankungen dienen per definitionem der Replikation (eines Teiles) des pathologischen Phänotyps in einem Labortier zur Untersuchung unter kontrollierten Bedingungen (24). Damit könnten die zur Beurteilung der entsprechenden Symptome angewandten Tests für jene Modellgruppen eine größere Belastung als für die Kontrollgruppen darstellen. Spiegelbildlich dazu können therapeutische oder präventive Interventionen den Grad der Belastung der Behandlungsgruppen reduzieren.

Von diesen bis zu einem gewissen Grad vorhersagbaren Auswirkungen auf den Schweregrad und die Belastung der Versuchstiere sind die spontanen Auswirkungen durch noch nicht beschriebene, unerforschte Eingriffe zu unterscheiden. Gerade ein zentraler Bestandteil der wissenschaftlichen Forschung ist die Beschreibung bisher noch nicht bekannter Phänomene und daher schwer voraussehbarer Auswirkungen des Tests/Modells auf das Verhalten. Hierzu zählen einerseits die durch genetische Manipulationen hervorgerufenen pathologischen Phänotypen, welche, so bekannt, separat zu beschreiben sind. Es ist anzumerken, dass auch äußerlich „nicht belastete“ Genotypen durch noch unbekannte Effekte der genetischen Manipulation eine schwerere Belastung in der Verhaltenstestung erfahren können [z.B. erhöhte Stressempfindlichkeit etc. (25)]. Diese werden meistens im Verlauf der Untersuchungen offensichtlich. Ähnliches gilt auch für die Applikation zu erforschender Substanzen bzw. für Umweltfaktoren, deren Auswirkungen auf den Grad der Belastung des Versuchstieres durch die Verhaltensuntersuchung nicht aus vorläufigen Daten/ anderen Versuchen vorhersagbar ist. In diesen Fällen ist eine Neubewertung des Schweregrads der genehmigten Versuche vorzunehmen.

Kumulationsfaktor durch multiple Tests

Die mehrfache Verwendung eines Tieres in demselben und/oder verschiedenen Verhaltensparadigmen kann entsprechend den 3R's („reduction“) als wünschenswert angesehen werden. Bei einer Abfolge mehrerer Verhaltenstests mit geringer bis mittlerer Belastung an einem Tier mit entsprechenden Erholungsphasen (mindestens 24h) führt dies nicht zwingend zu einer höheren Belastung (26, 27). Vielmehr richtet sich der Schweregrad einer Testserie nach dem Test mit der höchsten Belastung. Grundsätzlich gilt jedoch, dass die

Abfolge der Tests mit steigender Belastung (Aversivität) erfolgen sollte, um den Einfluss des vorhergehenden Tests auf den nachfolgenden so gering wie möglich zu halten (27). Diese Vorgehensweise ist international anerkannt. Das Prinzip der „Mehrfachtestung“ wird auch in verschiedenen etablierten Testbatterien (z.B. SHIRPA test batteries) verwirklicht. Sollte sich jedoch im Zuge der Untersuchungen herausstellen, dass die vorherige Testung unerwartet zu einer offensichtlichen Verhaltensänderung der Versuchstiere führt (28), so ist dies zu berücksichtigen, und es wird entsprechend den 3R's („refinement“) empfohlen, die Testserie abzubrechen. Die wiederholte Durchführung desselben Tests am gleichen Tier ist ebenso zu werten, wobei hier sichergestellt sein muss, dass die Aussagekraft des Tests erhalten bleibt (28). Das mehrmalige Testen eines Tieres ist vom Projektleiter zu begründen. Werden hingegen eine Reihe von (milden) Stressoren bei einem Tier angewendet, um eine Pathologie zu induzieren, die langfristige Auswirkungen auf das Wohlbefinden des Tiers hat (siehe TVG 2012)– erkennbar z.B. an der Abnahme von Körpergewicht und Veränderungen des Putzverhaltens -, so ist dies auf jeden Fall als erschwerend zu werten (8, 20, 21).

Auswirkungen des Tests/Modells

Üblicherweise werden die Tiere nach Beendigung des Verhaltenstests wieder zurück in ihre Haltungskäfige gesetzt. Es gibt keine Hinweise darauf, dass durch die bei den meisten Verhaltenstests erforderliche, kurzzeitige Entfernung aus der Haltungsgruppe zum vermehrten Auftreten von Kämpfen vor allem unter Männchen bzw. zu einer Änderung der sozialen Hierarchie in den Haltungskäfigen führt. Bei der längerfristigen Durchbrechung von sozialen Strukturen in den Haltungskäfigen sind die Zeitdauer der Entfernung von Einzeltieren und das Geschlecht zu berücksichtigen (29).

Durchführung von Verhaltensexperimenten

Allgemeines

Um den Einfluss der Person, die den Versuch durchführt, auf das Versuchstier so gering wie möglich zu halten, wird üblicherweise das Verhalten aufgezeichnet und im Nachhinein ausgewertet. Dazu werden über den Testboxen platzierte Kameras, Infrarot- und Drucksensoren meist computergestützt eingesetzt. Spezielle, kommerziell erhältliche Phänotypisierungsgeräte wie Intellicage®, Phenomaster® und Ähnliches sind optimiert, um keine bzw. nur eine geringe Belastung der Tiere während der Verhaltenstestung hervorzurufen, und können zahlreiche Verhaltensparameter zeitgleich registrieren. Zu berücksichtigen hierbei ist, ob die Tiere in Gruppen oder alleine in den Testkäfigen gehalten werden, was vor allem bei Ratten, die ein höheres soziales Verhalten als Mäuse aufweisen, einen kritischen Faktor bei der

Schweregradbeurteilung darstellt (siehe „Relevant parameters“ in der Tabelle „Severity classification of behavioural paradigms for mice and rats“) und wie lange sich die Tiere in der Testsituation aufhalten.

Standardprotokolle

Es hat sich herausgestellt, dass Arbeitsgruppen oftmals ähnliche, (leicht) voneinander abweichende, spezifische Protokolle für einzelne Verhaltenstests verwenden, die sich hinsichtlich Testkonditionen (z.B. Licht, Testdauer,...) unterscheiden. Standardprotokolle, sofern vorhanden, werden empfohlen, jedoch nicht vorgeschrieben bzw. bewertet (einzeln und in Kombination). Dazu verweisen wir auf die öffentlich zugänglichen Seiten <https://www.mousephenotype.org/impress/procedures/7> und <http://www.mousephenotype.org/phenoview/>.

