

**Auswirkungen von Environmental Enrichment auf
physiologische und Tierwohl-assoziierte Parameter der Maus**

von Viola André, geb. Feder

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

**Auswirkungen von Environmental Enrichment auf
physiologische und Tierwohl-assoziierte Parameter der Maus**

**von Viola André, geb. Feder
aus Düsseldorf**

München 2018

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

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Angefertigt am

Helmholtz Zentrum München

Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (GmbH)

Abteilung für Vergleichende Medizin

Leitung: PD Dr. Markus Brielmeier

Mentor: Dr. Angelika Scheideler

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

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

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Dorothea Döring

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

Meiner Familie

Et es wie et es.
Et kütt wie et kütt.
Et hätt noch immer jot jejange

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	v
1 Einleitung	1
2 Literatur.....	3
2.1 Environmental Enrichment: Hintergrund, Art, Ziel und Anwendung.....	3
2.1.1 Haltungsbedingungen von Labornagern und Standardisierung	3
2.1.2 Definitionen und Zweck von Environmental Enrichment.....	4
2.1.3 EE und das „3R-Prinzip“	6
2.1.4 Rechtliche Vorgaben	7
2.1.5 Anforderungen an Environmental Enrichment.....	9
2.2 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf physiologische Daten.....	10
2.2.1 Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter.....	10
2.2.2 Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter	12
2.3 Auswirkungen der Haltungsbedingungen auf das Tierwohl	13
2.3.1 Definition und Relevanz von „Tierwohl“ bei Versuchstieren und Tierwohl- assoziierte Parameter	13
2.3.2 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf ausgewählte Tierwohl- assoziierte Parameter	15
2.4 Zusammenfassung.....	20
2.5 Zielsetzung der Arbeit.....	21
3 Tiere, Material und Methoden	23
3.1 Tiere und deren Haltung.....	23
3.1.1 Hauptstudie	23
3.1.2 Validierungsexperimente	24
3.2 Versuchsdesign der Hauptstudie (Untersuchung der physiologischen Parameter in der GMC).....	25
3.3 Physiologische Parameter	26
3.3.1 Verhalten	26
3.3.2 Neurologie.....	27
3.3.3 Nozizeption.....	28
3.3.4 Dysmorphologie	28
3.3.5 Energiemetabolismus.....	29
3.3.6 Klinische Blutchemie und Hämatologie, Allergie	30

3.3.7	Kardiovaskuläre Gesundheit	31
3.3.8	Auge	32
3.3.9	Pathologie	32
3.3.10	Reduzierte Stichprobenzahl bei einzelnen Screens	32
3.4	Tierwohl-assoziierte Parameter	33
3.4.1	Körpergewicht	33
3.4.2	Allgemeiner Gesundheitszustand	34
3.4.3	Stereotypien und Fur-Score	36
3.4.4	Corticosteron	36
3.4.5	Nutzung des Environmental Enrichments (Nest-Score)	41
3.5	Statistik	42
3.5.1	Physiologische Parameter	42
3.5.2	Tierwohl-assoziierte Parameter	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Auswirkungen von Environmental Enrichment auf physiologische Parameter	45
4.1.1	Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter	45
4.1.2	Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter	60
4.2	Tierwohl-assoziierte Parameter	69
4.2.1	Körpergewicht	69
4.2.2	Allgemeiner Gesundheitszustand	72
4.2.3	Stereotypien und Fur-Score	73
4.2.4	Corticosteron	78
4.2.5	Nutzung des Environmental Enrichment (Nest-Score)	85
5	Diskussion	87
5.1	Auswirkung von Environmental Enrichment auf physiologische Parameter	87
5.1.1	Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter	87
5.1.2	Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter	95
5.1.3	Limitationen	96
5.2	Auswirkungen von Environmental Enrichment auf das Tierwohl	97
5.2.1	Körpergewicht	97
5.2.2	Allgemeiner Gesundheitszustand	97
5.2.3	Stereotypien und Fur-Score	98
5.2.4	Corticosteron	100
5.2.5	Nutzung des Environmental Enrichment (Nest-Score)	102
5.2.6	Verbesserung des Wohlbefindens erreicht?	103

5.3	Stellenwert von Environmental Enrichment als Einflussfaktor der experimentellen Forschung.....	104
6	Zusammenfassung	107
7	Summary	109
8	Literaturverzeichnis	111
9	Anhänge	121
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	121
9.2	Tabellenverzeichnis	122
10	Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

3R/ 3V	Grundsatz nach Russel und Burch: replace, reduce, refine/ vermeiden, vermindern, verfeinern
ABR	Auditory brainstem response
ACLAM	American College of Laboratory Animal Medicine
ALAT/GPT	Alanin-Aminotransferase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase
ALP	Alkalische Phosphatase
ARB	Abnormal repetitive behavior
ASAT/ GOT	Aspartat-Aminotransferase/Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
ASR	Akustischer Schreckreflex
AUC	Area under the curve
B6	C57BL/6NTac
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BIC	Bayesian Information Criterion
bspw.	beispielsweise
CCQ	Creatinin-Corticosteron-Quotient
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CV	Coefficient of variation
D2	DBA/2NCrl
DEXA	Dual energy X-ray absorptiometry
d/s	Degree per second
ECHO	Echokardiografie
EDTA	Ethylendiamtetraacetat
EE	Environmental Enrichment
EKG	Elektrokardiogramm
EIA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EU	Europäische Union

ggü.	Gegenüber
GMC	German Mouse Clinic
H & E	Hämatoxylin & Eosin
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (- Achse)
HMGU	Helmholtz Zentrum München, deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt
HR	Heart rate
HRV	Heart rate variability
i.e.	Id est = das heißt
IgE	Immunglobulin E
IMPC	International Mouse Phenotyping Consortium
IpGTT	Intraperitonealer Glukose Toleranztest
IVSs	Interventricular septum (systole)
IVSd	Interventricular septum (diastole)
kHz	Kilohertz
LDH	Lactatdehydrogenase
LVID/s	Left ventricular internal diameter (systole)
LVID/d	Left ventricular internal diameter (diastole)
LVPWs	Left ventricular posterior wall (systole)
LVPWd	Left ventricular posterior wall (diastole)
NSB	Non-specific binding (Kontrolle)
nt	Non testatum, nicht geprüft
OD	Optische Dichte
OFT	Open Field Test
PPI	Präpulsinhibition
PQ	PQ-Intervall (EKG)
PR	PR-Intervall (EKG)
pDEXA	Peripheral dual-energy x-ray absorptiometry

qNMR	Quantitative nuclear magnetic resonance (imaging)
QRS	QRS-Komplex (EKG)
QT	QT-Intervall (EKG)
QTc	Corrected QT-Intervall (EKG)
Rpm	Rounds per minute
RR	RR-Intervall (EKG)
s.	Siehe
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SHIRPA	Smithkline Beecham, MRC Harwell, Imperial College, the Royal London hospital phenotype assessment
SPF	Spezifiziert pathogen frei
STD	Standard
ST	ST-Intervall (EKG)
TMB	Tetramethylbenzidin
u.a.	Unter anderem
vgl.	Vergleiche
z.B.	Zum Beispiel

1 Einleitung

Der Grundsatz des deutschen TierSchG [1] (§1) besagt: „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“. Für Versuchstiere gibt es zwar besondere gesetzliche Regelungen (TierSchG, Richtlinie 2010/63/EU [2], TierSchVersV [3]), da Belastungen im Zuge der Experimente nicht immer vollständig vermieden werden können; doch auch für sie gilt, dass die Belastung auf ein Minimum reduziert werden muss, sowohl bei Experimenten als auch in der Haltung (TierSchG, §7, Absatz (1)).

Die Anwendung von Environmental Enrichment (d.h. die Anreicherung der Käfigumgebung (vgl. 2.1.2), im Folgenden EE) ist eine Verbesserungsmaßnahme im Sinne der „3R“ nach Russell und Burch [4]. Die „3R“ stehen für „replace, reduce, refine“ (bzw. „vermeiden, vermindern, verfeinern“) und können als ethische Grundlage für den humanen Umgang mit den Tieren in der tierexperimentellen Forschung verstanden werden (vgl. 2.1.3). EE wird somit in Versuchstierhaltungen eingesetzt, um die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere sicherzustellen, ihnen artgerechtes Verhalten zu ermöglichen und damit ihren ethologischen Bedürfnissen so weit wie möglich gerecht zu werden [5-7] und ist generell gesetzlich vorgeschrieben (vgl. 2.1.4).

Allerdings können auch scheinbar leichte Änderungen der Umweltbedingungen signifikante Effekte auf Versuchstiere und -ergebnisse haben [8] (vgl. 2.2.1.2). Die Ergebnisse einer Studie von Macri et al. [9] zeigen, dass EE gemäß den Anforderungen der Richtlinie 2010/63/EU starken Einfluss auf die Ergebnisse pharmakologischer und verhaltensbiologischer Studien haben kann. Vielfältige Gegenstände sind als EE kommerziell verfügbar, deren unbedachter Einsatz somit jedoch zu einer beeinträchtigten Vergleichbarkeit von Studien führen kann.

Überdies diskutieren Autoren [10-12], dass der Einsatz von EE zu einer Erhöhung der Variabilität führen könnte, wenn die Tiere individuell unterschiedlich auf die angereicherte Umgebung reagieren. Bei einer stärkeren Streuung der Daten müssen wiederum höhere Tierzahlen eingesetzt werden, um die benötigte Teststärke in der statistischen Auswertung zu erreichen. Dies widerspricht allerdings dem Grundsatz der „Verringerung“ nach Russell und Burch [4]. Auf der anderen Seite ist anzunehmen, dass eine angereicherte Umgebung artspezifisches Verhalten fördert, den Tieren die Stressbewältigung erleichtert und damit einheitlichere Reaktionen auf Versuche hervorruft, woraus bessere wissenschaftliche Ergebnisse resultieren [13, 14].

Allgemein ist die Literatur zum Thema EE umfangreich und vielfältig, nichtsdestotrotz fällt es schwer, konkrete Schlüsse in Bezug auf Auswirkungen von EE zu ziehen, da die vorhandenen Studien die Effekte von EE unter sehr spezifischen Versuchsbedingungen inklusive Stamm, Geschlecht, EE und Versuchsparameter untersuchen. Allerdings unterscheiden sich die Effekte abhängig von Art und Kombination des EE [15], untersuchtem Mausstamm [16-18], Geschlecht [19], Zeitpunkt und Dauer des EE [18, 20, 21], sowie dem

untersuchten Messparameter [12] und die Übertragbarkeit auf andere Stämme, Geschlechter oder Altersgruppen ist ungewiss [22]. Für den Großteil der genannten Studien wurde die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht untersucht und der direkte Vergleich der Ergebnisse verschiedener Studien ist aufgrund des sehr unterschiedlichen Studiendesigns schwierig.

Um unklare oder sogar falsche Ergebnisse und damit verbundene höhere Tierzahlen durch eine erhöhte Variabilität oder veränderte physiologische Parameter zu vermeiden, ist eine systematische Evaluation von EE-Strategien vor deren Einsatz unabdingbar [23, 24]. EE sollte mit Sorgfalt ausgewählt, genau definiert und zielgerichtet eingesetzt werden [8].

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist deshalb, die Auswirkungen von einfachem EE gemäß den gesetzlichen Vorgaben, nämlich Nistmaterial alleine und in Kombination mit einem Unterschlupf im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne EE auf Mittelwert und Variabilität bei einer Vielzahl physiologischer Parameter in einem systematischen, hochstandardisiertem Versuchsansatz zu untersuchen. Überdies wurden einige Tierwohl-assoziierte Parameter erhoben, um abschätzen zu können, ob das eingesetzte EE zu einer Besserung des Wohlbefindens beiträgt. Es wurden männliche und weibliche Mäuse zweier Inzuchtstämme in 3 unabhängigen Kohorten untersucht.

2 Literatur

2.1 Environmental Enrichment: Hintergrund, Art, Ziel und Anwendung

2.1.1 Haltungsbedingungen von Labornagern und Standardisierung

Ein wesentliches Ziel in der tierexperimentellen Forschung ist es, reproduzierbare Reaktionen einer Tiergruppe auf eine Versuchssituation zu erhalten [25]. Wenn die Reaktionen innerhalb der Gruppe einheitlich ausfallen, sinkt die für eine korrekte, statistische Auswertung benötigte Anzahl an Tieren, was dem Grundprinzip der „3R“ folgend erstrebenswert ist [26].

Um einheitliche Reaktionen der Tiere zu erhalten, ist es wichtig, dass die Tiergruppen möglichst homogen sind. Es gibt zwei Ansätze um eine homogene Gruppe an Versuchstieren zu generieren [25]:

1. die Reduktion der genetischen Variabilität durch die Verwendung definierter Zuchtverfahren
2. die Reduktion der phänotypischen Variabilität. Diese wird vor allem geprägt durch die Haltungsumwelt, aber auch durch (beispielsweise versuchsbedingte) Stressoren, die das Wohlbefinden der Tiere negativ beeinflussen [25].

Durch die weitgehende Standardisierung von Haltungsbedingungen soll deshalb die phänotypische Variation reduziert und damit die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Studien erhöht werden [27]. Stress kann ebenfalls zu einer Erhöhung der Variabilität führen [14]. Deshalb muss sichergestellt werden, dass die Tiere gesund und ungestresst sind, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten [25].

Tierhaltungsbereiche für Labornager wurden häufig nach ökonomischen und ergonomischen Anforderungen, wie personeller und maschineller Ausstattung, Kosten, verfügbarem Platz, der Möglichkeit, die Tiere zu beobachten und zu überwachen sowie einen bestimmten Hygienestandard sicherzustellen ausgerichtet [6]. Die ethologischen Bedürfnisse der Tiere wurden dabei kaum berücksichtigt [6]. Demnach wurden Mäuse in kleinen, einheitlichen Käfigen mit standardisierter Einstreu und standardisiertem Futter und Wasser *ad libitum* bei kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit gehalten [7].

Seit den 1950er Jahren entwickelte sich jedoch die versuchstierkundliche Forschung („laboratory animal science“) immer weiter, die es zum Ziel hat, die Qualität tierexperimenteller Studien sowie das Wohlergehen der Versuchstiere zu verbessern [4, 13]. Im Zuge dessen stellte sich mit dem Erstarken der „Wohlbefindensforschung“ („animal welfare science“, siehe auch 2.1.2) heraus, dass die Tiere in einer solchen reizarmen Haltung nicht die Möglichkeit hatten, durch arttypisches Verhalten Stress abzubauen. Ein reduziertes Wohlbefinden der Tiere und das Auftreten von abnormen Verhaltensweisen, wie z.B. Stereotypien waren die Folge (Würbel und Garner [28], sowie Garner [29] geben hier eine gute Übersicht). Ein eingeschränktes Wohlbefinden ist nicht nur aus Sicht des Tierschutzes relevant, sondern auch aus wissenschaftlicher Sicht, da es individuelle Unterschiede

zwischen den Tieren verstärken kann. Überdies ist die Validität von Ergebnissen, die an verhaltensgestörten Tieren erhoben wurden, fraglich [30]. In Studien konnte gezeigt werden, dass eine Anreicherung des Käfigs mit EE das Auftreten von Stereotypen [31] und zwanghaften Verhaltensweisen wie Barbering-induzierter Alopecie („barbering induced alopecia“) [32] vermindern kann (vgl. 2.3.2.3). Mit Inkrafttreten der Richtlinie 63/2010/EU [2] ist inzwischen EU-weit vorgeschrieben, dass Labortieren ein Mindestmaß an EE zur Verfügung gestellt werden muss, damit sie ihre artspezifischen Bedürfnisse ausleben können. Der „Standardkäfig“ beinhaltet heutzutage somit neben Einstreu und Futter und Wasser *ad libitum* auch Nistmaterial und einen Unterschlupf.

2.1.2 Definitionen und Zweck von Environmental Enrichment

Die Definition des Begriffs „Environmental Enrichment“ ist in der Literatur nicht einheitlich und wird je nach Einsatzzweck unterschiedlich formuliert.

Environmental Enrichment als experimentelles Werkzeug

1978 stellte Rosenzweig fest, dass EE, das er als eine „Kombination komplexer, unbelebter und sozialer Stimulation“ definierte, neurophysiologische Veränderungen im Gehirn von Ratten verursacht [33]. Bis heute wurde und wird EE als experimentelles Werkzeug eingesetzt um zu erforschen, inwieweit eine stimulierende Umwelt die Physiologie und das Verhalten von Versuchstieren verändern kann und welchen Einfluss sie auf Krankheitszustände und deren Heilung hat. Diese Art von EE, wie beispielsweise in einem Protokoll von Slater et al. [34] beschrieben, beinhaltet typischerweise eine Kombination von erhöhtem Platzangebot, größeren Gruppen und Objekten für Aktivität und Versteck, sowie Laufräder [35]. Es übt einen starken sensorischen, kognitiven und motorischen Reiz auf die Versuchsnagetiere aus [36] und kann zu verhaltensbiologischen [37], emotionalen [38, 39], physiologischen [40] und neurologischen [39, 41, 42] Veränderungen führen. Überdies kann EE in dieser Form pathologische Zustände verbessern, z.B. induziertes Tumorwachstum und Adipositas [34] oder die phänotypische Ausprägung von induzierten Krankheitsmodellen bei Mäusen vermindern (zur Übersicht siehe [36]). In diesem Sinne wird EE von Cao und During beschrieben als „experimentelles Paradigma zur Untersuchung der Effekte einer komplexeren Umwelt (im Vergleich zu Standard-Haltungsbedingungen von Labormäusen), ohne jedoch Elemente zu beinhalten, die als traditionell belastend („stressful“) angesehen werden“ [35]. Eine solche intensive Art der Käfiganreicherung wird allgemein in der Literatur auch als sogenanntes „Super-Enrichment“ bezeichnet.

Environmental Enrichment zur Verbesserung des Wohlbefindens

Im Gegensatz dazu liegt der Fokus bei der Definition für EE, die Wissenschaftler aus dem Bereich der Ethologie und „animal welfare science“ (einem Forschungszweig, der sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung des Wohlbefindens von Tieren beschäftigt) nutzen, auf den positiven Effekten für das Tier. So definierte Newberry EE als „eine Verbesserung der biologischen Funktionen von Tieren in Gefangenschaft durch Modifikationen in der Umgebung“ [43] und grenzt sich damit von anderen Autoren ab, die unter EE keine

Käfiganreicherung mit positiven Konsequenzen für die Tiere, sondern primär die Veränderung der Haltungsumwelt als solche verstehen. In einer Studie von van de Weerd et al. wird die obige Definition noch präzisiert: „EE verändert die Haltungsumgebung, indem Materialien oder Objekte eingebracht werden, die die Tiere stimulieren und es ihnen ermöglichen, ihr natürliches Verhaltensrepertoire vermehrt auszuleben, was ihr Wohlbefinden verbessert“ [44]. Garner [29] definiert EE nach Olsson und Dahlborn [7] als „biologisch relevante Ressourcen oder Strukturen, die Verhaltensweisen, die unter natürlichen Bedingungen motiviert ausgeübt werden, ermöglichen oder vereinfachen, insbesondere solche, die es den Tieren erlauben, ihre Umgebung und Homöostase zu kontrollieren“. Sie weisen damit auf die Tatsache hin, dass Tiere zur Stressbewältigung ihre Umgebung durch artspezifisches Verhalten kontrollieren können müssen [45]. In diesem Sinne soll durch EE das Wohlbefinden der Tiere verbessert werden, indem Materialien verwendet werden, die sich an den Bedürfnissen der jeweiligen Tierart orientieren [6].

Da manche EE-Maßnahmen aus ethologischer Sicht nicht nur wertlos, sondern sogar schädlich sein können, klassifizieren Würbel und Garner [28] EE in drei Kategorien: Pseudo-Enrichment, bedingt wohlbringendes Enrichment („conditionally beneficial enrichments“) und wohlbringendes Enrichment („beneficial enrichments“). Tabelle 1 zeigt zu den Kategorien die jeweilige ethologische Relevanz und mögliche Einflüsse hinsichtlich des Wohlbefindens der Tiere.

Tabelle 1. Klassifizierung von EE nach Würbel et al. [28].

Klassifizierung	Pseudo-EE		Bedingt wohlbringendes EE	Wohlbringendes EE
	Keine	Keine		
Ethologische Relevanz	Keine	Keine	Gegeben	Gegeben
Vorteile bzgl. Wohlbefinden	Keine	Keine	Variabel, abhängig von Stamm, Geschlecht, Management	Gegeben
Nachteile bzgl. Wohlbefinden	Hoch bis niedrig	Niedrig oder keine	Variabel (s.o.)	Niedrig oder keine
Konsequenzen bzgl. Wohlbefinden	Beeinträchtigung	Beeinträchtigung bis kein Effekt	Beeinträchtigung bis Verbesserung	Verbesserung
Bsp.	Murmeln ¹	?	Unterschlupf (vgl. 2.3.2.2)	Nistmaterial ²

¹Murmeln werden als Stressor in Tests auf Ängstlichkeit eingesetzt [46], ²Nistmaterial wird bei dem Großteil der Studien als positiv bewertet [7, 47], es gibt jedoch auch eine Studie, die eine erhöhte Aggressivität bei männlichen Tieren eines bestimmten Stammes bei Haltung mit Nistmaterial feststellten [48]; insofern könnte dies auch dem bedingt wohlbringenden EE zugeordnet werden.

Obwohl das Wort „Enrichment“ eine Verbesserung des Wohlbefindens nahelegt, ist dies aufgrund der ambivalenten Nutzung des Begriffs (experimentelles Werkzeug vs. Verbesserung des Wohlbefindens) nicht für alle EE-Arten das Ziel. Darüber hinaus können die Konsequenzen für das Wohlbefinden abhängig von der untersuchten Tiergruppe variieren (s. Tabelle 1). Daraus ergibt sich, dass nicht jede Art von EE zwangsläufig zu einer Verbesserung des Wohlbefindens führt. Vielmehr ist eine genaue Evaluierung von Anreicherungs-Maßnahmen nötig, um sicherzustellen, dass sie biologisch relevant sind, keine unerwarteten negativen Konsequenzen nach sich ziehen und tatsächlich zu einem verbesserten Wohlbefinden der Tiere beitragen [24, 30, 49], sofern dies der Zweck der Anwendung ist.

2.1.3 EE und das „3R-Prinzip“

Das sogenannte „3R-Prinzip“ (3R) wurde 1959 von William Russell und Rex Burch in ihrem Buch „The principles of humane experimental technique“ [4] entwickelt und beschreibt den ethischen Grundsatz des verantwortungsvollen Umgangs mit Versuchstieren in der tierexperimentellen Forschung. Die „3R“ stehen für „replacement“ (= Vermeidung), „reduction“ (= Verringerung) und „refinement“ (= Verfeinerung oder Verbesserung).

Unter „replacement“ werden alle Methoden zusammengefasst, die den Einsatz von lebenden Tieren im Experiment ersetzen können („full replacement“), z.B. durch die Nutzung von Zell- oder Gewebekulturen oder Computerprogrammen. Ein partieller Ersatz, „partial replacement“, liegt dann vor, wenn die Versuchsorganismen Tiergruppen angehören, die – nach jetzigem Kenntnisstand – nicht im Stande sind, Leid wahrzunehmen [50] bzw. die einer möglichst niedrigen Stufe der „Skala naturae“ entstammen. Da jedoch eine Umsetzung des Konzepts des „replacements“ in der Wissenschaft nur graduell fortschreitet, und solange der vollständige Ersatz von Tieren in der Forschung durch Alternativmethoden nicht möglich ist, sollen gemäß dem zweiten Grundsatz von Russell & Burch, der „reduction“, die Zahl der verwendeten Tiere durch eine gründliche statistische Planung und ein durchdachtes Versuchsdesign optimiert werden. Auch das Teilen und Veröffentlichen von Daten und Ressourcen kann danach einen Beitrag zum Konzept der Reduzierung leisten [50]. Die nach Anwendung von „replacement“ und „reduction“ noch im Experiment verwendeten Tiere unterliegen schließlich dem dritten Grundsatz, der „Verfeinerung“ („refinement“). Darunter versteht man die Minimierung von Schmerzen, Leiden und Schäden, denen das Versuchstier ausgesetzt wird. Hierzu zählen neben angemessenen Anästhesie- und Analgesiemaßnahmen unter anderem auch das Bereitstellen einer Haltungsumwelt, die es den Tieren ermöglicht, speziesspezifische Verhaltensweisen auszuüben [50] und somit Stress abzubauen.

Der Einsatz von EE wird dem Konzept der Verfeinerung zugeordnet, weil dies dazu beitragen kann, das Wohlbefinden der Tiere zu erhöhen [6, 7]. In aktueller Literatur wird darüber hinaus von der Ergänzung des „3R-Prinzips“ um 2 weitere „Rs“ gesprochen. Diese stehen für „rigour“ (= Robustheit) und „responsibility“ (= Verantwortung) und weisen auf annahmefreie, robuste Methoden und Studiendesigns hin, sowie auf Transparenz bei den

Methoden und Ergebnissen, die zu höherer Reproduzierbarkeit und Transparenz in der Wissenschaft führen [51].

Der hohe Stellenwert des humanen Umgangs mit den Tieren in der Forschung spiegelt sich bis heute darin wider, dass das „3R-Prinzip“ inhaltlich schon lange in die nationale, aber jetzt auch in die internationale Gesetzgebung aufgenommen wurde (vgl. 2.1.4). Zur Umsetzung der Forderungen der Richtlinie 2010/63/EU wurde 2015 in Berlin außerdem das deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) als Teil des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) eingerichtet [52].

2.1.4 Rechtliche Vorgaben

Die gesetzlichen Bestimmungen zur Haltung von Tieren, die zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden, finden sich in der Richtlinie 2010/63/EU [2], dem TierSchG [1], der TierSchVersV [3] und den Empfehlungen der EU-Kommission 2007/526/EG [53].

2.1.4.1 Richtlinie 2010/63/EU

Als Umsetzung des Grundsatzes der Vermeidung, Verminderung und Verbesserung gemäß Artikel 4, Richtlinie 2010/63/EU, müssen die Mitgliedstaaten (u.a.) gewährleisten, dass „die Zucht, **Unterbringung** und Pflege [...] verbessert werden, damit mögliche Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden ausgeschaltet oder auf ein Minimum reduziert werden“ (Artikel 4, Absatz (3)).

In Artikel 33, Absatz (1), Punkt a) und b) werden die grundsätzlichen Anforderungen an die Unterbringung der Tiere präzisiert: so erhalten alle Tiere „die für ihre Gesundheit und ihr Wohlergehen angemessene Unterbringung, Umgebung, das nötige Futter, Wasser und Pflege“ und „alle Faktoren, die ein Tier in der Befriedigung seiner physiologischen und ethologischen Bedürfnisse einschränken, werden auf einem Minimum gehalten“.

Absatz (3) verfügt allerdings, dass die Mitgliedsstaaten aus wissenschaftlichen Gründen, sowie aus Gründen des Tierschutzes oder der Tiergesundheit Ausnahmen von diesen Regelungen gestatten dürfen. In Artikel 33, Absatz (2), wird außerdem auf den Anhang III der Richtlinie verwiesen. In Teil A („Allgemeines“), Punkt 3.3 des Anhangs wird bestimmt, dass sozial lebende Tiere generell in stabilen Gruppen kompatibler Tiere untergebracht werden müssen. Zur Ausgestaltung heißt es unter b) „Alle Tiere sollten über Räume mit hinreichender Komplexität verfügen, um eine große Palette arttypischer Verhaltensweisen ausleben zu können. Sie müssen ihre Umgebung in bestimmtem Maße selbst kontrollieren und auswählen können, um stressbedingte Verhaltensmuster abzubauen. Alle Einrichtungen müssen über angemessene Ausgestaltungsmöglichkeiten verfügen, um die den Tieren zur Verfügung stehende Palette von Tätigkeiten und ihre Anpassungsfähigkeiten zu erweitern, einschließlich Bewegung, Futtersuche, manipulativem und kognitivem Verhalten je nach Tierart. Die Ausgestaltung des Lebensumfelds in Tierbereichen muss der Tierart und den individuellen Bedürfnissen der Tiere angepasst sein. Die Ausgestaltungsstrategien in den Einrichtungen müssen regelmäßig überprüft und aktualisiert werden“.

Das TierSchG und die TierSchVersV setzen die Anforderungen der Richtlinie 2010/63/EU in deutsches Recht um. In §1, Absatz (1), Punkt 1 der TierSchVersV ist verfügt, dass die Haltungsanforderungen der Anlage III der Richtlinie 2010/63/EU anzuwenden sind. Absatz (2) legt fest, wann Ausnahmen von diesen Anforderungen gestattet werden können: aus wissenschaftlichen Gründen, aus Gründen des Tierschutzes oder der Tiergesundheit.

2.1.4.2 TSchG und TierSchVersV

Im 2. Abschnitt des deutschen TierSchG, §2 werden die Anforderungen an die Haltung von Tieren im Allgemeinen beschrieben:

„Wer ein Tier hält, betreut oder zu betreuen hat,

1. muss das Tier seiner Art und seinen Bedürfnissen entsprechend angemessen ernähren, pflegen und verhaltensgerecht unterbringen,
2. darf die Möglichkeit des Tieres zu artgemäßer Bewegung nicht so einschränken, dass ihm Schmerzen oder vermeidbare Leiden oder Schäden zugefügt werden [...]

Dieser Abschnitt bezieht sich jedoch auf die Haltung von Tieren generell und ist sehr allgemein gehalten.

§2a ermöglicht deshalb den Erlass von Rechtsverordnungen, die die Anforderungen an die Haltung von Tieren nach §2 näher bestimmen. Die Tierschutz-Versuchstierverordnung ist eine solche Rechtsverordnung nach §2a, TierSchG, in der u.a. die Haltungsanforderungen für Labortiere geregelt sind und welche die Anforderungen der Richtlinie 2010/63/EU in deutsches Recht umsetzt.

In §7, Abschnitt (1), Punkt 2 wird verfügt, dass „die Tiere, die zur Verwendung in Tierversuchen bestimmt sind oder deren Gewebe oder Organe dazu bestimmt sind, zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet zu werden, so zu halten [...] und zu pflegen [sind], dass sie nur in dem Umfang belastet werden, der für die Verwendung zu wissenschaftlichen Zwecken unerlässlich ist“. Ein Tierversuch ist außerdem nach §8, Absatz (1), Punkt 5 auch nur zu genehmigen, wenn (u.a.) die Anforderungen an die Haltung nach §2 und ggf. erlassener Rechtsverordnung erfüllt werden.

2.1.4.3 Empfehlungen der EU-Kommission 2007/526/EG

Neben der EU-Richtlinie von 2010 gibt es bereits seit 2007 die Empfehlungen der EU-Kommission 2007/526/EG mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, auf die in §1, Absatz (3), TierSchVersV verwiesen wird.

Neben allgemeinen Anforderungen, die inhaltlich weitestgehend mit denen der Richtlinie 2010/63/EU übereinstimmen, wird im artspezifischen Teil über Nagetiere (A) unter Punkt 4.2. festgelegt, dass **Einstreu und Nestmaterial sowie Unterschlüpf**e sehr wichtige Ressourcen seien und für Nagetiere während der Trächtigkeit, zur Vorrathaltung oder bei Versuchen stets zur Verfügung stehen sollten, soweit veterinärmedizinische oder tierschützerische Gründe nicht dagegen sprechen. Für alle Nagerarten können außerdem Holzstückchen zum Kauen und Nagen verwendet werden.

Dass die Käfigausgestaltung durch EE allerdings kein starres Konzept ist, sondern immer wieder überprüft werden und an die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse angepasst werden muss, wird unter Punkt 4.5.3. deutlich: „Die Möglichkeiten der Ausgestaltung sollten veränderbar sein, damit auf neuen Erkenntnissen beruhende Innovationen berücksichtigt werden können. Das Ausgestaltungsprogramm sollte regelmäßig überprüft und aktualisiert werden. [...] Tierbetreuer sollten wissen, dass nicht alle Ausgestaltungsinitiativen unbedingt vorteilhaft für das Tier sind, und sollten daher die Wirkungen kontrollieren und die Programme entsprechend anpassen“. Gleichzeitig wird unter Punkt 4.5.1. darauf hingewiesen, dass „mögliche Auswirkungen der Unterbringungsart und der Maßnahmen zur Ausgestaltung von Lebens- und sozialem Umfeld auf die Ergebnisse wissenschaftlicher Untersuchungen berücksichtigt werden sollten, um unbrauchbare Daten und etwaige unnötige Tierverluste zu vermeiden“.

2.1.5 Anforderungen an Environmental Enrichment

Ein vernünftiges EE, im Sinne des Tierschutzes, der ethischen Verantwortung für das Tier und für die wissenschaftliche Forschung sowie der gesetzlichen Vorgaben, muss besondere Anforderungen erfüllen, um flächendeckend in Versuchstierhaltungen eingesetzt werden zu können. Aus der Literatur lassen sich folgende Bedingungen zusammenfassen [23, 54]:

- **Unbedenklichkeit:** EE muss für die Tiere gesundheitlich unbedenklich sein. Insbesondere beim Einsatz von bestimmten Nistmaterialien bei Jungtieren [55, 56] und Nacktmäusen [57] wurden Komplikationen berichtet. Außerdem können manche Gegenstände ein erhöhtes Aggressionsverhalten bei männlichen Tieren hervorrufen [40, 58-60] (vgl. 2.3.2.2). Es gibt jedoch auch schon Studien, die Lösungsvorschläge für Aggressionsprobleme bei männlichen Tieren erarbeiteten [61, 62].
- **Biologische Sicherheit:** Die genutzten Materialien müssen biologisch sicher sein, d.h. sie sollen keine organischen oder sogar krankhaften Veränderungen bei Aufnahme durch das Tier auslösen. In einer Studie riefen Baumwollbällchen Leberveränderungen hervor [63] und auch Holzmaterialien könnten problematisch sein, da der Einsatz bestimmter Arten von Holzstreu Veränderungen der Leber [64] und der mukösen Immunantwort [65] zeigte.
- **Wissenschaftliche Evaluierung:** Das Bereitstellen von EE kann unbeabsichtigte Folgen sowohl für die Tiere als auch für die Forschungsergebnisse haben [8, 66], da bereits geringe Veränderungen der Haltungsumwelt erhebliche Veränderungen im Gehirn und in den Organen hervorrufen können und damit wichtige Aspekte von Physiologie und Entwicklung beeinflussen [24] (siehe auch 2.2). Vor der Etablierung eines EE-Konzepts sollte dieses deshalb hinsichtlich seines möglichen Einflusses auf Versuchsergebnisse und die Vergleichbarkeit von Ergebnissen früherer und folgender Studien evaluiert und validiert werden [23].
- **Ethologische Relevanz:** Um ein echtes „Enrichment“, also eine positive Bereicherung im Sinne des Wortes zu sein, müssen EE-Strategien ethologisch relevant für die Tiere

sein, das heißt speziesspezifische Verhaltensweisen sollten ermöglicht werden. Ein Großteil des Verhaltensrepertoires von Nagern fällt unter die sozialen Aktivitäten [67], was den Nutzen von sozialem EE in Form von Artgenossen unterstreicht. Zu den nicht-sozialen Verhaltensweisen gehören neben der Kategorie Grundversorgung („maintenance“: Ess- und Trinkverhalten, Putzen und Nestbau) [68] auch Erkundungs-, Ausruh-, Kletter- und Grabverhalten [25]. Da Mäuse Beutetiere sind, zeigen sie bei Bedrohung Flucht- und/oder Versteckverhalten [49]. Die nicht-sozialen Verhaltensweisen können durch den Einsatz von EE-Gegenständen ermöglicht werden. Um die ethologische Relevanz verschiedener Anreicherungsobjekte zu bewerten, wurden bereits viele Präferenzstudien durchgeführt (zu Limitationen von Präferenzstudien siehe 2.3.1.). Ollson und Dahlborn fassten in ihrem Review zusammen, dass generell Materialien bevorzugt wurden, die sich zum Nestbau eignen [7]. In Bezug auf Käfigkomplexität scheinen Mäuse insgesamt die Käfige zu präferieren, die irgendeine Art von Unterschlupf bieten [7]. Studien, in denen zusätzlich die Motivationsstärke gemessen wurde, zeigten außerdem, dass Mäuse nicht nur eine angereicherte Umgebung (Laufrad, größere Käfige und strukturiertere Käfige) präferieren, sondern auch bereit sind, für den Zugang zu diesen zu arbeiten [7].

- **Praktikabilität und Arbeitssicherheit:** Ein angereicherter Käfig kann die Beobachtbarkeit der Tiere erschweren [23] und damit den Zeitaufwand für den täglichen Gesundheitscheck erhöhen [27]. Eine weitere Problematik in der praktischen Anwendung ist in diesem Zusammenhang, dass der Käfig u.U. häufiger geöffnet werden muss, um sicherzustellen, dass alle Tiere gesund sind; ein häufigeres Handling führt jedoch wiederum vermehrt zu Stress für die Mäuse. Röhren als EE scheinen jedoch zumindest das Fangen und Handling von Mäusen nicht zu erschweren [69]. Einen weiteren Aspekt stellt der erhöhte finanzielle und zeitliche Aufwand zur Reinigung und Desinfektion bzw. Austausch von EE beim Käfigwechsel dar [27]. Schließlich sollte Nistmaterial in Hinblick auf die Arbeitssicherheit der Mitarbeiter möglichst staubfrei sein, um das Risiko der Allergieentwicklung und der Infektion mit luftübertragbaren Krankheitserregern zu minimieren [23].

2.2 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf physiologische Daten

2.2.1 Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter

Der Einfluss von EE auf den Mittelwert verschiedener physiologischer Parameter hängt stark davon ab, welche Form von EE eingesetzt wird. Deshalb wird im Folgenden zwischen den Effekten von sog. „Super-Enrichment“ und einfachem EE zur Verbesserung des Wohlbefindens unterschieden. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen Super-Enrichment, einfachem EE und dem früheren „Standard“ ohne EE siehe Abbildung 1.

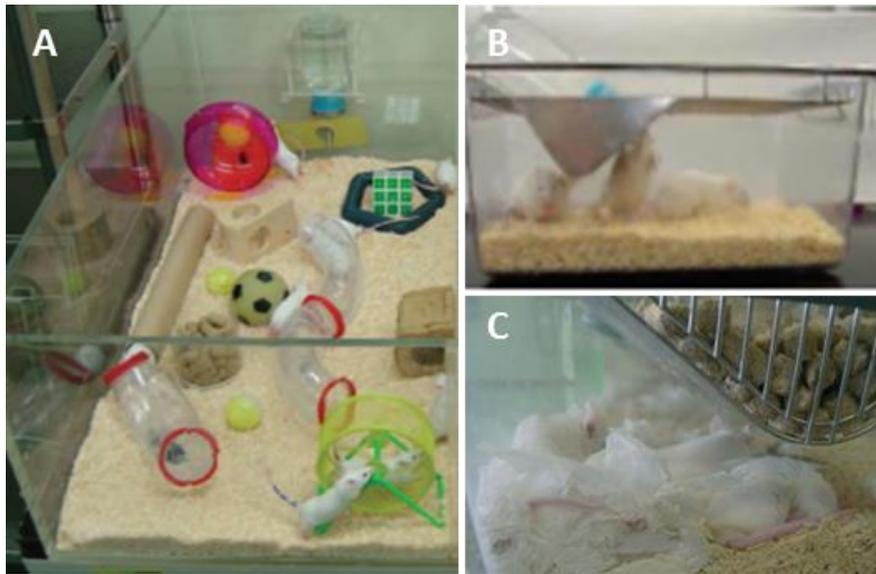


Abbildung 1. Verschiedene Arten der Käfiganreicherung.

A: Super-Enrichment, B: „Standard“-Käfig ohne Enrichment, C: einfaches EE, in Form von Nistmaterial (A und C aus [70], Fig. 1; C aus [13], Fig. 3)

2.2.1.1 Super-Enrichment

Es ist bekannt, dass bestimmte EE-Strategien starken Einfluss auf physiologische und verhaltensbiologische Parameter haben können und damit potentiell Versuchsergebnisse verändern können [66]. Besonders in der Neuro- und Verhaltensbiologie wurde und wird EE als experimentelles Werkzeug eingesetzt, um Effekte der Gen-Umwelt-Beziehung zu untersuchen. Ein solches EE beinhaltet häufig große Käfige hoher Komplexität, soziales Enrichment durch große Gruppengrößen und eine Kombination verschiedener Gegenstände wie Unterschlüpfе, Spielzeuge, Nistmaterial, Laufräder oder Strukturelemente (siehe z.B. Slater et al. [34]) um eine möglichst starke sensorische, kognitive und/ oder Motorstimulation hervorzurufen [36]. Die Folgen einer solchen Anreicherung spiegeln sich in Veränderungen der Bereiche des Verhaltens [20, 37, 71], der Emotionalität [38, 39], der Physiologie und Reproduktion [72, 73] und Neurobiologie [39, 41, 42] wider. Des Weiteren wurde in vielen Studien gezeigt, dass eine angereicherte Umgebung großen Einfluss auf den Verlauf bzw. die Heilung von Krankheiten haben kann. Nithianantharajah et al. [36], sowie van Praag et al. [42] geben hier eine gute Übersicht.

2.2.1.2 Einfaches Enrichment

EE wird in Versuchstierhaltungen auch im Rahmen der allgemeinen Haltungsbedingungen eingesetzt, um den Tieren speziesspezifische Verhaltensweisen zu ermöglichen, Stress zu reduzieren und das Wohlbefinden zu verbessern [2, 5, 7]. Die Ergebnisse von Studien, die den Einfluss von solchem EE auf verschiedene Parameter untersuchten, sind heterogen und sollen im Folgenden dargestellt werden. In diesen Studien betrug die Anzahl der untersuchten Tiere $n = 8-33$ und es handelte sich um Einzelstudien (Untersuchung einer Kohorte), wenn nicht unten anderweitig beschrieben. Inwieweit die Ergebnisse dieser Studien reproduzierbar sind, wurde dabei nicht untersucht.

Kuleshkaya et al. fanden heraus, dass einfaches EE einen Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben könnte: bei der Versuchsgruppe mit Nistmaterial als EE erhöhte sich das explorative Verhalten und das Angstverhalten war reduziert, während andere Parameter (Rotarod, PPI, Körpergewicht und Nozizeption) nicht beeinflusst wurden [74]. Coke-Murphy et al. zeigten stamm- und altersabhängige Effekte zweier Arten von Unterschlüpfen in Kombination mit Nistmaterial in den Bereichen motorische Aktivität, Koordination und einigen Angst-assoziierten Parametern [18]. Andere Autoren fanden heraus, dass männliche C57B/6 und BALB/c Mäuse in der Versuchsgruppe mit Nistmaterial [72, 75] ein höheres Körpergewicht aufwiesen, ebenso wie männliche ICR-Mäuse, die eine Leiter und Hindernisse als EE zur Verfügung hatten [76]. Die genannte Studie von Augustsson et al. [72] untersuchte den Effekt von EE in drei Kohorten, fand jedoch keine Unterschiede zwischen den Kohorten und das Körpergewicht war der einzige der untersuchten Parameter (Körpergewicht, Futter- und Wasseraufnahme und Verhalten: „light/dark-test“), der durch EE beeinflusst wurde. In einer Studie von Pasalic et al. wurde der Einfluss von EE auf die Ergebnisse eines Mausmodells für allergisches Asthma untersucht und es wurde festgestellt, dass die Mäuse auf Nistmaterial, nicht aber auf Plastiktunnel mit erhöhten allergischen Entzündungsparametern reagierten [77], hier betrug die Gruppengröße allerdings nur $n = 6-8$.

Demgegenüber fanden andere Autoren keine Hinweise auf einen Einfluss von Nistmaterial (und Papphäuschen [27]) auf das Verhalten [27, 75] und einige physiologische Parameter [75]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass einfache EE-Gegenstände wie Nistmaterial [48], Unterschlupf [40], Unterschlupf kombiniert mit einer Klettervorrichtung [60] oder ein Labyrinth [58] eine erhöhte Aggressivität zwischen männlichen Tieren verursachen können. Neben negativen Konsequenzen für das Wohlbefinden, könnte eine erhöhte Aggressivität infolge des damit verbundenen Stresses auch zu Veränderungen in der Physiologie führen. Allerdings zeigten Wirz et al. in ihrer Studie, dass ein Unterschlupf an männlichen und weiblichen Mäusen zweier Stämme weder verhaltensbiologische noch physiologische Parameter veränderte [78].