Kurzbeschreibung der Verhaltenstests

(ohne Protokollvorgaben)

Anmerkung: Details zu den Testapparaturen wie Größe, Dimensionen, Material,... sowie Testbedingungen (z.B. Temperatur, Dauer,...) sind hier nicht vorgesehen. Sollten diese Einfluss auf die Belastung haben, werden sie in der Belastungstabelle erfasst. Ansonsten sind diese Angaben gegebenenfalls aus den Projektanträgen zu entnehmen.

General behaviour & locomotor activity

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Circadian wheel running:</p> <p>Zur Beurteilung der zirkadianen Lokomotoraktivität werden Nagetiere in Haltungskäfigen, welche mit einem Laufrad ausgestattet sind, über mehrere Tage/ Wochen einzeln gehalten. Tiere können unter verschiedenen Protokollen von Licht/ Dunkelverhältnissen untersucht werden, um auch Einblick in den inneren zirkadianen Rhythmus bzw. seine Modulation durch äußere Zeitgeber zu beurteilen.</p>	1
<p>Homecage activity:</p> <p>Diese Methode dient der Beobachtung des Verhaltens von Nagern in der gewohnten Umgebung ihres Haltungskäfigs über längere Zeiträume, ohne zusätzliche Manipulationen. Beim Home Cage Activity Monitoring wird das Verhalten während mehrerer Ruhe- und Aktivitätsperioden bei normalem Tag-Nacht-Zyklus registriert.</p>	2

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Nesting (Nest Building):</p> <p>Der Nestbau ist ein starkes intrinsisches Bedürfnis von Nagern, besonders von Ratten und Mäusen (verbesserte Thermoregulation, Aufzucht von Jungtieren, Schutz vor Raubtieren). In diesem Test wird den Tieren in ihrem Haltungskäfig spezielles Nestbaumaterial zur Verfügung gestellt und ihnen erlaubt über 24h mit dem Material zu interagieren. Danach wird die Qualität des gebauten Nestes bewertet. Eine niedrige Nestqualität wird in der Literatur als Indikator für Stress angesehen.</p>	3
<p>Open field test:</p> <p>Der Open Field Test dient der Darstellung und quantitativen Auswertung des Erkundungsverhaltens und der Lokomotion von Versuchstieren, insbesondere von Mäusen und Ratten, in einer offenen Beobachtungsbox. Der Aufenthalt des Tieres im Zentrum der Freifläche ohne Deckungsmöglichkeit, im Vergleich zu den Randbereichen wird als ein Indikator für Angstverhalten verwendet, da sich Nager als Fluchttiere bei vermehrter Ängstlichkeit bevorzugt in den dunkleren, schutzvermittelnden Randarealen aufhalten.</p>	4

Motor coordination, strength and balance

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Beam walking test/balance beam test:</p> <p>Es werden die Zeit und die Fehlritte beim Überqueren eines Holzbalkens gemessen. Am Tag vor der Untersuchung werden die Versuchstiere trainiert.</p>	5

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Catwalk inkl. DigiGait test:</p> <p>Bei diesem Test wird computergestützt das Gangbild von Nagern durch Aufzeichnung der Pfotenabdrücke auf dem Laufsteg analysiert. Auf der gegenüberliegenden Seite deponiertes Futter dient als Motivation, den Laufsteg freiwillig zu durchlaufen.</p>	6
<p>Cylinder test:</p> <p>Die Tiere werden für max. 5 min. in einen Glaszylinder gesetzt. Der Kontakt der linken und der rechten Vorderpfote mit der Zylinderwand wird mittels Kamera aufgenommen und ausgewertet.</p>	7
<p>Foot fault test:</p> <p>Dieser Test dient der Beurteilung der lokomotorischen Funktion von Nagern. Die Tiere werden trainiert, eine erhöhte, horizontal ausgerichtete Sprossenleiter zu überqueren.</p>	8
<p>Grip strength:</p> <p>Die Maus/Ratte hält sich mit den Vorderpfoten (oder in einem anderen Ansatz mit allen vier Pfoten) an einem dargebotenen kleinen Gitter fest. Das Tier wird am Schwanz gehalten und langsam und vorsichtig nach hinten gezogen bis der Zug groß genug ist, und das Tier das Gitter auslässt. Die vom „Grip meter“ gemessene Zugkraft ist das verwendete Maß für die Muskelstärke. Der Versuch wird nach einer Erholungspause wiederholt und der höchste Wert protokolliert.</p>	9
<p>Pole test:</p> <p>Es wird die Zeit zum Herunterklettern auf einem vertikalen Holzbalken gemessen. Die Maus/Ratte wird am Tag vor der Untersuchung trainiert</p>	10

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Rotarod:</p> <p>Bei diesem Test werden Nager auf eine zunehmend schneller rotierende Rolle gesetzt und die Zeit gemessen, die sie sich auf der Rolle bis zum Herunterfallen halten können. Es werden mehrere Durchläufe an einem Tag durchgeführt.</p>	11
<p>Rotameter:</p> <p>Die Tiere werden durch einen Gürtel/einer Jacke oder einen Magnet mit dem Gerätesensor verbunden und in einen Testkäfig/Zylinder gestellt. Substanz-induzierte Rotationen werden für max. zu 2 Stunden aufgenommen.</p>	12
<p>Staircase test:</p> <p>Dieser Test misst die Verwendung der vorderen Pfoten der Tiere und wird generell zur Untersuchung der motorischen Feinkoordination verwendet. Die Tiere werden nach Futterentzug in eine enge Kammer gegeben und in Richtung eines Treppenaufbaus gerichtet. Auf jeder Treppenstufe befindet sich an der rechten und linken Seite jeweils ein Behälter mit Zuckerkügelchen. Die Anzahl der fehlerfrei genommenen Kügelchen wird in Kombination mit dem Schwierigkeitsgrad (unterste Treppenstufe: einfach; höchste Treppenstufe: sehr schwierig) zur Messung von Motorkoordination herangezogen.</p>	13
<p>Treadmill:</p> <p>Hier bewegt sich das Versuchstier auf einem horizontal oder mit einer Steigung aufgestellten Laufband mit eingestellter Maximalgeschwindigkeit. Die maximale Laufzeit beträgt 30 min.</p>	14

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Voluntary wheel running:</p> <p>Das Versuchstier wird in einem Haltungskäfig, welcher mit einem Laufrad ausgestattet ist, über einen längeren Zeitraum (Tage/ Wochen) gehalten. Mittels Verbindung des Laufrades an ein Computersystem kann die lokomotorische Aktivität des Tieres ausgewertet werden.</p>	15
<p>Wirehang test:</p> <p>Das Versuchstier wird vorsichtig auf ein Käfiggitter gesetzt, das Gitter umgedreht und verkehrt in 55 cm Höhe über einer gepolsterten Unterlage aufgehängt. Die Zeit, welche verstreicht bis sich das Tier auf die gepolsterte Unterlage fallen lässt, ist abhängig von der Muskelkraft. Dieser Versuch wird mehrmals (mit dazwischen > 30 min Ruhepausen) wiederholt und das längste Durchhalten gewertet. Die Experimentalzeit ist mit 10 min limitiert.</p>	16
<p>Horizontal ladderwalk:</p> <p>Die Tiere gehen wiederholt über eine horizontale Leiter mit variablen Abständen zwischen den einzelnen Sprossen.</p>	17

Cognition

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Active avoidance:</p> <p>In diesen Tests können die Versuchstiere einem milden elektrischen Reizstimulus ausweichen, indem sie lernen, auf ein Signal in ein anderes Kompartiment der Testkammer zu wechseln. So wird dem Tier die Möglichkeit gegeben, sich durch aktives Verhalten dem elektrischen Reiz selbstständig zu entziehen.</p>	18
<p>Passive avoidance:</p> <p>Die Tiere lernen in einem weniger bevorzugten Teil des Aufbaus (z.B. hellerer Bereich) zu bleiben, um die Exposition zu einem unangenehmen elektrischen Reiz in dem bevorzugten (dunkleren) Bereich zu vermeiden.</p>	19
<p>Barnes maze:</p> <p>Der Motivator in diesem Test für räumliches Lernen und Gedächtnisbildung ist die natürliche Aversion von Nagern gegenüber offenen Flächen. Der Testaufbau besteht aus einer runden Platte mit Löchern am Rand. Das Versuchstier erinnert sich im Zuge mehrerer Trainingssessions mithilfe von seitlich angebrachten Orientierungsmarken an die Zielzone, durch die sie der hellen Fläche in einen abgedunkelten Unterschlupf entkommen kann. Werden die Tiere durch Futter motiviert, so kann in der Testvorbereitung ein Futterentzug notwendig sein.</p>	20
<p>Cheese board test:</p> <p>Die Versuchstiere lernen, in welchem Bereich des Testaufbaus sie eine Belohnung (Futter) finden.</p>	21

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Conditioned fear / fear conditioning (einschl. fear extinction)</p> <p>Die Versuchstiere lernen, einen neutralen Stimulus durch die zeitliche Nähe/ Überlappung mit einem unangenehmen Reiz (meist ein kurzer elektrischer Reiz) zu assoziieren. Nach einer Lernphase zeigen die Tiere bei Anwesenheit des neutralen Stimulus Angstverhalten (Flucht (Vermeidung) oder Bewegungslosigkeit).</p>	22
<p>Safety conditioning/ Learned Safety:</p> <p>Dieser Test ist in seinem Aufbau dem der Furchtkonditionierung (conditioned fear/fear conditioning) gleich gesetzt, von welchem er sich nur durch die zeitliche Paarung des neutralen mit dem aversiven Stimulus unterscheidet. Im Gegensatz zum Fear Conditioning wird beim Safety Conditioning der neutrale Stimulus nie gleichzeitig mit dem aversiven Stimulus präsentiert. Das Tier lernt den neutralen Stimulus mit der Abwesenheit des aversiven Reizes zu verbinden und ihn daher als ein Sicherheitssignal zu interpretieren.</p>	23
<p>Conditioned place preference / aversion:</p> <p>Die Versuchstiere lernen einen neutralen, kontextuellen Stimulus durch die zeitliche Nähe/ Überlappung mit einem positiven oder negativen Reiz (z.B. dyadische soziale Interaktion oder Kokain) zu assoziieren. Verbringt das Versuchstier danach mehr Zeit in der mit dem Stimulus verknüpften Kammer, dann hat sich konditionierte Platzpräferenz entwickelt. Wenn das Versuchstier weniger Zeit in der mit dem Stimulus verknüpften Kammer verbringt, dann hat sich konditionierte Platzaversion entwickelt.</p>	24
<p>Conditioned taste aversion:</p> <p>Dabei handelt es sich um einen etablierten Lern- und Gedächtnistest basierend auf der klassischen Konditionierung. Durch Assoziation eines neuen genüsslichen Geschmacks (z.B. Saccharin) mit Übelkeit hervorgerufen durch die gleichzeitige Applikation einer emetisch wirkenden Substanz meidet das Tier den neuen Geschmack.</p>	25

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Delayed non matching to samples:</p> <p>Mit diesem Test kann das Arbeitsgedächtnis von Nagern untersucht werden. Dem Tier wird ein Objekt präsentiert, das 3s später gemeinsam mit einem neuen Objekt präsentiert wird. Es erhält eine (essbare) Belohnung, wenn es das neue Objekt wählt.</p>	26
<p>Morris water maze:</p> <p>Das Versuchstier schwimmt in einem Tank gefüllt mit Wasser und soll, mithilfe von im Raum angebrachten Orientierungsmarken, eine knapp unter der Wasseroberfläche installierte Plattform finden. Der Test am Ende des Experiments wird ohne Plattform durchgeführt. Hierbei wird die Zeit, die das Tier in der Zielzone verbringt, in der zuvor die Plattform lokalisiert war, gemessen und dient als Maß für räumliches Lernen und Gedächtnis.</p>	27
<p>Object recognition test:</p> <p>Das Versuchstier hat die Möglichkeit, in einer ihr bekannten Testbox verschiedene Objekte zu erkunden. Dann wird ein Objekt ausgetauscht oder umgestellt. Gemessen wird nun die Zeit, die das Tier mit dem neuen Objekt im Verhältnis mit dem bekannten Objekt/Position verbringt.</p>	28
<p>Odour discrimination:</p> <p>Mit diesem Test wird der (feine) Geruchssinn von Nagern hinsichtlich Duftidentifikation und – diskrimination beurteilt. Dazu werden dem Tier verschiedene reguläre und soziale Gerüche auf einem Watteball im Haltungskäfig in mehreren Durchgängen präsentiert.</p>	29