2.2.2 Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter

Wie bereits erwähnt (vgl. 2.1.1.), ist das Ziel einer Standardisierung der Haltung von Versuchstieren, deren genetische und phänotypische Variabilität und damit die Anzahl an Tieren zu reduzieren, die benötigt werden um eine wissenschaftliche Hypothese auch statistisch überprüfen zu können (vgl. 2.1.1). Neben dieser Senkung der intra-experimentellen Variation kann auch die Vergleichbarkeit zwischen Studien verschiedener Forschungseinrichtungen erhöht und die inter-experimentelle Variation gesenkt werden [79].

Obwohl einige EE-Strategien generell das Wohlbefinden der Tiere nachweislich zu verbessern scheinen [7, 47], wurde in Hinblick auf die Forschung allerdings die Sorge geäußert, dass Veränderungen der Haltungsumwelt durch EE zu mehr Variabilität in den Versuchsergebnissen und damit zu einer Erhöhung der benötigten Tierzahlen führen könnte, um eine angemessene statistische Teststärke zu erreichen [10-12]. Wäre dies tatsächlich der

Fall, würden Studien bei gleicher Tierzahl nach Änderung der Haltungsumgebung nicht mehr reproduzierbar sein.

Einige Studien haben den Einfluss von EE auf die Variabilität der Ergebnisse untersucht, aber die daraus gewonnenen Erkenntnisse sind heterogen. Die untersuchten Gruppengrößen lagen bei den Studien zwischen $n=8-36$ und es handelte sich um Einzelstudien (Untersuchung einer Kohorte), wenn nicht im Folgenden anderweitig beschrieben.

Eine Erhöhung der Streuung konnte z.B. in Untersuchungen mit Ratten nachgewiesen werden. Eskola et al. zeigten, dass das Einbringen von einem Block oder einem Tunnel aus Espenholz als EE bei Ratten die Variation bei manchen Parametern stark erhöhte [10]. Es wurde dann auf Grundlage der Ergebnisse eine Tierzahlberechnung durchgeführt, bei der ein Unterschied von 20 % bei einer Teststärke von 0,9 und einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ % nachgewiesen werden sollte und es wurde festgestellt, dass sich die benötigte Tierzahl bei manchen Parametern bei Einsatz von EE deutlich erhöhte. Auch Mering et al. fanden, dass durch EE in Form eines Espenholz-Blocks bei Ratten manche Parameter in ihrer Streuung beeinflusst wurden [80]. Auch bei Mäusen wurde die Variationskoeffizienten einiger Parameter (Körper-, Milz- und Nierengewicht, hämatologische Parameter [11], sowie "Open Field"- und "Food Drive-Test" [12]) durch das Einbringen von EE erhöht. Der Einfluss von EE auf die Variabilität schien dabei abhängig von Stamm und untersuchtem Messparameter [11, 12] zu divergieren.

Allerdings ergaben andere Studien keine Veränderungen der Variabilität durch verschiedene EE-Objekte [27, 72, 81]. Wolfer et al. [82] fanden in einer groß angelegten Studie heraus, dass EE die Variabilität bei 19/20 Parametern aus vier Verhaltenstests bei weiblichen Tieren der Stämme C57Bl/6j und DBA/2, sowie bei deren F₁-Hybriden nicht erhöhte. Die Studie wurde in drei verschiedenen Forschungseinrichtungen und in jeweils 3 Replikaten durchgeführt. Der Einfluss von EE auf die Variabilität in einigen verhaltensbiologischen Tests wurde auch von Lewejohann et. al in zwei unterschiedlichen Forschungseinrichtungen untersucht und die Variationskoeffizienten waren bei den EE-Gruppen unverändert oder verringert [83]. Nur in den zuletzt genannten Studien zur Auswirkung von EE auf die Variabilität verhaltensbiologischer Parameter wurde die Reproduzierbarkeit durch die Untersuchung in mehreren Replikaten bzw. in mehreren Forschungseinrichtungen untersucht, bei den anderen Studien ist die Reproduzierbarkeit und der mögliche Einfluss anderer Parameter bspw. der Versuchsdurchführung ungewiss.

2.3 Auswirkungen der Haltungsbedingungen auf das Tierwohl

2.3.1 Definition und Relevanz von „Tierwohl“ bei Versuchstieren und Tierwohl-assozierte Parameter

Mellor und Reid definieren Tierwohl oder Wohlbefinden („good welfare“) als „Zustand eines Tieres, in dem seine Ernährungs-, Umwelts-, Gesundheits-, Verhaltens- und mentalen Bedürfnisse erfüllt sind“ [84]. Diese Definition gibt im Prinzip die fünf Freiheiten wieder, die erstmalig vom britischen Nutztier-Tierwohl-Rat („farm animal welfare council“) formuliert

wurden und auch heute noch die ethische Grundlage für von diesem Rat ausgesprochene Empfehlungen darstellen [85]:

1. Freiheit von Hunger und Durst,
2. Freiheit von Diskomfort, indem eine angemessene Umgebung zur Verfügung steht, die Rückzugs- und Ruhemöglichkeiten bietet,
3. Freiheit von Schmerz, Verletzung und Krankheit,
4. Freiheit, normales Verhalten zu zeigen, indem genügend Platz, angemessene Haltungsanlagen und Artgenossen zur Verfügung gestellt werden,
5. Freiheit von Angst und Distress.

Diese Freiheiten stellen eine Grundlage dar, um Tierleid zu vermeiden [85].

Prescott und Lidster weisen darauf hin, dass bei Labortieren versuchsbedingte Schmerzen, Verletzungen, Krankheiten und auch Angst und Distress nicht immer vollständig vermieden werden können, nichtsdestotrotz aber auch hier angemessene Verbesserungsmaßnahmen im Sinne der 3-R angewendet werden müssen, um unnötigen Schaden auf ein Minimum zu reduzieren [86]. Neben den genannten Freiheiten hängt das Wohlbefinden aber auch davon ab, ob ein Tier die Umweltbedingungen, in denen es lebt, bewältigen („coping“) und kontrollieren kann [29, 45, 86].

Die Konsequenzen von unnötig beeinträchtigtem Tierwohl betreffen nicht nur Ethik, Recht, Ansehen und öffentliches Vertrauen in die tierexperimentelle Forschung, sondern auch die Qualität, Validität und Reproduzierbarkeit der wissenschaftlichen Ergebnisse [86].

Tiere, deren Wohlbefinden beeinträchtigt ist, können Störungen in Verhalten, Physiologie und Immunologie zeigen [86]. Gute wissenschaftliche (Versuchstier-) Praxis setzt aber normale und (von Verhalten und Physiologie her) gesunde Versuchstiere voraus.

Um Tierwohl zu beurteilen, schlagen Hawkins et al. [87] vor, das ‚ideale‘ Wohlbefindenslevel („ideal welfare state“) zu definieren, das erreicht ist, wenn die Ernährungs-, Umwelt-, Gesundheits-, Verhaltens- und mentalen Bedürfnisse der Tiere erfüllt werden [84]. Dieses „ideale“ Wohlbefindenslevel umfasst demnach drei Hauptkomponenten, von denen jeweils Tierwohl-Indikatoren abgeleitet werden können:

- Körperstatus: umfasst als wesentliche Indikatoren Körpergewicht, Haltung, Fellzustand,
- Physiologischer/biochemischer Status: beinhaltet als relevanten Parameter das Stresshormonlevel (Corticosteron),
- Psychologischer Status: wird charakterisiert durch das Verhalten; Indikatoren sind Verhaltensänderungen wie erhöhtes Aggressionsverhalten, Zurückziehen, Stereotypien, veränderter Umgang mit EE.

Baumans zeigt in ihrem Review zwei Wege der Beurteilung des Wohlbefindens auf [13]. Idealerweise sollte demnach ein positiver Ansatz gewählt werden, bei dem durch Präferenzstudien untersucht wird, welche Ressourcen notwendig sind, um das Wohlbefinden zu steigern. Ebenso sind nach Baumans Verhaltensbeobachtungen hierfür

geeignet. Präferenzuntersuchungen haben ihrer Meinung nach allerdings auch Limitationen, da sie nicht unbedingt die Langzeit-Prioritäten beschreiben, die Tiere unter Umständen zwischen ethologisch wertlosen Bedingungen wählen lassen oder die Wahl für die Tiere zu komplex ist [13]. Deshalb sollten Präferenzstudien auch mit Studien zur Motivationsstärke kombiniert werden [7]. Allerdings können Tiere-genau wie Menschen-auch Entscheidungen treffen, die nicht unbedingt gesundheitsförderlich sind [22, 24, 49]. Ein präferierter Gegenstand führt somit nicht zwangsläufig zu einem nachhaltig erhöhten Wohlbefinden der Tiere [88] und es sollten Studien durchgeführt werden, die untersuchen, ob die präferierte Umgebung tatsächlich das Wohlbefinden positiv beeinflusst [49].

Der zweite, von Baumans dargestellte Weg zur Beurteilung von Wohlbefinden ist der negative Ansatz, bei dem im Prinzip der gescheiterte Bewältigungsversuch („failure of coping“) und das sich daraus ergebende Unbehagen („discomfort“) gemessen wird. Hierzu gehören Verhaltensparameter (z.B. abnormes Verhalten, Haltung, plötzliche Angst oder Aggression, Vokalisation, verändertes Putzverhalten, veränderte Aktivität), physiologische Parameter (Gewichtsverlust, verminderte Nahrungsaufnahme, Durchfall, respiratorische und kardiovaskuläre Veränderungen, veränderte Stresshormonlevel und Immunsystemparameter) und post-mortem-Parameter (Fettdepots, Organgröße, Infektionen, Magengeschwüre und Dehydratation) [13].

In einer Veröffentlichung von Burkholder et al. wird die Gesundheits- und Wohlbefindensbeurteilung von Versuchsmäusen aufgeteilt in eine Beurteilung im Heimkäfig („home cage evaluation“) und eine Einzeltieruntersuchung („hands-on examination“) [89]. Bei der Beurteilung im Heimkäfig stehen das generelle Verhalten und das Ausüben speziesspezifischer Verhaltensweisen wie Nestbau im Fokus, während bei der Einzeltieruntersuchung morphologische und gesundheitliche Auffälligkeiten entdeckt werden können. Auch Spangenberg und Keeling schlagen eine Einzeltier-basierende Beurteilung des Wohlbefindens vor [90].

Laut Hawkins et al. müssen zur Beurteilung des Tierwohls normalerweise nicht alle Parameter erhoben werden, jedoch muss eine gut überlegte Auswahl getroffen werden, da einzelne physiologische Parameter sowohl auf positive Aufregung infolge von Spielverhalten, wie auch auf negative Stimuli reagieren und insbesondere Nagetiere häufig keine für den menschlichen Betrachter offensichtlichen Verhaltensänderungen infolge von Belastung zeigen [87]. Um Interpretationsschwierigkeiten zu vermeiden und ein möglichst detailliertes und umfassendes Bild der Tierwohl-Situation zu erhalten, empfehlen sie deshalb eine Kombination von Indikatoren der drei Hauptkomponenten (s.o.).

2.3.2 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf ausgewählte Tierwohl-assozierte Parameter

Das in dieser Studie eingesetzte EE, d.h. Nistmaterial und ein Unterschlupf, sind für Mäuse wichtige Ressourcen [53] und werden in Präferenzstudien generell bevorzugt [7]. Allerdings kommen Hutchinson et al. in ihrem Review zu dem Schluss, dass Studien benötigt werden, die einzelne EE-Schemas untersuchen, die praktikabel, finanziell tragbar und förderlich für

das Tierwohl sind, dabei aber minimalen (negativen) Einfluss auf Forschungsergebnisse zeigen [49]. Ihrer Meinung nach obliegt es dem Forscher, die Ergebnisse von Präferenztests mit Studien zu verknüpfen, die das Tierwohl beurteilen, um zu beweisen, dass die bevorzugte Umgebung sich auch positiv auf das Wohlbefinden auswirkt.

In der vorliegenden Studie wurden zur Beurteilung des Wohlbefindens Parameter aus allen drei Hauptkomponenten nach Hawkins et al. [87] (vgl. 2.3.1) untersucht, nämlich das Körpergewicht, sowie der allgemeine Gesundheitszustand (Hauptkomponente Körperstatus), Corticosteron als Stressparameter (Hauptkomponente physiologischer / biochemischer Status) und Verhaltensauffälligkeiten wie gesteigerte Aggression, zwanghaftes Haare-Ausreißen („Barbering“) und Stereotypien (Hauptkomponente psychologischer Status). Verhaltensauffälligkeiten wurden im Zuge der wöchentlichen Gesundheitsuntersuchung beurteilt und dokumentiert. Zusätzlich wurde geprüft, ob speziesspezifisches Verhalten mithilfe des EE (Nest-Score) ausgeführt wurde. Im Zuge der pathologischen Untersuchung wurden post mortem wichtige Organgewichte untersucht.

2.3.2.1 Körpergewicht

Stress kann zu einem vermindertem Wachstum und Gewichtsverlusten führen [45]. So wurde gezeigt, dass chronischer Stress durch Einschränkung der Bewegung bei Mäusen zu starken Gewichtsverlusten führt [91], aber auch Transportstress [92] sowie die Haltung in metabolischen Käfigen [93] können Veränderungen des Körpergewichts hervorrufen. In Studien, die u.a. den Effekt von EE auf das Körpergewicht untersuchten, ergab sich, dass die Tiere mit EE entweder höhere Körpergewichte als die Kontrollen aufwiesen [72, 75, 76] oder kein Unterschied zwischen den Gruppen bestand [74] (vgl. 2.2.1.2).

2.3.2.2 Allgemeiner Gesundheitszustand

Verschiedene Autoren [13, 89, 90] schlagen als wesentlichen Punkt die Beurteilung des allgemeinen Gesundheitszustandes zur Sicherstellung eines guten Wohlbefindens von Labortieren vor (vgl. 2.3.1). In dem vorliegenden Projekt wurde deshalb wöchentlich eine tierärztliche Allgemeinuntersuchung in Anlehnung an die genannten Studien durchgeführt und die Ergebnisse wurden dokumentiert. Es gibt jedoch keine Untersuchungen, wie sensibel diese gesundheitsbezogenen Parameter ein beeinträchtigtes Wohlbefinden anzeigen.

Im Zuge der Allgemeinuntersuchung wurde auch die Inzidenz von Hautverletzungen, die auf Bisse infolge von Aggressionsverhalten zurückzuführen sind, dokumentiert. Es wurde beschrieben, dass EE das Aggressionsverhalten in Mausgruppen, insbesondere bei männlichen Tieren bestimmter Stämme steigert [15, 40, 58-60]. Obwohl die Anzahl der untersuchten Mäuse in diesen Studien ≥ 10 betrug, lag die Anzahl der untersuchten Käfige bei einigen Studien [15, 40, 48, 60] nur zwischen 3 und 5. Eine gesteigerte Aggressivität innerhalb des Käfigs wirkt sich allerdings häufig auf alle Insassen aus, weshalb der Käfig als Untersuchungseinheit berücksichtigt werden muss.

In den genannten Studien zeigt sich, dass vor allem Gegenstände problematisch zu sein scheinen, die von einzelnen Individuen als Ressource monopolisiert werden können, wie

Unterschlüpfen [40], Unterschlüpfen in Kombination mit einem Klettergerüst [60], Unterschlupf mit Laufrad [15] oder Strukturen, die Fluchtmöglichkeiten erschweren wie ein Labyrinth [58, 59]. Haemisch et al. untersuchten in zwei Studien $n = 33$ Mäuse (in 11 Käfigen, aufgeteilt auf 2 Kohorten) und konnten zeigen, dass ein Labyrinth als EE (in Abhängigkeit vom Dominanzstatus der Mäuse) zu einer Steigerung des Aggressionsverhaltens und stressrelevanter Parameter (Plasma-Corticosteron und verminderte Körpergewichtsentwicklung) bei männlichen DBA/2-Mäusen führte [58, 59]. Nistmaterial wird hingegen von vielen Autoren auch für männliche Tiere zur Verbesserung des Wohlbefindens empfohlen [2, 7, 23]. Kaliste et al. fanden aber heraus, dass bei männlichen NIH-Mäusen die Gruppe nur mit Nistmaterial im Vergleich zu Gruppen mit Nistmaterial und Unterschlupf bzw. Nistmaterial und Tunnel deutlich mehr Verletzungen sowie veränderte stressrelevante Parameter (Körpergewichtsentwicklung, Organengewichte) aufwies, was auf ein erhöhtes Aggressionslevel bei diesen Tieren hindeutete [48]. In dieser Studie wurden $n = 16$ Tiere pro Gruppe (in jeweils 4 Käfigen) untersucht. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass EE hinsichtlich seiner Eignung als Faktor zur Verbesserung des Wohlbefindens, insbesondere bei Mausstämmen, die bekanntermaßen als aggressiv eingeschätzt werden, genau untersucht und evaluiert werden muss.

Aggressionsverhalten ist ein natürliches Verhalten von Mäusen, das zur Verteidigung von Territorien und den darin enthaltenen Ressourcen gezeigt wird [94]. Es ist jedoch unklar, ob das Auftreten von Aggressionen bei Mäusen in der Labortierhaltung auf ein Scheitern der Dominanzstrukturen innerhalb des Käfigs oder auf territoriale Aggressionen zurückzuführen ist oder aber die Reaktion auf aversive Stimuli wie Schmerz oder Frustration darstellt [95].

Davon abzugrenzen sind Verhaltensauffälligkeiten, die mit Veränderungen der Psychologie, Hirnentwicklung und Neurochemie einhergehen und unter dem Begriff *malfunctionale Verhaltensweisen* („malfunctional behaviors“) zusammengefasst werden [29]. Diese werden häufig durch aversive Stimuli der Haltungsumgebung hervorgerufen [29] und sollen im folgenden Punkt ausführlicher dargestellt werden.

2.3.2.3 Stereotypien und Fur-Score

Spezies-spezifisches Verhalten ermöglicht es Tieren, ihre physikalische und soziale Umgebung zu kontrollieren, zu modifizieren und adäquat auf Stressoren zu reagieren und diese möglichst zu bewältigen [7]. Eine Haltungsumgebung, die für die Tiere chronische, aversive Stimuli beinhaltet, gleichzeitig aber eine spezies-spezifische Reaktion und dadurch die Anpassungsreaktion und damit die Stressbewältigung verhindert, kann zu einer Entwicklung von Verhaltensstörungen führen [29, 96]. Ebenso kann das Verhindern hochmotivierter Verhaltensweisen, die für das Überleben oder die Reproduktion in der Wildnis essentiell wären, in einer suboptimalen Haltungsumgebung abnormes Verhalten begünstigen [7, 29].

Zu solchen abnormen, meist repetitiven Verhaltensweisen („abnormal repetitive behavior“, ARB) zählen Stereotypien (z.B. Kreislaufen, Springen,) und Zwangsstörungen („impulsive / compulsive behavior“), wie pathologisches Haare-Ausreißen („barbering“) [29].

Stereotypien sind unangemessene, gleichbleibende Wiederholungen von bestimmten Bewegungsabläufen oder Körperhaltungen, denen weder Ziel noch Funktion zugeschrieben werden kann [29]. Barbering beinhaltet dagegen ein flexibles und zielgerichtetes Verhaltensmuster [97] und es wird vermutet, dass sich auch die zugrundeliegenden neurologischen Zusammenhänge von denen der Stereotypie unterscheiden [98]. Darum wird Barbering den impulsiv / compulsiven Verhaltensweisen zugeordnet [99]. Verschiedene Studien deuten außerdem auf Ähnlichkeiten des Barberings zur Trichotillomanie des Menschen hin, die durch zwanghaftes Haare-Ausreißen idiosynkratischer Muster gekennzeichnet ist [100-102].

Generell sollten Verhaltensstörungen immer als Warnzeichen für potenzielles Leiden wahr- und ernstgenommen werden [103], auch wenn ihre Ursachen und zugrundeliegenden Mechanismen nicht vollständig erforscht sind. Aufgenommene Haare und Vibrissen in der Mundhöhle des Barbers können schmerzhaft Abszesse verursachen [104] und dadurch dessen Wohlbefinden beeinträchtigen. Das Ausreißen von (Schnurr-) Haaren ist außerdem schmerzhaft [97], und die „rasierten“ Tiere weisen degenerative Veränderungen der somatosensorischen, kortikalen Bereiche des Hirns, die mit den Schnurrhaaren assoziiert sind [97], auf. Da die Schnurrhaare für die Wahrnehmung der Maus von zentraler Bedeutung sind [105], spiegelt dies wahrscheinlich eine ernstzunehmende Beeinträchtigung des Wohlbefindens wider [100].

Viele Studien haben gezeigt, dass EE das Auftreten von abnormem Verhalten reduzieren kann [32, 96, 106, 107]. Allerdings ist nicht vollends geklärt, welche Umwelt- und andere Faktoren für die Entwicklung einer Verhaltensauffälligkeit verantwortlich sind. So entwickeln manche Individuen abnorme Verhaltensweisen, und andere nicht, obwohl bei ihnen der Stamm, das Geschlecht, das Alter und die Haltungs- und Pflegebedingungen gleich sind und sie sogar im gleichen Käfig sitzen. Ebenso kann die Stärke des abnormen Verhaltens sehr unterschiedlich sein [29]. Manche Arten von EE scheint Stereotypien noch verstärken zu können [108]. Die Rolle eines Laufrads für die Entwicklung von Stereotypien ist ebenfalls noch nicht hinreichend geklärt [109-111].

Es gibt verschiedene Ansätze, abnormes Verhalten zu verhindern oder zu reduzieren und einer davon ist die Anwendung von EE [112]. So konnte ein Papptunnel bei erwachsenen Mäusen (n = 16) das Auftreten von Gitternagen um etwa 40 % senken [96]. In zwei weiteren Studien (n = 28 bzw. 20 [106] und n = 10 [107]) wurde außerdem gezeigt, dass die Haltung mit Super-EE stereotypes Verhalten bei Mäusen im Vergleich zur Haltung mit wenig oder keinem EE deutlich reduzierte. Bechard et al. zeigten, dass EE in Form verschiedener Nistmaterialien, sowie eines roten Maus-Iglus und zusätzlich wechselnden Gegenständen das erstmalige Auftreten von Barbering-induzierter Alopezie („barbering induced alopecia“) verzögerte, sowie die Prävalenz und den allgemeinen Schweregrad der Haarlosigkeit

verminderte [32]. Dabei wurden n = 9 Käfige (EE-Versuchsgruppe) bzw. n = 8 Käfige (Kontrollgruppe) mit jeweils 2-3 Tieren pro Käfig untersucht. Ein sogenannter „Fur-Score“ eignet sich, um die Prävalenz und die Stärke des abnormen Verhaltens zu erheben [32] (s. 3.4.3.).

2.3.2.4 Nutzung des Environmental Enrichment (Nest-Score)

Motiviertes Verhalten stellt zusammen mit der Erhebung physiologischer Daten einen nützlichen Indikator dar, um herauszufinden, was die Prioritäten von Tieren sind welche Anforderungen sich daraus für die Haltungsbedingungen ergeben [113]. Da Mäuse hochmotiviert sind ein Nest zu bauen, wenn ihnen adäquates Material zur Verfügung steht [114-116], wurde der Nestbau als ethologisch relevanter Indikator für das Tierwohl erkannt und entsprechende Systeme zur Evaluation des Nestes, das sog. „Nest-Scoring“ entwickelt. Es konnte auch gezeigt werden, dass sich ein beeinträchtigtes Wohlbefinden der Tiere (nach OPs, Aggression und Kältestress) durch niedrigere „Nest-Scores“ äußerte [117, 118] (s. 3.4.5).

2.3.2.5 Corticosteron

Eine der am besten erforschten neuroendokrinen Antworten auf Stress ist die Aktivierung der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse (HHN-Achse), die die Ausschüttung von Steroidhormonen in der Nebenniere zur Folge hat [45]. Die langfristige Aktivierung der HHN-Achse durch chronischen Stress beeinträchtigt viele biologische Funktionen, z.B. Immunkompetenz, Reproduktion, Metabolismus und Verhalten [45]. Kortikosteroide zählen zu den klassischen Parametern der Stressbewertung, da generell ein direkter Zusammenhang zwischen der Dauer und Intensität eines Stressors und der Veränderung der Plasma-Glukokortikoid-Konzentration festzustellen ist [119].

Bei Nagetieren wird normalerweise Corticosteron als Indikator für Stärke und Auswirkungen eines Stressors untersucht [120]. Die Messung von Corticosteron ist in verschiedenen Körperflüssigkeiten (Plasma, Speichel, Urin, Faeces) möglich. Insbesondere bei der Analyse von Blutproben ergeben sich allerdings Schwierigkeiten [121], da die Ausschüttung von Glukokortikoiden in den Blutkreislauf innerhalb von Minuten erfolgt und einen raschen Konzentrationsanstieg um den Faktor zehn oder mehr verursacht [122, 123]. Es ist darum schwierig, sicherzustellen, dass nicht bereits die Blutentnahme an sich die Messwerte beeinflusst, denn auch schon das Handling der Tiere, ein Käfigwechsel und die Einschränkung der Bewegungsmöglichkeiten lösen eine deutliche Ausschüttung von Glukokortikoiden in die Blutbahn aus [124]. Außerdem stellen die geringe Blutmenge (insbesondere bei kleinen Tieren) und die invasive Probenahme limitierende Faktoren dar, wodurch nur eine begrenzte Anzahl an Proben untersucht werden kann [121]. Können allerdings nur einzelne Messwerte erhoben werden, ist deren Interpretation unter Umständen fehlleitend, weil Glukokortikoide diurnale, annuale und andere periodische Schwankungen in ihren Konzentrationen aufweisen [125, 126].

Dagegen können bei der Untersuchung nicht-invasiv gewonnener Proben viele Proben über einen längeren Zeitraum analysiert werden. Allerdings ist dabei zu beachten, dass sich eine

Verzögerung der Ausscheidung nach Einwirken des Stressors ergibt, da das Corticosteron vor der Ausscheidung über Urin oder Faeces zunächst metabolisiert wird. Diese beträgt bei Faeces etwa 4 bzw. 10 Stunden abhängig von der Tageszeit, zu der gemessen wird und bei Urin 2 Stunden [127]. Über den Kot werden vorrangig Metaboliten ausgeschieden [127], während die Glukokortikoide im Urin kaum degradiert sind [128]. Ein Nachteil der Bestimmung von Corticosteron aus Faeces ist, dass die Steroide, wahrscheinlich aufgrund der Anwesenheit einer Vielzahl von Bakterien, sehr anfällig sind, zu degradieren [129, 130] und damit die Messwerte je nach Dauer der Lagerung der Proben nach der Probennahme schwanken können [129]. Die heterogene Matrix des Kots kann außerdem Interaktionen mit dem Immunoassay hervorrufen und erfordert eine Aufreinigung, bevor der Corticosterongehalt bestimmt werden kann.

Es werden kommerziell erhältliche Immunoassay-Kits angeboten, die jedoch häufig nur für eine bestimmte Tier- und Probenart validiert sind. Bei Anwendung an einer anderen Spezies oder mit anderem Probenmaterial muss eine Validierung des Assays für die spezielle Probenmatrix in der Zielspezies durchgeführt werden [130].

In einigen Studien wurde Corticosteron als Stressindikator für verschiedene Haltungsbedingungen untersucht. So wurde gezeigt, dass ein Unterschlupf im Vergleich zu Nistmaterial oder fehlendem EE bei männlichen Mäusen ($n = 15$) zu einer Erhöhung von (Urin-) Corticosteron und anderen Stressparameters führte [40]. In einer anderen Studie wurden $n = 30$ männliche Mäuse untersucht und es zeigte sich, dass sowohl bei BALB/c als auch bei CD-1-Mäusen die Gruppe mit Nistmaterial, welches teilweise beim Käfigwechsel mit transferiert wurde, im Vergleich zu der Gruppe ohne EE niedrigere Corticosteronwerte im Urin und schwerere Thymi aufwies, was ein Hinweis auf reduzierte Stresslevel ist [131]. Auch Stress, der durch einen gestörten Lichtzyklus ausgelöst wurde, konnte unter anderem durch Änderungen der Urin-Corticosteronkonzentrationen bei insgesamt $n = 30$ männlichen BALB/c-Mäusen (in zwei Kohorten gemessen) pro Versuchsgruppe dargestellt werden, während keine Unterschiede zwischen mit Nistmaterial angereicherten und ohne EE gehaltenen Tieren festgestellt wurde [132].

2.4 Zusammenfassung

Die wissenschaftliche Literatur, die sich mit der Untersuchung der Effekte von EE beschäftigt, ist umfangreich. Trotzdem fällt es schwer, den Einfluss von EE auf Mittelwerte, Variabilität und das Wohlbefinden der Mäuse abzuschätzen, da die Literatur zum Großteil auf Studien basiert, die die Effekte von EE unter sehr spezifischen Bedingungen hinsichtlich untersuchtem Stamm, Geschlecht und EE-Material und meistens als Einzelstudie (eine Kohorte) erforschen. Allerdings scheinen die Mittelwert-Effekte von EE abhängig vom Mausstamm [16, 17], Geschlecht [19], Zeitpunkt und Dauer [20], Art und Kombination des Materials [15] und dem gemessenen Parameter [12] zu variieren. Die Reproduzierbarkeit wurde in dem Großteil der Studien dabei nicht untersucht und die Übertragbarkeit auf andere Stämme, Geschlechter oder Altersgruppen ist ungewiss [22].

Auch in Bezug auf Veränderungen der Variabilität sind die Ergebnisse der Literatur heterogen. Einige Autoren fanden heraus, dass die Variabilität einiger Parameter bei Tieren in angereicherter Umgebung erhöht war [10-12, 80], während andere keine Effekte von EE auf die Streuung bestimmter Parameter beobachten konnten [27, 72, 74, 75].

Der Zweck des Einsatzes von einfachem EE ist es, durch eine artgerechte Haltungsumgebung das Wohlbefinden der Tiere zu verbessern. Doch selbst einfaches EE kann schon vermehrt zu Aggressionsproblemen innerhalb der Tiergruppe führen [15, 40, 48, 58-60], potentiell das Tierwohl beeinträchtigen und physiologische Parameter verändern.

Der unbedachte Einsatz von EE ohne genaue Kenntnis seiner Effekte auf die Physiologie des Versuchstieres birgt somit die Gefahr, dass ältere Studien, die unter damals reizarmen „Standard“-Bedingungen durchgeführt wurden, nicht mehr vergleichbar sind mit Studien, bei denen der heutige „Standard“ mit zumindest einem Minimum an EE angewandt wurde. Überdies könnte eine unerwartet höhere Variabilität der Daten zu unklaren oder sogar falschen Ergebnissen führen, wenn die statistische Planung von einer niedrigeren Streuung ausgeht. Deshalb ist die genaue Evaluierung vonaltungsbedingungen unabdingbar [23, 24].

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in einem systematischen und standardisierten Versuchsansatz, herauszufinden, welchen Effekt einfaches EE in Form von Nistmaterial bzw. Nistmaterial und Unterschlupf im Vergleich zu früherer „Standard“-Haltung ohne EE auf den Mittelwert und die Variabilität eines großen Spektrums physiologischer, biomedizinisch relevanter Messparameter hat. Zur Überprüfung des Wohlbefindens der Tiere wurden über den gesamten Testzeitraum zusätzlich das Körpergewicht, der Gesundheitszustand, der „Fur-Score“, der „Nest-Score“ und die Urin-Corticosteronkonzentration ermittelt. Die Studie wurde mit männlichen und weiblichen Mäusen zweier Inzucht-Stämme (C57BL/6N und DBA2/N) in drei Durchgängen ausgeführt, wobei jeweils unabhängige Kohorten von Mäusen untersucht wurden.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere und deren Haltung

3.1.1 Hauptstudie

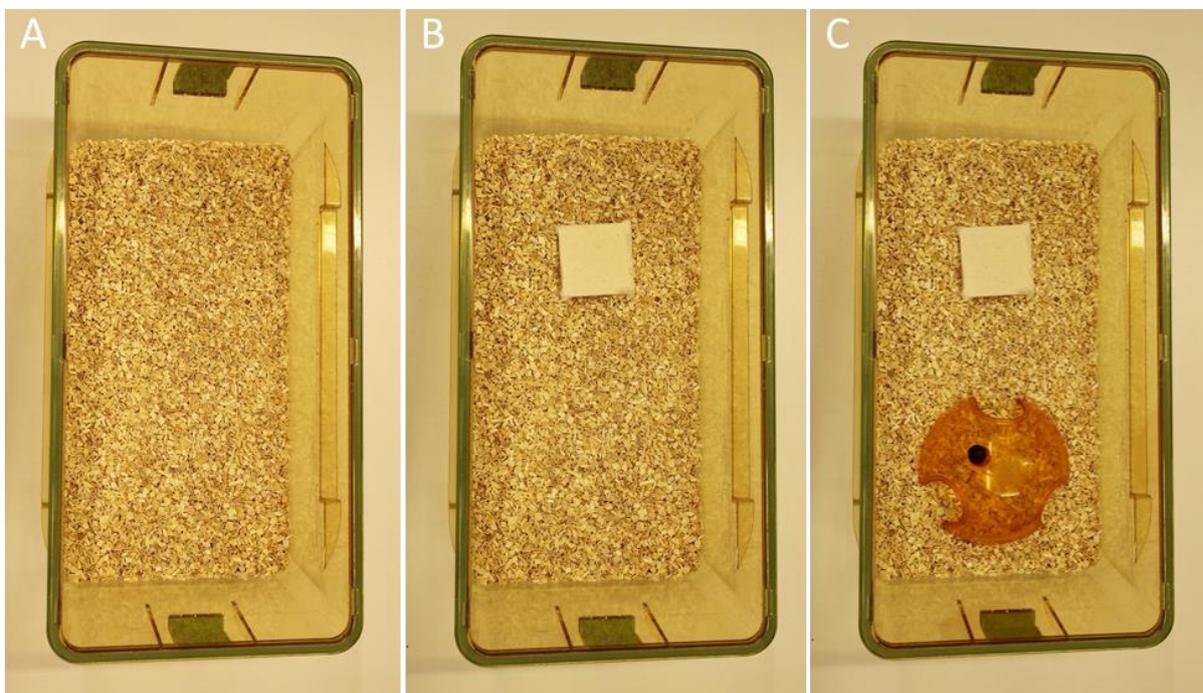
Die Hauptstudie für diese Arbeit wurde in der „Deutschen Mauslinik“ („German Mouse Clinic“, GMC) am Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt (HMGU) in Einklang mit deutschem Tierschutzrecht und nach Genehmigung durch die Regierung Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2532-199-13) durchgeführt.

Eine Gesamtzahl von 360 Mäusen beiderlei Geschlechts der Stämme C57BL/6NTac (B6; Taconic, Dänemark) und DBA/2Ncrl (D2; Charles River, Deutschland) wurden in dieser Studie verwendet. Über einen Zeitraum von 13 Monaten wurden drei unabhängige Kohorten von jeweils 60 Mäusen (30 männlich, 30 weiblich) eines jeden Stammes untersucht (Tabelle 2). Die Tiere wurden jeweils im Alter von drei Wochen geliefert. Direkt nach der Ankunft wurden sie gewogen, mit Ohrmarkierungen versehen und nach einem stratifizierten Randomisierungsschema den Versuchsgruppen zugeordnet. So wurde sichergestellt, dass die Versuchsgruppen hinsichtlich des Körpergewichts zu Beginn der Studie möglichst einheitlich waren. Die Mäuse wurden in einzelbelüfteten Käfigsystemen (Sealsafe plus, GM 500, Tecniplast, Buggugiate, Italien) in Gruppen von jeweils 5 gleichgeschlechtlichen Tieren auf Labortiereinstreu (Lignocel ³/₄S, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland), mit *ad libitum* Zugang zu gamma-bestrahltem Futter (Altromin 1314, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland) und steril-filtrierte Wasser gehalten. Den EE-Gruppen standen zusätzlich Nistmaterial in Form eines Nestlets (PLEXX, Artikel-Ref. 14010, Gruppe 'Nest') oder ein Nestlet und ein oranges Plastik-Maus-Iglu (PLEXX, Artikel-Ref. 13100, Gruppe 'Double') als Unterschlupf zur Verfügung, während die Kontrollgruppe ('Kontrolle') keine EE-Gegenstände bekam (Abbildung 2). Wöchentlich wurden die Käfige gewechselt und das EE erneuert, wobei von dem gebrauchten Nistmaterial jeweils ein Teil mit in den neuen Käfig transferiert wurde. Die Mäuse wurden in einem vollklimatisierten Tierhaltungsraum unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF-) Bedingungen bei einer Temperatur von 22±2°C, einer Luftfeuchte von 45-65 % und einem 12/12 Stunden Lichtzyklus gehalten.

Tabelle 2. Übersicht über die Versuchsgruppen der Hauptstudie in der GMC.

Stamm	B6						D2					
	Kontrolle		Nest		Double		Kontrolle		Nest		Double	
Experimentelle Gruppe												
Geschlecht	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w
Kohorte 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Kohorte 2	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Kohorte 3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Insgesamt wurden 360 Mäuse beiderlei Geschlechts (m = männlich, w = weiblich) zweier Stämme (C57BL/6NTac [B6], Taconic, Dänemark; DBA/2NCRl [D2], Charles River, Deutschland) jeweils einer von drei experimentellen Gruppen verschiedener Haltungsbedingung (Kontrolle, Nest, Nest + Haus [„Double“]) entsprechend der Tabelle zugeordnet. Ein Durchgang des Experiments spiegelt jeweils eine Kohorte wider (Kohorte 1, Kohorte 2, und Kohorte 3). Für jeden Stamm besteht eine Kohorte aus 6 Gruppen mit n = 10 Tieren.

**Abbildung 2. Haltungsbedingungen der drei experimentellen Gruppen.**

A: Gruppe „Kontrolle“, B: Gruppe „Nest“, C: Gruppe „Double“

3.1.2 Validierungsexperimente

Im Tierbereich „E-Streifen“ des HMGU wurden in nicht-invasiven, nicht-genehmigungspflichtigen Untersuchungen Probenahmen für die Validierung des Corticosteron-Immunoassays (s. auch 3.4.4.4) durchgeführt. Hierzu wurden aus eigenen Zuchten stammende C57BL/6 (N und J)-Mäuse unterschiedlichen Alters und beider Geschlechter verwendet. Die Tiere wurden in einzelbelüfteten Käfigsystemen (Sealsafe plus, GM 500, Tecniplast, Buggugiate, Italien) in Gruppen von jeweils 2-5 gleichgeschlechtlichen Tieren auf Labortiereinstreu (Lignocel $\frac{3}{4}$ S, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland), mit *ad libitum* Zugang zu gamma-bestrahltem Futter (Altromin 1314, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland) und sterilfiltriertem Wasser gehalten. Als

Enrichment wurde ihnen Nistmaterial in Form eines Nestlets (PLEXX, Artikel-Ref. 14010) angeboten. Wöchentlich wurden die Käfige gewechselt und das EE erneuert, wobei von dem gebrauchten Nistmaterial jeweils ein Teil mit in den neuen Käfig transferiert wurde. Die Mäuse wurden in einem vollklimatisierten Tierhaltungsraum unter spezifiziert Pathogen-freien (SPF-) Bedingungen bei einer Temperatur von $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchte von 45-65 % und einem 12/12 Stunden Lichtzyklus gehalten.

3.2 Versuchsdesign der Hauptstudie (Untersuchung der physiologischen Parameter in der GMC)

Die GMC bietet in wissenschaftlicher Kooperation eine standardisierte und umfassende phänotypische Analyse von Mauslinien an. Für die vorliegende Arbeit wurden dort wesentliche physiologische Parameter in den Bereichen (den sog. „Screens“) Verhalten, Morphologie, Neurologie, klinische Blutchemie und Hämatologie, Auge, Allergie, Energie-Metabolismus, Schmerzwahrnehmung, Herz-Kreislauf und Pathologie erhoben (Abbildung 3). Bei allen in der GMC durchgeführten Untersuchungen wurde nach standardisierten Versuchsprotokollen verfahren [133-135] (www.mouseclinic.de).

Die Mäuse wurden im Alter von drei Wochen in den Tierhaltungsbereich der „Deutschen Mauslinik“ („German Mouse Clinic“, GMC) des Helmholtz Zentrum München importiert und randomisiert auf die drei Versuchsgruppen aufgeteilt. Es folgte eine Phase der Akklimatisation an die neue Haltungsumgebung. Die phänotypische Untersuchung der Mäuse begann im Alter von 9 Wochen.

Während des wöchentlichen Käfigwechsels wurden die Tiere gewogen und ihr Gesundheitszustand sowie das Auftreten von abnormem Verhalten anhand eines Score-Sheets beurteilt. Außerdem wurde zweimal in der Woche visuell die Nutzung des EEs beurteilt (Nest-Scoring). In den Wochen 5, 8, und 20 wurden Urinproben von jedem einzelnen Tier gewonnen, um deren Corticosterongehalt zu bestimmen.

	Alter (Wochen)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Screens	Tests															
Verhalten	Open field			■												
	Akustischer Schreckreflex und PPI				■											
Neurologie	modifiziertes SHIRPA, Kraftmessung			■												
	Rotarod				■											
Nocizeption	Wärmeplatte						■									
Dysmorphologie	anatomische Untersuchung						■									
Energiemetabolismus	indirekte Kalorimetrie, NMR							■								
Klinische Blutchemie	IpGTT								■							
Kardiovaskuläre Gesundheit	EKG, Echocardiographie									■						
Auge	Scheimpflug imaging, optokinet. Trommel										■					
Neurologie	ABR												■			
Dysmorphologie	DEXA													■		
Klinische Blutchemie	Klinische Blutchemie, Hämatologie															■
Allergie	BIOPLEX ELISA (Ig Konzentration)															■
Pathologie	Makro- und mikroskopische Analyse															■

Abbildung 3. Versuchsablauf zur Erhebung physiologischer Parameter.

3.3 Physiologische Parameter

Die physiologischen Parameter wurden in der German Mouse Clinic (GMC) erhoben (siehe auch 3.1.1).

3.3.1 Verhalten

3.3.1.1 Open Field Test (OFT)

Der OFT diente der Untersuchung der allgemeinen lokomotorischen Aktivität und der Ängstlichkeit. Dabei wurden die Mäuse in eine transparente Test-Arena der Maße 45,5 x 45,5 x 39,5 cm (ActiMot, TSE) gesetzt und ihr Verhalten und ihre Aktivität wurden mit Hilfe eines Rahmen-Lichtschrankensystems erfasst und an einen angeschlossenen Computer mit entsprechender Analyse-Software übermittelt. Die Lichtintensität betrug 150 Lux in den Ecken bzw. 200 Lux in der Mitte der Arena. 30 Minuten vor Beginn des Tests wurden die Mäuse in den Testraum gebracht, um sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Dann wurden sie für 20 Minuten in die Testarena gesetzt. Nach jeder Maus wurde die Test-Arena mit einem Desinfektionsmittel behandelt. Die folgenden Parameter wurden digital gemessen: zurückgelegte Strecke, Ruhezeit und verbrachte Dauer sowie Geschwindigkeit in verschiedenen Bereichen der Testarena (zentraler Bereich, Peripherie) und die Anzahl von Aufrichte-Verhalten („rearing“). „Rearing“-Frequenz, prozentualer Anteil der zurückgelegten Strecke und der Zeit, die im zentralen Bereich der Arena verbracht wurde, sowie die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in den zentralen Bereich und die Eintritts-Frequenz in den zentralen Bereich wurden berechnet.

3.3.1.2 Akustische Schreckreaktion (ASR) und Präpulsinhibition (PPI)

Mithilfe der akustischen Schreckreaktion wird das Niveau der unconditionierten Angst erhoben und bei der Präpulsinhibition der ASR wird die Fähigkeit der sensorimotorischen

Informationsverarbeitung geprüft. Beide Versuche wurden mithilfe eines Testapparats (Med Associates Inc., VT, USA) untersucht. Das Versuchsprotokoll basierte auf dem Eumorphia-Protokoll (s. www.eumorphia.org), und wurde spezifisch an den vorhandenen Testapparat adaptiert. Der Testapparat ist eine schallisolierte Kammer, in der den Tieren kurze (50 ms), akustische Reize (weißes Rauschen) verschiedener Intensitäten (65-120 dB) präsentiert wurden. Die Reaktion der Tiere wurde über Sensoren im Boden des Testapparats ermittelt. Zur Messung der PPI der ASR ging jedem akustischen Reiz ein schwacher Präpuls verschiedener Intensitäten (67, 69, 73, 81 dB) um 50 ms voraus, der normalerweise die Amplitude der Reflexantwort abschwächt, da das Gehirn durch den Präpuls schon sensibilisiert wurde und deshalb ein weniger starker Schreckreflex ausgelöst wird. Jede Präpulsintensität wurde zehnmal in randomisierter Reihenfolge getestet. Dazwischen gab es Ruhephasen von 20-30 Sekunden.