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p data-bbox="204 367 671 400">Operant conditioning / Skinner box</p> <p data-bbox="204 461 1214 539">Hier erlernt das Tier standardisiert und weitgehend automatisiert ein neuartiges Verhalten vor allem durch Belohnung und seltener durch Bestrafung.</p>	30
<p data-bbox="204 624 376 658">Radial maze:</p> <p data-bbox="204 719 1270 891">Die Apparatur besteht aus mehreren, von einer zentralen Plattform ausgehenden und mit Wänden umschlossenen Armen und ist vom Boden erhöht. Die Tiere lernen, in welchem Arm sie eine Belohnung (meist Futter) finden. Werden die Tiere durch Futter motiviert, so kann in der Testvorbereitung ein Futterentzug notwendig sein.</p>	31
<p data-bbox="204 976 360 1010">T-/Y-maze:</p> <p data-bbox="204 1070 1270 1243">In dieser Versuchsanordnung lernen die Tiere, ob sie am rechten oder linken Arm eines T-/Y-förmigen Ganges eine Belohnung (meist Futter) finden. Werden die Tiere durch Futter motiviert, so kann in der Testvorbereitung ein Futterentzug notwendig sein.</p>	32 33

Emotional behaviour

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Elevated plus maze:</p> <p>Der Test beruht auf der Tatsache, dass Nagetiere helle, erhöhte Stellen ohne Deckung scheuen und sich bevorzugt in geschützten, gedeckten (dunkleren) Bereiche aufhalten. Der Testaufbau besteht aus vier Armen, die in Form eines Plus angeordnet sind, wovon zwei Arme von Wänden umgeben sind, und befindet sich vom Boden erhöht. Die Bereitschaft der Tiere, die offenen Arme freiwillig zu besuchen, wird beobachtet und quantifiziert (indirektes Maß für Ängstlichkeit).</p>	34
<p>Light-Dark Test:</p> <p>Dieser Test beruht wie der Elevated Plus Maze Test auf der Tatsache, dass Nagetiere helle Flächen ohne Deckung scheuen und sich in bevorzugt in gedeckte, dunklere Bereiche zurückziehen. In diesem Test wird den Tieren eine dunkle Box als Versteck angeboten, aus der heraus die hell beleuchtete Fläche freiwillig erkundet werden kann.</p>	35
<p>Marble burying:</p> <p>Testhypothese ist, dass Nager unbekannte Objekte als mögliche Bedrohung empfinden können und sie diese daher lieber vergraben. Den Tieren werden in einem Käfig mit tiefer Einstreu Glasmurmeln ausgelegt. Wieviele dieser Murmeln vergraben werden, wird gewertet.</p>	36

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Novelty suppressed feeding:</p> <p>Der Test beruht darauf, dass neue Umgebungen von Nagern zuerst auf mögliche Gefahren untersucht werden, bevor sie zu fressen beginnen, auch wenn sie hungrig sind. Je schneller das Tier ans Futter geht, desto geringer ist das Angstverhalten. Belastet werden die Tiere in diesem Test vorrangig durch den Futterentzug, der notwendig ist, um das Tier zu motivieren, ein Futterstück im Zentrum einer unbekannt Testbox zu konsumieren.</p>	37
<p>Forced swim test / Porsolt test:</p> <p>Dieser Test ermöglicht es, Antriebslosigkeit von Nagetieren zu messen. In diesem Test werden die Tiere in einen mit Wasser befüllten Glaszylinder für einen kurzen Zeitraum verbracht und die aktiven Versuche des Tieres, sich aus dieser Situation zu befreien, im Gegensatz zu passivem Verhalten (Immobilität, „Floating“), beurteilt. Der Porsolt Test beinhaltet eine zweite, kürzere Testphase am nächsten Tag und führt dort zu erhöhtem passivem Verhalten.</p>	38
<p>Sucrose preference test:</p> <p>Dieser Test misst Anhedonie bei Nagetieren anhand der bevorzugten Konsumation einer süßen Lösung (belohnende Wirkung) im Vergleich zu Wasser (neutrale Wirkung). Dazu werden den Tieren zwei Trinkflaschen angeboten, wovon die eine mit Wasser und die andere mit einer niedrig konzentrierten Zuckerlösung befüllt ist. Der Grad der Bevorzugung des süßen Wassers dient als Messwert der Genussfähigkeit (Hedonie).</p>	39
<p>Tail suspension test:</p> <p>Dieser Test ermöglicht es, Antriebslosigkeit bei Mäusen zu messen. Hierzu wird die Maus an der Schwanzspitze mit Kopf in Abwärtshaltung fixiert. Die Versuche, sich aktiv aus dieser Situation zu befreien, gehen mit fortschreitender Testdauer in passives Verhalten (Immobilität entsprechend der Antriebslosigkeit) über.</p>	40

Sensory perception & nociception

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Acoustic pre-pulse inhibition:</p> <p>Dieser Test basiert darauf, dass die Versuchstiere auf einen lauten Ton weniger stark mit einem Schutzreflex reagieren, wenn sie vorher einen schwächeren Ton gehört haben.</p>	41
<p>Acoustic startle response:</p> <p>Laute Töne (über 80 dB) rufen bei Nagern, insbesondere bei Mäusen und Ratten, Motorreflexe aus, die als Schutzmechanismus gewertet werden. An deren Ausprägung sind viele Hirnregionen beteiligt, die auch in der Emotionskontrolle wichtig sind.</p>	42
<p>Colonic bead expulsion test:</p> <p>Dieser Test wird zur Untersuchung der Darmmotilität und –passage von Nagern verwendet. Dabei wird dem Tier eine Glaskugel rektal eingeführt und die Zeit gemessen, wie lange die Glaskugel braucht, um wieder aus dem Darm ausgeschieden zu werden.</p>	43
<p>Flinch test:</p> <p>Dieser Test dient zur Messung der Empfindlichkeit von Nagetieren gegenüber elektrischer Reizung. Dabei werden die Tiere auf einem Metallgitter mit Stromstößen ansteigender Intensität behandelt und die Reaktion bewertet, bis das Tier zuckt, vokalisiert bzw. springt. Im Bereich des Flinch-responses sind die Stromstöße weder schädlich noch schmerzhaft, jedoch unangenehm.</p>	44

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Hot plate:</p> <p>Der Hot Plate Test dient der Bestimmung der Nozizeption. Das Versuchstier wird auf eine erhitzte Platte umgeben von einem Plastikzylinder platziert. Die Latenz bis zur offensichtlichen nozizeptiven Reaktion (a) lecken einer Hinterpfote, (b) Vokalisation, (c) hüpfen oder (d) Fluchtreaktion wird gemessen.</p>	45
<p>Tail flick / Plantar (Hargreaves) test:</p> <p>Der Tail Flick Test wird zur Bestimmung der Nozizeption verwendet. Der Schwanz der Maus wird über dem Photostimulus-Detektor (90% Intensität) positioniert. Die Zeit, bis das Versuchstier seinen Schwanz infolge des Hitzestrahls zurückzieht, wird gemessen (Reaktionslatenz).</p>	46
<p>Tail immersion:</p> <p>Dieser Test wird zur Bestimmung der thermischen (Hitze) Reaktionsschwelle der Tiere herangezogen. Dazu werden die Tiere immobilisiert (Plexiglasröhre) und der Schwanz in einen Behälter mit erwärmten Wasser (50°C) gehalten. Die Zeit, die bis zum Rückziehen des Schwanzes verstreicht, wird als thermische Reaktionslatenz herangezogen. Das Tier ist in der Lage, die Stimulation aktiv durch das Zurückziehen des Schwanzes abubrechen.</p>	47
<p>Von Frey test:</p> <p>Mit der Bestimmung der 50% Wegziehschwelle mit Hilfe kalibrierter von Frey Filamente lassen sich die mechanischen Reaktionsschwellen von Nagetieren erfassen. Kalibrierte von Frey Filamente (1-50 mN/mm²) werden in einem Testkäfig mit engmaschigen Drahtgitterboden auf die plantare Seite der Hinterpfoten appliziert. Hier gibt es verschiedene Protokolle zur Berechnung der 50% Reaktionsschwelle (notwendige Kraft um in 50% der Stimulationen eine Reaktion hervorzurufen). Bei Erreichen der Reaktionsschwelle wird die Pfote weggezogen. Dem Tier ist es jederzeit möglich, die Stimulation aktiv durch das Zurückziehen der Pfote abubrechen.</p>	48

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Writhing test:</p> <p>Der Writhing Test wird zur Bestimmung der abdominalen Nozizeption herangezogen. Den Versuchstieren wird intraperitoneal hoch verdünnte Essigsäure injiziert, um die sog. Krümmungsreaktion auszulösen, welche durch Kontraktionen der abdominalen Muskulatur gefolgt von einem Strecken der hinteren Beine charakterisiert ist. Die Anzahl der Krümmungen werden in der Beobachtungsperiode gezählt.</p>	49

Social behaviour

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Pup retrieval:</p> <p>Zur Beurteilung des maternalen Fürsorgeverhaltens wird beurteilt, wie lange eine Tiermutter braucht, um im Käfig verstreute neugeborene (Tag 4-8) Jungtiere wieder ins Nest zurück zu bringen.</p>	50
<p>Pup ultrasonic vocalisation:</p> <p>Neugeborene (Tag 4-8) Nagetiere, werden kurzzeitig von ihrer Mutter getrennt und in eine schallisolierte Box, welche mit einem Mikrofon ausgestattet ist, verbracht.</p>	51
<p>Resident intruder test:</p> <p>In diesem Test wird die Aggressivität gegenüber einem Artgenossen, der in den Käfig gesetzt wird, gemessen. Diese Aggressivität drückt sich zuerst durch Drohgebärden aus, es kann aber zur Verletzung des „Gegners“ kommen, wenn nicht rechtzeitig eingeschritten wird.</p>	52

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Social defeat:</p> <p>Bei diesem Test wird das Tier in den Käfig eines dominanteren Tieres gesetzt. Die Unterlegenheit bedingt Stress. Wichtigstes Kriterium ist hier, ob die Tiere physischen Kontakt haben und wenn ja, wann gegen die Übergriffe des dominanten Tiers eingegriffen wird. Wenn bei fehlender Abgrenzung nicht rechtzeitig interveniert wird, kann es zu schweren Verletzungen (meist des unterlegenen Tieres) kommen.</p>	53
<p>Social interaction/ recognition test:</p> <p>Dieser Test beruht auf der Vorliebe von Nagern, insbesondere von Mäusen und Ratten, mit ihren Artgenossen (gleichgeschlechtlich), im Vergleich zu einem unbelebten Objekt zu interagieren (<i>Social interaction</i>). Des Weiteren bedingt das soziale Erkundungsverhalten, dass sich die Tiere mehr mit ihnen unbekanntem, als mit ihnen bereits bekannten Artgenossen, beschäftigen (<i>social recognition</i>). Da es sich um keine aggressiven Auseinandersetzungen handelt, ist die Belastung der Tiere minimal.</p>	54
<p>Three chamber social approach task:</p> <p>Wie social interaction Test, aber hier hat das Testtier die Möglichkeit, aus 3 verschiedenen Kompartimenten zu wählen. In einem ist ein Artgenosse eingeschlossen in einem Zylinder, das mittlere ist neutral (leer) und das andere enthält einen leeren Zylinder.</p>	55

Diverse stressors

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Elevated platform:</p> <p>Hier werden die Tiere für einige Zeit (meist 5-10 min) auf eine offene erhöhte Plattform gesetzt. Diese können die Tiere nicht verlassen.</p>	56
<p>Air puff:</p> <p>Hier wird das Tier durch Luftstöße beunruhigt.</p>	57
<p>Immobilisation / restraint:</p> <p>Die Einschränkung der Bewegungsfreiheit erzeugt Stress. Dabei wird das Tier meist in einer engen Röhre fixiert.</p>	58
<p>Predator odour:</p> <p>Hier wird Einstreu aus dem Käfig einer Ratte in den Käfig der Maus gegeben. Die scheinbare Nähe eines natürlichen Feindes erzeugt Stress.</p>	59
<p>Sleep deprivation:</p> <p>Schlafentzug ist für viele Tiere ein Stressfaktor. Der Schweregrad hängt hier von der Dauer, Muster und Methode des Schlafentzugs ab.</p>	60
<p>Social deprivation / social isolation:</p> <p>Einzelhaltung geselliger Tiere erzeugt Stress. Hier ist eine klare Differenzierung zwischen Ratte und Maus zu sehen. Versuche haben gezeigt, dass Einzelhaltung in Ratten angstfördernd, in Mäusen angstreduzierend ist. Daher ist hier eine klare Trennung im Schweregrad zwischen Ratte und Maus zu ziehen.</p>	61