3.3.2 Neurologie

3.3.2.1 SHIRPA

Das SHIRPA („Smithkline Beecham, MRC Harwell, Imperial College, the Royal London hospital phenotype assessment“) Protokoll ist ein Untersuchungsgang zur Feststellung grundlegender neurologischer Funktionen und des allgemeinen Gesundheitszustandes. In dieser Studie wurde ein modifiziertes SHIRPA-Protokoll verwendet, wie kürzlich beschrieben [136]. Zunächst wurden die Tiere für drei Minuten in ein Glas-Behältnis von 11 cm Durchmesser gesetzt und folgende Parameter wurden beurteilt: Körperposition, Tremor, Lidschluss, Fellbeschaffenheit, Schnurrhaare, Tränenfluss und Kotabsatzverhalten. Anschließend wurden die Mäuse in eine Arena (36 x 20 cm) gesetzt und es wurde die Reaktion auf den Transfer („transfer arousal“), die lokomotorische Aktivität und das Gangbild, sowie das Auftreten von abnormen oder stereotypischem Verhalten evaluiert. Weitere untersuchte Parameter waren die Schwanzhaltung, die Fluchtreaktion infolge von Anfassen, Passivität und die Hautfarbe. Des Weiteren wurden die Mäuse am Schwanz hochgehoben und es wurde untersucht, ob sie dabei neurologisch auffällig den Rücken krümmten oder die Zehen zusammenkniffen. Es wurde außerdem der Ohrmuschel-, Korneal- und Aufrichte-Reflex geprüft.

3.3.2.2 Kraftmessung

Die Messung der Muskelkraft diente der Überprüfung neuromuskulärer und muskulärer Funktionen [136, 137] und wurde mithilfe eines Kraftmesssystems (Bioseb, Chaville, Frankreich) durchgeführt. Die Mäuse wurden an der Schwanzwurzel gehalten und über einem Gitter abgeseht, wo sie sich sofort je nach Position entweder nur mit den Vorderpfoten oder mit allen vier Pfoten festhielten. Das Gitter war mit einem Kraftsensor verbunden und sobald die Tiere vom Gitter weggezogen wurden, wurde die maximale Kraft gemessen, mit der sie sich festhalten konnten, bevor sie freiwillig losließen. Für die Zwei- und Vierpfotenmessung wurden hintereinander innerhalb einer Minute jeweils drei

Messwerte erhoben und deren Mittelwert wurde als repräsentativer Messwert für die einzelne Maus angesehen.

3.3.2.3 Rotarod

Ein Rotarod (Bioseb, Chaville, Frankreich) wurde genutzt, um die Motorkoordination, die Balance und die motorische Lernfähigkeit zu untersuchen [138]; es bestand aus einem motorbetriebenen, rotierendem Holm, der computergesteuert war und der in 4 Bahnen eingeteilt war, auf denen 4 Mäuse parallel gemessen werden konnten. Die Drehgeschwindigkeit wurde dabei stetig von 4 bis 40 rpm beschleunigt und die Zeit wurde gemessen, bis die Mäuse entweder herunterfielen, passiv mitdrehten oder ein Zeitgrenze von 5 Minuten überschritten wurde. Jede Maus wurde in 3 Versuchen untersucht mit einer Ruhepause von 15 Minuten zwischen den Durchgängen.

3.3.2.4 Messung auditorisch evozierter Hirnstammpotenziale („auditory brainstem response“, ABR)

Die Messung von auditorisch evozierten Hirnstammpotenzialen diente der objektiven Messung der Hörstärke. ABR bezeichnet die Reaktion des Hirnstamms auf akustische Stimulationen, welche über Elektroden am Tier abgeleitet werden kann. Dazu wurden die Mäuse durch intraperitoneale Applikation von 137 mg Ketamin und 6,6 mg Xylazin / kg Körpergewicht narkotisiert und 2 Elektroden wurden subkutan zwischen Mastoid und Vertex gesetzt. Diese erfassten die physiologischen Hörkurven in einer ABR-Messstation (Tucker-Davis Technologies, Alachua, USA), die infolge eines akustischen Stimulus verschiedener Frequenzen (6, 12, 18, 24, 30 Hz) durch Signalweiterleitung im Hirnstamm abgeleitet wurden. Die Hörschwelle wurde festgelegt als das minimale Schalldrucklevel der jeweiligen Frequenz, bei dem noch eine typische Hörkurve abgeleitet werden konnte.

3.3.3 Nozizeption

Zur Erfassung der Schmerzwahrnehmung wurde ein Wärmeplattentest („hot plate test“) durchgeführt, wie kürzlich beschrieben [133]. Dafür wurden Mäuse auf eine Wärmeplatte (TSE, Inc. Instrument, Bad Homburg, Deutschland) mit einer Oberflächentemperatur von $52\pm 2^{\circ}\text{C}$ gesetzt und sofort wieder entfernt, sobald 2 Anzeichen beobachtet wurden, die darauf hinwiesen, dass die Wärme der Platte wahrgenommen wurde (Schütteln oder Lecken der Pfote, Springen). Die Latenzzeit bis zum Auftreten dieser Reaktionen diente wiederum als Maß für die Schmerzreizschwelle. Nach 30 Sekunden wurden die Mäuse von der Platte entfernt, auch wenn keine Anzeichen, die indikativ für die Schmerzrezeption sind, erfasst wurden.

3.3.4 Dysmorphologie

3.3.4.1 Anatomische Untersuchung

Die anatomische Untersuchung ist ein grundlegender Screen zur Erfassung morphologischer Anomalien und wurde wie beschrieben [139] durchgeführt. Dabei wurde neben der visuellen Beurteilung des äußeren Erscheinungsbildes (Kopf, Gliedmaßen, Zehen, Augen,

Schwanz, Ohren, Zähne, Sinushaare, Fell, Haut, Muskeln, Krämpfe, Bewegung) auch-soweit visuell erfassbar-eine Beurteilung verschiedener Organsysteme (Ess- / Trinkverhalten, Atmung, Harn- / Geschlechtsapparat) durchgeführt. Anschließend wurde die Maus an der Schwanzwurzel festgehalten, um die Aktivität und Position der Gliedmaßen zu beurteilen. Zuletzt wurde sie aus niedriger Höhe in den Käfig fallen gelassen, um das Landeverhalten zu untersuchen.

3.3.4.2 Röntgenaufnahme

Zur Untersuchung des Skeletts und der Gelenke von Mäusen hinsichtlich pathologischer Veränderungen wurden Röntgenaufnahmen gemacht. Die Messungen wurden mit einem Radiographie-System (Faxitron Corporation, Tucson, USA) durchgeführt. Die Röntgenaufnahme wurde direkt im Anschluss an die ABR-Messung (3.3.2.4) und damit während der gleichen Narkose aufgenommen, wodurch eine zusätzliche Narkose vermieden wurde. Die narkotisierte Maus wurde dafür für die Dauer der Aufnahme auf die Messplattform des Röntgengeräts gelegt.

3.3.4.3 Knochendichtemessung

Die Bestimmung der gesamten Knochendichte und -masse von Mäusen wurde mit einem pDEXA Sabre-Gerät (Norland Medical Systems. Inc., Basingstoke, Hampshire, UK) nach einem beschriebenen Protokoll [133] durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf der differentiellen Absorption zweier unterschiedlich energiereicher Röntgenstrahlen durch Knochen- und Nichtknochengewebe und ist eine Standardmethode der Osteoporose Diagnostik. Die Messungen wurden mit den folgenden Einstellungen vorgenommen: Scan Geschwindigkeit 20 mm/s, Auflösung 0,5 mm x 1,0 mm, Histogramm Durchschnitts-Weiten-Einstellung („histogram average width setting“) 0,020 g/cm².

3.3.5 Energiemetabolismus

Die indirekte Kalorimetrie sowie die Messung der Körperzusammensetzung wurde generell durchgeführt, wie bereits beschrieben [133].

3.3.5.1 Indirekte Kalorimetrie

Zur Messung des Energiestoffwechsels wurden der Sauerstoffverbrauch und die Kohlendioxidproduktion einzelner Tiere in einem offenen respiratorischen System erfasst. Die Mäuse wurden einzeln in einen Stoffwechselkäfig (modifizierter Makrolonkäfig Typ II mit Kotrost) gesetzt, aus dem an einem Ende die Atemluft abgesaugt und Gasanalysatoren zugeführt wurde, und am anderen Ende Frischluft nachströmte. Aus den Flussmessungen der strömenden Gase und den Konzentrationen der Atemgase wurden der O₂-Verbrauch und die CO₂-Produktion bestimmt. Weiterhin wurde die respiratorische Austauschrate (RER) sowie die Wärmeproduktion aus den Daten berechnet. Parallel zur Messung des Gaswechsels wurde die lokomotorische Aktivität der Tiere über ein Lichtschrankensystem erfasst. Für die Dauer der Messung von 21 Stunden (13 Uhr – 10 Uhr am nächsten Morgen) wurden die Tiere bei regulärer Raumtemperatur von 22°C gehalten. Während der Messung hatten die Tiere *ad libitum* Zugang zu Futter und Wasser, keine der Versuchsgruppen hatte

jedoch EE. Die Aufnahme von Futter und Wasser wurde quantitativ und in Zeitauflösung über eine spezielle Wiegeeinrichtung erfasst. Vor Beginn und nach Ende der Gasanalyse wurde das Körpergewicht kontrolliert. Die Ergebnisse der Messung dienen dazu, Störungen im Energieverbrauch und der Substratoxidation zu bestimmen.

3.3.5.2 Messung der Körperzusammensetzung (qNMR = „quantitative nuclear magnetic resonance imaging“)

Die Körperzusammensetzung wurde mit dem Minispec LF 50 (Fa. Bruker Optics, Ettlingen, Deutschland) an der lebenden, wachen Maus analysiert. Dabei wurden die Körpermasse, der Fettanteil und die fettfreie Weichteilmasse bestimmt. Die Tiere wurden dazu für etwa 30 Sekunden in einen Zylinder gesetzt (Innendurchmesser ca. 50 mm), und darin in die Magnetrohre des Messgerätes eingeführt.

3.3.6 Klinische Blutchemie und Hämatologie, Allergie

Die Bestimmung von Parametern der klinischen Blutchemie, Hämatologie und Allergie in Blutproben wurde bereits beschrieben [133, 140].

3.3.6.1 Intraperitonealer Glukosetoleranztest (IpGTT)

Vor Beginn des Tests wurde den untersuchten Tieren für 16-18 Stunden das Futter entzogen, damit sie bei Testbeginn nüchtern waren. Zu Beginn des Tests wurde dann mit einer scharfen Schere ca. 0,5 mm Gewebe der Schwanzspitze entfernt und ein kleiner Tropfen Blut (ca. 10-20 μ l) zur Bestimmung des basalen Glukosespiegels wurde entnommen. Anschließend erhielten die Tiere 2g Glukose / kg Körpergewicht in einer sterilen 20 %-igen Glukoselösung, welche mit einer 25G Kanüle intraperitoneal injiziert wurde. Danach wurde den Tieren zu vier weiteren Zeitpunkten (jeweils nach 15, 30, 60, 120 Minuten) durch sanftes Massieren am Schwanz von der gleichen Wunde jeweils ein Tropfen Blut entnommen, um den Glukosespiegel zu messen. Der Blut-Glukosespiegel wurde mit einem Accu-Chek Aviva Glucose Analyzer (Roche / Mannheim, Deutschland) bestimmt. Bei der Auswertung wurde die Fläche unter der Kurve („area under the curve“) und dem basalen Glukoselevel für die ersten 30 Minuten (AUC 0-30) und für die restlichen 90 Minuten (AUC 30-120) berechnet wie beschrieben [141].

3.3.6.2 Blutentnahme

Zur Bestimmung von Parametern der klinischen Blutchemie, Hämatologie und Allergie wurden Blutproben gewonnen, indem der retrobulbäre Sinus der Mäuse unter Isofluran-Narkose mit einer nicht heparinisierten Glaskapillare (1,0 mm Durchmesser; Neolab, München, Germany) punktiert wurde. Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse noch während der Narkose durch zervikale Dislokation oder CO₂ getötet. Das Blut wurde in verschiedenen Röhrchen aufgefangen. Der größere Anteil wurde in heparinisierten Blutröhrchen (Li-heparin, KABE; Numbrecht, Deutschland; Art.No. 078028) gefüllt. Zellen und Plasma wurden durch Zentrifugation (10 min, 5000 \times g; 8°C, Biofuge fresco, Heraeus; Hanau, Germany) getrennt. Die Konzentration von Immunglobulinen, sowie die klinische Blutchemie wurden im Plasma analysiert. Der kleinere Anteil der Blutprobe wurde in EDTA-

beschichteten Blutröhrchen (KABE, Art.No 078035) zur Untersuchung der Hämatologie aufgefangen.

3.3.7 Kardiovaskuläre Gesundheit

3.3.7.1 Elektrokardiogramm (EKG)

Mithilfe eines Elektrokardiogramms wurden die elektrische Aktivität, die Herzfrequenz und der Herzrhythmus bestimmt, welche Rückschlüsse auf die erregbare Myokard-Masse, die Leitungseigenschaften und die Erregungsausbreitung innerhalb des Herzgewebes zulassen. EKGs wurden mit dem ECGenie (Mouse Specifics Inc., Boston, MA) bestimmt und aufgezeichnet und mithilfe der „e-Mouse“-Software (Mouse Specifics Inc., Boston, MA) ausgewertet. Für die Messung wurden die Mäuse auf eine Messplattform gesetzt, auf deren Boden sich eine Gel-Elektrode befand, die das EKG über die Pfoten ableitete. Das über drei Pfoten abgeleitete Signal entsprach der Einthoven II Ableitung. Vor Beginn der Messung hatten die Mäuse eine mindestens 2-minütige Akklimatisationsphase. Es wurden für jede Maus mindestens 15 EKG-Signale aufgezeichnet, bei denen die Intervalle und Amplituden beurteilt wurden. Die „e-Mouse“-Software bestimmte automatisch durch die Detektion der R-Zacke die Herzfrequenz („heart rate“ = HR). Die Herzfrequenzvariabilität („Heart rate variability“ = HRV) wurde als Mittelwert der Unterschiede zwischen fortlaufenden Herzfrequenzen bestimmt. Mithilfe der Software wurden auch die P, Q, R, S und T-Intervalle bestimmt und ihre mittlere Dauer wurde berechnet. Der Parameter „QTc“ (korrigierter QT) errechnete sich aus dem Quotienten von QT-Intervall und der Quadratwurzel des vorangegangenen RR-Intervalls. Die QT-Ausbreitung („QT dispersion“) wurde als „inter-lead“ Variabilität der QT-Intervalle gemessen.

3.3.7.2 Echokardiografie (ECHO)

Die Funktion des linken Ventrikels wurde bei wachen, nicht-anästhesierten Mäusen durch transthorakale Echokardiografie mit dem Vevo 2100 Imaging System (Visual Sonics, Toronto, Canada) mit einem 30 MHz Schallkopf untersucht. Links-ventrikuläre parasternale Kurz- und Langachsenbilder wurden im B-Mode erfasst, linksventrikuläre parasternale Kurzachsenbilder wurden im M-Mode auf Höhe des Papillarmuskels dargestellt. Die Kurzachsen M-Mode-Bilder wurden genutzt, um verschiedene Parameter bei drei aufeinanderfolgenden Herzschlägen abzumessen: links ventrikulärer end-diastolischer innerer Durchmesser (LVIDd), links ventrikulärer end-systolischer innerer Durchmesser (LVIDs), diastolische und systolische Septums-Wandstärke (IVS) und die Wandstärke der hinteren Herzwand während der Systole und der Diastole (LVPW) nach Empfehlungen der Amerikanischen Gesellschaft für Echokardiografie [142]. Weitere Parameter wie die Verkürzung des Herzmuskels während der Systole („fractional shortening“), korrigierte linksventrikuläre Masse, Herzschlagvolumen und Herz- und Atemfrequenz wurden aus den oben genannten Parametern berechnet, wie bereits beschrieben [143].

3.3.8 Auge

3.3.8.1 Scheimpflug-Imaging

Die Scheimpflug-Analyse ermöglicht eine genaue Untersuchung der Hornhaut und der Linse. Dazu wurden die Pupillen mit einem Tropfen 0,5 %-iger Atropin-Lösung erweitert. Für die Untersuchung wurden die Mäuse in einer Hand gehalten und auf einer Styroporplattform vor der Scheimpflugkamera (Penatacam, Oculus, Wetzlar, Deutschland) aufgesetzt, sodass der vertikale Licht-Schlitz (Lichtquelle: LEDs, 475 nm) sich in der Mitte des Augapfels befand. Der Abstand zwischen Augapfel und Kamera wurde mithilfe der vorhandenen Software fein-justiert, um eine optimale Bildschärfe sicherzustellen. Die mittlere Dichte der Linse wurde mithilfe der Analyse-Software quantifiziert. Es wurde außerdem eine qualitative Untersuchung von Linse und Hornhaut vorgenommen.

3.3.8.2 Optokinetische Trommel

Als Sehtest wurde eine optokinetische Trommel (OptoMotry virtual optokinetic drum system, Cerebral Mechanics, Lethbridge, Canada) eingesetzt, wie vor kurzem beschrieben [144]. Dabei wurden die Mäuse auf eine Plattform gesetzt. Auf 4 senkrecht zueinander stehenden Bildschirmen, die ein Quadrat bilden und die Maus umgaben, wurde ein Streifenmuster projiziert, das rotierte. Eine normal sehende Maus zeigt daraufhin typische Kopfbewegungen in Bewegungsrichtung des Streifenmusters. Die Sehschwelle der untersuchten Mäuse wurde mithilfe eines randomisierten Treppentests quantifiziert. Die Rotationsgeschwindigkeit und der Kontrast wurden auf 12,0 d/s und 100 % eingestellt.

3.3.9 Pathologie

Nach der Blutentnahme (3.3.6.2) und Euthanasie wurde an den Mäusen eine makroskopische, pathologische Untersuchung durchgeführt [145]. Nach Abschluss der Sektion wurden alle Organe in 4 %-igem Formalin fixiert und in Paraffin zur histologischen Untersuchung eingebettet. Gewebsschnitte von 4 µm Dicke wurden von Haut, Herz, Muskel, Lunge, Groß- und Kleinhirn, Thymus, Milz, zervikalen Lymphknoten, Luftröhre, Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Nebenniere, Speiseröhre, Magen, Darm, Leber, Gallenblase, Pankreas, Nieren, Reproduktionsorganen und Blase angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H & E) gefärbt.

3.3.10 Reduzierte Stichprobenzahl bei einzelnen Screens

Bei einzelnen Tests bzw. Screens war die Standard-Strichprobenzahl von $n = 10$ Tieren wie folgt reduziert:

- alle drei Kohorten, alle Gruppen: $n = 7$ im Augen-Screen; $n = 4-5$ im Pathologie-Screen / makroskopische Untersuchung; $n = 1-2$ im Pathologie-Screen / histologische Untersuchung
- Kohorte 1, alle Gruppen B6: $n = 7$ im kardiovaskulären Screen / Echokardiografie
- Kohorte 1, Gruppe B6 / weiblich / Nest: $n = 9$ bei DEXA
- Kohorte 1, Gruppe D2 / männlich / Kontrolle: $n = 9$ bei IgE
- Kohorte 1, Gruppe D2 / männlich / Nest: $n = 9$ bei der Blutentnahme, ABR und DEXA

- Kohorte 1, Gruppe D2 / weiblich / Kontrolle: n = 9 bei der Blutentnahme, ABR und DEXA
- Kohorte 2, Gruppe B6 / männlich / Kontrolle: n = 9 bei der Echokardiografie
- Kohorte 2, Gruppe B6 / weiblich / Nest: n = 9 bei der Blutentnahme, ABR und DEXA
- Kohorte 2, Gruppe D2 / weiblich / Nest: n = 9 bei der Blutentnahme, ABR und DEXA
- Kohorte 3, alle Gruppen B6: n = 8 bei der indirekten Kalorimetrie
- Kohorte 3, Gruppe B6 / männlich / Kontrolle: n = 7 bei DEXA
- Kohorte 3, Gruppe B6 / männlich / Double: n = 7 bei DEXA
- Kohorte 3, Gruppe B6 / weiblich / Kontrolle: n = 9 bei DEXA
- Kohorte 3, Gruppe D2 / weiblich / Nest: n = 9 bei Echokardiografie, n = 8 bei IgE
- Kohorte 3, Gruppe D2 / männlich / Kontrolle: n = 9 bei Hämatologie, n = 6 bei Scheimpflug-Imaging
- Kohorte 3, Gruppe D2 / männlich / Nest: n = 9 bei der Blutentnahme und Elektrokardiogramm
- Kohorte 3, Gruppe D2 / männlich / Double: n = 8 bei der Blutentnahme, ABR und DEXA, n = 7 bei dem Elektrokardiogramm, n = 6 bei Scheimpflug-Imaging und der optokinetischen Trommel
- Kohorte 3, Gruppe D2 / weiblich / Nest: n = 9 bei der Blutentnahme
- Kohorte 3, Gruppe D2 / weiblich / Double: n = 9 bei IgE
- Aus technischen Gründen konnte eine Kohorte von D2-Mäusen nicht mit DEXA gemessen werden, und die Daten wurden deshalb nicht in die Auswertung mithilfe von linearen Modellen einbezogen.
- Aus technischen Gründen mussten die Parameter Basal-Glukose-Wert („Glucose level fasted“), AUC 0-30 und AUC 30-120 für B6 ausgeschlossen werden und wurden deshalb nicht in die Auswertung mithilfe von linearen Modellen einbezogen.

3.4 Tierwohl-assoziierte Parameter

Das Körpergewicht, der Gesundheitszustand und der Fur-Score wurden verblindet erhoben, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Voreingenommenheit des Untersuchers zu verhindern. Dafür setzte eine Hilfsperson die Mäuse in einen frischen Käfig mit Einstreu und entfernte den alten Käfig inklusive EE. Der Untersucher trat erst dann hinzu und wog und beurteilte die Mäuse. Die Ohrlochung der Mäuse war in den einzelnen Gruppen identisch, um zu verhindern, dass der Untersucher daraus Rückschlüsse auf die Versuchsgruppe ziehen konnte. Im Anschluss an die Untersuchung fügte die Hilfsperson dann das gruppenspezifische EE hinzu.

3.4.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde initial bei Ankunft der Mäuse in der GMC und danach jeweils wöchentlich (i.d.R. immer freitagvormittags) im Zuge des Käfigwechsels bestimmt.

3.4.2 Allgemeiner Gesundheitszustand

Der Gesundheitszustand wurde bei der Einzeltieruntersuchung einmal wöchentlich im Zuge des Käfigwechsels beurteilt. Die Ergebnisse wurden in einer Dokumentationstabelle (Abbildung 4) eingetragen, die die Kategorien Haltung, Verhalten, Atmung, Pflegezustand, Bewegungsapparat, Ernährungszustand, Kot- und Urinabsatz umfassten. Je nach Befund wurden Punkte vergeben, die dann als Summenscore addiert wurden. Für einen Summenscore >0 wurden ggf. zum Schutz der Tiere Maßnahmen, sowie maximale Fristen, wie lange ein Zustand tolerierbar war / wann ein Abbruchscore erreicht war, definiert.

3.4.3 Stereotypien und Fur-Score

Bei der Beurteilung des Verhaltens im Zuge der Gesundheitsuntersuchung wurde einmal pro Woche das Auftreten von abnormen Verhaltensweisen erfasst. Neben der Dokumentation der Inzidenz von Stereotypien wurden die Mäuse zur Beurteilung der Häufigkeit von Fell- und Schnurrhaarveränderungen auf Käfig- und Einzeltierebene einer von 2 Kategorien (Alopezie und / oder abnorme Schnurrhaare vorhanden / nicht vorhanden) zugeordnet. Zusätzlich wurde das kategoriale Alopezie-Scoring-System von Bechard et al. [32] adaptiert und angewendet (Abbildung 5), um den Schweregrad von Fell- und Schnurrhaarveränderungen auf Einzeltierebene zu untersuchen. Um Alopezie infolge von Barbering von Fellveränderungen anderer Genese (z.B. Bissverletzung) abzugrenzen, wurde nur ein Alopezie-Score (in Anlehnung an [100]) für Tiere mit Fellveränderungen vergeben, bei denen:

- die Hautläsionen nicht entzündlich verändert waren,
- keine Narben oder Kratzspuren bei den Läsionen zu erkennen waren,
- der Gesundheitszustand und das vorhandene Fell unauffällig waren,
- keine andere Ursache für die Alopezie festzustellen war.

Score	% Alopezie	abnormale Schnurrhaare	
0	0	nein	
1	0	ja	a
	0≤10	nein	b
2	0≤10	ja	c
	10≤20	nein	d
3	10≤20	ja	e
	20≤100	nein	f
4	20≤100	ja	

Abbildung 5. Schema zur Evaluierung des Alopezie-Scores.

Bei der visuellen Bewertung des Alopezie-Scores wurde der Prozentsatz der Körperoberfläche abgeschätzt, der haarlos war und es wurde der Zustand der Schnurrhaare beurteilt. Beispiele für „barbering-induced alopecia“ und die zugeordneten Scores: a,b) Score 1, c,d) Score 2, e,f) Score 3.

3.4.4 Corticosteron

Zur Beurteilung des Stresslevels wurde der Corticosterongehalt in Urinproben der Versuchstiere gemessen. Um Verfälschungen durch Konzentrationsschwankungen des Urins einzelner Individuen zu vermeiden, wurde in jeder Urinprobe auch der Creatinin-Gehalt bestimmt. Als vergleichbarer Parameter zwischen den Tieren wurde dann der Corticosteron-Creatinin-Quotient gebildet.

Da das Test-Kit zur Corticosteron- Bestimmung laut Hersteller zwar für verschiedene Spezies und Probenmaterialien (Serum, Plasma, Urin, Gewebeskultur, Kot) geeignet war, die Validierung aber mit menschlichen Serumproben durchgeführt worden war, wurde eine Validierung des Test-Kits für murine Urinproben durchgeführt.

3.4.4.1 Materialien und Geräte

Tabelle 3 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits

Ethanol, 80 %	Abteilung für vergleichende Medizin, Helmholtz Zentrum München
Milli Q-Wasser	Abteilung für vergleichende Medizin, Helmholtz Zentrum München
Desinfektionsmittel, Pursept A	Merz Hygiene GmbH, Frankfurt, Deutschland
96-Loch-Zellkultur-Platte, steril, f-Boden, CellStar®	greiner, bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Bechergläser	Schott Duran, Wertheim, Deutschland
Eppendorf-Tube, 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Handschuhe, Nitril® Next Gen®	greiner, bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten, Cellstar, 5ml, 10ml, 50ml	greiner, bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettierschalen, Plastik	Abteilung für vergleichende Medizin, Helmholtz Zentrum München
Pipettenspitzen, Tip one, 10µl, 100µl, 1000µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Teststreifen, Reflotron® Creatinine	scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
DetectX® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit	Arbor Assays, Ann Arbor, USA
QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (DICT-500)	BioAssay Systems, Hayward, USA

Tabelle 4 Geräte

12-Kanal-Pipetten, Star Pet, 5-50µl, 40-200µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Analysegerät Reflovet® Plus	scil animal care company GmbH, Viernheim, Deutschland
Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge LSE™	Corning®, Corning, USA
Pipetten, P2, P10, P20, P100, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer, Brand®Accu-jet®	Sigma Aldrich, Chemie GmbH, München, Deutschland
Plattenlesegerät, Synergy 2	Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Gefriertruhe, -20°C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank	Electrolux Hausgeräte GmbH Markenvertrieb AEG, Nürnberg, Deutschland
Schüttelgerät	Edmund Bühler Labortechnik, Materialtechnik, Johanna Otto GmbH
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA

3.4.4.2 Corticosteron-Bestimmung im Urin

Der Corticosterongehalt im Urin wurde mit dem Detect X® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit von Arbor Assays entsprechend der Herstelleranweisung analysiert. Das Testprinzip entsprach dem eines kompetitiven Enzymimmunoassays.

Es wurden zunächst die Proben jeweils 1:100 bzw. 1:30 für B6 bzw. D2 mit Puffer verdünnt und die Standardverdünnungsreihe wurde hergestellt. Anschließend wurden Doppelansätze von jeweils 50 µl von der Probe, dem Standard, der internen Kontrolle und Puffer (für die Maximum-Binding-Kontrolle) in die dafür vorgesehenen Kavitäten auf der 96-Loch-Mikrotiter-Platte pipettiert (Tabelle 5). Für die non-specific-binding-Kontrolle wurden 75 µl Puffer in die entsprechenden Löcher gegeben. Danach wurden mit einer Mehrkanalpipette zunächst 25 µl Corticosteron-Peroxidase-Konjugat in jede Plattenvertiefung, und im Anschluss 25 µl Corticosteron-Antikörper in alle Kavitäten, außer der NSB-Kontrolle pipettiert. Der Corticosteron-Antikörper wurde nun an die unspezifischen Antikörper der beschichteten Platte gebunden, und Proben-Corticosteron und Corticosteron-Peroxidase-Konjugat konkurrierten um die Bindungsstellen am spezifischen Antikörper. In der folgenden 70-minütigen Inkubationsphase auf der Schüttelplatte bei 350 rpm, stellte sich ein Reaktionsgleichgewicht zwischen dem konkurrierenden Proben-Corticosteron und dem Corticosteron-Peroxidase-Konjugat um Antikörperbindungsstellen ein. Anschließend wurde Waschpuffer in jede Kavität eingebracht, 2 Minuten eingeweicht, dann wurde die Flüssigkeit ausgegossen und die Platte wurde ausgeklopft. Der Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. 100 µl Tetramethylbenzidin (TMB) wurde dann mit einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung gegeben und für 30 Minuten unter Lichtausschluss ohne Schütteln inkubiert. Dabei setzte die Peroxidase des Corticosteron-Peroxidase-Konjugats das TMB unter blauer

Farbentwicklung um. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1M Salzsäure gestoppt und die dabei entstandene Gelbfärbung wurde nach 6 Minuten photometrisch bestimmt. Mithilfe eines Plattenlesegeräts wurde die optische Dichte (OD) bei 450 nm gemessen und die Standardkurve, sowie die Berechnung der Konzentrationen aus der OD wurden mithilfe der Gen5-Software des Herstellers durchgeführt.

Die Farbentwicklung verhielt sich entgegengesetzt proportional zur Menge an Proben-Corticosteron. Je mehr Corticosteron sich in der Probe befand, desto weniger Corticosteron-Peroxidase-Konjugat wurde gebunden und desto weniger Farbstoff wurde in der Nachweisreaktion freigesetzt.

Tabelle 5. Allgemeine Pipettiervorlage für eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Corticosteron

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	I1	STD4	STD8	3	6	10	14	18	22	26	30	34
B	I1	STD4	STD8	3	6	10	14	18	22	26	30	34
C	STD1	STD5	1	4	7	11	15	19	23	27	31	35
D	STD1	STD5	1	4	7	11	15	19	23	27	31	35
E	STD2	STD6	2	5	8	12	16	20	224	28	32	12
F	STD2	STD6	2	5	8	12	16	20	224	28	32	12
G	STD3	STD7	NSB	MAX	9	13	17	21	25	29	33	36
H	STD3	STD7	NSB	MAX	9	13	17	21	25	29	33	36

A-H: Bezeichnung der Reihen, 1-12: Bezeichnung der Spalten, I: interne Kontrolle, STD: Standard-Verdünnungsreihe, 1-36: Proben, NSB: non-specific-binding-Kontrolle, MAX: maximum-binding-Kontrolle

3.4.4.3 Creatinin-Bestimmung im Urin

Die Bestimmung des Creatinin-Gehalts der Urinproben wurde mithilfe des QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (DICT-500) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden jeweils 5 µl Standard und Proben in Doppelansätzen in eine durchsichtige, plane 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 200 µl pro Vertiefung Arbeits-Reagenz hinzugefügt und die optische Dichte (OD) wurde bei 510 nm mithilfe eines Plattenlesegeräts sofort (Probe 0 und Standard 0) und nach 5 Minuten (Probe 5 und Standard 5) bestimmt. Die Creatinin-Konzentration wurde dann wie folgt berechnet:

$$c(\text{Creatinin}) = \frac{OD_{\text{Probe 5}} - OD_{\text{Probe 0}}}{OD_{\text{Standard 5}} - OD_{\text{Standard 0}}} * [\text{Standard}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \quad (1)$$

Für die Darstellung der diurnalen Rhythmik im Urin-Corticosteron wurde der Creatinin-Wert mithilfe des Scil Reflovet® Plus nach Herstellerangaben nach Verdünnung 1:20 mit Milli Q-Wasser bestimmt.

3.4.4.4 Validierungsexperimente

Für die Validierung der Messung von Corticosteron mithilfe eines Test-Kits (Detect X® Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit von Arbor Assays) in murinen Urinproben wurde sowohl eine analytisch-technische Validierung, sowie eine biologisch-physiologische Validierung durchgeführt:

Analytisch-technische Validierung:

Es wurden die Parallelität, die Präzision und die Wiederfindung des Test-Kits untersucht. Die Parallelität wurde untersucht, indem eine Verdünnungsreihe von Standardlösung mit der Verdünnungsreihe einer verdünnten Urinprobe verglichen wurde. Für die Präzision wurden zum einen die Messwerte der internen Kontrolle, die auf 28 Platten mitgemessen wurde, ausgewertet (Inter-Assay-Präzision), zum anderen wurde eine Urinprobe auf einer Platte sechsfach gemessen und ausgewertet (Intra-Assay-Präzision). Zur Beurteilung der Wiederfindung wurden 5 Aliquots von (verdünnten) Urinproben mit je 3 Lösungen bekannter Corticosteron-Konzentrationen versetzt und die Wiederfindung nach Scorrano et al. [146] berechnet.

$$\text{Wiederfindung} = \frac{\text{Konzentration (Probe + Spike)}}{\text{Konzentration (Probe)} + \text{Konzentration (Spike)}} * 100 \quad (2)$$

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Verunreinigung der Urinproben mit Kot die Messung des Corticosteron-Creatinin-Quotients verfälscht. Dafür wurde von 3 weiblichen und 5 männlichen B6-Mäusen Urinproben gewonnen, indem sie einzeln in leere Käfige ohne Einstreu gesetzt wurden. Es wurde jeweils eine Leerprobe in eine Eppendorf-Tube pipettiert und dann wurde ein Kotpellet des gleichen Tiers in die Urinprobe im Käfig gelegt. Urin direkt neben dem Kotpellet und etwa 1 cm entfernt vom Kotpellet wurde nach etwa 10 Minuten mit der Pipette aufgenommen und ebenfalls analysiert. Die Stabilität des Corticosterons bzw. die Lagerfähigkeit der Proben wurde über die interne Kontrolle überprüft, von der für jede Analyse ein Aliquot aufgetaut und mitgemessen wurde.

Biologisch-physiologische Validierung:

Es wurde überprüft, ob sich die diurnale Rhythmik der Corticosteron-Ausschüttung, sowie der erwartete Anstieg als Reaktion auf einen Stressor (Fixation) im Corticosteron-Gehalt des Urins widerspiegeln.

Für die diurnale Rhythmik wurden zu 4 Zeitpunkten (7, 13, 19 und 1 Uhr) Urinproben von jeweils 8-10 männlichen C57BL/6NTac-Mäusen gewonnen, indem sie fixiert wurden. Wenn sie während der Fixierung keinen Urin absetzten, wurden sie für maximal 30 Minuten in einen leeren Plastikkkäfig gesetzt und Urin wurde dann mit einer Pipette vom Boden aufgenommen. In der Dunkelphase (19, 1 Uhr) wurde nur unter Rotlicht gearbeitet, um die anderen Mäuse im Raum möglichst wenig zu stören.

Für die Abbildung des Corticosteron-Anstiegs durch einen Stressor (Fixation) wurden 17 C57/BL6-Mäuse (10 ♂, 7 ♀) im Nackengriff fixiert und der dabei abgesetzte Urin wurde

aufgefangen (Abbildung 6) und als Basiswert (P0) genutzt. Dann wurden die Mäuse einzeln in leere Plastik Käfige gesetzt und nach 90 Minuten wurden sie erneut fixiert und der gewonnene Urin wurde als „Stress-Wert“ (P90) definiert.

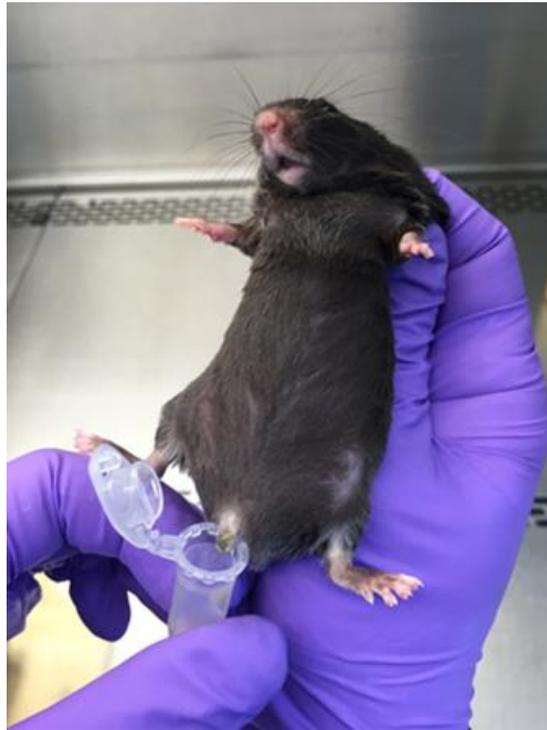


Abbildung 6. Fixation zur Urinprobengewinnung für die Validierungsexperimente.

3.4.4.5 Urinprobengewinnung während der Studie

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden von jedem Tier 3 Urinproben (in Woche 5, 8 und 20) hinsichtlich des Corticosteron- und Creatiningsgehalts analysiert. Dazu wurden die Mäuse einzeln in leere IVC-Käfige ohne Einstreu gesetzt. Sobald sie Urin abgesetzt hatten, wurde dieser mit einer Pipette aufgenommen und in Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Um den Einfluss von circadianen Schwankungen möglichst gering zu halten, wurden die Tiere immer in der gleichen Reihenfolge untersucht. So wurden um 9 Uhr zunächst die männlichen Tiere einzeln gesetzt und beprobt. Danach, um etwa 10 Uhr, erfolgte die Probennahme bei den weiblichen Tieren. Der Urin wurde bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.4.5 Nutzung des Environmental Enrichments (Nest-Score)

Zur Beurteilung der Nutzung des EEs wurde das Nest-Scoring-Schema nach Deacon et al. [147] leicht adaptiert und dann angewendet (Abbildung 7). Die Nester in den EE-Gruppen wurden 2x pro Woche beurteilt, ohne die Tiere vorher umzusetzen. Die Beurteilung erfolgte zu Anfang der Woche (Montag oder Dienstag) und freitags vor dem regulären Umsetzen. Die erhobenen Scores zeigten eine leichte Variabilität von einem bis (selten) maximal 2 Score-Punkten zwischen diesen beiden Zeitpunkten. Dies lässt sich damit erklären, dass die Mäuse ihre Nester kontinuierlich manipulierten und veränderten und durch die große Gruppengröße immer wieder auch Material beim Betreten und Verlassen des Nests verschleppt wurde. Zusätzlich wurden die Mäuse zwischen Montag und Donnerstag in den

Experimenten untersucht und das Einsetzen bzw. Entfernen der Tiere aus dem Nest könnte dieses wiederum verändert und somit Einfluss auf den Nest-Score gehabt haben. Für die Auswertung wurden deshalb nur die Scores der freitäglichen Beurteilung berücksichtigt, da zu diesem Zeitpunkt die Mäuse für die letzten 12-15 Stunden ungestört gewesen waren und eine Beeinflussung der Scores durch kurz zurückliegendes Handling ausgeschlossen werden konnte. Es wurde außerdem dokumentiert, wie viele Tiere sich zu diesem Zeitpunkt jeweils im Nest, im Haus oder ohne Kontakt zu dem angebotenen EE befanden.

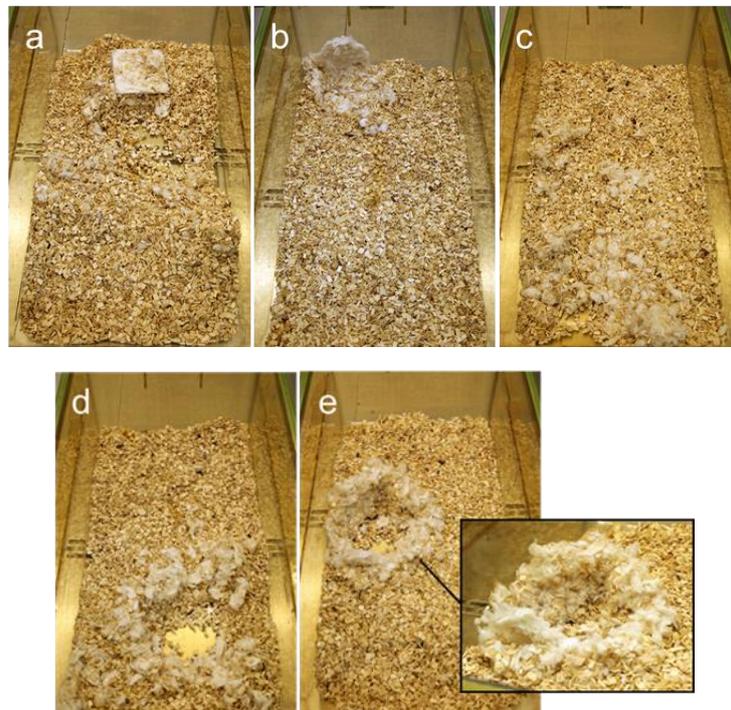


Abbildung 7. Nest-Score-Schema adaptiert nach [147].

Score a: Nestlet nahezu unverändert (> 90 % des Nestlets intakt); Score b: Nestlet teilweise zerpfückt (50-90 % des Nestlets intakt); Score c: Nestlet größtenteils zerpfückt, aber kein eindeutiges Nest zu erkennen (< 50 % des Nestlets intakt, < 90 % in einem 1/3 der Käfigfläche); Score d: ein deutliches, aber flaches Nest (>90 % des Nestlets zerpfückt und in einem 1/3 der Käfigfläche, < 50 % der Zirkumferenz höher als die Mausekörperhöhe (liegend)); Score e: ein nahezu perfektes Nest (>90 % des Nestlets zerpfückt, >50 % der Zirkumferenz höher als die Mausekörperhöhe (liegend))

3.5 Statistik

3.5.1 Physiologische Parameter

Die Zielsetzung unserer Studie war es, zwei Fragestellungen zu untersuchen, nämlich erstens, ob sich der Mittelwert durch die Anwendung von EE verändert und zweitens, ob EE einen Einfluss auf die Variabilität hat. Als weitere Einflussfaktoren für mögliche Veränderungen des Mittelwerts und der Variabilität wurden das Geschlecht und die Kohorte, d.h. die Gesamtheit aller Faktoren jedes einzelnen Durchgangs, angenommen. Der Einfluss von EE auf die Mittelwerte der gemessenen Parameter wurde mithilfe von linearen Modellen

$$y = \beta_{\text{Intercept}} + \beta_{\text{Enrichment Nest}} + \beta_{\text{Enrichment Double}} + \beta_{\text{Geschlecht (m)}} + \beta_{\text{Kohorte 2}} + \beta_{\text{Kohorte 3}} + \text{alle Doppelinteraktionen} \quad (3)$$

ausgewertet. Eine Variablenselektion wurde mithilfe des Bayesschen Informationskriterium (BIC) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Form einer Heatmap dargestellt, wobei für jeden Parameter die farbkodierten Schätzer (β) des jeweiligen Modells, ausgedrückt durch den prozentualen Anteil am Intercept des Modells, abgebildet wurden. Die Darstellung der Veränderung als prozentualen Anteil des Intercepts diente dazu, einen Wert zu erhalten, der einen Vergleich zwischen den Parametern ermöglicht. Nicht-selektierte Parameter wurden grau markiert.

Zur Evaluation des Einflusses von EE auf die Variabilität wurden die gemessenen Daten zunächst mithilfe des Bootstrap-Verfahrens [148] modifiziert. Dafür wurden 1000 Stichproben der Anzahl n_j aus jeder Subgruppe j (Enrichment \times Geschlecht \times Kohorte-Kombination) gezogen. Als vergleichbarer Messwert der Variabilität zwischen den Parametern wurde der Variationskoeffizient („coefficient of variation“, im folgenden CV) genutzt, welcher sich aus

$$\text{Variationskoeffizient} = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} \quad (4)$$

berechnet. Zur Zusammenfassung der Ergebnisse des Bootstrap-Verfahrens wurden empirische 95 %-Konfidenzintervalle von den Schätzern für alle Einflussvariablen des linearen Modells kalkuliert.

Die Ergebnisse wurden in Form einer Heatmap dargestellt, wobei durch Farbcodierung drei unterschiedliche Kategorien ausgedrückt werden (Abbildung 12): grau: Konfidenzintervall schließt 0 mit ein (es wird kein Effekt vermutet), lila: Konfidenzintervall ist größer als 0 (Variationskoeffizienten erhöht im Vergleich zur Kontrolle), gelb: Konfidenzintervall ist kleiner als 0 (Variationskoeffizienten erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle). Alle Analysen wurden einzeln, für jeden Parameter und jeden Mausstamm durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm R (Version 3.0.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [149] genutzt. Es wurde außerdem eine Dummy-Kodierung für alle kategorialen Faktoren in den linearen Modellen durchgeführt; die Referenzkategorien waren in allen Analysen die weiblichen Mäuse der ersten Kohorte ohne Enrichment (Kontrolle).

3.5.2 Tierwohl-assoziierte Parameter

Zur Analyse des Einflusses von EE auf die Parameter Körpergewicht und Corticosteron-Creatinin-Quotient (im Folgenden CCQ) wurden lineare gemischte Modelle eingesetzt. Als weitere Einflussfaktoren wurden das Geschlecht, die Kohorte und der Zeitpunkt (Woche) angenommen. Da die Länge der Zeit bis zur Gewinnung einer Urinprobe u.U. einen Einfluss auf den Corticosteron-Wert haben könnte, wurde die Probennahme als weiterer Faktor im Modell berücksichtigt. Des Weiteren wurden die Zweifach-Interaktionen zur Analyse der Körpergewichtsveränderungen

$$\begin{aligned}
 y_i = & \beta_{\text{Intercept}} + \beta_{\text{Intercept}_j} + \beta_{\text{Woche}} \\
 & + \beta_{\text{Enrichment Nest}} + \beta_{\text{Enrichment Double}} \\
 & + \beta_{\text{Geschlecht (m)}} \\
 & + \beta_{\text{Kohorte2}} + \beta_{\text{Kohorte3}} \\
 & + \textit{alle gruppenspezifischen Doppelinteraktionen} \\
 & + \varepsilon_i
 \end{aligned} \tag{5}$$

und zur Analyse der Corticosteron-Creatinin-Quotient-Veränderungen

$$\begin{aligned}
 y_i = & \beta_{\text{Intercept}} + \beta_{\text{Intercept}_j} + \beta_{\text{Woche}} \\
 & + \beta_{\text{Enrichment Double}} + \beta_{\text{Enrichment Nest}} \\
 & + \beta_{\text{Geschlecht (m)}} \\
 & + \beta_{\text{Kohorte2}} + \beta_{\text{Kohorte3}} \\
 & + \beta_{\text{ProbenentnahmeMin}} \\
 & + \textit{alle gruppenspezifischen Doppelinteraktionen} \\
 & + \varepsilon_i
 \end{aligned} \tag{6}$$

mit den Versuchsgruppen in das Modell aufgenommen, um zusätzlich Gruppen-interne Unterschiede zu untersuchen. Bei den B6-Mäusen fehlten für die Wochen 5 und 8 der ersten Kohorte die Angaben zur Probennahme; diese beiden Wochen wurden deshalb in der statistischen Analyse nicht berücksichtigt. Die CCQs wurden vor der Analyse log-transformiert, um eine annähernde Normalverteilung sicherzustellen. Die Körpergewichtsdaten wurden ab Woche 5 analysiert, um mögliche Einflüsse der Akklimatisationsphase, die unabhängig von den Versuchsgruppen waren, unberücksichtigt zu lassen. Die Signifikanz der Modellkoeffizienten wurde im Zuge der Modellschätzung mit einem zweiseitigen T-Test überprüft. Als Signifikanzniveau wurde $\alpha = 0,05$ angenommen. Für die statistische Auswertung wurde das Statistik-Programm R genutzt. Es wurde außerdem eine Dummy-Kodierung in den linearen Modellen durchgeführt; die Referenzkategorien waren in allen Analysen die weiblichen Mäuse der ersten Kohorte ohne EE (Kontrolle). Die Daten der Parameter Fur-Score und Nest-Score wurden deskriptiv ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf physiologische Parameter

In der umfassenden phänotypischen Untersuchung der GMC wurden sowohl innerhalb als auch zwischen den verschiedenen Screens unabhängige und abhängige Messparameter verwendet. Bei der Auswertung des Einflusses von EE auf die Mittelwerte und die Variabilität der quantitativ erhobenen Parameter wurde nicht zwischen unabhängigen und abhängigen Messparametern unterschieden, sondern die Auswertung für die Gesamtzahl der Parameter ($n = 164$) bzw. für alle Parameter innerhalb der einzelnen Screens durchgeführt.

4.1.1 Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter

Der Einfluss der Hauptfaktoren (Enrichment [double und nest], Geschlecht [sex male], Kohorte [cohort 2 und 3]) auf den Mittelwert der quantitativen, physiologischen Parameter wurde mithilfe von linearen Modellen ausgewertet. Die Referenzkategorie waren die weiblichen Mäuse ohne EE der ersten Kohorte [control, sex female, cohort 1]. Es wurde eine Variablenselektion nach dem Bayesschen Informationskriterium (BIC) durchgeführt und die Ergebnisse in einer Heatmap (Abbildung 9) zusammengefasst. Nicht-selektierte Parameter wurden grau markiert, während ein relevanter Unterschied durch violette (d.h. Mittelwert im Vergleich zur Referenzkategorie erhöht) oder gelbe (d.h. Mittelwert im Vergleich zur Referenzkategorie verringert) Farbgebung kenntlich gemacht wurde. Die Stärke der Farbgebung spiegelte die Größe des Unterschieds wider (Abbildung 8).

Um den Einfluss des Faktors Enrichment besser mit dem der Faktoren Geschlecht bzw. Kohorte vergleichen zu können, wurden geglättete Histogramme der Parameter erstellt, die durch die jeweiligen Hauptfaktoren beeinflusst wurden (Abbildung 10, Abbildung 11).

Die Anzahl veränderter Parameter pro Test sowie die Größe des gefundenen Unterschieds sind zusätzlich in Tabelle 6 und Tabelle 7 dargestellt.

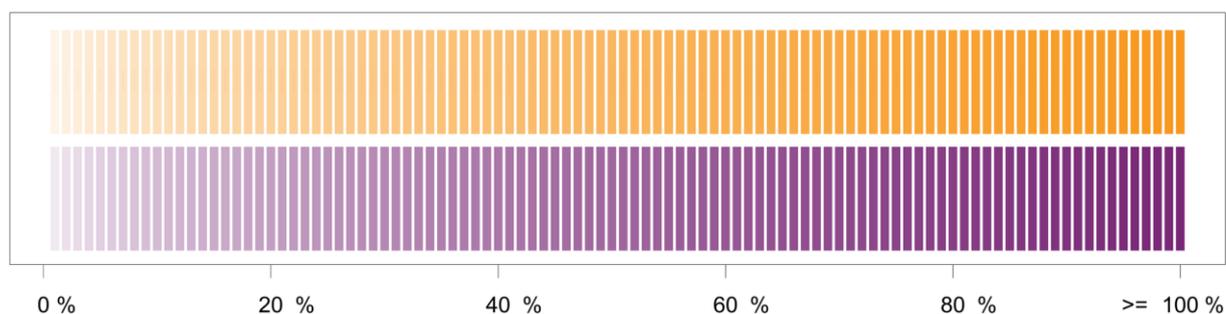


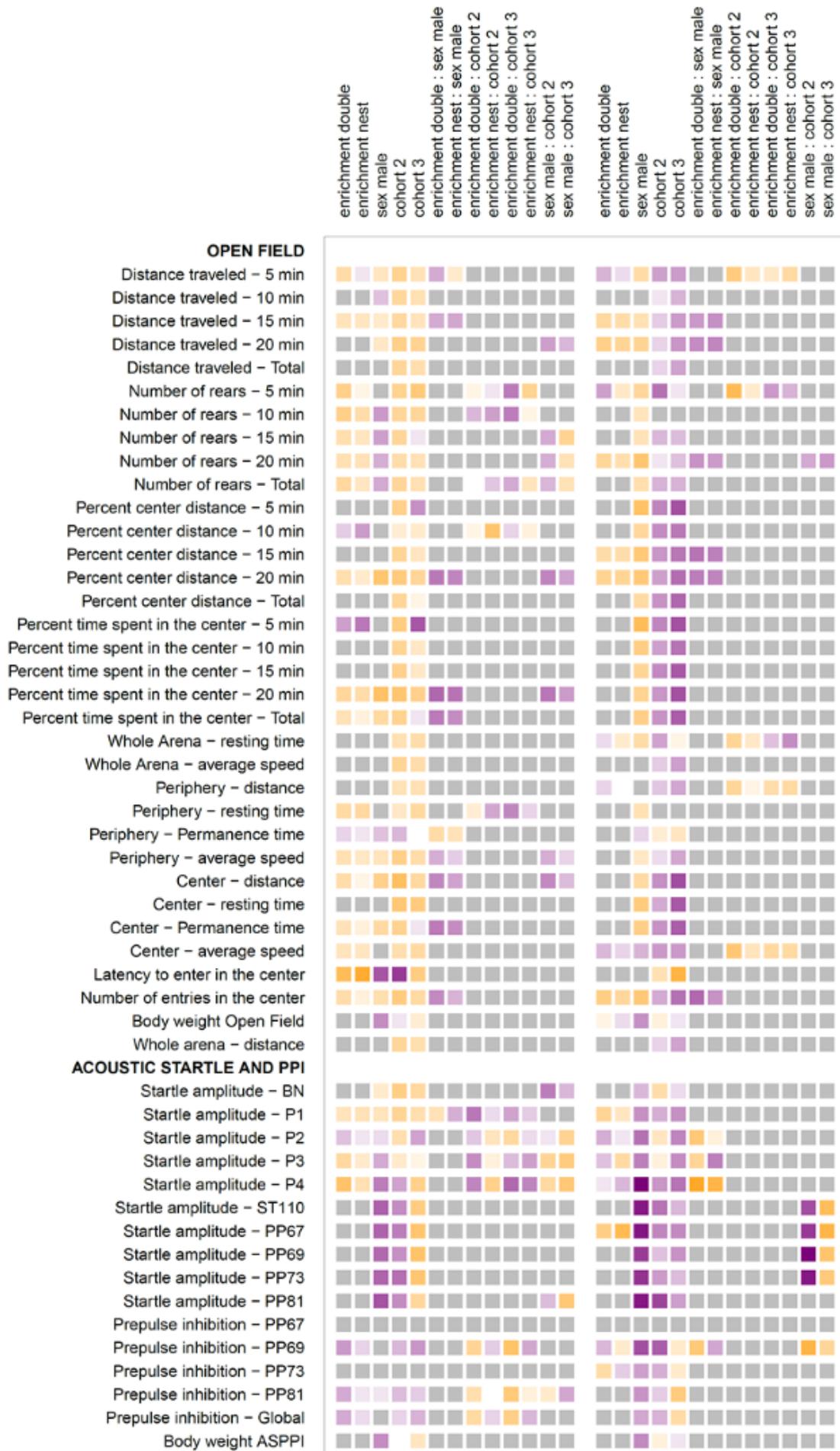
Abbildung 8. Farbschema zur Heatmap, die Veränderungen des Mittelwerts darstellt.

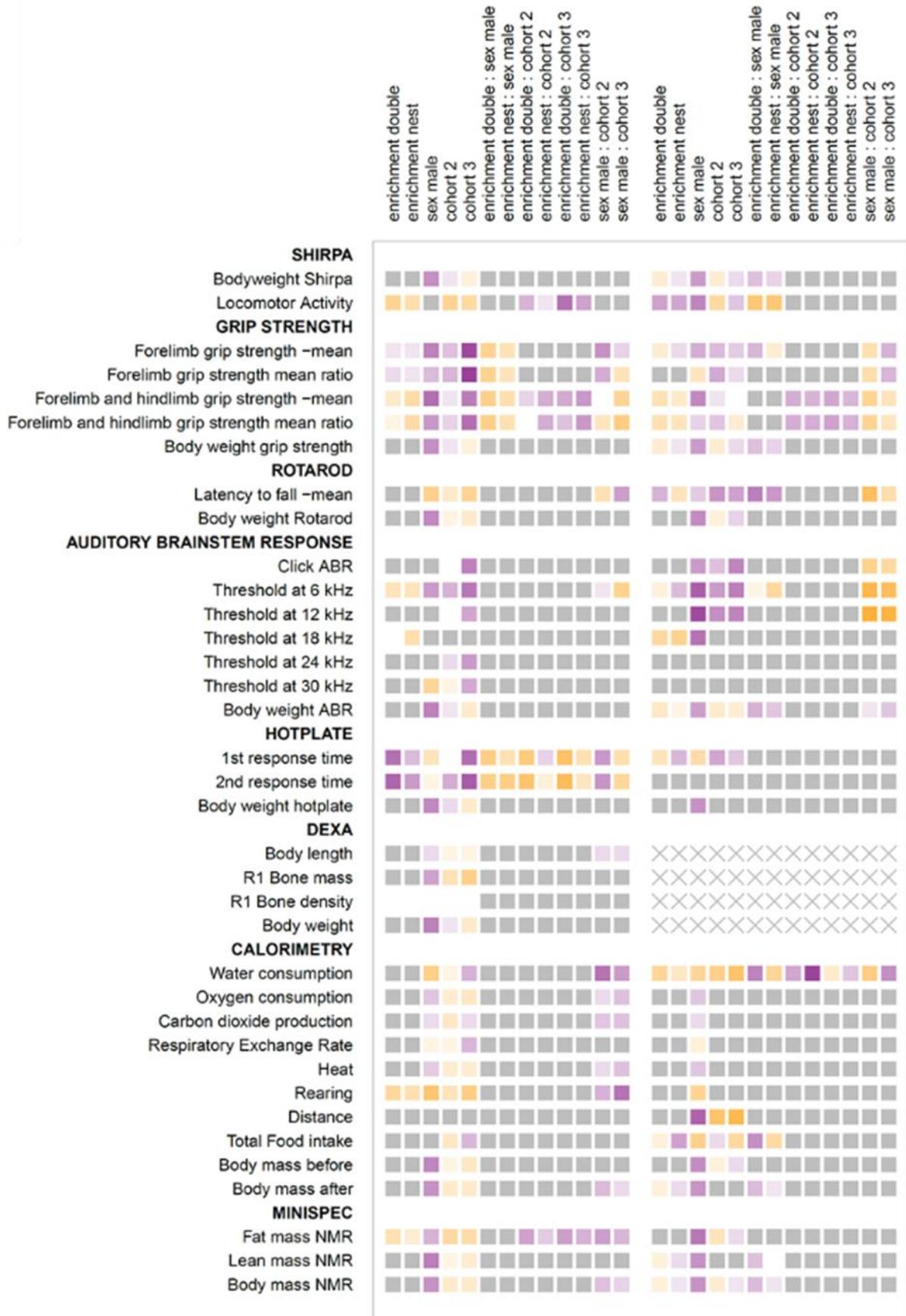
Das Farbschema gibt die Veränderungen des Mittelwerts als prozentualen Anteil des Mittelwerts der Referenzkategorie (weibliche Tiere der Kohorte 1 ohne Enrichment) wieder und die Farbstärke spiegelt die Größe des Unterschieds wider. Gelbe Färbung: der Faktor war relevant für das Modell, i.e. der Mittelwert war verringert im Vergleich zu der Referenzgruppe; violette Färbung: der Faktor war relevant für das Modell, i.e. der Mittelwert war erhöht im Vergleich zu der Referenzgruppe.

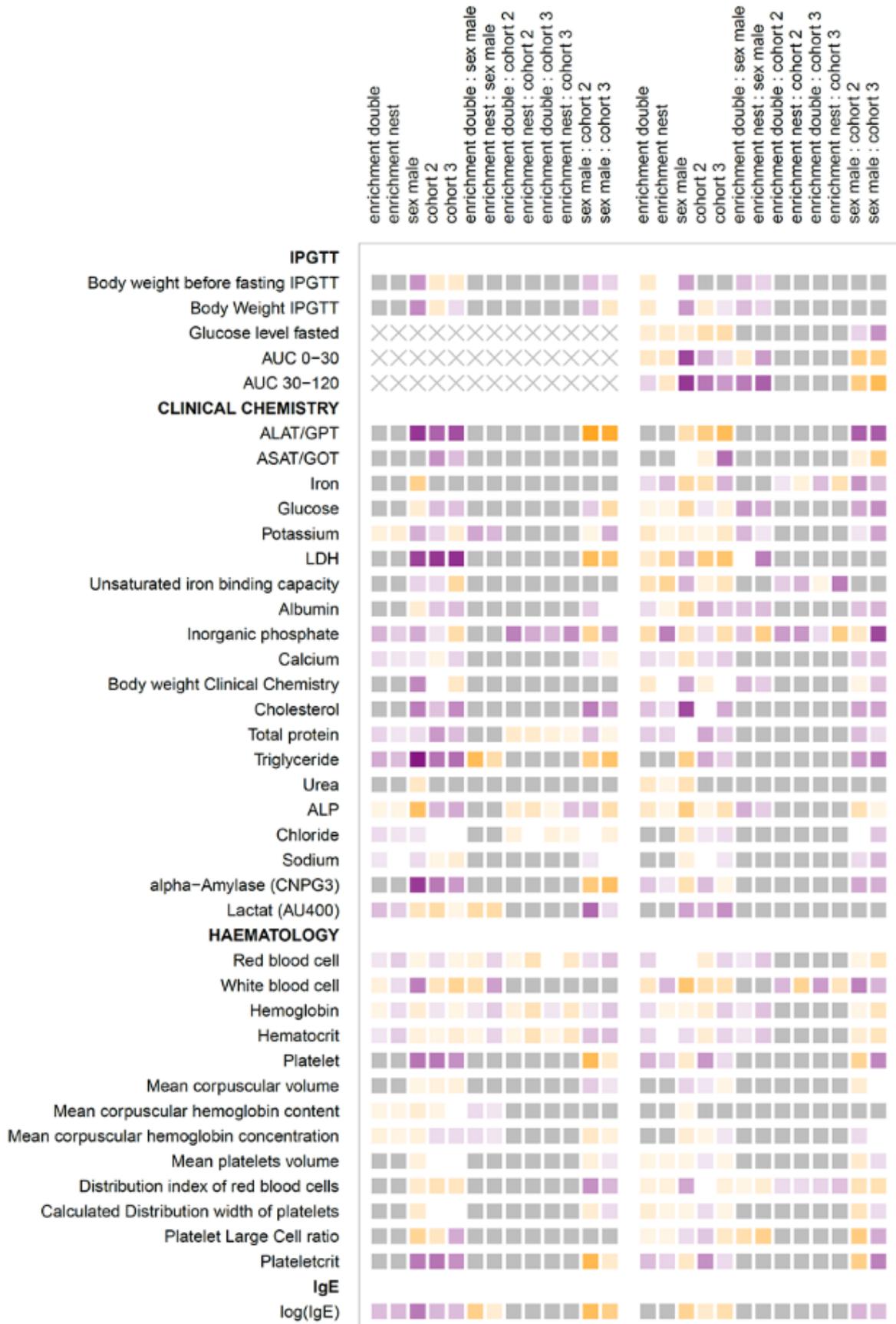


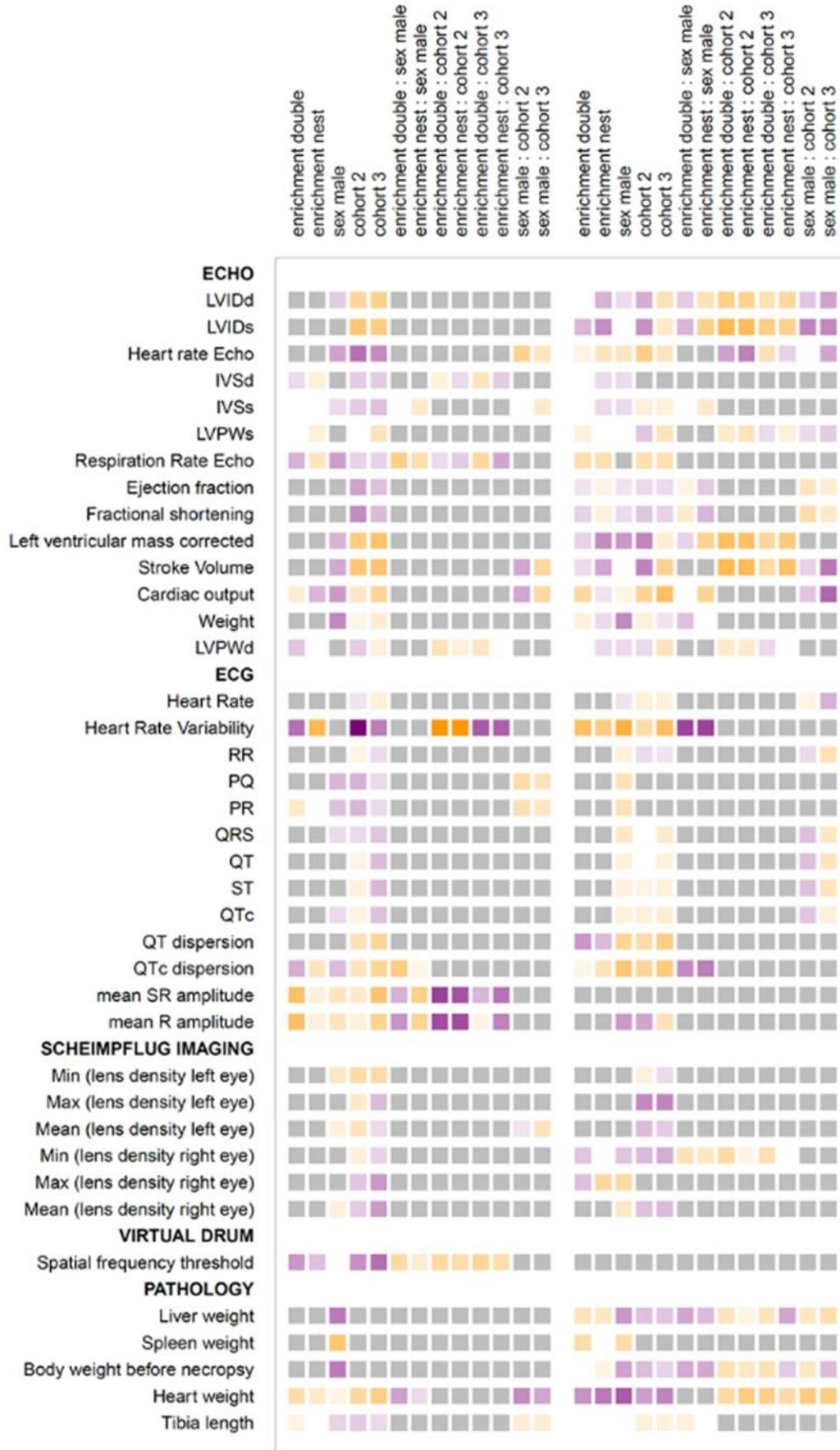
Abbildung 9. Einfluss der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) auf den Mittelwert physiologischer Parameter bei B6 und D2. Detailansichten auf den folgenden Seiten.

Die Heatmap zeigt die Ergebnisse für alle quantitativen Parameter (Reihen) und die (Haupt-) Einflussfaktoren, sowie deren (Doppel-) Interaktionen (Spalten). Ergebnisse für B6 sind jeweils auf der linken Seite, Ergebnisse für D2 auf der rechten Seite dargestellt. Der Einfluss der Hauptfaktoren wurde mithilfe von linearen Modellen berechnet. Eine Variablenselektion mittels des Bayesschen Informationskriterium (BIC) wurde durchgeführt und die Unterschiede sind als farbkodierte Schätzer β des jeweiligen Modells in Prozent des Mittelwerts der Referenzkategorie dargestellt. Die Referenzkategorie sind die weiblichen Tiere der ersten Kohorte ohne Enrichment. Der Schätzer β gibt die Veränderung durch den jeweiligen Faktor an. Die Farbkodierung erklärt sich wie folgt: grau: die Variablenselektion ergab keinen relevanten Einfluss des jeweiligen Faktors auf das Modell, das heißt, kein Unterschied zur Referenzkategorie wurde beobachtet, violett: Faktor war relevant für das Modell, Mittelwert war erhöht im Vergleich zur Kontrolle, gelb: Faktor war relevant für das Modell, Mittelwert war verringert im Vergleich zur Kontrolle. Die Farbstärke korreliert mit der Größe des Unterschieds. „x“ markiert Parameter, die in der Analyse nicht ausgewertet wurden.









4.1.1.1 B6

Der Faktor Enrichment hatte Einfluss auf 69/161 Parameter; eine höhere Anzahl von Parametern wurde durch die anderen Hauptfaktoren Geschlecht (118/161) und Kohorte (152/161) verändert.

Insgesamt waren die prozentualen Unterschiede der jeweiligen Gruppen und ihrer Kontrollen für den Faktor Geschlecht und Kohorte deutlich höher als für den Faktor Enrichment (Abbildung 10). Es wurden weniger Parameter durch Enrichment beeinflusst als durch die anderen Hauptfaktoren, was an der kleineren Fläche unter der Kurve für den Faktor Enrichment im Vergleich zu Faktor Geschlecht und Kohorte ersichtlich ist. Beide Enrichment-Kurven sind außerdem schmaler als die der anderen Hauptfaktoren. Dies weist darauf hin, dass der Einfluss von Enrichment geringer ist als der der anderen Hauptfaktoren.

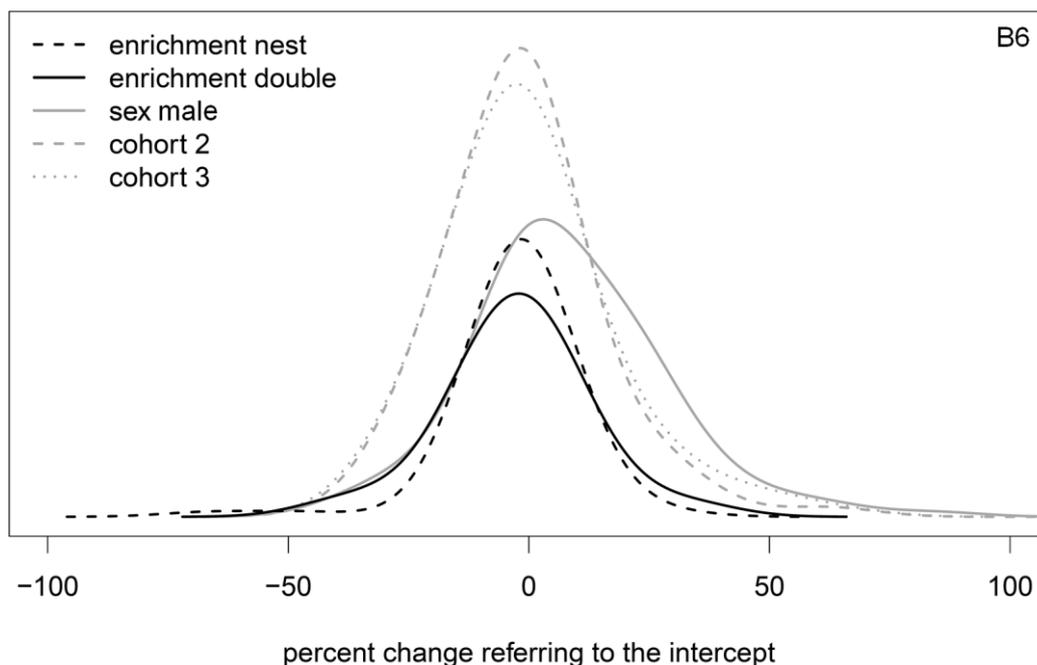


Abbildung 10. Geglättetes Histogramm, das den Einfluss der Hauptfaktoren auf den Mittelwert der untersuchten Parameter (n = 161) bei B6 darstellt.

Der Veränderung durch die Hauptfaktoren ist als prozentualer Anteil des „Intercept“ angegeben. Der „Intercept“ gibt den Mittelwert der Referenzkategorie an. Die Fläche unter der Kurve ist proportional zur Anzahl an Parametern, die im Zuge der Variablenselektion mithilfe des BICs als relevant selektiert wurden. Nicht-selektierte Parameter wurden nicht dargestellt; Anzahl selektierter Parameter: „enrichment nest“: 69, „enrichment double“: 69, „sex“: 118, „cohort“ 2: 152, „cohort“ 3: 152. Die Höhe des Histogramms ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeitsdichte multipliziert mit der Gesamtparameterzahl und ist proportional zur Anzahl der Parameter, die in die jeweilige Klasse fallen.

Ein genauer Blick auf Parameter einzelner Screens oder Tests in der Heatmap (Abbildung 9) und Tabelle 6 zeigt, dass manche Tests robust gegenüber dem Einflussfaktor Enrichment waren. Die gemessenen Parameter der folgenden Tests wurden generell nicht durch Enrichment im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst: Rotarod (Neurologie), Scheimpflug-Imaging (Auge), ABR (Neurologie), indirekte Kalorimetrie und qNMR (Energiemetabolismus).

Andere Tests schienen empfindlicher gegenüber dem Einfluss von Enrichment zu sein. Besonders Stress-sensible Tests, z.B. aus dem Bereich des Verhaltens, wurden in der Literatur häufig durch Veränderungen der Haltungsumgebung beeinflusst und sollen deshalb genauer betrachtet werden. In der vorliegenden Studie wurden beim OFT (Verhalten) 20/34 Parameter durch Enrichment beeinflusst. Der prozentuale Unterschied zwischen dem Mittelwert der Gruppen Nest bzw. Double und dem Mittelwert der Kontrolle schwankte zwischen 1 und 15 % bei 17/20 (Gruppe Double) und 18/20 (Gruppe Nest) Parametern.

Es wurden bei vielen Parametern geschlechtsspezifische Unterschiede beobachtet (Abbildung 9 und Tabelle 6). Interaktionen zwischen Geschlecht und EE traten bei 34 Parametern und zumeist nur bei einzelnen Parametern eines Tests auf. Lediglich bei der Kraftmessung und beim Wärmeplattentest waren bei allen Parametern eines Tests durchgängig Interaktionen zu finden.

Tabelle 6. Anzahl der physiologischen Parameter, die durch die Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) beeinflusst wurden bei B6.

Test	N	Double		Nest		Sex male		Cohort 2		Cohort 3	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Open Field	34	17 3	1-20 >20	18 2	1-20 >20	15 3	1-20 >20	25 9	1-20 >20	30 4	1-20 >20
ASR + PPI	15	6 1	1-20 >20	7 0	1-20 >20	6 6	1-20 >20	11 3	1-20 >20	10 4	1-20 >20
SHIRPA	2	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
Grip strength	5	4 0	1-20 >20	4 0	1-20 >20	3 2	1-20 >20	5 0	1-20 >20	1 4	1-20 >20
Rotarod	2	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	1 1	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
ABR	7	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 1	1-20 >20	6 0	1-20 >20	4 2	1-20 >20
Hotplate	3	0 2	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 1	1-20 >20	3 0	1-20 >20	1 2	1-20 >20
DEXA	4	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	3 1	1-20 >20	4 0	1-20 >20	3 1	1-20 >20
Calorimetry	10	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	5 3	1-20 >20	9 0	1-20 >20	8 1	1-20 >20
Minispec	3	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	2 1	1-20 >20	3 0	1-20 >20	3 0	1-20 >20
IPGTT	2	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	1 1	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
Clin. Chem.	20	9 0	1-20 >20	9 0	1-20 >20	12 7	1-20 >20	14 4	1-20 >20	14 4	1-20 >20
Hematology	13	6 0	1-20 >20	6 0	1-20 >20	10 3	1-20 >20	11 2	1-20 >20	13 0	1-20 >20
IgE	1	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	0 1	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20
ECHO	14	10 4	1-20 >20	11 3	1-20 >20	7 1	1-20 >20	12 1	1-20 >20	12 2	1-20 >20
ECG	13	2 3	1-20 >20	4 1	1-20 >20	7 0	1-20 >20	12 1	1-20 >20	11 2	1-20 >20
Scheimpflug	6	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	3 0	1-20 >20	6 0	1-20 >20	6 0	1-20 >20
Virtual drum	1	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	0 1	1-20 >20
Pathology	5	2 0	1-20 >20	1 1	1-20 >20	2 3	1-20 >20	2 0	1-20 >20	1 1	1-20 >20

Die Tabelle stellt die Anzahl (n) der durch die Hauptfaktoren veränderten Parameter für jeden einzelnen Test dar und zeigt zusätzlich, wie groß der Veränderung (1-20 % oder > 20 %) ist. Die Veränderung ist in Prozent des Mittelwerts der Referenzkategorie (weibliche Tiere der ersten Kohorte ohne EE) angegeben. N = Gesamtzahl der gemessenen Parameter pro Test.

4.1.1.2 D2

Bei den D2-Mäusen konnten Unterschiede zwischen den Tieren mit und ohne Enrichment bei 88/160 Parametern festgestellt werden, während durch die anderen Hauptfaktoren 144/160 (Geschlecht) und 135/160 (Kohorte) Parameter verändert wurden.

Insgesamt wurden, wie auch bei den B6-Mäusen, weniger Parameter von dem Faktor Enrichment beeinflusst als von den anderen Hauptfaktoren, was sich in der kleineren Fläche unter der Kurve für den Faktor Enrichment im Vergleich zu den anderen Hauptfaktoren widerspiegelt (Abbildung 11). Die Kurven für Double- und Nest-Enrichment waren außerdem schmaler als die der anderen Hauptfaktoren. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss von Enrichment insgesamt geringer ist als der der Faktoren Kohorte und Geschlecht.

Auch bei D2-Mäusen waren manche Tests weniger sensibel gegenüber dem Einfluss von Faktor Enrichment als andere (Abbildung 9, Tabelle 7), zum Beispiel das Scheimpflug imaging und die Untersuchung in der optokinetischen Trommel (Auge), die indirekte Kalorimetrie (Energie-Metabolismus), IgE-Messung (Allergie) und das EKG (Kardiovaskuläre Gesundheit).

Der Unterschied zwischen den Geschlechtern war bei D2-Mäusen bei einem Großteil der Parameter zu sehen (Abbildung 12 und Tabelle 7). Interaktionseffekte zwischen den Faktoren Geschlecht und Enrichment waren bei 54 Parametern erkennbar, es waren jedoch jeweils nur einzelne Parameter eines Tests betroffen.

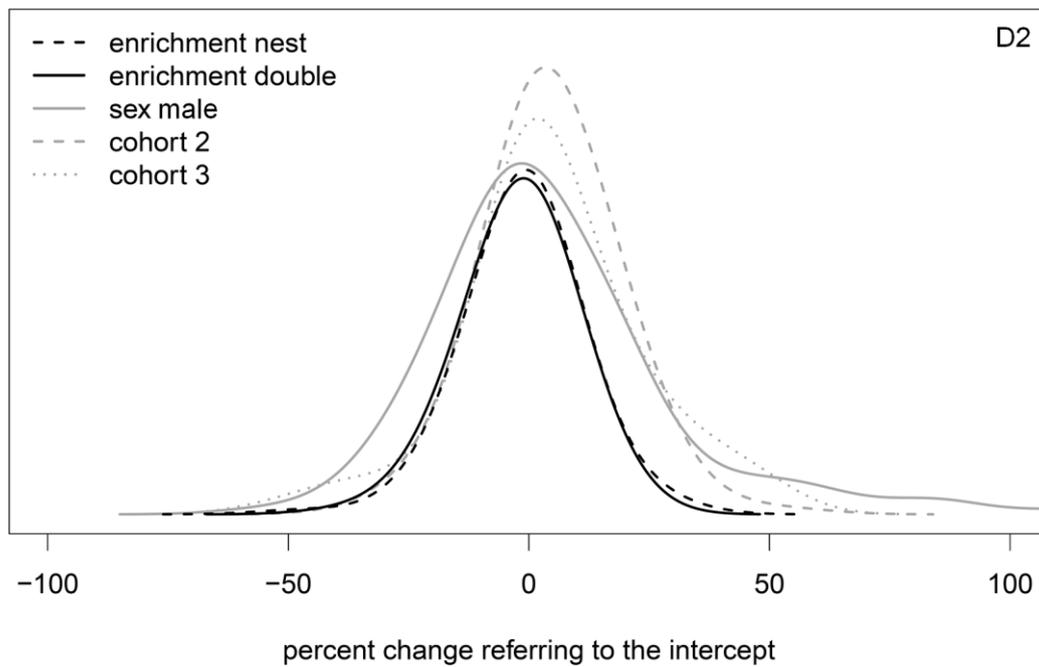


Abbildung 11. Geglättetes Histogramm, das den Einfluss der Hauptfaktoren auf den Mittelwert der untersuchten Parameter (n = 160) bei D2 darstellt.

Die Veränderung durch die Hauptfaktoren ist als prozentualer Anteil des „Intercept“ angegeben. Der „Intercept“ gibt den Mittelwert der Referenzkategorie an. Die Fläche unter der Kurve ist proportional zur Anzahl an Parametern, die im Zuge der Variablenselektion mithilfe des BICs als relevant selektiert wurden. Nicht-selektierte Parameter wurden nicht dargestellt; Anzahl selektierter Parameter: „enrichment nest“: 88, „enrichment double“: 88, „sex“: 144, „cohort“ 2: 135, „cohort“ 3: 135. Die Höhe des Histogramms ergibt sich aus der Wahrscheinlichkeitsdichte multipliziert mit der Gesamtparameterzahl und ist proportional zur Anzahl der Parameter, die in die jeweilige Klasse fallen.

Tabelle 7. Anzahl der physiologischen Parameter, die durch die Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) beeinflusst wurden bei D2.

Screen	N	Double		Nest		Sex male		Cohort 2		Cohort 3	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Open Field	34	10 2	1-20 >20	12 0	1-20 >20	18 10	1-20 >20	28 4	1-20 >20	17 15	1-20 >20
ASR + PPI	15	6 1	1-20 >20	6 1	1-20 >20	6 9	1-20 >20	11 4	1-20 >20	11 4	1-20 >20
SHIRPA	2	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	1 1	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
Grip strength	5	4 0	1-20 >20	4 0	1-20 >20	4 1	1-20 >20	5 0	1-20 >20	5 0	1-20 >20
Rotarod	2	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
ABR	7	3 0	1-20 >20	3 0	1-20 >20	2 3	1-20 >20	4 0	1-20 >20	1 3	1-20 >20
Hotplate	3	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20
DEXA	4	x	1-20 >20	x	1-20 >20	x	1-20 >20	x	1-20 >20	x	1-20 >20
Calorimetry	10	3 0	1-20 >20	3 0	1-20 >20	8 2	1-20 >20	3 1	1-20 >20	2 2	1-20 >20
Minispec	3	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 1	1-20 >20	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20
IPGTT	5	5 0	1-20 >20	5 0	1-20 >20	3 2	1-20 >20	3 1	1-20 >20	4 0	1-20 >20
Clin. Chem.	20	14 0	1-20 >20	13 1	1-20 >20	17 3	1-20 >20	17 2	1-20 >20	16 3	1-20 >20
Hematology	13	10 0	1-20 >20	10 0	1-20 >20	12 1	1-20 >20	12 0	1-20 >20	12 0	1-20 >20
IgE	1	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20	1 0	1-20 >20
ECHO	14	14 0	1-20 >20	14 0	1-20 >20	12 1	1-20 >20	10 3	1-20 >20	12 1	1-20 >20
ECG	14	2 1	1-20 >20	2 1	1-20 >20	10 2	1-20 >20	10 0	1-20 >20	7 3	1-20 >20
Scheimpflug	6	2 0	1-20 >20	2 0	1-20 >20	3 0	1-20 >20	4 1	1-20 >20	4 1	1-20 >20
Virtual drum	1	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20	0 0	1-20 >20
Pathology	5	5 0	1-20 >20	4 1	1-20 >20	4 1	1-20 >20	4 0	1-20 >20	3 1	1-20 >20

Die Tabelle stellt die Anzahl (n) der durch die Hauptfaktoren veränderten Parameter für jeden einzelnen Test dar und zeigt zusätzlich, wie groß die Veränderung (1-20 % oder > 20 %) ist. Die Veränderung ist in Prozent des Mittelwerts der Referenzkategorie (weibliche Tiere der ersten Kohorte ohne EE) angegeben. N = Gesamtzahl der gemessenen Parameter pro Test. „x“ markiert Parameter, die in der Analyse nicht ausgewertet wurden.

4.1.1.3 Kategoriale Daten

Die folgenden Parameter wurden nicht quantitativ, sondern kategorial bzw. qualitativ erhoben, und wurden deshalb nicht in die Auswertung mit linearen Modellen einbezogen:

- Die Ergebnisse der SHIRPA-Untersuchung wurden mit der wissenschaftlichen Leiterin des Neurologie-Screens (Dr. Lore Becker) diskutiert, und es zeigten sich keine Auffälligkeiten, die auf die unterschiedlichen Haltungsbedingungen zurückzuführen waren (Tabelle 8).
- In der anatomischen Untersuchung (Dysmorphologie) wurden bei den folgenden untersuchten Parametern keine unphysiologischen Abweichungen weder bei B6- noch bei D2-Mäusen festgestellt: Schwanz, Haarkleid, Gliedmaßen, Schnurrhaare, Kopf, Ohren, Schnauze, Pfoten, Zehen, Nägel, Haut, Zähne, Genitalien, Mund, Lippen.
- In der histopathologischen Untersuchung (Pathologie) wurden einige Befunde festgestellt, die jedoch nicht mit den experimentellen Gruppen zu korrelieren waren (Tabelle 9). Einige Befunde wurden aber in der Literatur bereits erwähnt: Eine Kalzifizierung des Epi- und Myocardiums des Herzens wurde für D2-Mäuse bereits beschrieben [150]. Des Weiteren wurde eine subkapsuläre Zellhyperplasie in der Nebenniere sowohl bei B6- als auch D2-Mäusen gezeigt, wobei bei den B6- Mäusen die weiblichen Tiere stärker betroffen waren [151, 152]. Mikrogranulome in der Leber sind ebenfalls Veränderungen, die regelmäßig bei Mäusen gefunden werden [153]. Die Vakuolierung des Drüsenepithels in der Schilddrüse bei den B6-Tieren beiderlei Geschlechts und aller Versuchsgruppen wurde mit den wissenschaftlichen Leitern des Pathologie-Screens diskutiert. Es handelt sich um Befunde, die bei Mäusen des Stammes C57BL/6NTac sporadisch gefunden werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Veränderung weisen auf eine Substanz hin, die im retikulärem Endoplasmatischen Retikulum akkumuliert. Genauere Untersuchungen und deren Veröffentlichung stehen jedoch noch aus.

Tabelle 8. Ergebnisse der SHIRPA-Untersuchung (Neurologie).