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>White noise:</p> <p>Hier wird der Stress durch laute Hintergrundgeräusche gemischter Frequenzen erzeugt.</p>	62

Stress-induced models

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Chronic (unpredictable) mild stress:</p> <p>Hier werden die Tiere unterschiedlichen Stressoren (in einer für die Tiere nicht erkennbaren Reihenfolge) ausgesetzt. Diese Stressoren können unterschiedliche Schweregrade aufweisen, die die Einstufung beeinflussen. Ebenso ist die Dauer entscheidend. Häufig verwendete leichte bis mittlere Stressoren sind schiefgestellte Käfige, feuchte Einstreu, Licht an über Nacht, kurzer Restraint, elevated platform, predator odor etc.</p>	63
<p>Dark rearing:</p> <p>Die längere Haltung junger Mäuse ohne Licht bedingt eine schwache Differenzierung der Sehregion im Gehirn. Bei Exposition zu Licht kommt es dann zu plastischen Veränderungen in der Hirnrinde, die untersucht werden.</p>	64
<p>Light rearing:</p> <p>Hier handelt es sich um die Aufzucht von Jungtieren ohne echte Dunkelphasen. Die Grenze zwischen Tag und Nacht liegt für Nagetiere bei ca. 50 Lux Beleuchtungsstärke.</p>	65

Verhaltenstest	Nr. in Tabelle
<p>Learned helplessness:</p> <p>Das Versuchstier wird wiederholt schmerzhaften oder anderen aversiven Reizen ausgesetzt, denen es nicht entkommen oder die es nicht meiden kann. Es akzeptiert, dass es die Kontrolle verloren hat und gibt selbst in anderen, unangenehmen Situationen auf, denen es zuvor aktiv entkommen konnte.</p>	66
<p>Maternal separation/ maternal deprivation:</p> <p>Darunter versteht man die vorübergehende Trennung von Jungtieren von ihrer Mutter, welche Stress bei beiden auslöst.</p>	67

Severity classification of behavioural paradigms for mice and rats

General behaviour & locomotor activity

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
1	Circadian wheel running	M, R	Housing	No single housing	Single housing with visual, tactile OR olfactory contact	Single housing w/o visual, tactile OR olfactory contact		
2	Home cage activity	M, R	Illumination Microchip implant Housing	≤ 200 lux No implant No single housing	> 200 lux Implant Single housing with visual, tactile OR olfactory contact	> 200 lux Implant Single housing w/o visual, tactile OR olfactory contact		

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
3	Nesting (Nest Building)	M, R	Housing	No single housing	Single housing with visual, tactile OR olfactory contact	Single housing w/o visual, tactile OR olfactory contact		
4	Open field test	M, R	Illumination Duration	≤ 200 lux ≤ 30min	> 200 lux 31-60min			

Motor coordination, strength and balance

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
5	Beam walking test / Balance beam test	M, R	Light Forced air puff		X			(30)
6	Catwalk incl. DigiGait test	M, R	Handling	X				
7	Cylinder test	M, R			X			
8	Foot fault test	M	Mesh size/pattern		≤ 50mm			
		R	Mesh size/pattern Number of runs	< 3cm regular < 5 runs/d	Irregular pattern < 5 runs/d	> 5 runs/d		
9	Grip strength	M	Nr of trials		≤ 25 trials			
		R	Nr of trials		≤ 25 trials			

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
10	Pole test (vertical)	M	Height Diameter Nr of trials		≤ 60cm 6-10mm ≤ 25			
		R	Height Diameter Nr of trials					
11	Rotarod	M	Constant speed Duration/trial Nr of trials/d		≤40rpm ≤ 2min ≤ 5 trials/d			
			Accelerating speed Duration/trial Nr of trials/d		4-40rpm ≤ 5min ≤ 5 trials/d			
		R	Speed Duration/trial Nr of trials/d					

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
12	Rotameter	M R	Diameter Duration Diameter Duration		> 20cm ≤ 10min			
13	Staircase test	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner.				
14	Treadmill	M R	Speed Duration Punishment Exhaustion Speed Duration Punishment Exhaustion		≤ 70m/min ≤ 15min No No	Yes No	Yes Yes	(31, 32)
15	Voluntary wheel running	M, R		X				

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
16	Wirehang test	M R	Duration		≤ 2min			
17	Horizontal ladderwalk	M, R	Nr of trials/d Punishment	≤ 6 trials/d No	> 6 trials/d No	Yes		

Cognition

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
18	Active avoidance	M R	Shock intensity		≤ 0.5mA/s	> 0.5mA/s		(15-17, 33-35)
19	Passive avoidance	M R	Shock intensity		≤ 0.5mA/s	> 0.5mA/s		(15-17, 33-35)
20	Barnes maze	M, R	Food deprivation Illumination	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner ≤ 200lux > 200lux				
21	Cheese board test	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific				
22	Conditioned fear / fear conditioning (incl. fear extinction)	M, R	Shock intensity Nr of shocks			≤ 0.8mA ≤ 7	> 0.8mA > 7	(15-17, 33-35)
23	Safety conditioning / learned safety	M, R	Shock intensity Nr of shocks			≤ 0.8mA ≤ 7	> 0.8mA > 7	(15-17, 33-35)

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
24	Conditioned place preference / aversion	M, R	Intensity of conditioned stimulus		X	X		
25	Conditioned taste aversion	M, R			X	X		
26	Delayed non-matching to samples	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
27	Morris water maze	M, R	Duration		≤ 2min	>2min ≤ 15min	> 15min	
28	Object recognition test	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
29	Odour discrimination	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
30	Operant conditioning	M, R	Intensity of conditioned stimulus			X		
31	Radial maze	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner				
32	T-maze	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner				
33	Y-maze	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner				

Emotional behaviour

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
34	Elevated plus maze	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
35	Light-dark test	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
36	Marble burying	M, R	Illumination	≤ 200lux	> 200lux			
37	Novelty suppressed feeding	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific				
38	Forced swim test / Porsolt test ⁵	M	Duration Water temperature			1–15 min, 20–25°C	> 15 min, < 20°C	(35)
		R	Duration Water temperature		1–15 min, 20–25°C	1–15 min, 15–20°C	> 15 min, < 15°C	(36-38)
39	Sucrose preference test	M, R	Water restriction	The classification of severity is exclusively based on the severity of water deprivation in a species-specific manner				
40	Tail suspension test	M	Duration			< 10min	> 10min	

⁵ Comment: the mice and rats are not forced to swim, but allowed to swim for a given period of time without interference and without reaching exhaustion (18, 39, 40). The forced swim test measures stress-coping behaviour and not behavioural despair (41).

Sensory perception & nociception

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
41	Acoustic pre-pulse inhibition	M	Intensity Nr of trials		≤ 100dB ≤ 30 trials/d	> 100dB ≤ 30 trials/d		(42)
		R	Intensity Nr of trials		≤ 120dB ≤ 50 trials/d	> 120dB ≤ 350 trials/d		
42	Acoustic startle response	M, R	Intensity		≤ 100dB	> 100dB		
43	Colonic bead expulsion test	M, R	Food deprivation	The classification of severity is exclusively based on the severity of food deprivation in a species-specific manner				
		M	Size of bead Insertion distance	≤ 2mm ≤ 3cm past anus				(43)
		R	Size of bead Insertion distance	≤ 3mm ≤ 3cm past anus				(44)

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
44	Flinch test (shock threshold)	M, R	Shock intensity			Abort upon vocalisations and/or jumping		
45	Hot plate	M, R	Restrainer		Without restrainer	With restrainer		
46	Tail flick / Plantar (Hargreaves) test	M, R	Stimulation intensity, cut off		$\leq 150 \text{ mW/cm}^2$	$> 150 \text{ mW/cm}^2$		
47	Tail immersion	M, R	Temperature Cut-off latency		X			
48	Von Frey test	M, R	Force		X			
49	Writhing test	M	Volume Concentration		$\leq 0.25\text{mL}$ of $\leq 0.02\%$ v/v acetic acid	$\leq 0.2\text{mL}$ of $\leq 2\%$ v/v acetic acid $\leq 0.4\text{mL}$ of $\leq 1\%$ v/v acetic acid	$> 0.2\text{mL}$ of $> 2\%$ v/v acetic acid	(45, 46)
		R	Volume Concentration		$\leq 10\text{ml/kg}$ $\leq 1.0\%$ v/v acetic acid			

Social behaviour

Nr.	Behavioural test	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
50	Pup retrieval	M, R	Duration of separation		≤ 10min/session			
51	Pup ultrasonic vocalization	M, R	Duration of separation		≤ 10min			
52	Resident intruder test	M, R	Attack		no	yes		
53	Social defeat	M, R	Boundary Nr of attacks		With boundary Abortion upon attack	No boundary No Abortion upon attack ≤ 2	No boundary No Abortion upon attack ≥ 3	(47)
54	Social interaction / social recognition test	M, R	Housing	No single housing	Single housing with visual, tactile OR olfactory contact	Single housing w/o visual, tactile OR olfactory contact		
55	Three-chamber social approach task	M	Duration		≤ 30min/session			

Diverse stressors

Nr.	Stressor	Species	Relevant parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
56	Elevated platform	M, R	Duration		< 10min	> 10min		
57	Air puff	M, R	Duration Repeats		≤ 30min < 10x	> 30min > 10x		
58	Immobilisation/ restraint	M, R	Duration Repeats			≤ 30min 1-3x	> 30min > 3x	(48)
59	Predator odour	M, R				X		
60	Sleep deprivation	M, R	Pattern, method		≤ 24h	25-48h	> 48h	(49)
61	Social deprivation/social isolation	M, R	Housing	no single housing	Single housing with visual, tactile OR olfactory contact	Single housing w/o visual, tactile OR olfactory contact		
62	White noise	M, R	Duration Loudness		≤ 60min ≤ 100dB	> 60min > 100dB		

Stress-induced models

Nr.	Stressor	Species	Relevant Parameter(s)	Classification of severity				Ref
				no	mild	moderate	severe	
63	Chronic (unpredictable) mild stress	M, R				Mild stressors; Moderate stressors for \leq 14d	Moderate stressors for > 14d Severe stressors	(50, 51)
64	Dark rearing	M, R				X		
65	Light rearing	M, R	Illumination Duration		< 50lux	> 50lux > 2w		
66	Learned helplessness	M, R					X	(20, 21)
67	Maternal separation/ maternal deprivation	M, R	Duration of separation	\leq 15min/d		1-3h/d		

Legend: d: day; min: minute; M: mouse; nr: number; R: rat; s: second; w: week; w/o: without;

Referenzen

1. Österreich R (2012) Bundesgesetz über Versuche an lebenden Tieren (Tierversuchsgesetz 2012 – TVG 2012).
2. European Directive 2010/63/EU <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>
3. Hanell A & Marklund N (2014) Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. *Front Behav Neurosci* 8:252.
4. Health TNIoM (2002) Methods and Welfare Considerations in Behavioral Research with Animals. eds Morrison AR, Evans HL, Ator NA, & Nakamura RK (Washington D.C., USA).
5. Council NR (2003) *Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research* (The National Academies Press, Washington, DC) p 223.
6. Empfehlung der Kommission (2007) mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG).
7. Olsson IA & Dahlborn K (2002) Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim* 36(3):243-270.
8. Jirkof P (2014) Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 234:139-146.
9. Claassen V (1994) *Neglected Factors in Pharmacology and Neuroscience Research: Biopharmaceutics, Animal Characteristics, Maintenance, Testing Conditions* (Elsevier Amsterdam, The Netherlands).
10. Arakawa H (2018) Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res* 341:98-108.
11. Genn RF, Tucci SA, Thomas A, Edwards JE, & File SE (2003) Age-associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev* 27(1-2):155-161.