Stamm	B6						D2					
	Kontrolle		Nest		Double		Kontrolle		Nest		Double	
Gruppe												
Geschlecht	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w
Körperposition	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0
Tremor	30/0	30/0	29/1	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Kotabsatz	20/10	16/14	14/16	19/11	20/10	17/13	11/19	18/12	14/16	21/9	17/13	26/4
Reaktion auf Transfer	0/23/ 7	0/13/ 17	0/19/ 11	0/16/ 14	0/22/ 8	0/17/ 13	0/27/ 3	0/29/ 1	0/28/ 2	0/29/ 1	0/29/ 1	0/29/ 1
Gangbild	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Schwanzhaltung	0/21/ 9	0/23/ 7	0/20/ 10	0/23/ 7	0/21/ 9	0/29/ 1	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0
Schreckreaktion	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/29/ 1	0/30/ 0	0/30/ 0	1/29/ 0	2/28/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0	0/30/ 0
Fluchtreaktion infolge Anfassen	0/19/ 11	0/21/ 9	0/25/ 5	0/25/ 5	0/22/ 8	0/23/ 7	0/23/ 7	0/24/ 6	0/25/ 5	0/22/ 8	0/22/ 8	0/25/ 5
Rückenkrümmung	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Zehenkneifen	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Pinna Reflex	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Urinabsatz	8/22	4/26	9/21	11/19	8/22	6/24	6/24	1/29	5/25	6/24	4/26	4/26
Aufrichtereflex	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Beißverhalten	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	29/1	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0	30/0
Vokalisation	25/5	25/5	26/4	23/7	23/7	28/2	27/3	28/2	26/4	27/3	28/2	28/2

Die Tabelle fasst die Anzahl der Tiere zusammen, die einen Parameter-spezifischen Score erreicht haben. Hierfür wurden die Tiere aller Kohorten zusammengefasst und die Ergebnisse sind für die Versuchsgruppen, beide Geschlechter (m = männliche, w = weiblich) und beide Stämme wie folgt dargestellt: (x/y/z), wobei x = Anzahl der Tiere mit Score "0", y = Anzahl der Tiere mit Score "1", z = Anzahl der Tiere mit Score "2". Details zu den einzelnen Scores: Körperposition: 0 = inaktiv, 1 = aktiv, 2 = übermäßig aktiv; Tremor: 0 = nicht vorhanden, 1 = vorhanden; Kotabsatz: 0 = vorhanden, 1 = nicht vorhanden; Reaktion auf Transfer: 0 = anhaltende Starre, 1 = kurzes Erstarren, 2 = sofortige Bewegung; Gangbild: 0 = flüssig, 1 = abnormal; Schwanzhaltung: 0 = schleifend, 1 = horizontal, 2 = erhoben; Schreckreaktion: 0 = keine Reaktion, 1 = Preyer Reflex, 2 = Springen; Fluchtreaktion infolge von Anfassen: 0 = keine Reaktion, 1 = Reaktion vorhanden, 2 = Fluchtreaktion vor Berührung; (pathologische) Rückenkrümmung: 0 = nicht vorhanden, 1 = vorhanden; Zehenkneifen: 0 = nicht vorhanden, 1 = vorhanden; Pinna Reflex: 0 = vorhanden, 1 = nicht vorhanden; Urinabsatz: 0 = vorhanden, 1 = nicht vorhanden; Aufrichtereflex: 0 = vorhanden, 1 = nicht vorhanden; Beißverhalten: 0 = keine Aggression, 1 = aggressiv; Vokalisation: 0 = nein, 1 = ja.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Befunde der histopathologischen Untersuchung (Pathologie).

Stamm	B6						D2					
	Kontrolle		Nest		Double		Kontrolle		Nest		Double	
	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w	m	w
Fok. Vakuolierung des Keimepithels, Hoden	0/6		0/6		2/6		0/6		1/5		0/5	
Fok. Hyperplasie, Samenblase	0/6		0/6		0/6		1/6		0/5		1/5	
Follikuläre Zysten, Ovar		1/6		0/6		0/6		0/6		0/5		0/5
Kalzifizierung des Epi- und Myocardiums, Herz	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	11/12	10/12	11/12	11/12	12/12	11/12
Fok. entz. Infiltrate, Lunge	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Fok. vask. Mineralisation, Lunge	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Fok. basophile Hypertrophie, Gl. Parotis	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Fok. lymphohistiozytische Infiltration, Gl. submandibularis	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Vakuolierung des Drüsenepithels, Schilddrüse	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Fok .follikuläre Zellhyperplasie, Schilddrüse	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Kleine Zysten, Nebenschilddrüse	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Fok. basophile Hypertrophie, Nebenschilddrüse	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	1/5
Fok. Zysten, Thymus	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	1/5	0/5
Fok. Mikrogranulome, Leber	2/6	5/6	4/6	2/6	3/6	3/6	1/6	4/6	0/5	3/5	2/5	3/5
Eosinophile Stellen, Leber	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/5	0/5	1/5	1/5
Subkapsuläre Zellhyperplasie (Typ A), Nebenniere	0/6	5/6	1/6	4/6	0/0	4/6	2/6	4/6	2/5	4/5	4/5	3/5
Akzessorische cortikale Knötchen, Nebenniere	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Fok. Entz. Infiltrate, Pankreas	1/6	1/6	0/6	2/6	0/6	1/6	1/6	1/6	0/5	2/5	0/5	2/5
Fok. zelluläre Veränderungen, Pankreas	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	3/6	0/5	1/5	0/5	0/5
Keratin-Zysten, Magen	0/6	1/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Amyloidose der Lamina propria, Dünndarm	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/5	2/5	0/5	2/5
Fok. tubuläre Regeneration, Niere	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Übergangszellpapillom, Niere	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/5	0/5	0/5	0/5
Fok. entz. Infiltrate, Urinblase	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5	0/5	0/5

Die betroffenen Tiere sind als Anteil der insgesamt untersuchten Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe dargestellt. Fok. = fokal, entz. = entzündlich, vask. = vaskulär

4.1.2 Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter

Zur Auswertung des Einflusses von EE auf die Variabilität der quantitativen, physiologischen Parameter wurden diese zunächst mit dem Bootstrap-Verfahren modifiziert. Dafür wurde 1000x eine Stichprobe von jeder Subgruppe (n = 10 pro Stamm, Geschlecht, Versuchsgruppe und Kohorte) gezogen. Als vergleichbares Maß für die Variabilität wurde der Variationskoeffizient ($= \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}}$) genutzt. Die Ergebnisse des Bootstrap-Verfahrens wurden dann mit linearen Modellen analysiert, bei denen Enrichment, Geschlecht und Kohorte als Hauptfaktoren angenommen wurden. Empirische 95 %-Konfidenzintervalle für die Schätzer für alle Einflussvariablen des linearen Modells wurden dann berechnet und wie folgt in einer Heatmap (Abbildung 12) zusammengefasst: Konfidenzintervall schließt 0 mit ein (grau, es wird kein Effekt vermutet), Konfidenzintervall ist größer als 0 (lila, Variationskoeffizienten erhöht im Vergleich zur Kontrolle), Konfidenzintervall ist kleiner als 0 (gelb, Variationskoeffizienten erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle).

Zusätzlich sind in Tabelle 10 und in Tabelle 11 die Anzahl und Anteile der Parameter, die in ihrer Variabilität erhöht, verringert oder unverändert sind dargestellt.

Tabelle 10. Zusammenfassung des Einflusses der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht und Kohorte) auf Variationskoeffizienten nach Modifizierung durch das Bootstrap-Verfahren bei B6.

Test	N	Double			Nest			Sex male			Cohort 2			Cohort 3		
Open Field	34	15	10	9	8	16	10	19	8	7	5	2	27	19	1	14
ASR + PPI	16	6	4	6	7	3	6	4	8	4	7	6	3	8	2	6
SHIRPA	2	1	0	1	2	0	0	0	0	2	0	1	1	0	1	1
Grip strength	5	2	2	1	3	2	0	0	0	5	0	3	2	0	4	1
Rotarod	2	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	2
ABR	7	4	2	1	3	4	0	0	1	6	2	4	1	0	4	3
Hot plate	3	2	1	0	1	1	1	0	0	3	1	1	1	0	0	3
DEXA	4	1	0	3	2	0	2	1	1	2	1	2	1	1	1	2
Calorimetry	10	4	3	3	5	1	4	6	3	1	4	3	3	4	4	2
Minispec	3	1	1	1	1	1	1	2	0	1	2	1	0	0	0	3
IpGTT	2	2	0	0	2	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	2
Hematology	13	6	0	7	5	1	7	4	3	6	5	7	1	4	5	4
Clin. Chem.	20	11	5	4	9	7	4	5	5	10	6	7	7	5	8	7
ECHO	14	10	2	2	6	3	5	2	1	11	1	12	1	1	11	2
ECG	13	8	2	3	7	3	3	6	6	1	7	4	2	1	1	11
Scheimpflug	6	1	2	3	1	1	4	1	3	2	2	2	2	1	2	3
Virtual drum	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
IgE	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
Pathology	5	1	0	4	3	0	2	1	3	1	2	3	0	3	0	2
Summe		77	35	49	68	44	49	54	42	65	47	60	54	49	44	68
%		48	22	30	42	27	30	34	26	40	29	37	34	30	27	42

Die Tabelle fasst die Ergebnisse von Abbildung 12 zusammen und gibt die absolute Anzahl und Anteile der Parameter an, die den jeweiligen Kategorien zugeordnet worden sind (grau: das Konfidenzintervall für β schließt die 0 mit ein \rightarrow es wird kein Effekt vermutet; lila: das Konfidenzintervall für β ist größer als 0 \rightarrow Variationskoeffizienten erhöht im Vergleich zur Kontrolle; gelb: das Konfidenzintervall für β ist kleiner als 0 \rightarrow Variationskoeffizienten verringert im Vergleich zur Kontrolle). N = Gesamtzahl der Parameter des Tests

Tabelle 11. Zusammenfassung des Einflusses der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht und Kohorte) auf Variationskoeffizienten nach Modifizierung durch das Bootstrap-Verfahren bei D2.

Test	N	Double			Nest			Sex male			Cohort 2			Cohort 3		
Open Field	34	10	7	17	11	2	21	1	1	32	9	24	1	11	18	5
ASR + PPI	16	3	5	8	7	6	3	2	6	8	5	4	7	10	3	3
SHIRPA	2	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1
Grip strength	5	2	1	2	3	2	0	0	4	1	4	0	1	0	4	1
Rotarod	2	2	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
ABR	7	5	0	2	4	0	3	4	0	3	5	0	2	3	1	3
Hot plate	3	2	0	1	1	2	0	2	1	0	2	1	0	1	1	1
DEXA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Calorimetry	10	7	3	0	6	4	0	4	5	1	2	1	7	4	1	5
Minispec	3	1	1	1	3	0	0	0	3	0	1	0	2	0	0	3
IpGTT	5	2	0	3	5	0	0	3	1	1	4	0	1	1	0	4
Hematology	13	3	10	0	1	12	0	2	0	11	4	7	2	3	4	6
Clin. Chem.	20	7	10	3	8	10	2	7	1	12	4	13	3	2	12	6
ECHO	14	5	4	5	7	7	0	9	4	1	8	1	5	6	5	3
ECG	13	4	3	6	8	5	0	5	4	4	3	2	8	2	4	7
Scheimpflug	6	1	1	4	1	3	2	3	2	1	4	0	2	1	2	3
Virtual drum	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
IgE	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
Pathology	5	3	1	1	2	3	0	2	2	1	2	2	1	1	3	1
Summe		59	46	55	69	58	33	46	36	78	59	57	44	46	60	54
%		37	29	34	43	36	21	29	23	49	37	36	28	29	38	34

Die Tabelle fasst die Ergebnisse von Abbildung 12 zusammen und gibt die absolute Anzahl und Anteile der Parameter an, die den jeweiligen Kategorien zugeordnet worden sind (grau: das Konfidenzintervall für β schließt die 0 mit ein \rightarrow es wird kein Effekt vermutet; lila: das Konfidenzintervall für β ist größer als 0 \rightarrow Variationskoeffizienten erhöht im Vergleich zur Kontrolle; gelb: das Konfidenzintervall für β ist kleiner als 0 \rightarrow Variationskoeffizienten verringert im Vergleich zur Kontrolle). N = Gesamtzahl der Parameter des Tests, „x“ = markiert Parameter, die in der Analyse nicht ausgewertet wurden.

Bei B6-Mäusen wurden die CVs von 84/161 bzw. 93/161 Parameter von Double- bzw. Nest-Enrichment im Vergleich zur Kontrolle beeinflusst, das heißt sie wurden entweder erhöht oder erniedrigt. Auch bei den D2-Mäusen waren die CVs eines Teils der Parameter durch Double-Enrichment (101/160) bzw. Nest-Enrichment (91/160) verändert, dh. erhöht oder verringert.

Allerdings gab es insgesamt gesehen kein eindeutiges Muster, dass die CVs von Parametern bestimmter Tests durch Enrichment überwiegend erhöht oder erniedrigt waren. Vielmehr

waren auch innerhalb eines Tests oder Screens sowohl Erhöhung als auch Erniedrigung oder auch keine Veränderung der CVs einzelner Parameter zu beobachten (Abbildung 12).

Auch die anderen Hauptfaktoren hatten Einfluss auf die CVs von Parametern: 107/161 (Geschlecht), 114/161 (Kohorte 2) und 112/161 (Kohorte 3) Parameter waren bei den B6-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle verändert, während sich bei den D2-Mäusen 114/160 (Geschlecht), 101/160 (Kohorte 2) und 114/160 (Kohorte 3) Parameter von der Kontrolle unterschieden.

Insgesamt wurden keine Hinweise gefunden, dass die Anwendung von Enrichment zu einer Erhöhung der Variationskoeffizienten weder generell, noch in einzelnen Tests oder Screens führte. Tatsächlich wurden durch Enrichment (Double und Nest) bei beiden Mausstämmen weniger Parameter in ihrer Variabilität beeinflusst als durch die Faktoren Geschlecht und Kohorte.

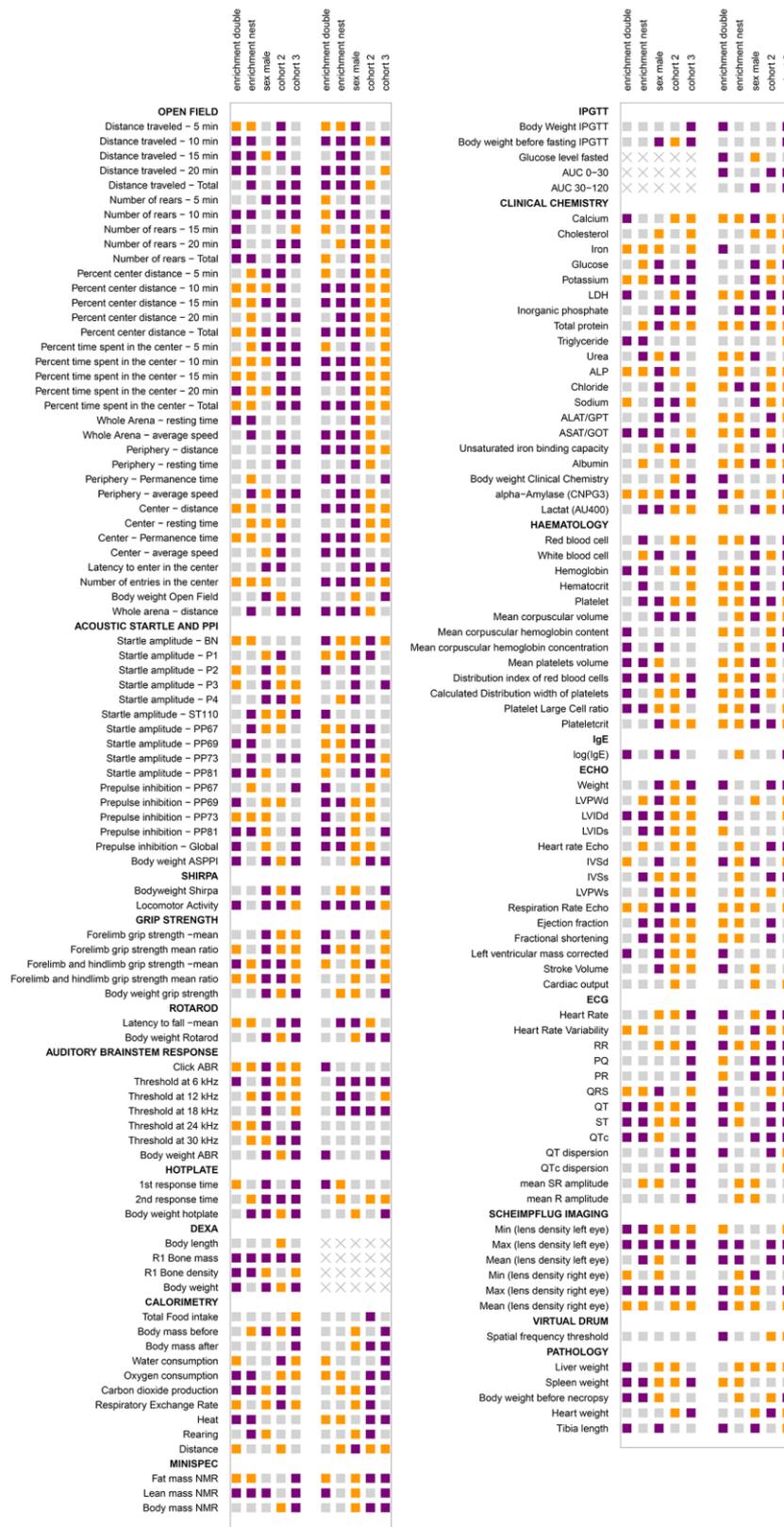
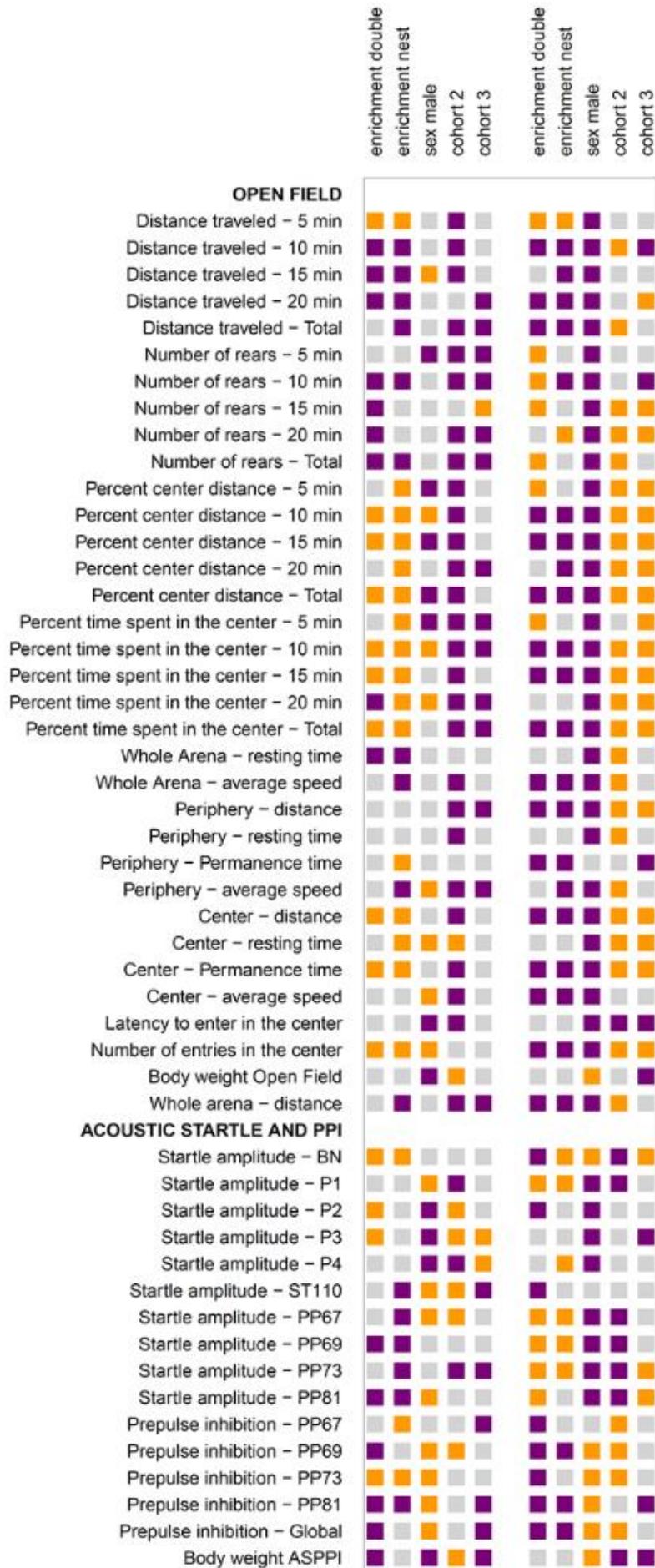
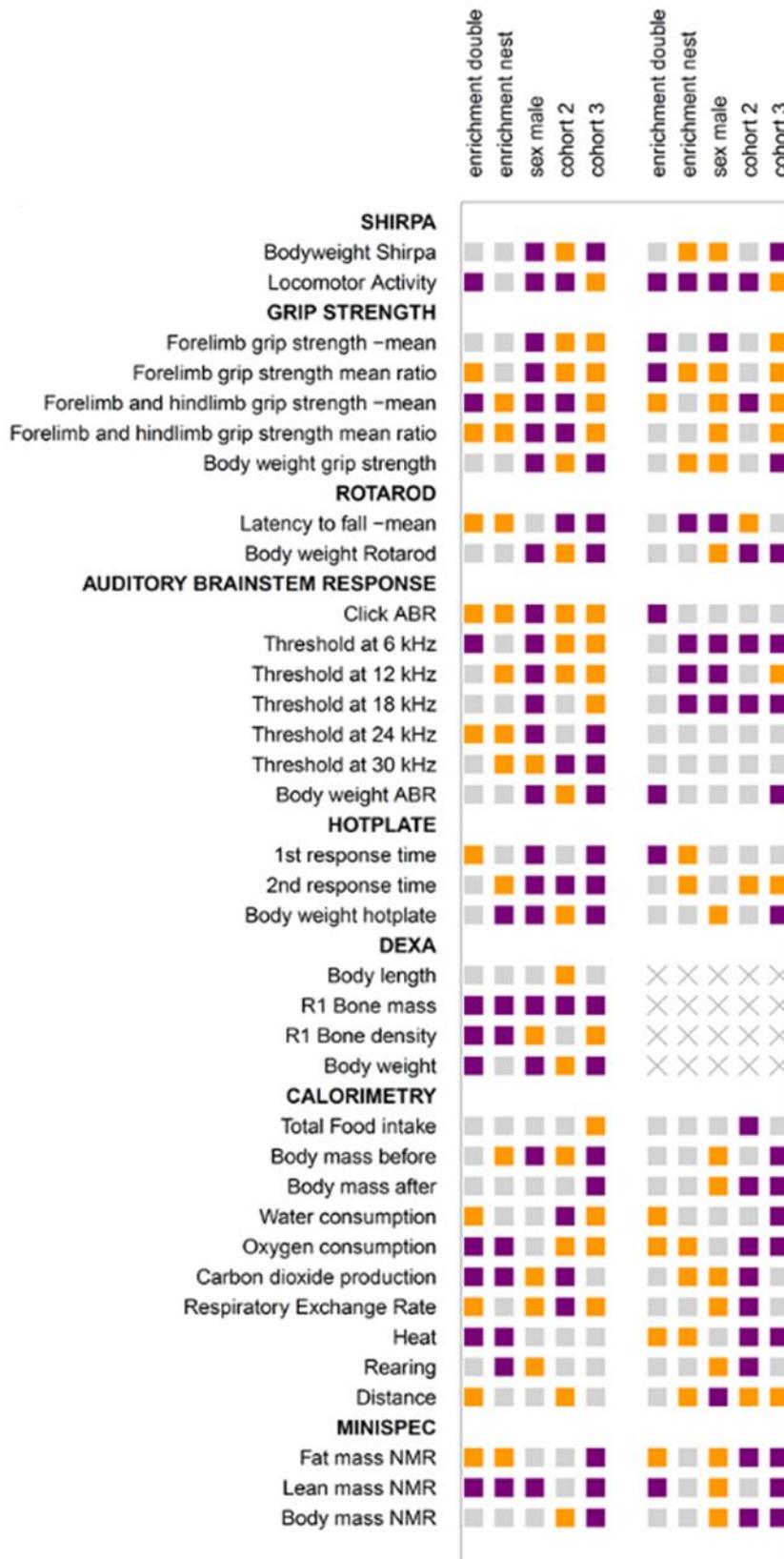
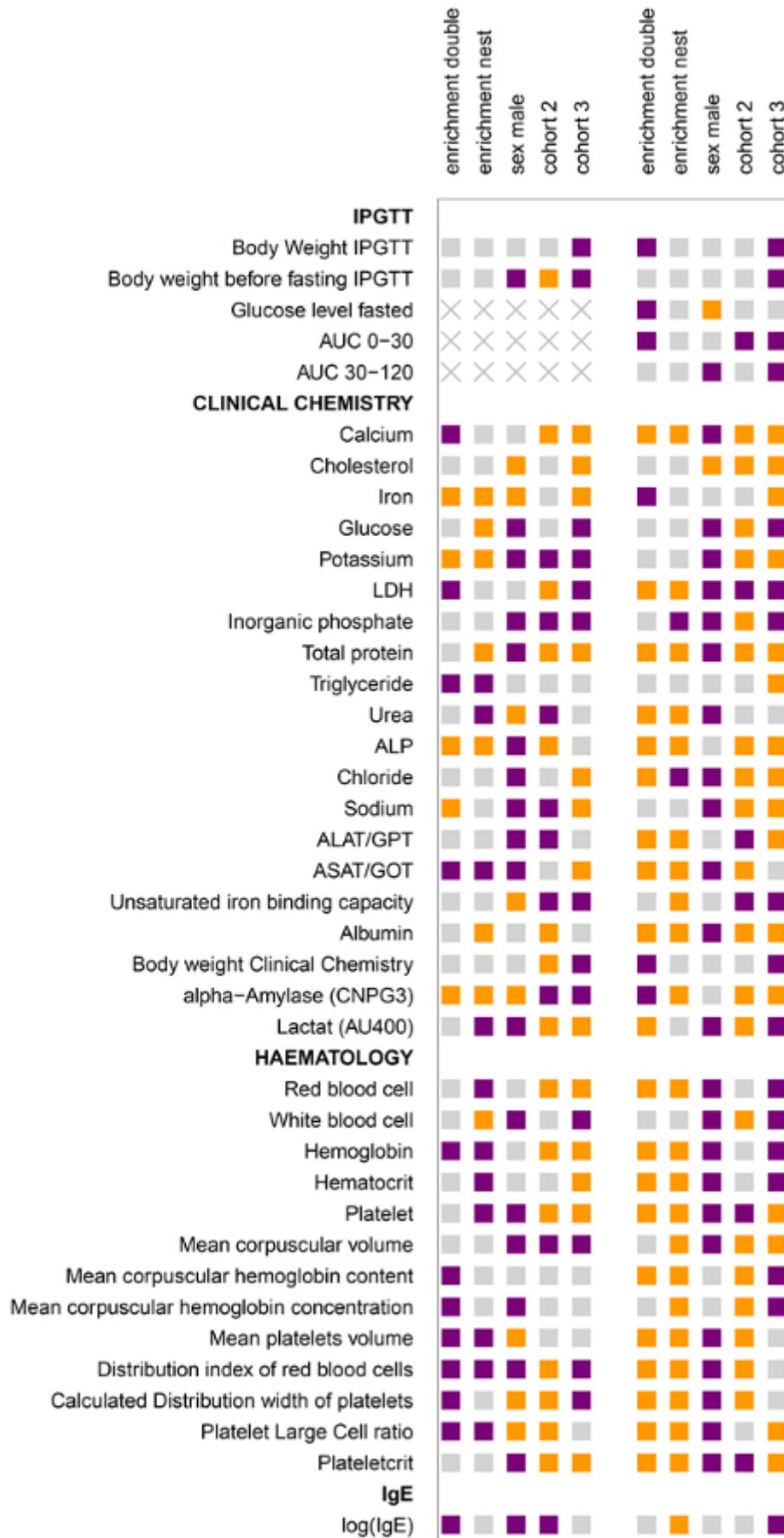


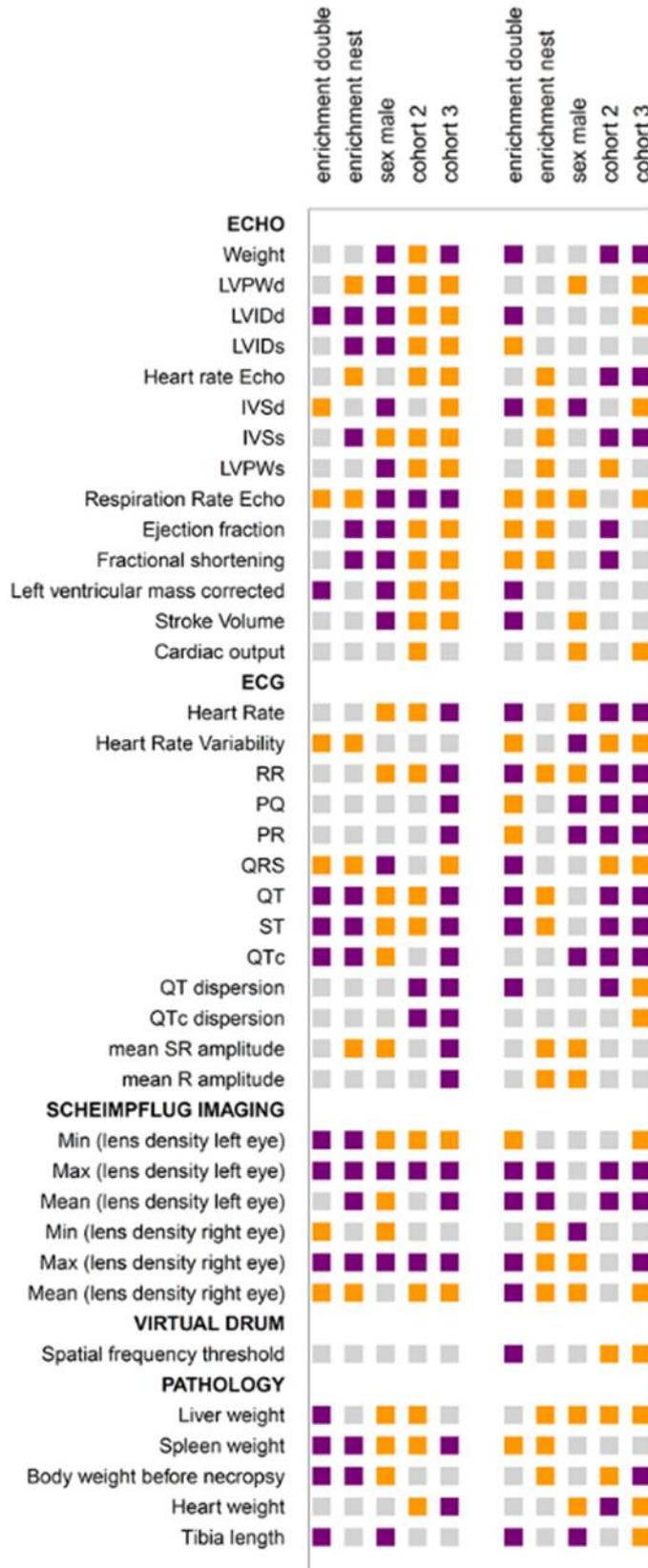
Abbildung 12. Einfluss der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) auf die Variabilität physiologischer Parameter bei B6 und D2. Detailansicht auf den nächsten Seiten.

Die Heatmap zeigt die Ergebnisse für alle quantitativen Parameter (Reihen) und die (Haupt-) Einflussfaktoren, sowie deren (Doppel-) Interaktionen (Spalten). Die Referenzkategorie sind die weiblichen Tiere ohne EE (Kontrolle) der ersten Kohorte. Ergebnisse für B6 sind jeweils auf der linken Seite, Ergebnisse für D2 auf der rechten Seite dargestellt. Die Ergebnisse des Bootstrap-Verfahrens wurden zusammengefasst, indem empirische 95 %-Konfidenzintervalle für die Schätzer für alle Einflussvariablen des linearen Modells berechnet wurden. Die Variationskoeffizienten (nach Bootstrap) der Parameter wurden dann einer der drei folgenden Kategorien zugeteilt: Konfidenzintervall schließt 0 mit ein (grau, es wird kein Effekt vermutet), Konfidenzintervall ist größer als 0 (lila, Variationskoeffizienten erhöht im Vergleich zur Kontrolle), Konfidenzintervall ist kleiner als 0 (gelb, Variationskoeffizienten erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle). „x“ = markiert Parameter, die in der Analyse nicht ausgewertet wurden.









4.2 Tierwohl-assoziierte Parameter

4.2.1 Körpergewicht

Die Mäuse beider Stämme nahmen über den Versuchszeitraum kontinuierlich an Gewicht zu ($p < 0,001$) (Abbildung 13, Abbildung 14). In beiden Stämmen war außerdem ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied zu sehen, männliche Mäuse wogen im Mittel 4,7g (B6) bzw. 3,7g (D2) mehr als die weiblichen Mäuse ($p < 0,001$). Es ergab sich außerdem ein signifikanter Kohorten-Effekt ($p < 0,05$): B6-Mäuse der 3. Kohorte waren insgesamt etwas leichter (etwa 1,2g) als die Tiere der ersten Kohorte.

Bei den B6-Tieren waren weder signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen (Double, Nest im Vergleich zur Kontrolle), noch signifikante Interaktionseffekte zu beobachten.

Bei D2-Tieren wurde auch kein signifikanter Haupteffekt der Versuchsgruppe (Double, Nest) beobachtet. Die Interaktion zwischen der Versuchsgruppe Double und dem Geschlecht zeigte jedoch, dass männliche D2-Mäuse mit Nest und Haus (Double) ein höheres Gewicht (ca. + 0,75 g) aufwiesen als die männlichen Tiere der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

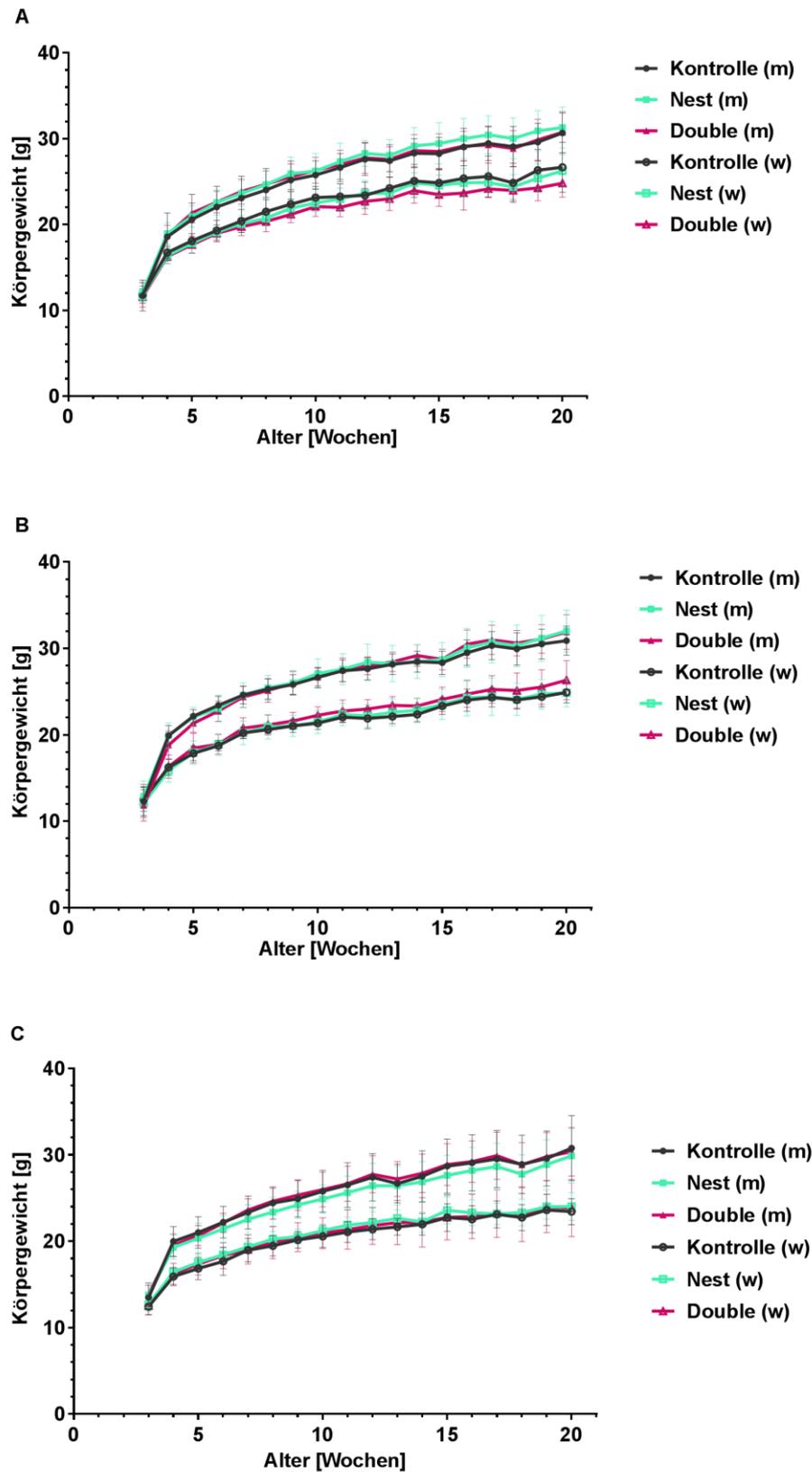


Abbildung 13. Körpergewichtsentwicklung bei B6-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die Entwicklung des Körpergewichts männlicher (m) und weiblicher (w) B6-Mäuse, der drei experimentellen Gruppen (Kontrolle, Nest, Double) über den Versuchszeitraum (3-20 Wochen) für A) Kohorte 1, B) Kohorte 2 und C) Kohorte 3. Die Gruppengröße betrug $n = 10$, außer Kohorte 2, w, Nest ab Woche 16: $n = 9$. Das Körpergewicht ist angegeben als Mittelwert \pm SD.

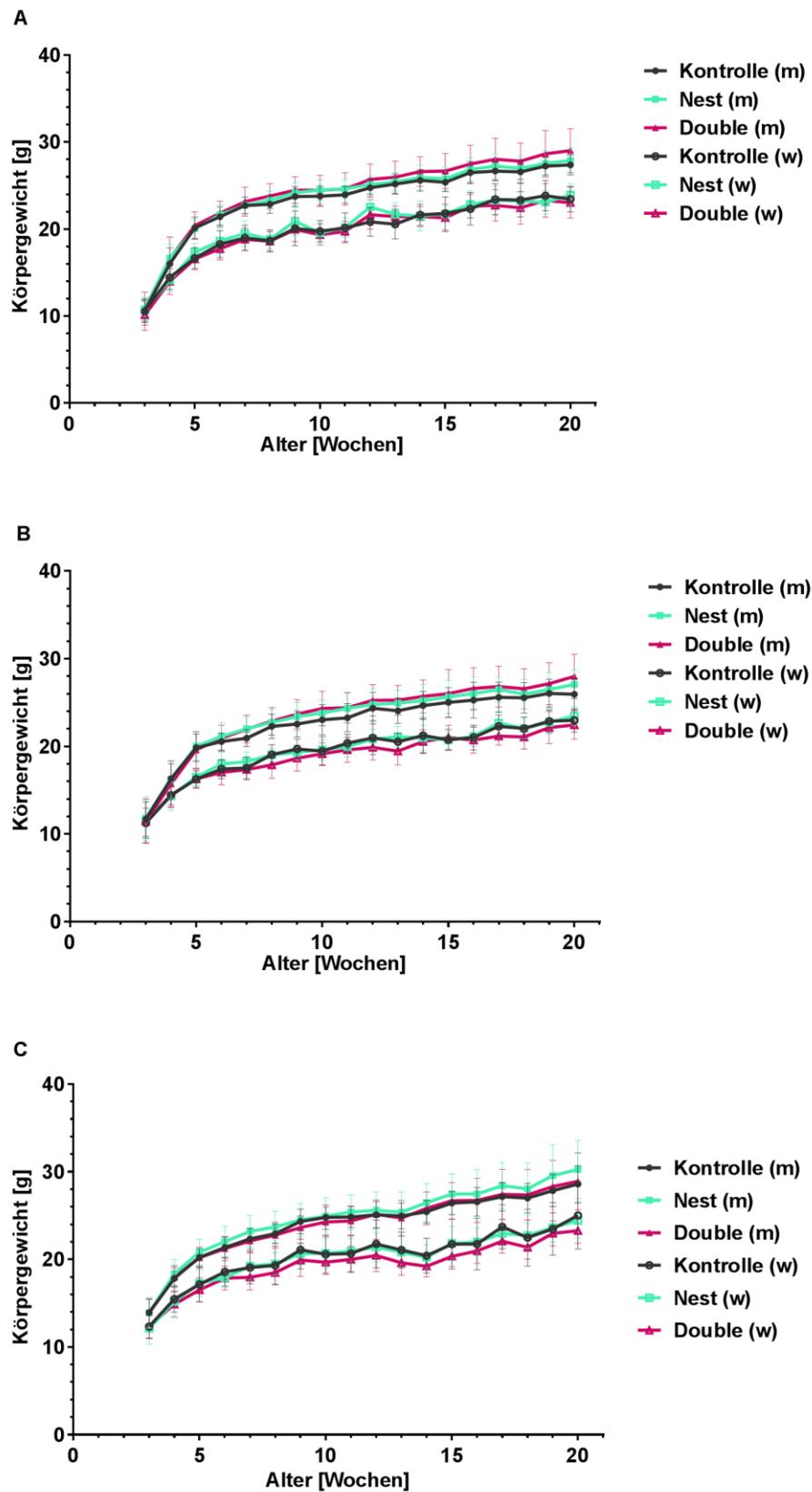


Abbildung 14. Körpergewichtsentwicklung bei D2-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die Entwicklung des Körpergewichts männlicher (m) und weiblicher (w) D2-Mäuse der drei experimentellen Gruppen (Kontrolle, Nest, Double) über den Versuchszeitraum (3-20 Wochen) für A) Kohorte 1, B) Kohorte 2 und C) Kohorte 3. Die Gruppengröße betrug $n = 10$ außer Kohorte 1, m, Nest: $n = 9$ ab Woche 18, Kohorte 1, w, Kontrolle: $n = 9$ ab Woche 16, Kohorte 2, w, Nest: $n = 9$ ab Woche 16, Kohorte 3, m, Nest: $n = 9$ ab Woche 19, Kohorte 3, m, Double: $n = 8$ ab Woche 16, Kohorte 3, w, Nest: $n = 9$ ab Woche 18. Das Körpergewicht ist angegeben als Mittelwert \pm SD.

4.2.2 Allgemeiner Gesundheitszustand

Bei der wöchentlichen Gesundheitsuntersuchung sind im Versuchszeitraum diverse Befunde aufgefallen. Drei Mäuse (zwei B6, eine D2) zeigten ein übermäßiges Zahnwachstum, weshalb die Zähne regelmäßig gekürzt wurden. Eine dauerhafte Trübung der Augen wurde in 6 Fällen festgestellt, bei 5 davon beginnend nach der Narkose in Woche 18. Zusätzlich war bei einigen Tieren (n = 10) temporär nach der Narkose eine leichte Trübung festzustellen, die aber nach wenigen Tagen wieder verschwand. Einige Tiere wiesen außerdem Verletzungen auf, die in die Kategorie Hautverletzung (wahrscheinlich infolge von Bissen) und andere Verletzungen (z.B. Verdickungen am Schwanz) eingeteilt wurden. Die Hautverletzungen waren in folgenden Körperbereichen lokalisiert: Penis (n = 3), Gesicht (n = 3), Anogenitalbereich (n = 5). Temporäre, motorische Auffälligkeiten wie eine verminderte Belastung einer Gliedmaße bzw. ein fehlender Stellreflex wurden bei zwei bzw. einer Maus gefunden. Verhaltensauffälligkeiten in Form von Stereotypen und Barbering sind unter Punkt 4.2.3 dargestellt bzw. beschrieben. In zwei Fällen war temporär das Allgemeinbefinden reduziert (Apathie, gestäubtes Fell). Bei zwei Tieren wurden außerdem Umfangsvermehrungen festgestellt. Eine Maus hatte einen nicht reponierbaren Penisprolaps und musste deshalb euthanasiert werden, während eine andere eine Linsenluxation ohne gestörtes Allgemeinbefinden aufwies, aus der sich eine Mikrophthalmie entwickelte. Sieben Tiere starben während des Versuchszeitraums vorzeitig, fünf davon versuchsbedingt (vier nach Atropin-Gabe während des Augen-Screens, eine in der Narkose für die ABR- und DEXA-Messung). Insgesamt waren diese Auffälligkeiten aber nicht mit den Versuchsgruppen korreliert (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12. Ergebnisse der Gesundheitsuntersuchung.

Stamm	B6						D2					
	Kontrolle		Nest		Double		Kontrolle		Nest		Double	
Gruppe												
Geschlecht	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f	m	f
Übermäßiges Zahnwachstum	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
dauerhafte Trübung der Augen	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
Haut-Verletzungen	1	0	0	0	4	0	1	2	2	0	0	1
Verletzungen anderer Art	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
Motorische Auffälligkeiten	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Stereotypes Springen	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Reduziertes Allgemeinbefinden	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Umfangsvermehrung	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Penisprolaps	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Linsenluxation	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Todesfälle	0	0	0	1	0	0	0	1	1	2	2	0

Die Tabelle fasst die Anzahl der Tiere zusammen, die während des Versuchs medizinische Auffälligkeiten zeigten. Hierfür wurden die Tiere aller Kohorten zusammengefasst (Gruppengröße n = 30) und die Ergebnisse sind für die Versuchsgruppen, beide Geschlechter und beide Stämme dargestellt.

4.2.3 Stereotypien und Fur-Score

Während der Gesundheitsuntersuchung wurde ein Fall von stereotypem Springen bei einer weiblichen B6-Maus in der Nestgruppe festgestellt (insgesamt n = 360).

Barbering induzierte Alopezie („Barbering induced alopecia“) trat ausschließlich bei B6-Mäusen auf:

Bei den männlichen Tieren war im Alter von fünf Wochen ein Käfig betroffen, wobei vier der fünf Tiere ein verändertes Fell und / oder Schnurrhaare aufwiesen. In Woche 9 waren in allen Kohorten Tiere der Gruppe „Kontrolle“ betroffen, in der dritten Kohorte beide Käfige. Zu diesem Zeitpunkt zeigten auch zwei Tiere der Gruppe Double (in unterschiedlichen Kohorten) Auffälligkeiten. Mit 14 und 20 Wochen waren in allen Kohorten und allen Versuchsgruppen Tiere betroffen, wobei eine höhere Anzahl der Kontroll- als den anderen Versuchsgruppen zuzuordnen war (Tabelle 13). Der allgemeine Schweregrad war bei den männlichen Tieren der Kontrollgruppe tendenziell höher als bei den anderen Versuchsgruppen: Ein Score 2 wurde in allen Kohorten ausschließlich von Tieren der Kontroll-Gruppe erreicht (Abbildung 15).

Bei den weiblichen Tieren waren in Woche 5 drei Käfige betroffen, zwei mit Nestlet und einer mit Nestlet und Haus. Die Tiere der Kontrollgruppe waren zu diesem Zeitpunkt unauffällig. Mit neun Wochen zeigten bereits aus allen Versuchsgruppen in allen Kohorten Mäuse Fellveränderungen mit Ausnahme der Kontrollgruppe der ersten Kohorte. Im Alter von 14 und 20 Wochen waren dann aus allen Gruppen und Kohorten Mäuse betroffen, wobei jeweils mehr Tiere den Gruppen mit EE als der Kontrollgruppe angehörten (Tabelle 14). Der allgemeine Schweregrad war bei den weiblichen Tieren tendenziell höher als bei den männlichen: Bei den weiblichen Tieren wurden vereinzelt auch Scores 3 und 4 erreicht, während bei den männlichen Tieren maximal ein Score 2 erreicht wurde. Tendenzial gehörten die weiblichen Tiere mit höheren Scores in allen Kohorten häufiger einer der Enrichment-Gruppen als der Kontrollgruppe an (Abbildung 16) und die Tiere, die zuerst Auffälligkeiten zeigten, gehörten tendenziell eher einer Gruppe mit EE an.

Bei den D2-Mäusen wurden weder Stereotypien noch Barbering-assozierte Fellveränderungen beobachtet.

Tabelle 13. Häufigkeit von Barbering induzierter Alopezie bei männlichen B6-Mäusen.

Wochen	1. Kohorte	2. Kohorte	3. Kohorte	Gruppe
5	0	0	(4) 1 (0)	Kontrolle
	0	0	0	Nest
	0	0	0	Double
9	(0) 1 (3)	(0) 1 (4)	(5) 2 (4)	Kontrolle
	0	0	0	Nest
	0	(0) 1 (1)	(1) 1 (0)	Double
14	(0) 1 (5)	(0) 1 (5)	(5) 2 (4)	Kontrolle
	(0) 1 (1)	(0) 1 (3)	(1) 1 (0)	Nest
	(0) 1 (2)	(0) 1 (4)	(5) 1 (0)	Double
20	(3) 2 (5)	(0) 1 (5)	(4) 2 (4)	Kontrolle
	(0) 1 (5)	(4) 2 (3)	(3) 1 (0)	Nest
	(0) 1 (4)	(1) 2 (4)	(4) 1 (0)	Double

Die Tabelle zeigt das Auftreten von barbering induzierter Alopezie auf Käfig- und Einzeltierbasis bei männlichen B6-Mäusen. Die Anzahl betroffener Tiere und Käfige ist für jede Versuchsgruppe, jeden Zeitpunkt und jede Kohorte wie folgt dargestellt: (x) **y** (z), wobei x = Anzahl betroffener Tiere in Käfig 1, **y** = Anzahl betroffener Käfige, z = Anzahl betroffener Tiere in Käfig 2.

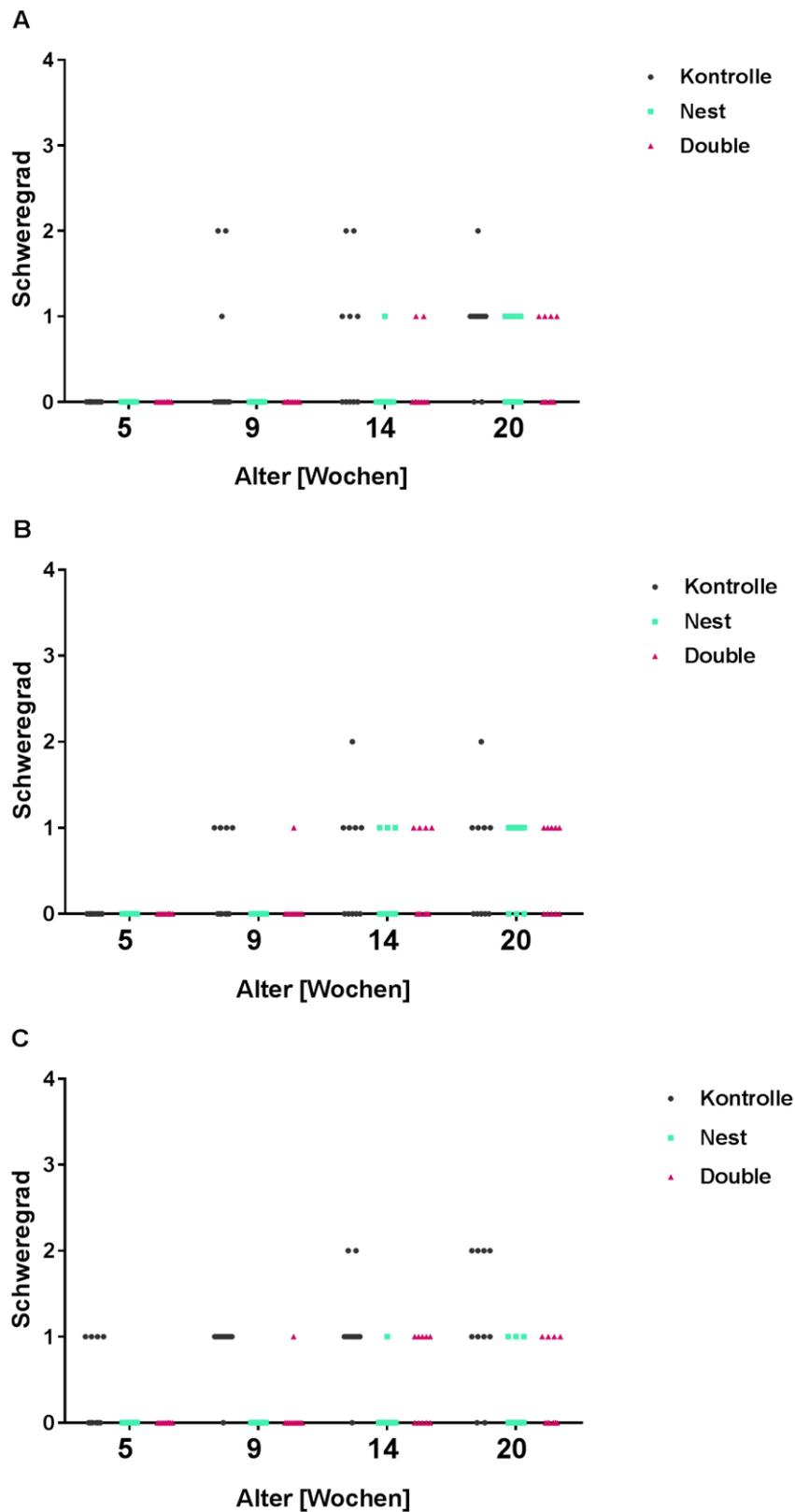


Abbildung 15. Schweregrad der Barbering induzierter Alopezie bei männlichen B6-Mäusen.

Die Abbildung zeigt den Alopezie-Score der männlichen B6-Mäuse in den drei Versuchsgruppen im Alter von 5, 9, 14 und 20 Wochen in A: Kohorte 1, B: Kohorte 2, C: Kohorte 3.

Tabelle 14. Häufigkeit von Barbering induzierter Alopezie bei weiblichen B6-Mäusen.

Wochen	1. Kohorte	2. Kohorte	3. Kohorte	Gruppe
5	0	0	0	Kontrolle
	0	0	(4) 2 (1)	Nest
	0	0	(0) 1 (1)	Double
9	0	(0) 1 (1)	(0) 1 (3)	Kontrolle
	(3) 1 (0)	(0) 1 (2)	(4) 2 (1)	Nest
	(4) 2 (4)	(0) 1 (3)	(0) 1 (4)	Double
14	(1) 1 (0)	(2) 2 (5)	(0) 1 (5)	Kontrolle
	(4) 1 (0)	(0) 1 (5)	(5) 2 (2)	Nest
	(4) 2 (5)	(0) 1 (4)	(1) 2 (4)	Double
20	(1) 1 (0)	(2) 2 (5)	(1) 2 (4)	Kontrolle
	(4) 1 (0)	(3) 2 (4)*	(5) 2 (5)	Nest
	(4) 2 (5)	(0) 1 (5)	(1) 2 (4)	Double

Die Tabelle zeigt das Auftreten von Barbering induzierter Alopezie auf Käfig- und Einzeltierbasis bei weiblichen B6-Mäusen. Die Anzahl betroffener Tiere und Käfige ist für jede Versuchsgruppe, jeden Zeitpunkt und jede Kohorte wie folgt dargestellt: (x) **y** (z), wobei x = Anzahl betroffener Tiere in Käfig 1, **y** = Anzahl betroffener Käfige, z = Anzahl betroffener Tiere in Käfig 2.

*: In Käfig 2 waren zu diesem Zeitpunkt nur noch 4 Mäuse, weil eine Maus vorzeitig gestorben war.

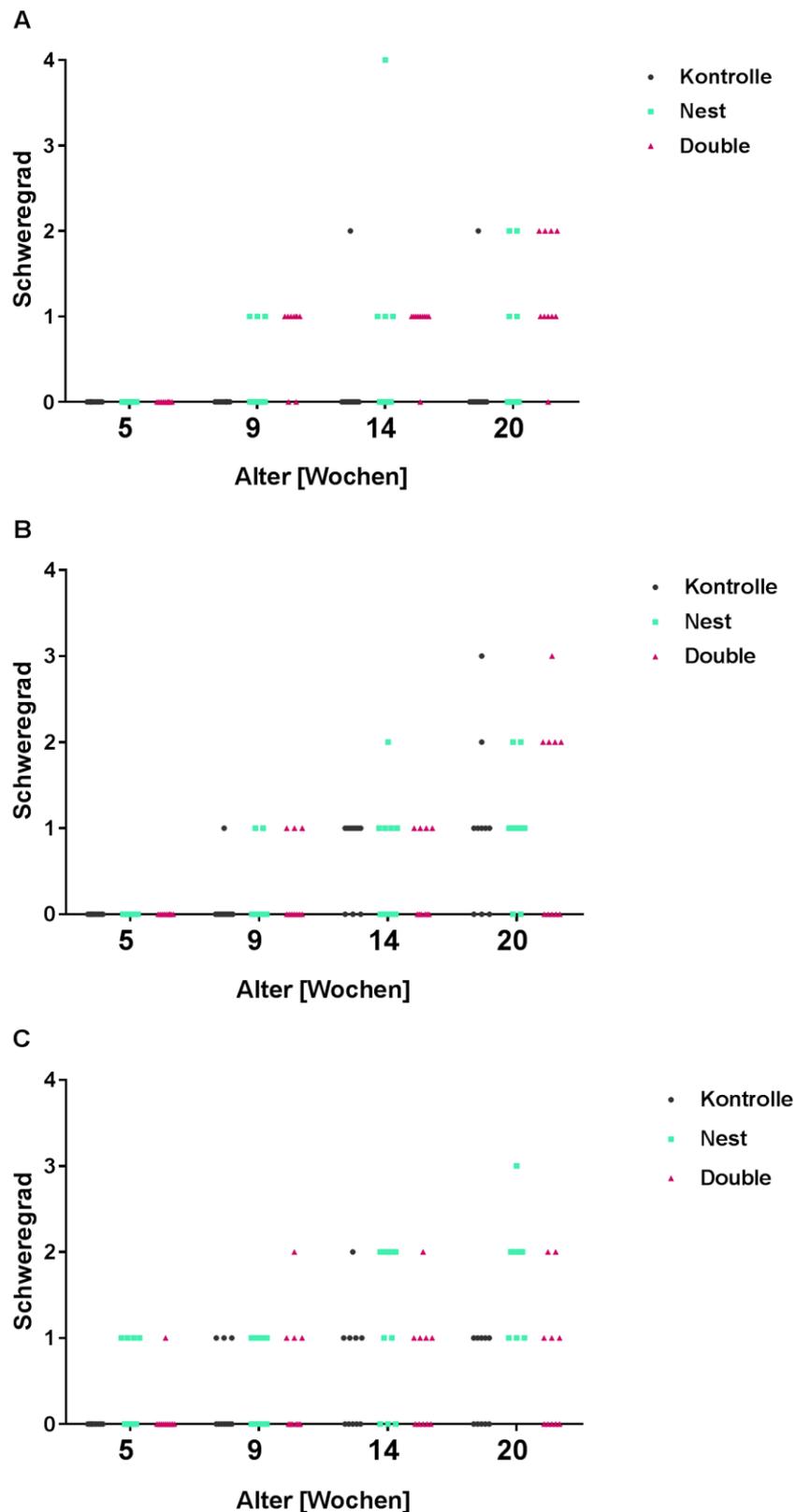


Abbildung 16. Schweregrad der Barbering induzierter Alopezie bei weiblichen B6-Mäusen.

Die Abbildung zeigt den Alopezie-Score der weiblichen B6-Mäuse in den drei Versuchsgruppen im Alter von 5, 9, 14 und 20 Wochen in A: Kohorte 1, B: Kohorte 2, C: Kohorte 3.

4.2.4 Corticosteron

4.2.4.1 Validierungsexperimente

Zur Validierung des kommerziell erhältlichen Testkits zur Corticosteron-Bestimmung wurden eine analytisch-technische und eine biologisch-physiologische Validierung durchgeführt.

Analytisch-technische Validierung

Im Zuge der analytisch-technischen Validierung wurde das EIA-Kit hinsichtlich der Parallelität, der Präzision und der Wiederfindung untersucht. In Abbildung 17 ist der annähernd parallele Verlauf für die log-transformierten Verdünnungsreihen für Standardlösung und eine Urinprobe dargestellt.

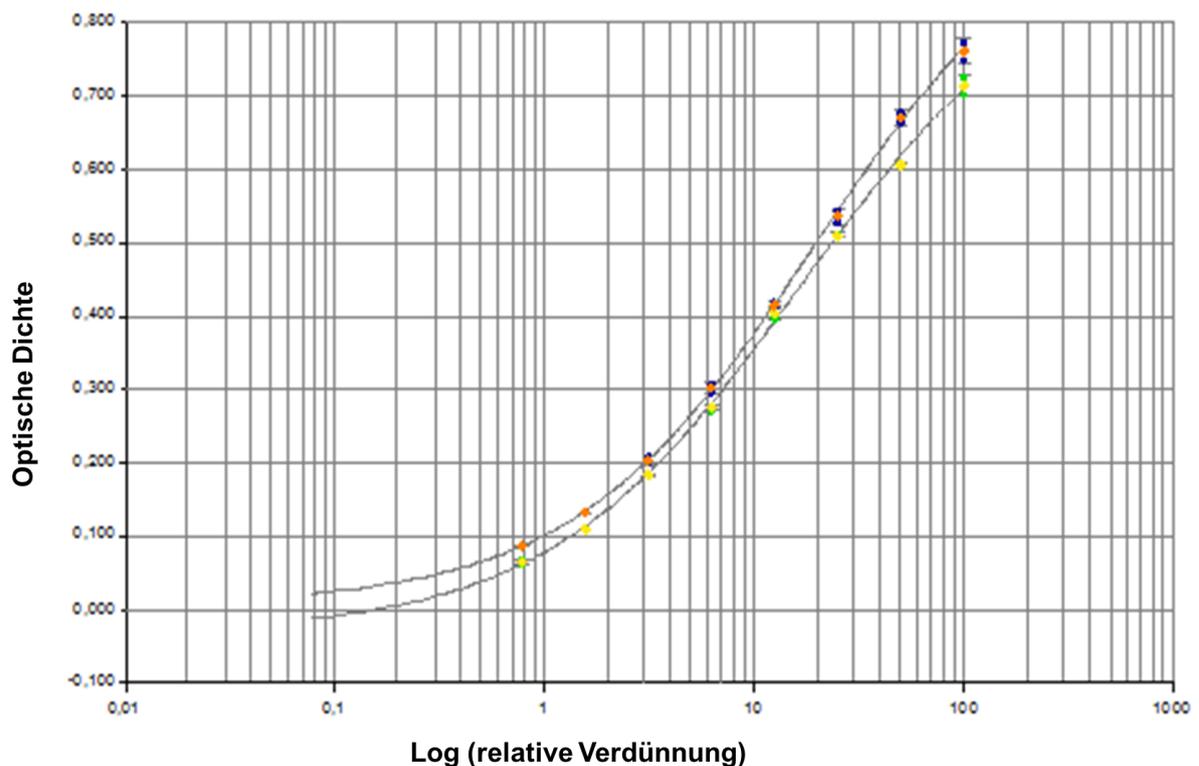


Abbildung 17. Parallelität.

Mittlere optische Dichte \pm SD für Doppelbestimmungen einer Verdünnungsreihe von Standardlösung (orange, Fehlerbalken in blau) und einer verdünnten Urinreihe (gelb, Fehlerbalken in grün) nach log-Transformation. Die relative Verdünnung ergibt sich aus folgender Formel: $relative\ Verdünnung = \frac{Verdünnungsstufe}{maximale\ Verdünnungsstufe} * 100$.

In Tabelle 15 wird die Inter-Assay-Präzision, sowie die Intra-Assay-Präzision als mittlere Corticosteron-Konzentrationen und Variationskoeffizienten dargestellt. Die mittlere Konzentration der internen Kontrolle, die auf 28 Platten gemessen wurde, lag bei 660,5 pg/ml mit einem Variationskoeffizienten von 5,6 %. Die mittlere Konzentration einer Probe, die sechsfach auf der gleichen Platte gemessen wurde, lag bei 283,3 pg/ml und wies einen Variationskoeffizienten von 8,5 % auf.

Tabelle 15. Präzision.

Präzision	Corticosteron-Konz. [pg/ml]	CV [%]
Inter-Assay-Präzision	660,5	5,6
Intra-Assay-Präzision	283,5	8,5

Inter-Assay-Präzision: mittlere Corticosteronkonzentration und Variationskoeffizient (CV) einer Urinprobe, die als interne Kontrolle auf 28 Platten gemessen wurde.

Intra-Assay-Präzision: mittlere Corticosteronkonzentration und Variationskoeffizienten (CV) einer Urinprobe, die sechsfach parallel auf einer Platte gemessen wurde.

Zur Bestimmung der Genauigkeit wurden Aliquots von fünf Urinproben mit jeweils drei Lösungen bekannter Corticosteronkonzentration (Spike) versetzt und die Wiederfindung wurde berechnet. Die mittlere Wiederfindung betrug $112 \pm 7,4$ % [Mittelwert \pm SD] (Tabelle 16).

Tabelle 16. Wiederfindung.

Probe	Corticosteron-Konzentration			Wiederfindung
	Spike [pg/ml]	Probe [pg/ml]	Probe + Spike [pg/ml]	%
1	500	nt	nt	nt
	1000	200,9	1280,0	106,6
	2000	166,4	2258,3	104,2
2	500	nt	nt	nt
	1000	270,9	1370,9	107,9
	2000	323,7	2403,6	103,4
3	500	673,5	1311,9	111,8
	1000	706,1	2146,1	125,8
	2000	682,4	2878,7	107,3
4	500	629,1	1402,6	124,2
	1000	609,7	1735,7	107,8
	2000	598,9	3038,1	116,9
5	500	1063,3	1719,8	110,0
	1000	1009,3	2405,0	119,7
	2000	1080,9	3392,2	110,1

Aliquots von fünf Urinproben (verdünnt) wurden mit je drei Lösungen bekannter Corticosteronkonzentration (500, 1000, 2000 pg/ml) versetzt und die Wiederfindung wurde nach Formel (2) (nach Scorrano et al. [146]) berechnet. nt = non testatum, nicht geprüft

Es wurde außerdem geprüft, ob eine Vermischung des Urins mit Kotpellets während der Probennahme den Corticosterongehalt beeinflusst. Abbildung 18 zeigt, dass die Exposition von Kot in den Urinproben keinen Unterschied verursacht, der über die normalen Schwankungen der Messung hinausgehen.

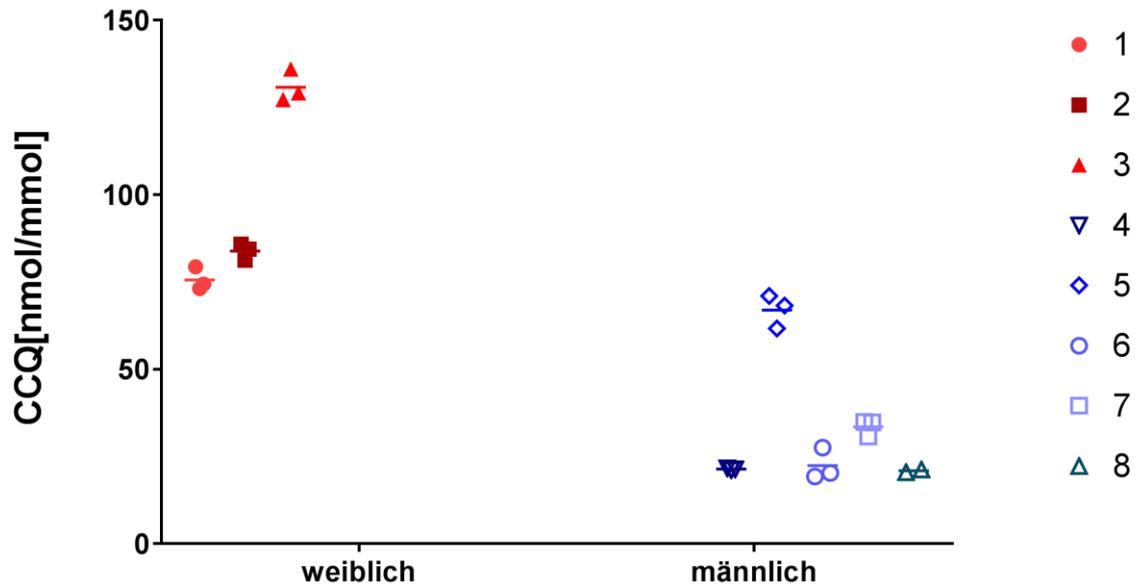


Abbildung 18. Einfluss von Verunreinigungen der Urinproben durch Kotpellets.

Für acht Proben weiblicher (Probe 1-3) und männlicher (Probe 4-8) B6-Mäuse sind jeweils drei Creatinin-korrigierter Corticosteron-Messwerte (CCQ) und deren Mittelwert als Linie dargestellt. Die drei Werte einer Probe sind jeweils das Ergebnis der Leerprobe (Urin ohne Kot) und der gleichen Probe mit Kotpellet, einmal direkt neben dem Kotpellet pipettierter Urin und einmal ca. 1 cm entfernt.

Biologisch-physiologische Validierung

Für die biologisch-physiologische Validierung wurde untersucht, ob sich die circadiane Rhythmik der Corticosteronausschüttung auch im Urin darstellen lässt. In Abbildung 19 ist zu sehen, dass der mittlere CCQ zu Beginn der Dunkelphase einen Peak aufweist, während die Ergebnisse der Messzeitpunkte in der Hellphase niedrige Messwerte zeigen, was die typische circadiane Rhythmik widerspiegelt.

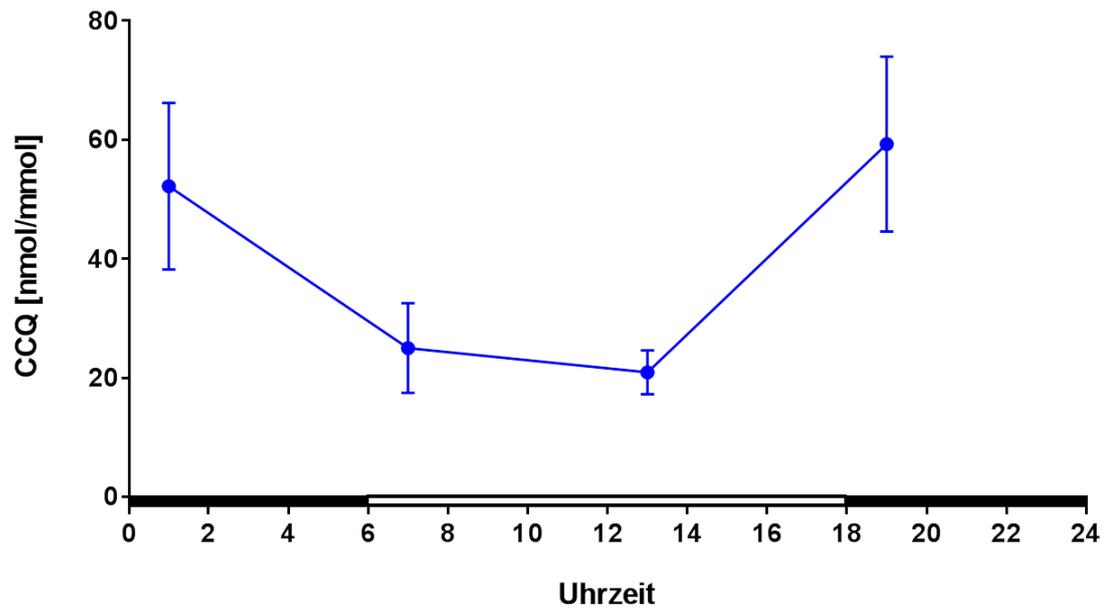


Abbildung 19. Tagesprofil des Corticosterons im Urin.

Mittelwert \pm SD gemessener Creatinin-korrigierter Corticosteronwerte (CCQ) bei männlichen C57BL/6-Mäusen ($n = 8-10$) für 4 verschiedene Zeitpunkte innerhalb von 24 Stunden mit einem 12/12h Lichtzyklus (Beginn Hellphase um 6:00 Uhr). Schwarze Balken markieren die Dunkelphase, weiße Balken die Hellphase.

Des Weiteren wurde geprüft, ob der Corticosteronanstieg infolge eines Stressors auch im Urin nachweisbar ist. Bei 16 von 17 Mäusen war ein deutlicher Anstieg des Creatinin-korrigierten Corticosteronwerts vom Zeitpunkt T_0 zum Zeitpunkt (T_{90}) zu sehen (Abbildung 20). Der Anstieg betrug bei den Individuen zwischen Faktor 2,5 und 10.

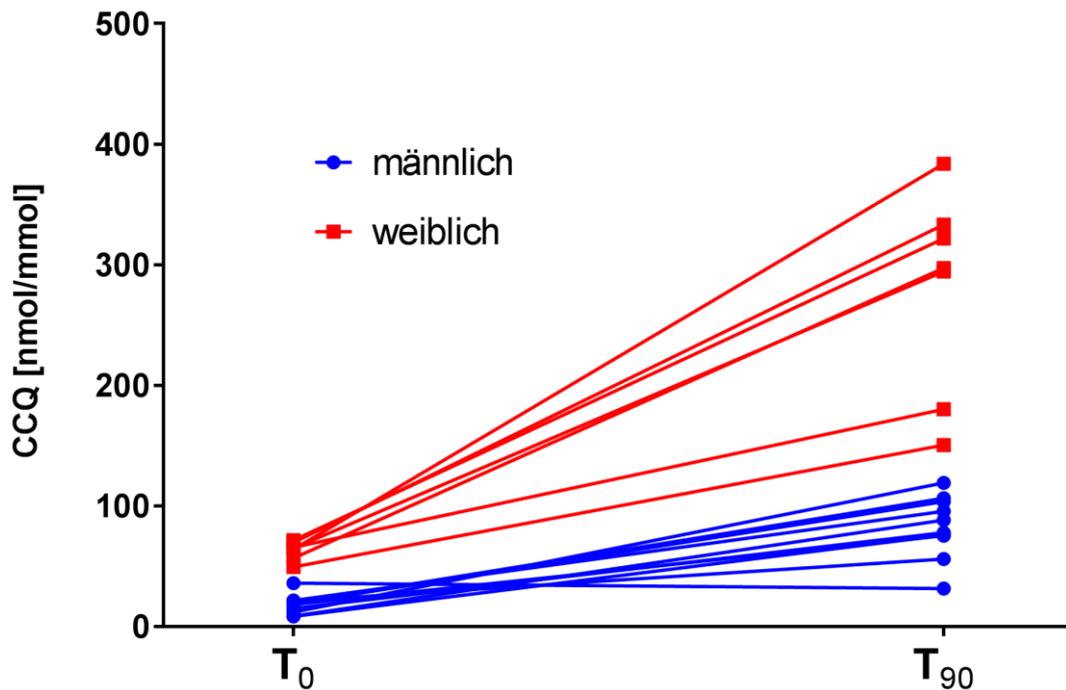


Abbildung 20. Darstellung der Stressreaktion (infolge von Fixation) im Urin.

Creatinin-korrigierte Corticosteronwerte (CCQ) für C57BL/6-Mäuse beider Geschlechter zum Zeitpunkt T_0 und T_{90} . Die Urinproben wurden zum Zeitpunkt T_0 durch Fixierung im Nackengriff gewonnen; nach 90-minütiger Isolation in einem Einzelkäfig wurden die Mäuse erneut fixiert und die Probe zum Zeitpunkt T_{90} gewonnen.

4.2.4.2 Studienergebnisse

Die Haltungsbedingungen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die CCQs, weder bei B6- noch bei D2-Mäusen (Abbildung 21, Abbildung 22). Der Faktor Kohorte hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den CCQ.

Es wurden signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern gefunden ($p < 0,001$), wobei die männlichen Tiere 0,45x (B6) bzw. 0,23x niedrigere Creatinin-korrigierte Corticosteronlevel aufwiesen als die Weibchen.

Außerdem veränderten sich die CCQs signifikant mit der Zeit ($p < 0,001$). Mit fünf Wochen waren die Werte am höchsten, sanken dann und erreichten das niedrigste Level mit 20 Wochen.

Auch der Faktor Probennahme (in Minuten) hatte einen signifikanten Einfluss auf den CCQ ($p < 0,001$).

Lediglich bei B6-Mäusen war eine relevante Interaktion zu finden, nämlich Double:Geschlecht ($p < 0,05$): demnach hatten männliche Tiere der Versuchsgruppe Double einen 1,38x höheren CCQ als die männlichen Kontrolltiere. Alle anderen Interaktionen blieben unter dem Signifikanzniveau.

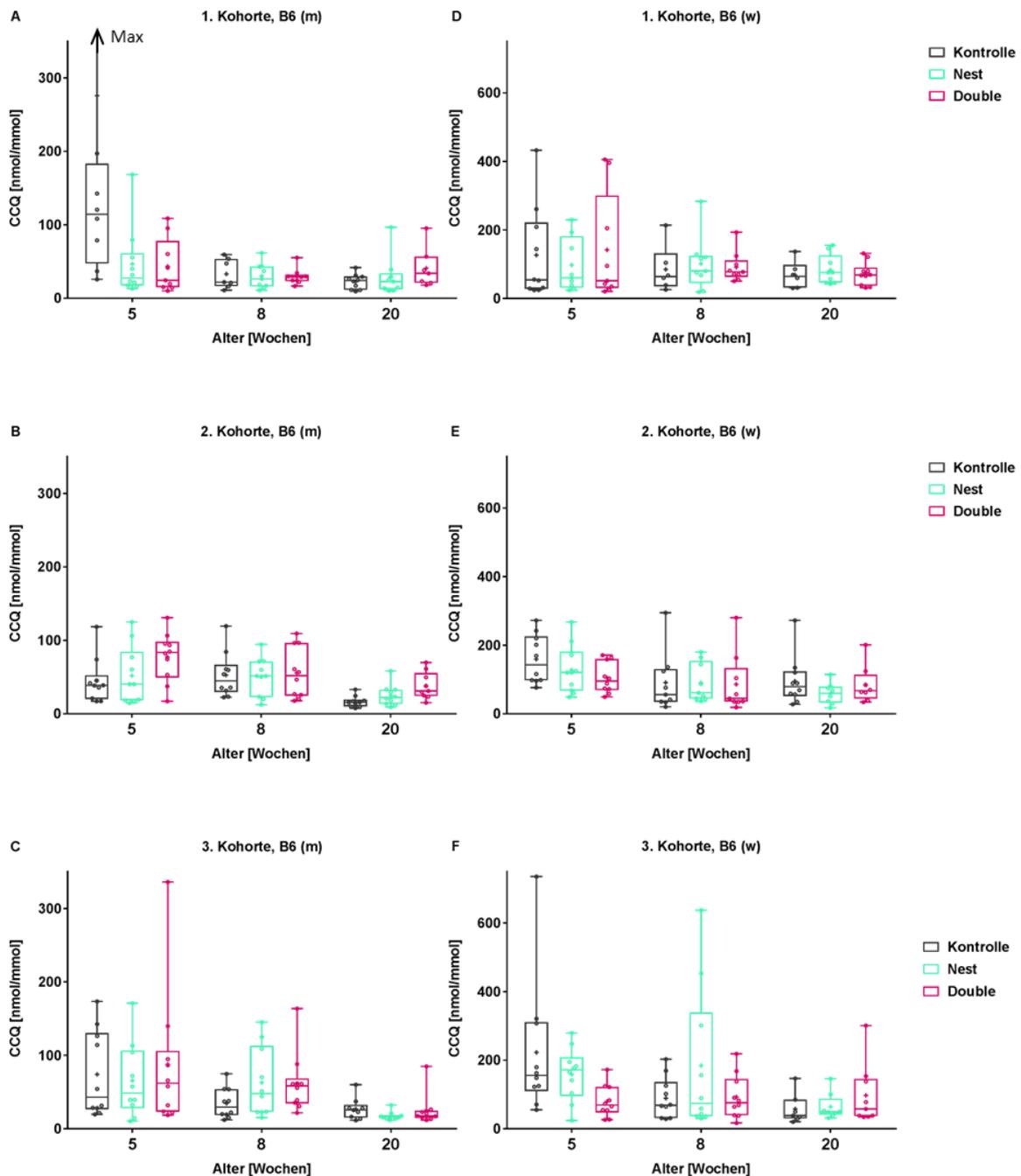


Abbildung 21. Corticosteron-Creatinin-Quotienten von B6-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die (Urin-) Corticosteron-Creatinin-Quotienten (CCQ) von B6-Mäusen der drei experimentellen Gruppen (Kontrolle, Nest, Double) zu drei Zeitpunkten (5, 8, 20 Wochen). Die Daten sind als Kastengrafik dargestellt, einzelne Messwerte sind zusätzlich als Kreise dargestellt. Der Kasten repräsentiert das zweite und dritte Quartil mit Darstellung des Medians, die Antenne zeigt das Minimum und das Maximum der Daten an. Der arithmetische Mittelwert ist als Kreuz dargestellt. In A-C finden sich jeweils die Ergebnisse der Kohorten 1-3 der männlichen Tiere (m), in D-F die Daten der Kohorten 1-3 der weiblichen Tiere (w). Der Maximalwert der Kontrollgruppe männlicher Tiere der Kohorte 1 im Alter von 5 Wochen liegt außerhalb des Diagramms bei 1497.

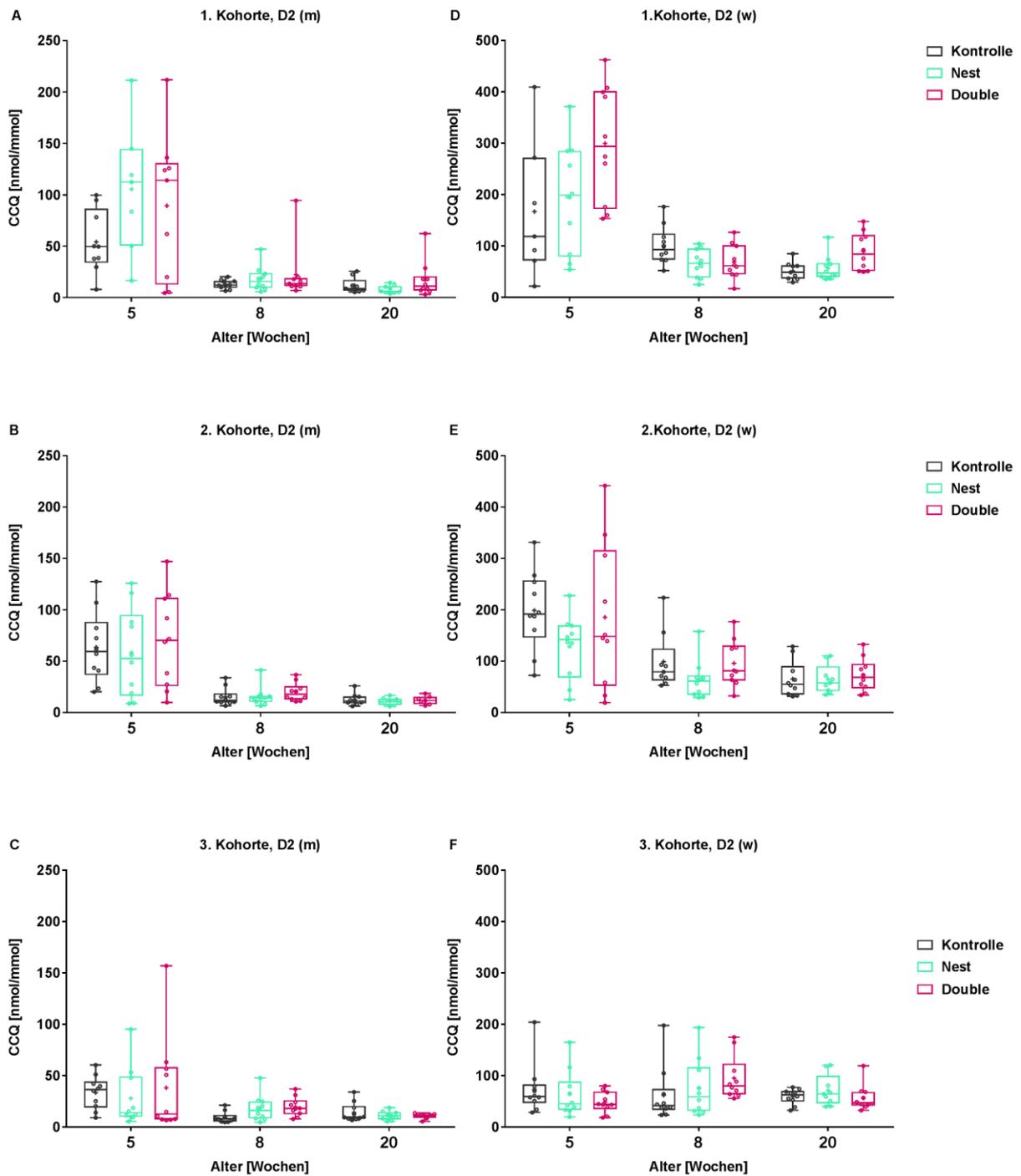


Abbildung 22. Corticosteron-Creatinin-Quotienten von D2-Mäusen.

Die Abbildung zeigt die (Urin-) Corticosteron-Creatinin-Quotienten (CCQ) von B6-Mäusen der drei experimentellen Gruppen (Kontrolle, Nest, Double) zu drei Zeitpunkten (5, 8, 20 Wochen). Die Daten sind als Kastengrafik dargestellt, einzelne Messwerte sind zusätzlich als Kreise dargestellt. Der Kasten repräsentiert das zweite und dritte Quartil mit Darstellung des Medians, die Antenne zeigt das Minimum und das Maximum der Daten an. Der arithmetische Mittelwert ist als Kreuz dargestellt. In A-C finden sich jeweils die Ergebnisse der Kohorten 1-3 der männlichen Tiere (m), in D-F die Daten der Kohorten 1-3 der weiblichen Tiere (w).

4.2.5 Nutzung des Environmental Enrichment (Nest-Score)

Beim überwiegenden Teil der B6-Mäuse der Nest-Gruppe wurde ein deutliches, aber flaches Nest gefunden, was dem Score 4 entsprach (Abbildung 23). In keinem dieser Käfige wurde ein Score von 1 erreicht. Sowohl bei männlichen, als auch weiblichen B6-Mäusen, die Nest und Haus zur Verfügung hatten (Versuchsgruppe Double), war der Anteil von Score 4 gegenüber den Nest-Gruppen reduziert. Dafür waren die Anteile mit Score 3 in diesen Gruppen entsprechend höher.

Dies ließ sich auch bei den männlichen D2-Mäuse beobachten: bei der Nest-Gruppe wurde häufiger der Score 4 und entsprechend seltener der Score 3 erreicht, während dieses Verhältnis bei der Double-Gruppe umgekehrt war. Bei den männlichen D2-Mäusen wurde der Score 5 nicht erreicht. Die weiblichen D2-Mäuse der Double-Gruppe erreichten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen am häufigsten den Score 5.

Die Tiere der Kontrollgruppe ohne EE wurden in Abbildung 23 nicht berücksichtigt. Des Öfteren waren aber auch bei diesen Tieren Nestplätze zu erkennen, die aus einer Kuhle in der Einstreu und einem niedrigem Wall aufgehäufter Einstreu bestanden. Es wurde außerdem beobachtet, dass die Tiere der Double-Gruppe zwischen den Ruheplätzen zu wechseln schienen. Befanden sie sich im Häuschen, war zusätzlich in vielen Fällen ein verlässlicher Nestplatz zu erkennen. Teilweise nutzte ein Teil der Gruppe auch das Nest und ein Teil das Haus. In den EE-Gruppen wurde für Ruheverhalten bevorzugt das Nest und / oder Haus genutzt.