12. Moran G (1975) Severe food deprivation: some thoughts regarding its exclusive use. *Psychol Bull* 82(4):543-557.
13. Gouveia K & Hurst JL (2013) Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLoS One* 8(6):e66401.
14. Ghosal S, et al. (2015) Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav* 150:31-37.
15. Bali A & Jaggi AS (2015) Investigations in foot shock stress of variable intensity in mice: Adaptation and role of angiotensin II. *Eur J Pharmacol* 761:86-94.
16. Maier SF, Ryan SM, Barksdale CM, & Kalin NH (1986) Stressor controllability and the pituitary-adrenal system. *Behav Neurosci* 100(5):669-674.
17. Rabasa C, Munoz-Abellan C, Daviu N, Nadal R, & Armario A (2011) Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav* 103(2):125-133.
18. Wahlsten D (2011) *Mouse Behavioral Testing: How to Use Mice in Behavioral Neuroscience* (Academic Press, London, UK).
19. Vollmayr B & Gass P (2013) Learned helplessness: unique features and translational value of a cognitive depression model. *Cell Tissue Res* 354(1):171-178.
20. Nollet M, Le Guisquet AM, & Belzung C (2013) Models of depression: unpredictable chronic mild stress in mice. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 5:Unit 5 65.
21. Willner P (2017) The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of stress* 6:78-93.
22. Landgraf D, et al. (2016) Genetic Disruption of Circadian Rhythms in the Suprachiasmatic Nucleus Causes Helplessness, Behavioral Despair, and Anxiety-like Behavior in Mice. *Biol Psychiatry* 80(11):827-835.
23. Landgraf D, Long J, Der-Avakian A, Streets M, & Welsh DK (2015) Dissociation of learned helplessness and fear conditioning in mice: a mouse model of depression. *PLoS One* 10(4):e0125892.

24. Willner P (1991) *Behavioural Models in Psychopharmacology: Theoretical, industrial and Clinical Perspectives* (Cambridge University Press, Cambridge, UK).
25. Ridder S, et al. (2005) Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. *J Neurosci* 25(26):6243-6250.
26. Bodden C, et al. (2018) Evidence-based severity assessment: Impact of repeated versus single open-field testing on welfare in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 336:261-268.
27. McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, & Paylor R (2001) The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiol Behav* 73(5):705-717.
28. Albrechet-Souza L, Cristina de Carvalho M, Rodrigues Franci C, & Brandao ML (2007) Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previously exposed to the elevated plus-maze are sensitive to the anxiolytic-like effects of midazolam. *Horm Behav* 52(2):267-273.
29. Kappel S, Hawkins P, & Mendl MT (2017) To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals (Basel)* 7(12).
30. Carter RJ, Morton J, & Dunnett SB (2001) Motor coordination and balance in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:Unit 8 12.
31. Bayod S, et al. (2011) Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *J Appl Physiol* (1985) 111(5):1380-1390.
32. Coleman MA, et al. (1998) Glucocorticoid response to forced exercise in laboratory house mice (*Mus domesticus*). *Physiol Behav* 63(2):279-285.
33. Coover GD, Sutton BR, Welle SL, & Hart RP (1978) Corticosterone responses, hurdle-jump acquisition, and the effects of dexamethasone using classical conditioning of fear. *Horm Behav* 11(3):279-294.
34. Pietersen CY, Bosker FJ, Postema F, & den Boer JA (2006) Fear conditioning and shock intensity: the choice between minimizing the stress induced and reducing the number of animals used. *Lab Anim* 40(2):180-185.

35. Prince CR & Anisman H (1990) Situation specific effects of stressor controllability on plasma corticosterone changes in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 37(4):613-621.
36. Pinter O, Domokos A, Mergl Z, Mikics E, & Zelena D (2011) Do stress hormones connect environmental effects with behavior in the forced swim test? *Endocr J* 58(5):395-407.
37. Abel EL (1993) Physiological correlates of the forced swim test in rats. *Physiol Behav* 54(2):309-317.
38. Linthorst AC, Flachskamm C, & Reul JM (2008) Water temperature determines neurochemical and behavioural responses to forced swim stress: an in vivo microdialysis and biotelemetry study in rats. *Stress* 11(2):88-100.
39. Jung K, Kim IH, & Han D (2004) Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. *J Ethnopharmacol* 93(1):75-81.
40. Fushiki T, Matsumoto K, Inoue K, Kawada T, & Sugimoto E (1995) Swimming endurance capacity of mice is increased by chronic consumption of medium-chain triglycerides. *J Nutr* 125(3):531-539.
41. Commons KG, Cholanians AB, Babb JA, & Ehlinger DG (2017) The Rodent Forced Swim Test Measures Stress-Coping Strategy, Not Depression-like Behavior. *ACS Chem Neurosci* 8(5):955-960.
42. Valsamis B & Schmid S (2011) Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents. *J Vis Exp* (55):e3446.
43. Ross GR, Gabra BH, Dewey WL, & Akbarali HI (2008) Morphine tolerance in the mouse ileum and colon. *J Pharmacol Exp Ther* 327(2):561-572.
44. Xu J, Chen Y, Liu S, & Hou X (2013) Electroacupuncture regulates apoptosis/proliferation of intramuscular interstitial cells of cajal and restores colonic motility in diabetic constipation rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013:584179.
45. Naddaf H, Najafzadeh H, Fallah H, & Saremipoor P (2013) Comparison the Analgesic Effect of Electroacupuncture and Tramadol on Writhing Test in Rat. *Pharm sci* 18(4):205-207.
46. Ness TJ (1999) Models of Visceral Nociception. *ILAR J* 40(3):119-128.

47. Finnell JE, *et al.* (2017) Physical versus psychological social stress in male rats reveals distinct cardiovascular, inflammatory and behavioral consequences. *PLoS One* 12(2):e0172868.
48. Woo H, Hong CJ, Jung S, Choe S, & Yu SW (2018) Chronic restraint stress induces hippocampal memory deficits by impairing insulin signaling. *Mol Brain* 11(1):37.
49. Rechtschaffen A, Bergmann BM, Everson CA, Kushida CA, & Gilliland MA (2002) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. 1989. *Sleep* 25(1):68-87.
50. DeVallance E, *et al.* (2017) Effect of chronic stress on running wheel activity in mice. *PLoS One* 12(9):e0184829.
51. Schweizer MC, Henniger MS, & Sillaber I (2009) Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One* 4(1):e4326.