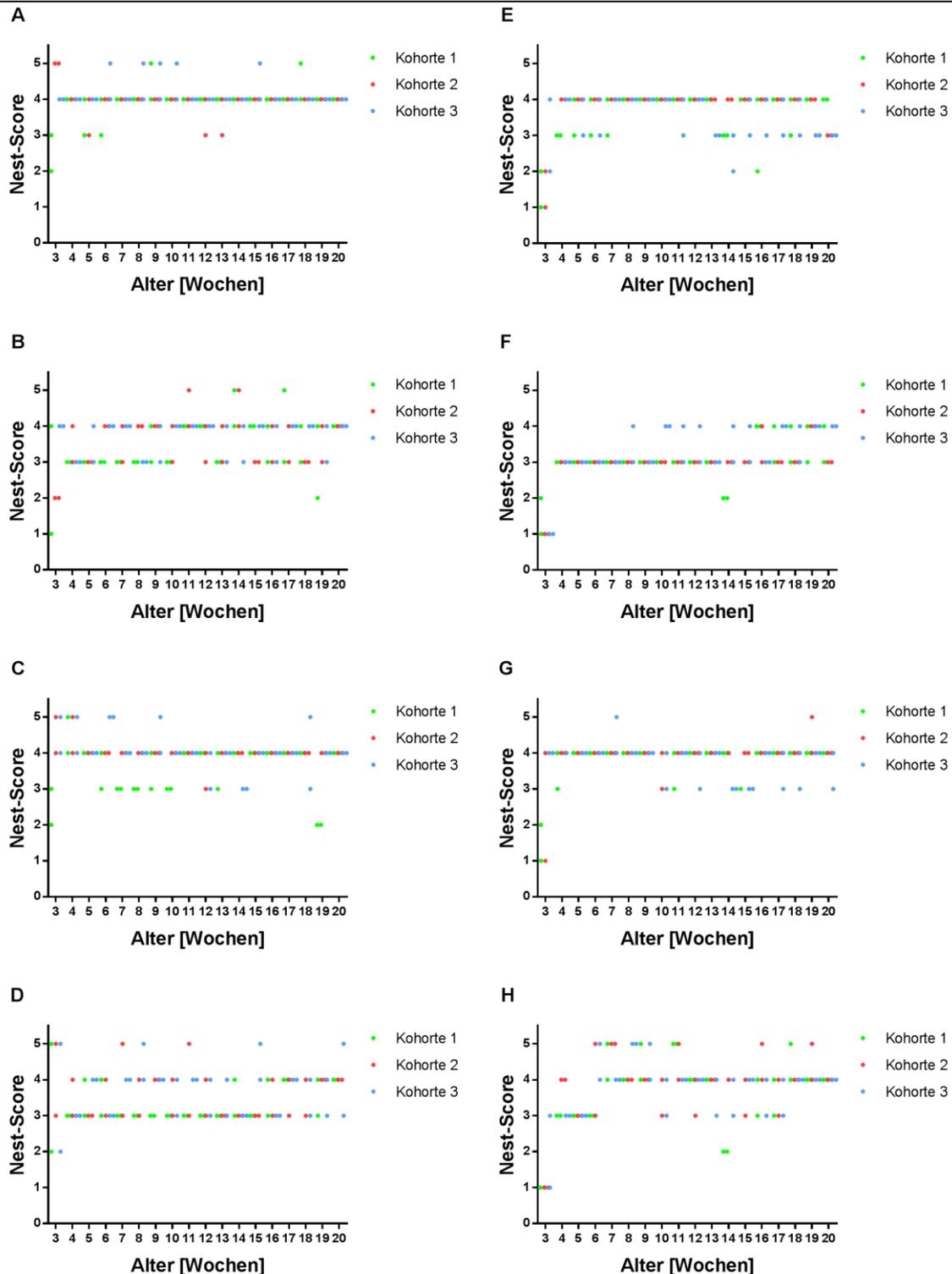


Abbildung 23. Ergebnisse des Nest-Scorings.

Die Abbildung zeigt die Nest-Scores für männliche B6-Mäuse der Versuchsgruppe Nest (A) und Double (B), weibliche B6-Mäuse der Versuchsgruppe Nest (C) und Double (D), männliche D2-Mäuse der Versuchsgruppe Nest (E) und Double (F) und weibliche D2-Mäuse der Versuchsgruppe Nest (G) und Double (H) für die 3 untersuchten Kohorte. Die Untersuchungseinheit ist der Käfig und es wurden 2 Käfige pro Woche, Versuchsgruppe und Kohorte untersucht. An wenigen Zeitpunkten konnte das Nest-Scoring nicht durchgeführt werden. Deshalb sind in D) keine Scores für die beiden Käfige der Kohorte 1 in Woche 18, in E) keine Scores für einen Käfig der Kohorte 1 in Woche 15, in F) keine Scores für die beiden Käfige der Kohorte 1 in Woche 15, in G) keine Scores für beide Käfige der Kohorte 1 in Woche 10 und kein Score für einen Käfig der Kohorte 1 in Woche 15, kein Score für einen Käfig der Kohorte 2 in Woche 14, kein Score für einen Käfig der Kohorte 3 in Woche 4 und in H) keine Scores für beide Käfige der Kohorte 1 in den Wochen 10 und 15 und kein Score für einen Käfig der Kohorte 2 in Woche 14 dargestellt.

5 Diskussion

5.1 Auswirkung von Environmental Enrichment auf physiologische Parameter

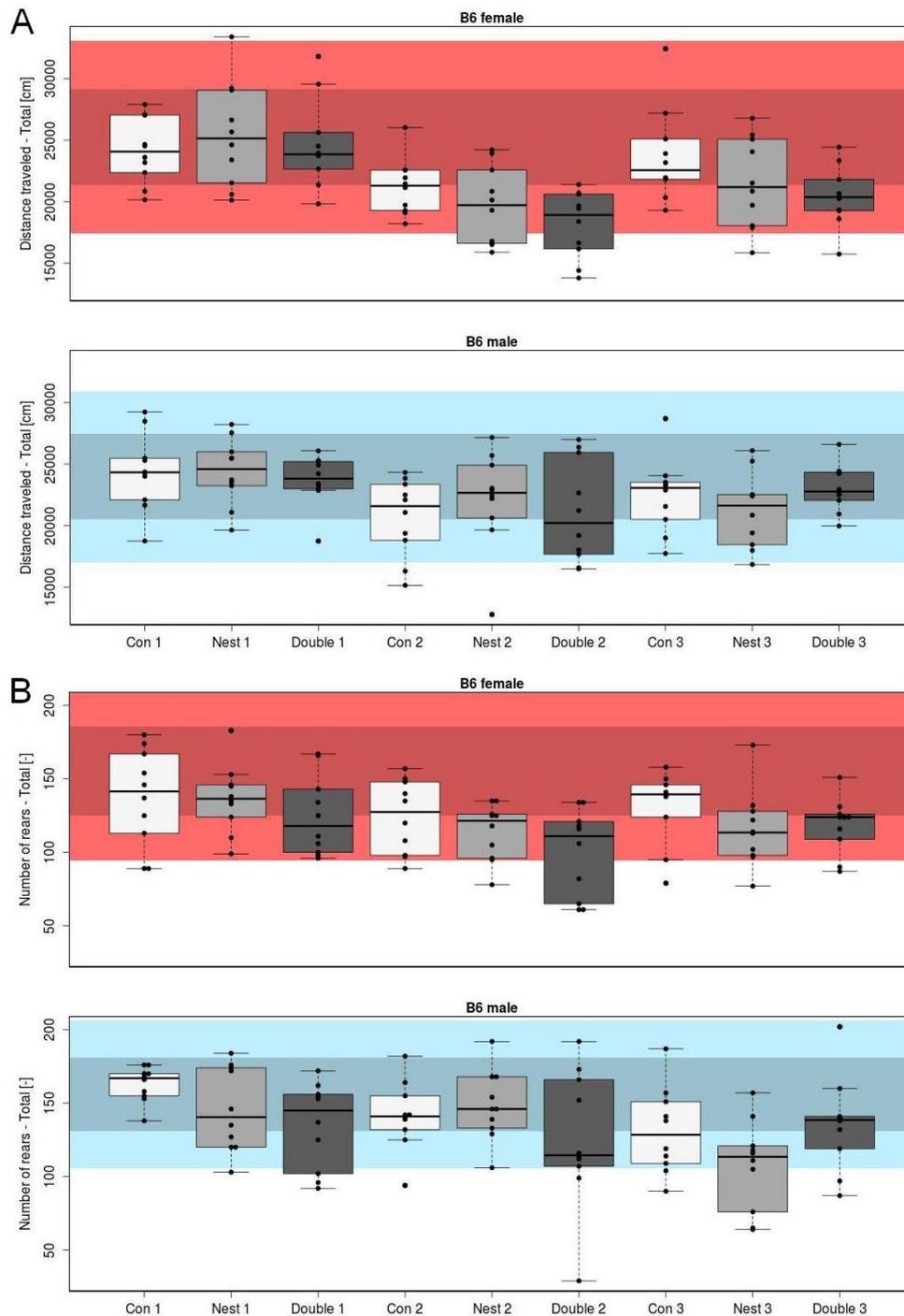
In der umfassenden phänotypischen Untersuchung der GMC wurden sowohl innerhalb als auch zwischen den verschiedenen Screens unabhängige und abhängige Messparameter verwendet. Bei der Auswertung des Einflusses von EE auf die Mittelwerte und die Variabilität der quantitativ erhobenen Parameter wurde nicht zwischen unabhängigen und abhängigen Messparametern unterschieden, sondern die Auswertung für die Gesamtzahl der Parameter ($n = 164$) bzw. für alle Parameter innerhalb der einzelnen Screens durchgeführt.

5.1.1 Veränderungen des Mittelwerts physiologischer Parameter

Die Anwendung von EE beeinflusste etwa die Hälfte aller gemessenen Parameter in ihrem Mittelwert bei beiden untersuchten Mausstämmen (B6: 43 %, D2: 55 %). Die gefundenen Unterschiede waren jedoch überwiegend gering und die biologische Relevanz muss für jeden Parameter einzeln beurteilt werden. Dafür wurden zusätzlich die Rohdaten aller Parameter in Form von Kastengrafiken ausgewertet und es wurde überprüft, ob die gefundenen Unterschiede in allen Kohorten zu erkennen waren. Dabei wurden keine wiederkehrenden Muster von Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen in den Kohorten gesehen. Da in einigen Studien von Unterschieden im Bereich des Verhaltens durch einfaches EE berichtet wurde (vgl. 2.2.1) und beim OFT in der vorliegenden Studie ein Großteil der Parameter Veränderungen in den EE-Gruppen aufwies, sollen diese Ergebnisse ausführlich diskutiert werden. Außerdem wurden im Wärmeplattentest und bei der Kraftmessung deutliche und konsistente Interaktionseffekte zwischen EE und Geschlecht festgestellt, die deshalb ebenfalls genauer beleuchtet werden sollen.

Im OFT fanden sich bei B6-Mäusen bei 2/3 der Parameter Unterschiede zwischen Gruppen mit EE und der Kontrolle. Allerdings sind viele dieser Parameter nicht unabhängig voneinander, da es sich zum Teil um den gleichen Parameter über eine bestimmte Zeitspanne (nach 5, 10, 15 und 20 Minuten) handelt oder die Parameter inhaltlich verbunden sind, wie z.B. die Parameter, die das Verhalten in bestimmten Bereichen des OFT beschreiben. Um beispielhaft die biologische Relevanz der gefundenen Unterschiede im OFT zu evaluieren, wurden die Rohdaten der 4 Hauptparameter des OFTs ("distance traveled total" als Index der Bewegungsaktivität, "number of rears total" als Index für Explorationsverhalten, "percent center distance total" und "center permanence time" als Indices für ängstliches Verhalten) in Form von Kastengrafiken zusammengefasst (Abbildung 24). In diese Diagramme wurden zur Darstellung eines „Normbereichs“ zusätzlich die Daten von mehr als 200 B6-Wildtyp-Mäusen, die in der GMC als Kontrolltiere in anderen Phänotypisierungsprojekten genutzt wurden, mit einbezogen. Da diese Mäuse in dem gleichen Zeitraum und in demselben Alter wie diejenigen der vorliegenden Studie untersucht wurden, eignen sich ihre Daten, eine Spannweite der normalen, biologischen

Variabilität für B6 darzustellen. Von den vier Hauptparametern wurden gemäß der Heatmap (Abbildung 9) zwei Parameter (“number of rears total” und “center permanence time”) von EE beeinflusst. Dieser Effekt war jedoch nicht in allen Kohorten zu sehen und die meisten Messwerte bewegten sich außerdem im Rahmen der normalen, biologischen Variabilität (Abbildung 24). Dies deutet darauf hin, dass die Veränderungen, die durch EE verursacht wurden, Teil der normalen Variation waren, die zwischen den verschiedenen Kohorten zu sehen waren.



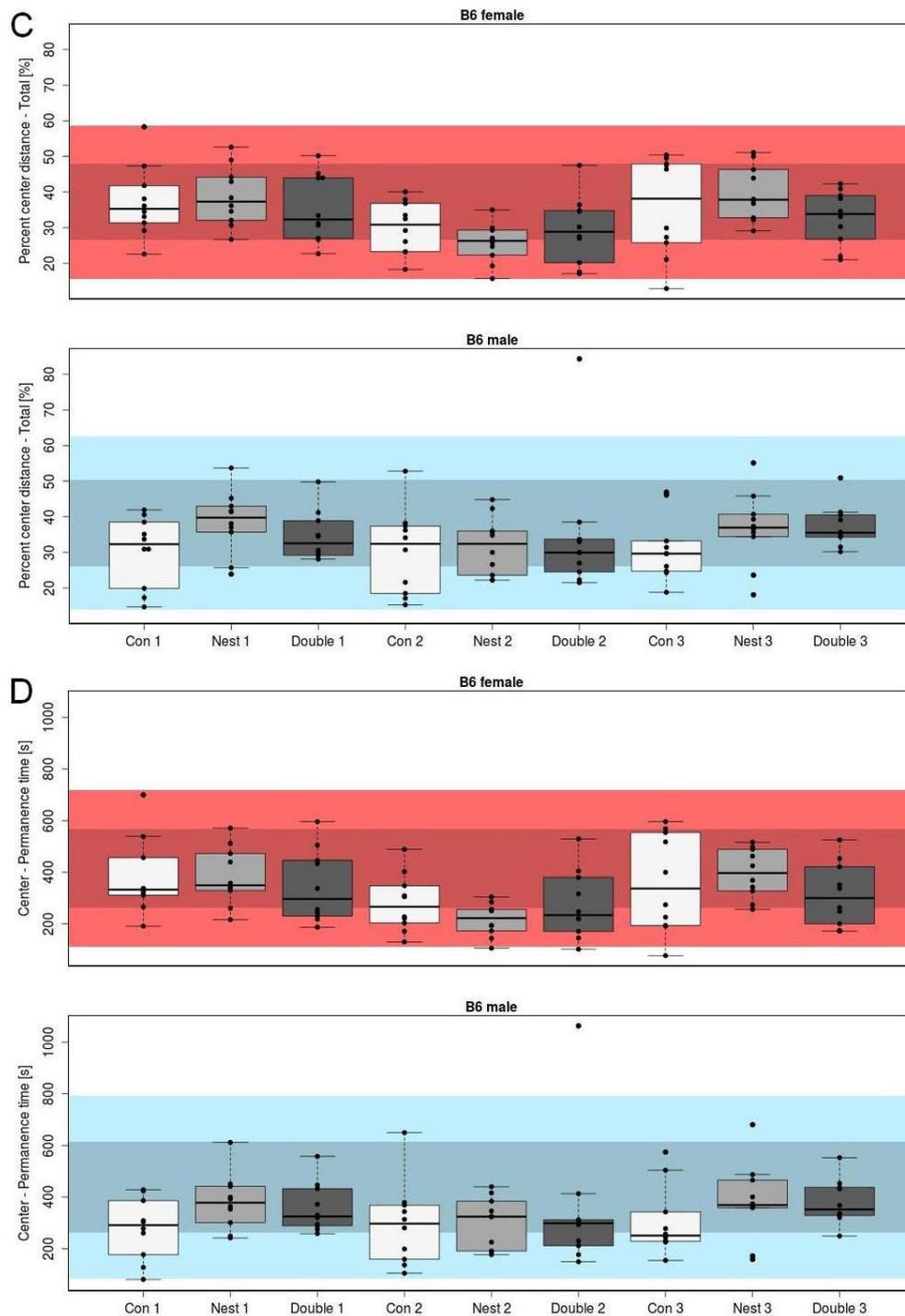


Abbildung 24. Rohdaten der Hauptparameter des OFTs vor dem Hintergrund der Spannweite der normalen, biologischen Variabilität von B6-Mäusen.

Die Rohdaten der vier Hauptparameter des OFTs [A) „distance traveled total“, B) „number of rears total“, C) „percent center distance total“ and D) „center permanence time“] sind als Kastengrafik dargestellt. Der Kasten repräsentiert das zweite und dritte Quartil mit Darstellung des Medians, die Antenne hat maximal die Länge des 1,5-fachen Interquartilabstandes und wird begrenzt durch den letzten Messwert innerhalb dieses Bereichs. Alle individuellen Messpunkte von weiblichen (oben) und männlichen (unten) Mäusen sind dargestellt für jede Versuchsgruppe („con“ = Kontrolle, „nest“ = Nest, „double“ = Nest + Haus) und alle Kohorten (1, 2, 3) für jeden der genannten Parameter (A-D). Der rot (weibliche Tiere) bzw. blau (männliche Tiere) gefärbte Bereich im Hintergrund gibt die ein- bzw. zweifache Standardabweichung von > 200 Referenz-B6-Mäusen als dunklere bzw. hellere Schattierung an. Die Referenz-Mäuse waren in demselben Alter und wurden im gleichen Zeitraum untersucht wie die Tiere dieser Studie.

Eine viel zitierte Multi-Labor-Studie von Crabbe et al. [154] (siehe auch Wahlsten et al. [155]) zeigte, dass stammspezifische Unterschiede von Mäusen in manchen Verhaltenstests stark von dem spezifischen Labor und der Interaktion zwischen Labor und Genotyp abhängen, in dem sie durchgeführt wurden. Es wurden jedoch auch nur $n = 4$ Mäuse pro Stamm, Labor, Geschlecht und Transportbedingung untersucht. Mandillo et al. zeigten in einer großangelegten Multi-Labor-Studie mit $n = 10-12$ Tiere pro Versuchsgruppe, dass große Effekte, im Bereich des Verhaltens zwischen verschiedenen Mausstämmen, in verschiedenen Laboren reproduziert werden konnten, auch wenn die absoluten Werte in den einzelnen Untersuchungen unterschiedlich waren [156]. Die Tatsache, dass wir, im Gegensatz zu anderen [74], keine biologisch relevanten Unterschiede zwischen EE-Gruppen und der Kontrollgruppe gefunden haben, könnte darauf hinweisen, dass die Effekte dieser Art von EE zu klein waren um verlässlich reproduziert zu werden; die genannte Studie [74] beinhaltete außerdem keine Untersuchung der Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse.

Auf der anderen Seite schienen manche Tests bzw. Parameter wenig anfällig gegenüber dem Einfluss von EE zu sein. Für einige Parameter weisen unsere Ergebnisse in die gleiche Richtung wie die Ergebnisse von anderen (Einzel-Kohorten-) Studien, bei denen keine Unterschiede durch einfaches EE in folgenden Tests bzw. Parametern bei B6-Mäusen festgestellt wurden: Rotorod [74], Körpergewicht [11, 78], Futteraufnahme [78, 157], Leber- und Milzgewicht [11]. In anderen (Einzel-Kohorten-) Studien wurden jedoch Veränderungen des Körpergewichts [75, 157] und der Futteraufnahme [75], sowie beim Rotarod [18] durch bestimmte Arten von EE beobachtet.

Die Unterschiede in den Ergebnissen verschiedener Studien lassen sich teilweise durch Unterschiede im Studiendesign erklären, da Faktoren wie die Art und Kombination von EE [15], der untersuchte Mausstamm [16, 17], das untersuchte Geschlecht [19], der Zeitpunkt und die Dauer der Anwendung des EE [20], sowie die untersuchten Parameter [12] Einfluss auf den Effekt von EE haben. Obwohl diese Faktoren in unserer Studie standardisiert waren, schienen andere Umweltfaktoren einen stärkeren Einfluss auf die Parameter zu haben, was sich in den mitunter großen Unterschieden zwischen den Kohorten widerspiegelt 94 % bzw. 84 % der Parameter wurden bei B6- bzw. D2-Mäusen durch den Faktor Kohorte beeinflusst; somit wurden deutlich mehr Parameter durch Faktor Kohorte verändert als durch den Faktor Enrichment und die quantitative Veränderung des Mittelwerts durch den Faktor Kohorte war auch im Schnitt größer als die des Faktors Enrichment.

Kohorten-Effekte wurden bereits als temporale Variation [158] in Phänotypisierungsstudien beschrieben und lassen sich auf verschiedene bekannte Faktoren wie Unterschiede in den untersuchten Tiergruppen (Erfahrung oder Körpergewicht [159]), Einflüsse durch die Tierhaltung (unkontrollierte Geräusche [160], saisonale Variation [161]) und Veränderungen bei den Experimenten (verschiedene Experimentatoren [83], Geschlecht des Experimentators [162]) zurückführen. Es ist wahrscheinlich, dass auch andere, (noch) nicht bekannte Faktoren zu diesen Schwankungen beitragen [8]. Aus logistischen Gründen wurden die Tests in der vorliegenden Studie von verschiedenen Personen beider Geschlechter durchgeführt, was zu

der Variation zwischen den Kohorten beigetragen haben könnte [83, 162]. Zudem unterschieden sich die Kohorten von D2-Mäusen, die vom Züchter geliefert wurden, in ihrem mittleren Gewicht bei Ankunft mitunter um einige Gramm, was mit hoher Wahrscheinlichkeit die Kohorten-Effekten verstärkt hat. Bei Anlieferung der B6-Mäuse fiel auf, dass einige Jungtiere bereits kahle Stellen im Fell hatten, möglicherweise aufgrund von Barbering durch die Eltern- oder Geschwistertiere und die genauen Abstammungsverhältnisse waren ebenfalls unbekannt. Inwieweit eine Verhaltensstörung der Elterntiere sich auf die Jungtiere auswirkt, ist noch wenig erforscht und darum schwer abzuschätzen. Es ist jedoch gut denkbar, dass auch diese Erfahrungen der Jungtiere zu größeren Unterschieden zwischen den Kohorten führten. Einige Tiere der 1. Kohorte von B6-Mäusen wiesen Auffälligkeiten am Herzen (Linksherzdilatation, verminderte Verkürzung des Herzmuskels) auf. Diese wurden bei der Echokardiografie erkannt, jedoch weder im Echokardiogramm, noch bei der Pathologie bestätigt. Die Veränderungen traten bei einzelnen Tieren aus allen Versuchsgruppen und bei beiden Geschlechtern auf. Inwieweit hierdurch bei diesen Tieren auch andere Parameter beeinflusst wurden, ist nicht eindeutig zu sagen; es ist aber denkbar, dass auch diese Unterschiede zwischen den Individuen zu den Kohorteneffekten beisteuern. Die Messung einer Vielzahl von Parametern in sogenannten Test-Batterien kann ebenfalls zusätzliches Rauschen verursachen und damit zu den Unterschieden zwischen den Kohorten beitragen [163].

Der Einfluss der oben diskutierten Umweltfaktoren, die zu Kohorten-Effekten beitragen, könnte auch die variierenden Ergebnisse von Studien, die den Einfluss von einfachem EE in einzelnen Kohorten untersuchen, erklären. Darüber hinaus könnten andere (bisher unbekannt) Umweltfaktoren mit der Messung von EE-Effekten interferieren. Kürzlich gelang es Westwood et al. nicht, das Ergebnis einer anderen Studie, in der EE das Tumorstadium reduzierte [164], zu reproduzieren ($n = 18-20$ pro Versuchsgruppe). Auch sie kamen zu dem Schluss, dass andere Umweltfaktoren entweder zusammen oder gegensätzlich zu EE zu wirken scheinen und daraus die variablen Ergebnisse resultierten [165].

Das Geschlecht der Tiere beeinflusste ebenfalls einen Großteil der Parameter, nämlich 73 % der Parameter bei B6- und 90 % der Parameter bei D2-Mäusen. Diese Unterschiede zwischen den Geschlechtern sind wenig verwunderlich, da viele physiologische Parameter gewichtsabhängig sind und männliche Tiere generell schwerer sind als weibliche. Tatsächlich fanden Karp et al. in ihrer Analyse von IMPC- (International Mouse Phenotyping Consortium) Daten heraus, dass 56,6 % der kontinuierlichen Daten einen Geschlechtsdimorphismus aufwiesen, ohne Berücksichtigung des Faktors Körpergewicht waren es sogar 73,3 % [166]. Für viele der untersuchten Parameter gibt es Vergleichsdaten, z.B. in Datenbanken [167].

Für die vorliegende Studie war die Untersuchung beider Geschlechter von Interesse, um mögliche geschlechtsspezifische Einflüsse von EE herauszufinden. In einer Untersuchung von Lin et al. [19] wurde beispielsweise gezeigt, dass Angst-assoziiertes Verhalten im

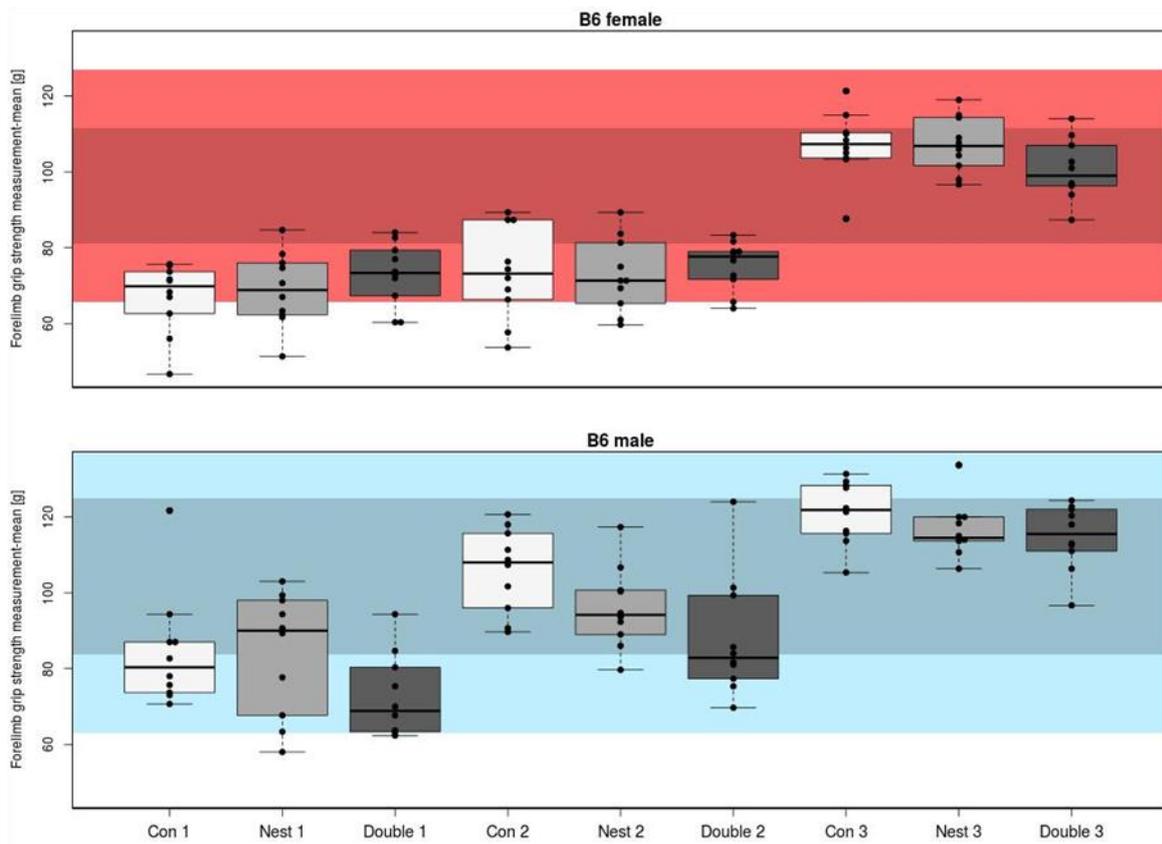
erhöhten T-Labyrinth bei männlichen B6-Mäusen durch EE verringert, bei weiblichen Tieren dagegen erhöht wurde ($n = 25$ pro Geschlecht und Haltungsbedingung). In dieser Studie wurde auch das Verhalten im OFT untersucht; hier wurde allerdings keine Interaktion zwischen Geschlecht und EE gefunden. Die EE-Gruppen wurden dort in großen Plastik-Containern gehalten und hatten neben einem Laufrad und einem Tunnel weitere Plastikgegenstände zur Verfügung. In der vorliegenden Studie waren bei den B6-Mäusen im OFT vereinzelt Interaktionseffekte zu sehen. Die biologische Relevanz dieser ist jedoch als gering einzuschätzen, weil es sich um Einzelbefunde handelte und diese keinen Hinweis auf ein generell verändertes Verhalten durch EE eines bestimmten Geschlechts gaben. Lediglich bei der Kraftmessung und beim Wärmeplattentest waren bei den B6-Mäusen Interaktionen zwischen Geschlecht und EE in allen Parametern des jeweiligen Tests zu sehen (Abbildung 9). Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, dass männliche Double B6-Mäuse sowohl bei der 2-Pfoten- als auch bei der Vier-Pfoten-Messung tendenziell eine geringere Kraft aufwiesen, als die Tiere der Kontrollgruppe. Allerdings befand sich der Großteil der Daten im Rahmen der normalen biologischen Variabilität von B6-Mäusen, und die Streuung innerhalb der Versuchsgruppen war relativ groß. Überdies war diese Tendenz in der dritten Kohorte nicht mehr deutlich zu erkennen. Deshalb ist auch bei diesen Parametern davon auszugehen, dass es sich um zufällige Befunde handelt und kein Hinweis auf einen veränderten Phänotyp ist.

Für die Parameter des Wärmeplattentests stehen keine Vergleichsdaten von anderen B6-Mäusen für die Darstellung der Spannweite der normalen, biologischen Variabilität der Daten zur Verfügung. Die Darstellung der Rohdaten in Form von Kastengrafiken (Abbildung 26) zeigt jedoch, dass auch hier kein über die Kohorten konstanter Interaktionseffekt zu erkennen ist.

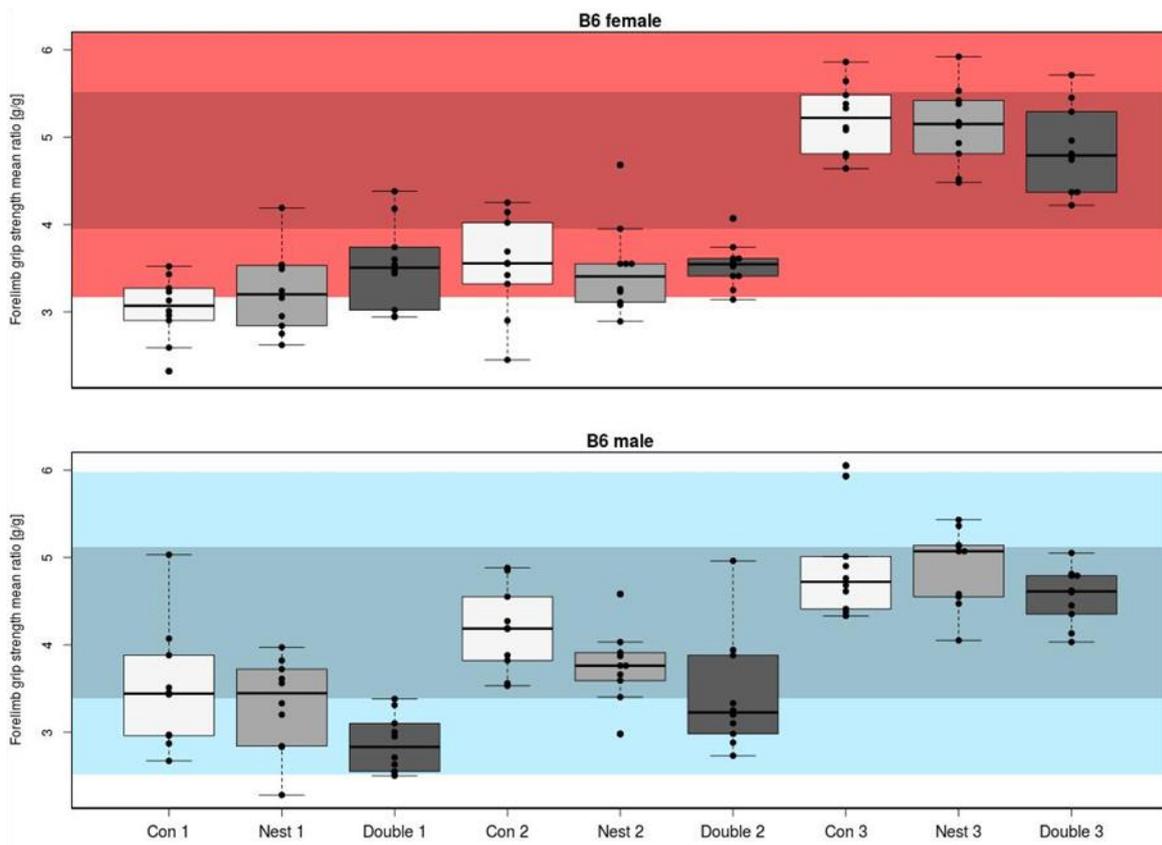
Bei den D2-Mäusen waren schwache Interaktionseffekte bei vereinzelt Parametern zu sehen (Abbildung 9), die jedoch nicht auf einen veränderten Phänotyp hinwiesen, da keine konstante Veränderung der Parameter ganzer Testsets feststellbar war.

Es lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass EE zwar den Mittelwert einiger Parameter veränderte, sein Einfluss aber insgesamt vor dem Hintergrund der deutlich stärkeren zusätzlichen Umwelteffekte, die durch die Kohorte repräsentiert wurden, von geringer biologischer Relevanz sein dürfte. Bei dem Großteil der Parameter waren keine Interaktionseffekte zwischen dem Faktor Geschlecht und EE zu sehen; bei wenigen Parametern wurden solche Interaktionseffekte gefunden, die jedoch größtenteils als Einzelbefunde zu interpretieren sind und eine geringe biologische Relevanz haben dürften.

A



B



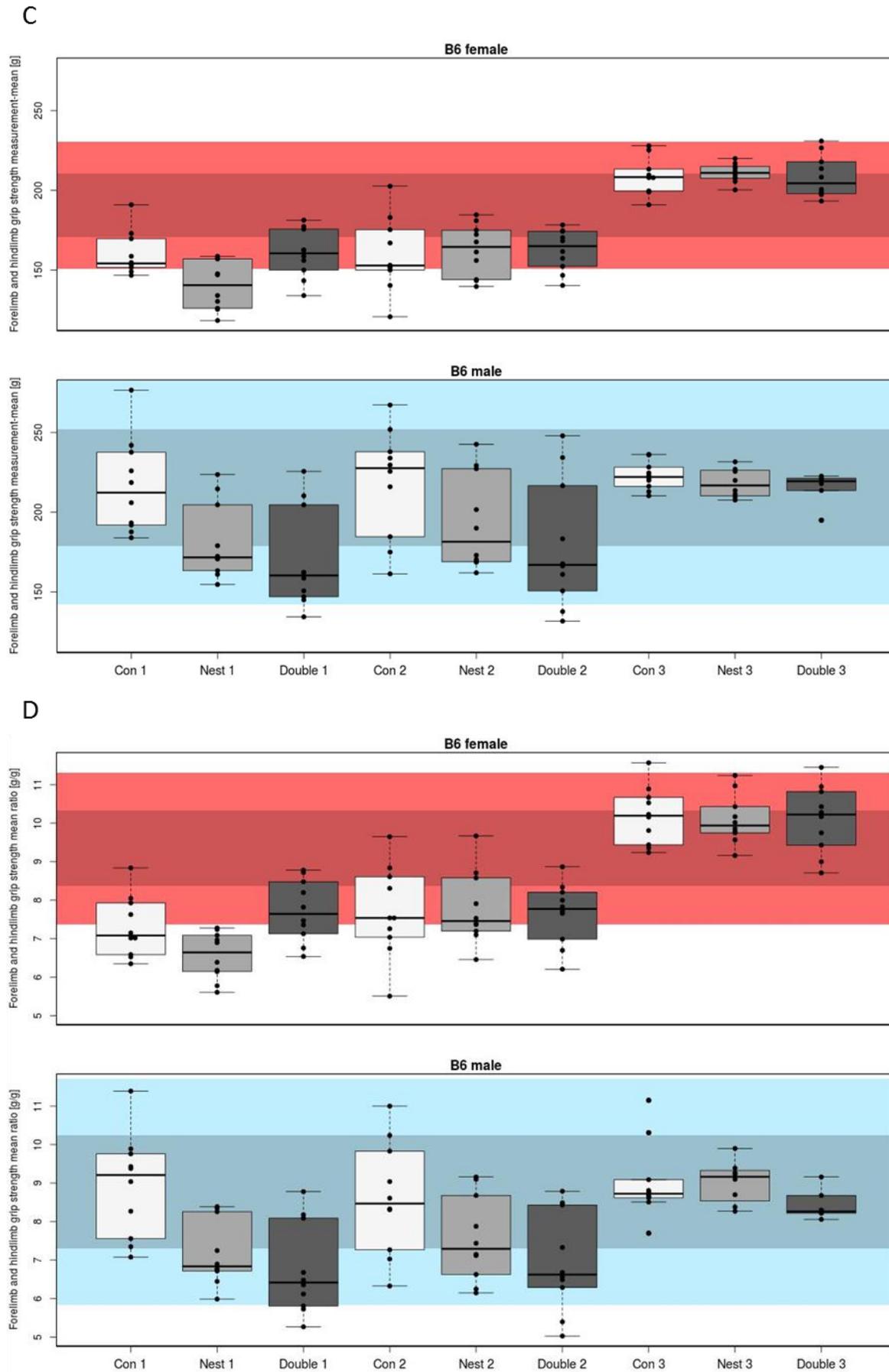


Abbildung 25. Rohdaten der Parameter der Kraftmessung vor dem Hintergrund der Spannweite der normalen, biologischen Variabilität von B6-Mäusen.

(Vorherige Seiten) Die Rohdaten der Parameter der Kraftmessung [A) „forelimb grip strength measurement – mean [g]“, B) „forelimb grip strength mean ratio [g/g]“, C) „forelimb and hindlimb grip strength measurement – mean [g]“ and D) „forelimb and hindlimb grip strength mean ratio [g/g]“] sind als Kastengrafik dargestellt. Der Kasten repräsentiert das zweite und dritte Quartil mit Darstellung des Medians, die Antenne hat maximal die Länge des 1,5-fachen Interquartilabstandes und wird begrenzt durch den letzten Messwert innerhalb dieses Bereichs. Alle individuellen Messpunkte von weiblichen (oben) und männlichen (unten) Mäusen sind dargestellt für jede Versuchsgruppe („con“ = Kontrolle, „nest“ = Nest, „double“ = Nest + Haus) und alle Kohorten (1, 2, 3) für jeden der genannten Parameter (A-D). Der rot (weibliche Tiere) bzw. blau (männliche Tiere) gefärbte Bereich im Hintergrund gibt die ein- bzw. zweifache Standardabweichung von > 200 Referenz-B6-Mäusen als dunklere bzw. hellere Schattierung an. Die Referenz-Mäuse waren im selben Alter und wurden im gleichen Zeitraum untersucht wie die Tiere dieser Studie.

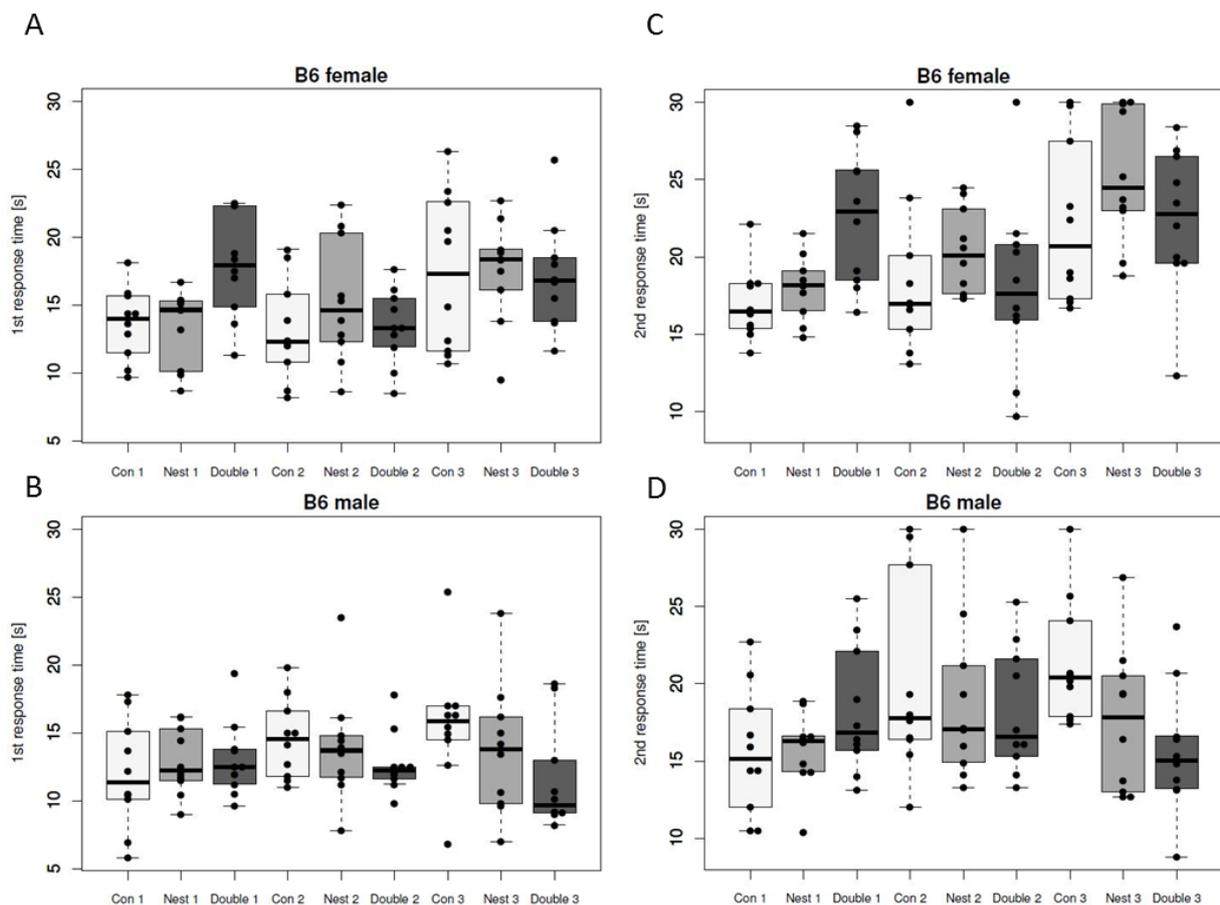


Abbildung 26. Rohdaten der Parameter des Wärmeplattentests bei B6-Mäusen.

Die Rohdaten der Parameter des Wärmeplattentests [A) „1st response time [s]“ der weiblichen Tiere, B) „1st response time [s]“ der männlichen Tiere, C) „2nd response time [s]“ der weiblichen Tiere und D) „2nd response time [s]“ der männlichen Tiere] sind als Kastengrafik dargestellt. Der Kasten repräsentiert das zweite und dritte Quartil mit Darstellung des Medians, die Antenne hat maximal die Länge des 1,5-fachen Interquartilabstandes und wird begrenzt durch den letzten Messwert innerhalb dieses Bereichs. Alle individuellen Messpunkte von weiblichen (oben) und männlichen (unten) Mäusen sind dargestellt für jede Versuchsgruppe („con“ = Kontrolle, „nest“ = Nest, „double“ = Nest + Haus) und alle Kohorten (1, 2, 3) für jeden der genannten Parameter (A-D).

5.1.2 Veränderungen der Variabilität physiologischer Parameter

Etwa die Hälfte der untersuchten Parameter bei B6- und D2-Mäusen (52-63 %) wurde durch den Einsatz von EE in ihrer Variabilität beeinflusst. Eine eindeutige Tendenz, dass die

Variationskoeffizienten durch EE entweder überwiegend erhöht oder verringert wurden, war jedoch weder insgesamt, noch auf Screen- oder Testebene zu erkennen. Die Ergebnisse verschiedener Studien, in denen die Auswirkung von EE auf die Variabilität verschiedener Parameter untersucht wurde, sind ebenfalls uneinheitlich. So ergaben manche Studien, dass die Verwendung von EE die Variabilität einzelner Parameter erhöhen könnte [10, 80], andere kamen zu dem Schluss, dass die Streuung sich durch EE tendenziell eher verminderte [83]. In einigen Studien wurden keine Unterschiede in der Variabilität zwischen Versuchsgruppen mit und ohne EE gefunden [27, 72, 81] oder uneinheitliche Ergebnisse, bei denen die Effekte auf die Variabilität vom Geschlecht und untersuchten Parameter abhingen [12]. Allerdings wurde bei diesen Studien nur eine Kohorte von Mäusen (ohne Wiederholungen) untersucht, was die Uneinheitlichkeit der Ergebnisse bedingen könnte. Die einzige Studie an mehreren Kohorten untersuchte nur weibliche Tiere (3 Kohorten von $n = 8$ Mäuse pro Stamm und Haltungsbedingung), und ihre Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Anwendung von EE keinen Einfluss auf die (intra-experimentelle) Variabilität von einigen Parametern aus dem Bereich Verhalten hatte [82].

Die Kenntnis, ob bestimmte Faktoren Einfluss auf die Variabilität von Parametern haben, ist äußerst wichtig, um abschätzen zu können, ob die Reproduzierbarkeit von Daten gefährdet ist. Es wurde die Sorge geäußert, dass jede individuelle Maus unterschiedlich auf EE reagieren könnte, was wiederum zu einer erhöhten Variabilität von physiologischen Parametern und damit zu einer erhöhten Anzahl von Versuchstieren, die für eine ausreichende statistische Teststärke benötigt werden, führen könnte [10, 12]. Daraus ergäbe sich ein ethischer Konflikt zwischen den Prinzipien der Verminderung und der Verbesserung, da EE angewendet wird, um eine Verbesserung des Wohlbefindens herbeizuführen, während höhere Tierzahlen dem Prinzip der Verminderung entgegenwirken. Die vorliegende Arbeit ergab jedoch keinen Hinweis darauf, dass einfache Formen von EE die Variabilität eines großen Spektrums an biomedizinisch relevanten Parametern erhöht.

5.1.3 Limitationen

Die vorliegende Studie wurde konzipiert, um einen Überblick zu gewinnen, inwieweit einfaches EE einen Einfluss auf eine große Anzahl von physiologischen Parametern aus verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen hat. Da somit keine wissenschaftliche Hypothese geprüft wurde, schließt die vorliegende statistische Auswertung keine klassischen Tests auf statistische Signifikanz ein. Hierfür wäre aufgrund der Menge und Diversität der Parameter eine weitaus größere Tierzahl notwendig gewesen.

Ein detaillierter, quantitativer Vergleich der eigenen Ergebnisse zur bisher publizierten Literatur auf diesem Gebiet würde eine Meta-Analyse der publizierten Daten voraussetzen, die bisher nicht durchgeführt wurde und auch nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Die Untersuchung der Mäuse in den einzelnen Screens konnte nicht verblindet vorgenommen werden. Dies kann unter Umständen zu Voreingenommenheit der Experimentatoren und damit zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen. Allerdings

werden die meisten der durchgeführten Tests als robust gegenüber subjektiver Voreingenommenheit angesehen, da die Tiere mithilfe von technischen Geräten untersucht und die Parameter digital aufgenommen und analysiert wurden.

5.2 Auswirkungen von Environmental Enrichment auf das Tierwohl

5.2.1 Körpergewicht

In der vorliegenden Studie wurden keine signifikanten Unterschiede des Körpergewichts zwischen den EE-Gruppen und der Kontrolle gefunden. Die ist in Übereinstimmung mit anderen (Einzel-Kohorten-) Studien ($n = 8-24$ pro Versuchsgruppe), die keinen Einfluss von Nestbox, Holzgerüst und Nistmaterial [11], Tecniplast Maushaus [78] und Nistmaterial [74] als EE auf das Körpergewicht der Mäuse fanden. Es gibt jedoch auch Untersuchungen, in denen Gruppen, die Nistmaterial zur Verfügung hatten insgesamt ein höheres Körpergewicht aufwiesen als die Kontrollgruppen ohne EE ($n = 9-24$ pro Versuchsgruppe) [72, 75, 168]. In der vorliegenden Arbeit waren lediglich die männlichen D2-Mäuse der Double-Gruppe signifikant schwerer als die Kontrolltiere. Wenn man jedoch die Körpergewichtsentwicklung für jede Kohorte vergleicht, fällt auf, dass dieser Gewichtsunterschied nur in den ersten beiden Kohorten zu finden war (Abbildung 14). In der dritten Kohorte waren die männlichen D2-Mäuse der Nest-Gruppe schwerer und es war kein Unterschied zwischen der Double- und Kontrollgruppe zu sehen. Kleine Unterschiede zwischen den EE-Gruppen und der Kontrollgruppe fanden sich in einigen untersuchten Parametern (vgl. 5.1.1), jedoch waren auch diese Unterschiede nicht in allen Kohorten zu sehen. Die biologische Relevanz dieses Befundes dürfte deshalb analog zu den anderen physiologischen Parametern gering sein.

5.2.2 Allgemeiner Gesundheitszustand

Verschiedene Studien zeigten, dass EE zu einer Erhöhung des Aggressionsverhaltens bei männlichen BALB/c- [15], NIH/S [48]-, CS- [60] und DBA/2-Mäusen [58, 59] führen kann. Die Gruppengröße auf Käfigebene war allerdings teilweise gering ($n = 3-5$).

Haemisch et al. untersuchten in zwei Studien den Einfluss eines Labyrinths als EE ($n = 33$ Mäuse in 11 Käfigen, aufgeteilt auf 2 Kohorten) bei männlichen DBA/2-Mäusen und fanden (in Abhängigkeit vom Dominanzstatus der Mäuse) eine Steigerung des Aggressionsverhaltens und Stress-relevanter Parameter (Plasma-Corticosteron und verminderte Körpergewichtsentwicklung) [58, 59]. Eskola et al. untersuchten den Effekt von Nistmaterial auf männliche BALB/c- ($n = 36$ in 6 Käfigen pro Versuchsgruppe) und B6-Mäuse ($n = 18$ in 3 Käfigen pro Versuchsgruppe), und es wurden dabei keine Veränderungen des Aggressionsverhaltens und der Anzahl aufgetretener Wunden durch die Haltungsbedingungen festgestellt [169]. Die Ergebnisse einer Studie von van Loo et al. [40] zeigten, dass EE in Form von Nistmaterial aggressives Verhalten und die Anzahl von Verletzungen bei BALB/c-Mäusen ($n = 15$ Tiere in 5 Käfigen) verminderte, während ein Unterschlupf diese erhöhte. Der Unterschlupf führte außerdem zu einer verminderten Körpergewichtsentwicklung sowie erhöhten (Urin-) Corticosteronwerten.

Viele der oben genannten Studien nutzten zur Beurteilung des agonistischen Verhaltens den „group intruder“- oder „resident intruder“-Test [48, 58, 59]. Dabei wurde für eine bestimmte Zeitspanne beobachtet, wie entweder die gesamte Tiergruppe oder eine einzelne Maus in ihrem Käfig auf das Einsetzen eines fremden Tieres gleichen Geschlechts und Alters reagiert und agonistisches Verhalten wurde quantifiziert. Bei dem „social approach“-Test wurde das agonistische Verhalten der Mäuse mit einer fremden gleichaltrigen und gleichgeschlechtlichen Maus in einer neutralen Testumgebung untersucht [15]. Es wurden auch Verhaltensbeobachtungen im Käfig durchgeführt, mithilfe von Videokameras dokumentiert und im Anschluss hinsichtlich aggressiver Verhaltensweisen analysiert [40, 108]. Andere untersuchten die Tiere regelmäßig und bewerteten sie anhand von Wunden-Scores [15, 40, 48]. Die Ergebnisse des Wunden-Scorings korrelierten generell mit den Ergebnissen der Verhaltenstests in den Studien, die mehrere Parameter untersuchten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tiere im Zuge der wöchentlichen Gesundheitsuntersuchung auch auf Bissverletzungen untersucht, um Rückschlüsse auf das Aggressionsverhalten ziehen zu können. Insgesamt wurden nur bei wenigen Tieren Hautverletzungen festgestellt, was auf ein niedriges Aggressionslevel schließen lässt. Ein generell niedriges Aggressionslevel bei B6 und D2 Mäusen im Vergleich zu Auszucht-Stämmen wurde auch von Nevison et al. beobachtet [108]. Der Großteil der Inzidenzen (vier Fälle) von Bissverletzungen trat bei männlichen B6-Mäusen der Gruppe Double in Kohorte 2 auf (Tabelle 12). In dieser Gruppe war jedoch eine Maus zu wenig geliefert worden und die Vergesellschaftung mit einer nachgelieferten Maus in Woche 4 war vermutlich die Ursache des Aggressionsverhaltens, denn nach Separation der neu hinzugekommenen Maus zeigten sich daraufhin bei keinem weiteren Tier Verletzungen. Insgesamt geben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit somit keine Hinweise darauf, dass Nistmaterial oder Unterschlupf zu einer Steigerung des Aggressionsverhaltens bei B6 und D2-Mäusen führt. Ansonsten ergab die wöchentliche Gesundheitsuntersuchung über den Versuchszeitraum einige nicht Aggressions-korrelierte Auffälligkeiten, die aber nicht vorrangig einer bestimmten Versuchsgruppe zuzuordnen waren. Temporäre, aber auch dauerhafte Trübungen eines oder beider Augen schienen in Zusammenhang mit der Narkose in Woche 18 aufzutreten. Es ist wahrscheinlich, dass dies durch eine ungenügende Versorgung mit Augensalbe verursacht wurde. Es ist denkbar, dass bereits erwachte Tiere die Augensalbe bei noch schläfrigen Tieren wegleckten und dies zu einer Reizung führte.

5.2.3 Stereotypien und Fur-Score

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei einem Tier einmalig stereotypes Springen beobachtet. Allerdings wurde dies nur im Zuge der wöchentlichen Gesundheitsuntersuchung in der Hell-, und damit Ruhephase der Mäuse untersucht. Für eine genaue und aussagekräftige Untersuchung der Prävalenz von Stereotypien wären Verhaltensbeobachtungen während der aktiven Phase der Mäuse notwendig gewesen.

Die Häufigkeit und der Schweregrad von Barbering-assoziierten Fellveränderungen wurden mittels Fur-Score ermittelt. B6-Mäuse gehören zu denjenigen Mausstämmen, in denen

Barbering gehäuft beobachtet wird: Garner et al. zeigten in einer groß angelegten epidemiologischen Studie, dass für B6-Mäuse 14x höhere Wahrscheinlichkeit, dieses abnorme Verhalten zu zeigen, als z.B. für CBA-Mäuse besteht [101].

Auch das Geschlecht soll (wie bei der Trichotillomanie des Menschen) einen Risikofaktor darstellen: weibliche Tiere sind 1,5x häufiger betroffen als männliche [101]. In dieser Studie, wie auch in der Untersuchung von Bechard et al. [32] waren jedoch keine Unterschiede beim Vorkommen von Barbering-assoziierten Fellveränderungen zwischen männlichen und weiblichen Tieren festzustellen. Allerdings wurde in der Studie von Garner et al. [101] die Prävalenz von Tieren, die das Barbering-Verhalten zeigen, bestimmt, während in der vorliegenden Untersuchung (in Anlehnung an [32]) die Häufigkeit des Auftretens von Fellveränderungen als Parameter erhoben wurde.

Mit steigendem Alter der Tiere stieg auch die Anzahl der betroffenen Tiere, was in Übereinstimmung mit anderen Studien ist [32, 101]. Abnorme, repetitive Verhaltensweisen entstehen oft, wenn Tiere in einer Umgebung gehalten werden, in der sie speziesspezifische Verhaltensweisen nicht ausüben können [29].

In verschiedenen Studien wurde EE erfolgreich eingesetzt um die Haltungsbedingungen zu verbessern und damit verschiedene abnorme Verhaltensweisen zu reduzieren [32, 96, 106, 107]. Bechard et al. [32] zeigten, dass die Anwendung von EE das erstmalige Auftreten von Barbering induzierter Alopezie verzögerte, sowie die Prävalenz und den allgemeinen Schweregrad verminderte (n=8 bzw. 9 Käfige als Untersuchungseinheit pro Versuchsgruppe). In der vorliegenden Studie konnte allenfalls bei den männlichen Tieren eine Tendenz in diese Richtung gesehen werden, da insgesamt die Tiere der Kontrollgruppe tendenziell früher und stärker betroffen waren als die Tiere der Versuchsgruppen mit EE. Bei den weiblichen Tieren waren eher die Tiere mit EE früher und stärker von Barbering-assoziierten Fellveränderungen betroffen. Dies könnte darauf hinweisen, dass männliche und weibliche Tiere unterschiedlich von dem untersuchten EE profitierten. Das Ergebnis müsste jedoch in einer konfirmativen Studie bestätigt werden, weil die Stichprobenzahl auf Käfigebene in der vorliegenden Arbeit keine statistisch sicheren Aussagen zulässt. Das von Bechard et al. genutzte EE war jedoch auch komplexer und beinhaltete regelmäßig neue Anreize durch wechselnde Gegenstände und Materialien, und die Kontrollgruppe erhielt ebenfalls einfaches EE in Form von Nestlet und Haus, was unserer am stärksten angereicherten Gruppe entsprach.

In einer anderen Studie wurde der Einfluss von komplexem EE auf verschiedene Verhaltensauffälligkeiten bei ICR-Mäusen untersucht und es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den EE-Gruppen (n=24 in 12 Käfigen) und dem Standard (nur Nistmaterial, n=24 in 12 Käfigen) festgestellt [31]. Insgesamt wurden in dieser Studie aber deutlich niedrigere Stereotypie-Level beobachtet als in einer vergleichbaren Studie der gleichen Arbeitsgruppe, in der eine Versuchsgruppe gar kein EE zur Verfügung hatte [107]. Die Autoren schlossen daraus, dass bei ICR-Mäusen Nistmaterial alleine ebenso wirksam sei, abnormes Verhalten zu reduzieren wie komplexere Arten von EE. In unserer Studie zeigte

das Nistmaterial diesen Effekt nicht, bei den ICR-Mäusen wurden allerdings auch kein Barbering, sondern verschiedene motorische Stereotypien beobachtet. Es wird vermutet, dass Stereotypien bei Mäusen aus dem unerfüllten Bedürfnis, ein Unterschlupf zu suchen, entstehen [98], Barbering jedoch aus dem Kontext der sozialen Fellpflege („allogrooming“) [170].

In der vorliegenden Studie wurden die Tiere im Alter von 3 Wochen vom Züchter bezogen, und das Verwandtschaftsverhältnis der Individuen sowie die Haltungsbedingungen waren nicht bekannt. Die Haltung von Geschwistertieren erhöht allerdings die Wahrscheinlichkeit für Barbering etwa um den Faktor 3,5 [100]. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass die Ätiologie von Barbering sowohl eine genetische, als auch eine Lernkomponente hat, da genetisch prädisponierte Jungtiere auch bei unauffälligen Ziehelternieren das abnorme Verhalten entwickelten und nicht prädisponierte Jungtiere bei Elterntieren, die Barbering zeigten, ebenfalls später dieses Verhalten aufwiesen [171]. In unserer Studie bestand jede Versuchsgruppe aus 10 Tieren pro Kohorte und wurde auf 2 Käfige verteilt ohne Berücksichtigung des Verwandtschaftsgrades oder des Barbering-Status der Elterntiere; es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise eine Häufung von Geschwistertieren in einer experimentellen Gruppe tatsächliche Effekte des EE verdeckte.

Für Stereotypien ist außerdem bekannt, dass reizarme Aufzuchtbedingungen zu einer Schädigung der normalen Hirnentwicklung bei Jungtieren führen können [172]. Auch erhöhter Stress, z.B. durch frühes Absetzen der Jungtiere scheint das Auftreten von Barbering zu begünstigen [173]. Inwieweit die Bedingungen während der Aufzucht Einfluss auf die normale (Hirn-) Entwicklung der Mäuse ausgeübt haben könnten und so eine „Prädisposition“ für die Entwicklung von Verhaltensauffälligkeiten darstellen könnte, ist ebenso nicht abzuschätzen.

5.2.4 Corticosteron

5.2.4.1 Analytik

Zur Bestimmung des Corticosterongehaltes im Urin, wurde ein kommerziell erhältliches EIA-Test-Kit genutzt. Dieser wurde vom Hersteller als „spezies-unabhängig“ und für verschiedene Probenmedien (Serum, EDTA- und Heparinplasma, Urin, getrocknete Kotextrakte und Zellkulturmedium) anwendbar deklariert. Da die Validierung vom Hersteller aber mit humanen Serum-Proben durchgeführt wurde, empfahl es sich, eine Teilvalidierung des Assays für die spezielle Probenmatrix in der Zielspezies durchzuführen [130]. Im Zuge dessen wurde eine analytisch-technische, sowie biologisch-physiologische Validierung durchgeführt um Matrixeffekte auszuschließen.

Die Ergebnisse der analytisch-technischen Validierung (Punkt 4.2.4.1) zeigen, dass für den Assay auch bei murinen Urinproben eine akzeptable (inter- und intra-) Assay-Präzision, Parallelität und Wiederfindung gewährleistet sind.

Im Zuge der biologisch-physiologischen Validierung wurde außerdem gezeigt, dass die diurnalen Schwankungen der Corticosteronwerte infolge ihrer pulsatilen Ausschüttung auch

im Urin dargestellt werden können. In Übereinstimmung mit Thorpe et al. zeigten die mittleren Urin-CCQ einen charakteristischen Peak zu Beginn der Dunkelfphase und niedrige Werte in der Hellphase, was nach den Ergebnissen von Thorpe et al. (etwas verzögert) mit den circadianen Serum-Corticosteron-Schwankungen korrelierte [174]. In weiteren Untersuchungen stellten Thorpe et al. außerdem dar, dass der Anstieg des Urin-CCQ infolge eines Stressors zwar leicht verzögert im Vergleich zum Serum-Corticosteron-Wert zu sehen war, aber trotzdem generell systemische Corticosteronschwankungen widerspiegelte [175]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Stress-Anstieg infolge von Fixation im Urin zu messen ist. Es ist somit davon auszugehen, dass die Creatinin-korrigierte Messung von Corticosteron im Urin zuverlässig die systemischen Corticosteronveränderungen widerspiegelt.

Da in der vorliegenden Studie viele Proben untersucht wurden, musste sichergestellt werden, dass systematische Messungenauigkeiten und Inter-Assay-Varianzen die tatsächlichen Ergebnisse nicht verfälschten. Dafür wurde auf jeder Platte jeweils ein frisch aufgetautes Aliquot einer interne Kontrolle in jeweils 2 Doppelbestimmungen (zu Beginn und Ende der Platte) gemessen. Für jeden Assay wurde außerdem der lineare Messbereich („working range“: 20-80 % OD) bestimmt und Messwerte, die außerhalb dieses Bereichs lagen wurden erneut analysiert.

5.2.4.2 Probenaufarbeitung

Die Proben wurden nach ihrer Gewinnung bei -20°C gelagert, genau wie die Aliquots der in dieser Studie genutzten internen Kontrolle. Während für Kotproben bekannt ist, dass die Messwerte der Corticosteronmetaboliten je nach Länge der Lagerung schwanken können [129], zeigt die geringe Inter-Assay-Variation der internen Kontrolle, dass das kaum metabolisierte Corticosteron im Urin weniger anfällig gegenüber Degradation zu sein scheint.

5.2.4.3 Probennahme

Die Urinproben wurden in diesem Projekt gewonnen, indem die Mäuse vorsichtig an der Schwanzwurzel hochgehoben und in einen leeren Käfig transferiert wurden, der Käfig wurde dann wieder in das Regal gestellt. Obwohl diese Art der Probennahme (im Gegensatz zur Blutprobennahme) nicht-invasiv ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Mäuse durch das Handling einem geringem Maß an Stress ausgesetzt waren. Während der Anstieg des Corticosterons infolge eines Stressors wenige Minuten dauert [122], sieht man im Urin durch die vorangehende Metabolisierung erst verzögert (nach 1-2 Stunden) einen Anstieg [127, 176]. Für den Großteil der Tiere wurde deshalb die Zeit dokumentiert, bis der Urin abgesetzt wurde. Die statistische Auswertung ergab für die Probennahme einen signifikanten Effekt auf die Corticosteron-Daten. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass kleine Unterschiede u.U. überdeckt oder verfälscht wurden.

5.2.4.4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Unterschiede der CCQ zwischen den Versuchsgruppen festgestellt, weder bei B6-, noch bei D2-Mäusen. Dies ist in Übereinstimmung mit Studien von van der Meer et al. (n = 30 pro Versuchsgruppe) und van de Weerd et al. (n = 9), die ebenfalls keinen Einfluss von Nistmaterial als EE auf CCQs im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne EE fanden [75, 132]. In zwei anderen Studien zeigten van Loo et al. dagegen, dass Nistmaterial zu einer Stressreduktion führte [40, 131], während der angewandte Unterschlupf („Utrecht shelter“, eine Plattform, unter der sich die Mäuse verstecken können, aber auch darauf sitzen können) in einer der Studien zu erhöhten CCQs und gesteigertem Aggressionsverhalten führte [131]. Die untersuchten Tierzahlen lagen bei n = 15 [40] und n = 30 [131]. In diesen beiden Studien wurden jedoch nur männliche Tiere von den Stämmen BALB/c und CD-1 verwendet.

Bei den B6-Mäusen war eine relevante Interaktion zwischen Geschlecht und der Versuchsgruppe Double zu sehen. Männliche Tiere mit Unterschlupf und Nistmaterial hatten demnach signifikant höhere CCQs (um den Faktor 1,38) als die männlichen Kontrolltiere. Eine Studie von Van Loo et al. an ausschließlich männlichen Tieren zeigte ebenfalls, dass ein Unterschlupf zu erhöhten CCQ-Levels infolge erhöhter Aggression führte [131]. Es muss jedoch beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit bei der statistischen Analyse die Werte für die Wochen 5 und 8 bei der ersten Kohorte von B6-Mäusen nicht berücksichtigt werden konnten, wodurch weniger Beobachtungen zur Verfügung standen und die biologische Relevanz einer Erhöhung um den Faktor 1,38 ist bei den gefundenen individuellen Schwankungen zwischen den Tieren fraglich.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten einen deutlichen geschlechtsspezifischen Effekt, wobei weibliche Tiere höhere CCQ aufwiesen, als männliche Mäuse. Dies ist jedoch wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass männliche und weibliche Tiere prozentual unterschiedlich viel Corticosteron über den Urin bzw. die Faeces ausscheiden; weibliche Mäuse scheiden nach Untersuchungen von Touma et al. 47 % über den Urin aus, männliche 27 % [127].

Die CCQ-Levels veränderten sich auch mit dem Alter der Tiere. Zu Beginn der Studie (fünf Wochen) wurden höhere CCQ-Werte gemessen als mit acht und 20 Wochen. Dieses Phänomen wurde auch in anderen Studien beobachtet und könnte mit der noch neuen Gruppenzusammensetzung und möglicherweise noch nicht vollständig etablierten Hierarchie-Verhältnissen zusammenhängen [40, 62].

5.2.5 Nutzung des Environmental Enrichment (Nest-Score)

Die Anwendung von Nistmaterial ist sinnvoll hinsichtlich des Tierwohls, da es eine Vielfalt von Verhaltensbedürfnissen erfüllt: es ermöglicht Exploration, Manipulation, Beschäftigung, Versteckmöglichkeit und letztlich die Schaffung und Kontrolle einer individuellen Mikroumgebung, die an die Umgebungswärme [168] und –Helligkeit angepasst werden kann [56]. Die Tatsache, dass Mäuse, unabhängig von Geschlecht und Zuchtstatus, hochmotiviert sind, ein Nest zu bauen [114-116], und dafür sogar bereit sind, negativ-

assoziierte Bedingungen (wie z.B. einen Gitterboden [44]) hinzunehmen, unterstreicht die hohe Relevanz dieser Art von EE. Die Ergebnisse unsere Studie bestätigten, dass sowohl B6- als auch D2-Mäuse hochmotiviert sind, das Nistmaterial zu manipulieren, was sich in dem hohen Anteil von Scores >2 widerspiegelt. In den Versuchsgruppen, die zusätzlich einen Unterschlupf zur Verfügung hatten, waren die Scores (zumindest bei den B6 und männlichen D2-Mäusen) tendenziell niedriger, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Gruppen mit Unterschlupf auch häufig diesen genutzt haben und dementsprechend weniger auf ein gut gebautes Nest angewiesen waren. Nichtsdestotrotz wurde das Nistmaterial in fast allen Käfigen zerpfückt und manipuliert, wodurch die Mäuse ihr Erkundungs- und Nestbauverhalten auslebten, wenn auch das Nest nicht zwangsläufig dann als Unterschlupf genutzt wurde.

5.2.6 Verbesserung des Wohlbefindens erreicht?

Nistmaterial erfüllt die unter Punkt 2.1.5 aufgeführten Anforderungen und wird von Wissenschaftlern [6, 7, 49] und dem Gesetzgeber [2, 53] als EE für Mäuse empfohlen. Ein Unterschlupf wird in der EU-Empfehlung [53] ebenfalls empfohlen und eine höhere Käfig-Komplexität wird von Mäusen präferiert [7], allerdings zeigen verschiedene Studien, dass diese Art der Käfiganreicherung auch zu einem gesteigerten Aggressionsverhalten führen kann (vgl. 2.3.2.2).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tierwohl-assoziierten Parameter geben keine klare Antwort auf die Frage, ob das Wohlbefinden der Mäuse in den EE-Gruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe nachweislich erhöht wurde.

Bei der allgemeinen Gesundheitsuntersuchung, der Entwicklung des Körpergewichts, sowie der (Urin-) CCQs waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festzustellen. Es waren zwar geringe Interaktionseffekte zwischen Geschlecht und der Versuchsgruppe Double (bei B6-Mäusen beim CCQ, bei D2-Mäusen beim Körpergewicht) zu beobachten, jedoch ist ein veränderter Parameter allein wenig aussagekräftig und darüber hinaus die biologische Relevanz dieser Befunde ebenfalls fraglich (vgl. 5.2.1 und 5.2.4.4).

Obwohl verschiedene Studien zeigten, dass sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Parameter infolge von Stress verändern (siehe 2.3.2), ist schwer abzuschätzen, wie sensibel diese ein eingeschränktes Wohlbefinden widerspiegeln. Mäuse sind Beutetiere und verbergen instinktiv Anzeichen für Schmerz und Unwohlsein [89], weshalb allgemeine Parameter des Gesundheitszustandes alleine möglicherweise nicht immer zuverlässig Rückschlüsse auf das Wohlbefinden zulassen.

Allerdings wiesen am Ende der Studie (Woche 20) mehr als die Hälfte der B6-Mäuse Barbering-induzierte Alopezie auf. Barbering stellt ein komplexes Verhaltens-Phänomen dar [177] und scheint von verschiedenen sozialen und Umweltfaktoren beeinflusst zu werden (vgl. 2.3.2.3 und 5.2.3). Dies erschwert es, die Ergebnisse des Fur-Scores im Kontext der Anwendung des EEs zur Verbesserung des Wohlbefindens einzuordnen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass Barbering mit einer ernstzunehmenden Beeinträchtigung des

Wohlbefindens zusammenhängt. Dies gilt sowohl für den Barber als auch für die Tiere, die die Barbering-induzierte-Alopezie aufweisen (vergleiche 2.3.2.3). Die Empfehlung, in für Barbering anfälligen Kolonien die Haltungsumgebung anzureichern, wird häufig ausgesprochen, es existieren jedoch wenig Daten, die genau angeben, welches EE in diesen Fällen am besten genutzt werden sollte bzw. wie effektiv es ist [178].

Insgesamt lässt sich sagen, dass das angewandte EE in dieser Studie von den Mäusen genutzt wurde und es ihnen ermöglichte spezies-typisches Verhalten (Nestbau, Versteck, Exploration, Beschäftigung) auszuüben, was zu einer Verbesserung des Wohlbefindens beigetragen hat. Inwieweit das in dieser Studie eingesetzte EE tatsächlich nicht ausgereicht hat, um das abnormes Verhalten zu reduzieren oder aber andere Faktoren (Aufzuchtbedingungen und andere soziale Faktoren, sowie andere Umweltfaktoren) ursächlich für das beobachtete Barbering waren, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Um generell in Zukunft eindeutiger das Tierwohl beurteilen zu können, wären außerdem grundlegende Studien nötig, die untersuchen, welche Parameter sich als sensible und verlässliche Tierwohllindikatoren eignen und möglichst auch schon leichte Beeinträchtigungen des Wohlbefindens detektieren.

5.3 Stellenwert von Environmental Enrichment als Einflussfaktor der experimentellen Forschung

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, Auswirkungen von einfachem und häufig verwendetem EE auf den Mittelwert und die Variabilität physiologischer Parameter zu untersuchen und zusätzlich abzuschätzen, inwieweit EE möglicherweise eine Störvariable bei der Versuchsplanung bzw. bei dem Vergleich von Studienergebnissen, die unter verschiedenen Haltungsbedingungen erhoben wurden, darstellt.

Obwohl bei etwa der Hälfte der untersuchten Parameter Unterschiede zwischen den EE- und der Kontrollgruppe zu sehen waren, schienen diese von geringer biologischer Relevanz zu sein und traten bei Betrachtung der häufigeren und größeren Unterschiede infolge anderer Umweltfaktoren, die durch den Faktor Kohorte repräsentiert wurden, in den Hintergrund.

Das Studiendesign und die Messung von 3 Kohorten gingen darauf zurück, dass der Einfluss von EE auf die Variabilität von Parametern untersucht werden sollte. Die mitunter deutlichen Unterschiede zwischen den Kohorten werfen die Frage auf, inwieweit eine rigorose Standardisierung der Haltungsumgebung tatsächlich zu einer Steigerung der Reproduzierbarkeit führen kann, insbesondere bei kleinen Effekten.

Mandillo et al. zeigten in einer Multi-Labor-Studie ($n = 10-12$), dass robuste stammspezifische Effekte trotz Unterschieden in den absoluten Werten in vielen Verhaltenstests qualitativ reproduziert werden konnten [156]. Lewejohann et al. verglichen die Effekte zweier Haltungsbedingungen auf drei Verhaltenstests in zwei Laboren, erhoben von jeweils drei Experimentatoren mit $n = 12$ Tieren. Sie fanden ebenfalls heraus, dass das Labor einen großen Einfluss auf die absoluten Ergebnisse hatte, die meisten Ergebnisse aber qualitativ unabhängig von Experimentator und Forschungsinstitut gefunden wurden [83].

Demgegenüber versuchten Westwood et al. die Ergebnisse einer Studie, dass EE Tumorwachstum vermindert [164] zu replizieren, was jedoch nicht gelang [165] (in beiden Studien jeweils $n = 18-20$). Auch Untersuchungen von Karp et al. zeigten, dass Schwankungen zwischen Kohorten trotz großer Anstrengung der Standardisierung nicht immer vermieden werden konnten [158].

Zusätzlich zur klassischen Standardisierung von kontrollierbaren Parametern wie Geschlecht, Alter oder Haltungsbedingungen sollten deshalb weitere Variablen wie Körpergewicht und Kohorte in der statistischen Analyse berücksichtigt werden [158]. Neben diesen grundsätzlichen Methoden gibt es weitere Ansätze zur Sicherung der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen. Richter et al. schlagen beispielsweise eine standardisierte Heterogenisierung von Tier und Umweltbedingungen vor, die zwar die intra-experimentelle Variation erhöhen könnte, dafür aber zu einer geringeren inter-experimentellen Variation und damit zu einer erhöhten externen Validität führen könnte. Eine effiziente Heterogenisierungs-Strategie müsste demnach allerdings noch entwickelt werden [179-181]. Van der Staay et al. geben jedoch zu bedenken, dass die Heterogenisierung von Umweltbedingungen zwar die Generalisierbarkeit erhöhen könnte, aber die Gefahr bestünde, dass geringe Unterschiede übersehen werden könnten. Die Wahl des Studiendesigns (Heterogenisierung vs. strikte Standardisierung) hinge deshalb in großem Maße davon ab, welche Fragestellung geklärt werden soll [79]. Weitere Lösungsansätze werden diskutiert [182] und könnten darin bestehen, Multi-Labor-Studien durchzuführen [183], durch statistische Methoden (insbesondere bei Phänotypisierungsprojekten) Ergebnisse von Einzel-Labor-Studien für die erwartete Variation zwischen Laboren zu korrigieren [184] oder aber Experimente in mehreren Replikaten (Kohorten) zu untersuchen [185]. Eine kürzlich ins Leben gerufene Reproduzierbarkeits-Initiative soll Wissenschaftler unterstützen, die Reproduzierbarkeit ihrer Ergebnisse zu bestätigen, indem Schlüsselexperimente repliziert und validiert werden [186]. Obwohl eine Replikation von Ergebnissen zu einer Erhöhung der Tierzahlen führt, könnte dies als ethisch gerechtfertigt beurteilt werden, wenn dadurch die Validität von Ergebnissen garantiert würde und irreführende oder falsche Ergebnisse vermieden werden können.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass der Einfluss von EE vor dem Hintergrund anderer Umweltfaktoren von geringer biologischer Relevanz sein dürfte. Überdies muss auch bedacht werden, dass Tiere gerade als Folge einer reizarmen Haltungsumgebung häufig abnorme Verhaltensweisen entwickeln und ein geringeres Wohlbefinden aufweisen [28]. Ein Tier, das abnorme Verhaltensweisen zeigt, ist aber nur bedingt geeignet um physiologische Prozesse zu untersuchen [172], so dass sich dies insgesamt ebenfalls negativ auf die Verlässlichkeit und die Reproduzierbarkeit von Studien auswirken könnte [29]. EE könnte sich demnach durch die Förderung spezies-spezifischen Verhaltens positiv auf die physische und psychische Konstitution des Versuchstiers auswirken und ebenfalls förderlich für die externe Validität und Reproduzierbarkeit von Forschung sein, wenn es nämlich zu einer Minderung von abnormem Verhalten führt.

Weitere Studien sind jedoch notwendig, um praktikable Faktoren zu identifizieren, die die Entstehung abnormer Verhaltensweisen und die damit einhergehenden Einschränkungen des Wohlbefindens minimieren und nachweislich zu einer Verbesserung des Wohlbefindens führen.

6 Zusammenfassung

Eine artgerechte Haltung von Labortieren ist essentiell, um das Wohlbefinden der Tiere sicherzustellen und mögliche Schmerzen, Leiden oder Schäden auf ein Minimum zu reduzieren. Auch aus wissenschaftlicher Sicht ist die mentale und körperliche Gesundheit der Versuchstiere unabdingbar, da nur durch gesunde Tiere die Validität und Reproduzierbarkeit von Versuchsergebnissen gewährleistet werden kann. Eine angemessene Anreicherung der Haltungsumgebung ermöglicht es den Tieren, speziesspezifische Verhaltensweisen auszuüben, um ihre ethologischen Bedürfnisse so weit wie möglich zu befriedigen, und stellt damit die Gesundheit und das Wohlbefinden der Labortiere sicher. Gleichzeitig dürfen aber Änderungen der Käfigumgebung weder einen Einfluss auf wissenschaftliche Untersuchungen haben (z.B. durch eine Erhöhung der Variabilität), noch die Vergleichbarkeit von Studien beeinträchtigen. Zusätzlich sollen bei der Auswahl einer sinnvollen Anreicherung auch Aspekte der Praktikabilität, Arbeitssicherheit und Ökonomie berücksichtigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwieweit einfaches und häufig angewandtes EE eine angemessene Anreicherung der (Labortier-) Haltungsumgebung aus ethologischer und wissenschaftlicher Sicht darstellt. Dazu wurde der Einfluss von Nistmaterial, sowie Nistmaterial in Kombination mit einem Unterschlupf im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne EE auf eine Vielzahl physiologischer, sowie einiger Tierwohl-assoziierter Parameter erforscht. In Kooperation mit der GMC wurden insgesamt 360 Mäuse der Stämme C57BL/6NTac und DBA/2NCRl beiderlei Geschlechts in drei voneinander unabhängigen Kohorten untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass EE etwa die Hälfte der physiologischen Parameter im Mittelwert beeinflusste. Im Vergleich zu anderen Umwelteffekten, die durch den Faktor Kohorte repräsentiert werden, erschienen die Unterschiede jedoch von geringer biologischer Relevanz zu sein. Die Auswirkungen von EE auf die Variabilität der Parameter waren heterogen, wobei die Variationskoeffizienten erhöht, verringert oder unverändert waren, ohne dass eine Tendenz zu einer klar erhöhten oder verringerten Streuung durch EE in bestimmten Screens oder Tests zu erkennen war.

Die Resultate der Tierwohl-assozierten Parameter deuteten darauf hin, dass das Wohlbefinden der Tiere einerseits positiv beeinflusst wurde, weil das angebotene EE intensiv zur Ausübung speziesspezifischer Verhaltensweisen genutzt wurde. Zusätzlich ergaben sich keine Hinweise darauf, dass das Aggressionsverhalten bei Mäusen der untersuchten Stämme durch das EE erhöht wurde. Andererseits zeigten auch in den EE-Gruppen viele B6-Tiere Fellveränderungen infolge von Barbering. Allgemeine Gesundheits- und Stressparameter waren unauffällig, es ist jedoch schwer abzuschätzen, wie sensibel diese Parameter eine Beeinträchtigung des Tierwohls anzeigen. Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hin, dass die Anwendung von einfachem EE weder aus wissenschaftlicher, noch aus ethologischer Sicht negative Konsequenzen nach sich zieht.

7 Summary

Influence of Environmental Enrichment on Physiological and Welfare-Associated Parameters in Mice

Good laboratory animal welfare is essential to guarantee animal well-being and to reduce pain, suffering or harm to a minimum. In addition, physically and mentally healthy animals also contribute to increased validity and reproducibility of experimental results and are therefore crucial, from a scientific point of view. A sensible choice of environmental enrichment enables laboratory animals to perform species-specific behaviors to meet their ethological needs as much as possible and thereby ensures their health and well-being. At the same time, it must be ensured that the application of environmental enrichment neither influences scientific results (e.g. by increasing variability) nor interferes with the comparability of data. In addition, aspects of practicability, operational safety and economy must be considered.

The aim of this study was to examine if the application of simple and commonly used EE was an adequate way of improving the laboratory animal housing standards from an ethological, as well as scientific point of view. Our study approach was therefore to investigate the effect of a mouse house and nesting material (nestlet) versus nestlet alone compared to controls without EE by using a wide range of physiological parameters, as well as some welfare related parameters. A total of 360 male and female mice of two commonly used inbred mouse strains, C57BL/6NTac and DBA/2NCrl, were examined in the highly standardized environment of the GMC in three replicates using three independent cohorts of mice.

The results of the present study show, that about half of the means of the measured physiological parameters were affected by EE. But the biological relevance of the changes seemed to be minor compared to the effects of other environmental factors, which were represented by factor cohort. The impact of EE on variability of data was heterogeneous: We found that CVs were increased, decreased or unchanged. But, overall, no distinct patterns could be observed that hinted towards a general increase or decrease of CVs of parameters in a certain test due to factor enrichment.

Results of the welfare related parameters indicate that on the one hand animal welfare was positively influenced, as the supplied EE was readily used to perform species-specific behaviors. Additionally, results of this study did not indicate an increased aggression in mice of the examined strains due to EE. On the other hand, mice from all experimental groups (including the EE-groups) showed barbering induced alopecia. General health- and stress-related parameters were not influenced by the housing condition tested, but it is difficult to estimate how sensitively those parameters reflect an impaired welfare. Altogether, the results of this study indicate, that the use of simple EE does not have negative consequences neither from the scientific nor the ethological point of view.

8 Literaturverzeichnis

1. Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 141 des Gesetzes vom 29. März 2017 (BGBl. I S. 626) geändert worden ist.
2. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere.
3. Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 394 der Verordnung vom 31. August 2015 (BGBl. I S. 1474) geändert worden ist.
4. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959. S. 69-154.
5. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J.* 2005;46(2):162-70.
6. Baumans V, Van Loo PL. How to improve housing conditions of laboratory animals: the possibilities of environmental refinement. *Vet J.* 2013;195(1):24-32.
7. Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim.* 2002;36(3):243-70.
8. Toth LA. The influence of the cage environment on rodent physiology and behavior: Implications for reproducibility of pre-clinical rodent research. *Experimental neurology.* 2015;270:72-7.
9. Macri S, Ceci C, Altabella L, Canese R, Laviola G. The Directive 2010/63/EU on animal experimentation may skew the conclusions of pharmacological and behavioural studies. *Scientific reports.* 2013;3:2380.
10. Eskola S, Lauhikari M, Voipio HM, Laitinen M, Nevalainen T. Environmental enrichment may alter the number of rats needed to achieve statistical significance. *Scand J Lab Anim Sci.* 1999;26(3):134-44.
11. Tsai PP, Pachowsky U, Stelzer HD, Hackbarth H. Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim.* 2002;36(4):411-9.
12. Tsai PP, Stelzer HD, Hedrich HJ, Hackbarth H. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? *Lab Anim.* 2003;37(4):314-27.
13. Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).* 2005;24(2):503-13.
14. Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim.* 1997;31(2):116-24.
15. Swetter BJ, Karpiak CP, Cannon JT. Separating the effects of shelter from additional cage enhancements for group-housed BALB/cJ mice. *Neurosci Lett.* 2011;495(3):205-9.
16. van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, van Zutphen LF. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J Exp Anim Sci.* 1994;36(4-5):117-27.
17. Abramov U, Puussaar T, Raud S, Kurrikoff K, Vasar E. Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci Lett.* 2008;443(3):223-7.
18. Coke-Murphy C, Buendia M, Saborido T, Stanwood G. Simple shelter-style environmental enrichment alters behavior in mice. *TranslatNeurosci.* 2014;5(3):185-96.
19. Lin EJ, Choi E, Liu X, Martin A, Dearing MJ. Environmental enrichment exerts sex-specific effects on emotionality in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res.* 2010;216(1):349-57.

20. Amaral OB, Vargas RS, Hansel G, Izquierdo I, Souza DO. Duration of environmental enrichment influences the magnitude and persistence of its behavioral effects on mice. *Physiol Behav.* 2008;93(1-2):388-94.
21. Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel JC, et al. Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991).* 2015;25(11):4048-61.
22. Toth LA, Kregel K, Leon L, Musch TI. Environmental enrichment of laboratory rodents: the answer depends on the question. *Comp Med.* 2011;61(4):314-21.
23. Baumans V, Clausing P, Hubrecht R, Reber A, Vitale A, Wyffels E, et al. FELASA Working Group Standardization of Enrichment. Working Group Report: FELASA; 2006. <http://www.felasa.eu/recommendations/reports/Standardization-of-enrichment/>.
24. Benefiel AC, Dong WK, Greenough WT. Mandatory "enriched" housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation. *ILAR J.* 2005;46(2):95-105.
25. Poole T. UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals: Volume 1: Terrestrial Vertebrates: Wiley; 1999. S. 7ff.
26. Festing M. Refinement and reduction through the control of variation. *Alternatives to laboratory animals: ATLA.* 2004;32:259-63.
27. Baumans V, PLP VL, Pham TM. Standardisation of Environmental Enrichment for Laboratory Mice and Rats: Utilisation, Practicality and Variation in Experimental Results. *Scand J Lab Anim Sci.* 2010;37(2).
28. Würbel H, Garner JP. Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. *NC3Rs-online.* 2007. <http://www.nc3rs.org.uk/news.asp?id=395>.
29. Garner JP. Stereotypies and other abnormal repetitive behaviors: potential impact on validity, reliability, and replicability of scientific outcomes. *ILAR J.* 2005;46(2):106-17.
30. Bayne K, Würbel H. The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics).* 2014;33(1):273-80.
31. Gross AN, Richter SH, Engel AK, Würbel H. Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behav Brain Res.* 2012;234(1):61-8.
32. Bechard A, Meagher R, Mason G. Environmental enrichment reduces the likelihood of alopecia in adult C57BL/6J mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(2):171-4.
33. Rosenzweig MR, Bennett EL, Hebert M, Morimoto H. Social grouping cannot account for cerebral effects of enriched environments. *Brain research.* 1978;153(3):563-76.
34. Slater AM, Cao L. A Protocol for Housing Mice in an Enriched Environment 2015 [100]. 2015/07/02:[e52874]. <http://www.jove.com/pdf/52874/jove-protocol-52874-a-protocol-for-housing-mice-in-an-enriched-environment>.
35. Cao L, During MJ. What Is the Brain-Cancer Connection? *Annu Rev Neurosci.* 2012;35(1):331-45.
36. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature reviews Neuroscience.* 2006;7(9):697-709.
37. Mesa-Gresa P, Perez-Martinez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice. *Aggress Behav.* 2013;39(4):269-79.

38. Benaroya-Milshtein N, Hollander N, Apter A, Kukulansky T, Raz N, Wilf A, et al. Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci.* 2004;20(5):1341-7.
39. Zhu SW, Yee BK, Nyffeler M, Winblad B, Feldon J, Mohammed AH. Influence of differential housing on emotional behaviour and neurotrophin levels in mice. *Behav Brain Res.* 2006;169(1):10-20.
40. Van Loo P, Kruitwagen C, Koolhaas J, Van de Weerd H, Van Zutphen L, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2002;76(1):65-81.
41. Ehninger D, Kempermann G. Regional effects of wheel running and environmental enrichment on cell genesis and microglia proliferation in the adult murine neocortex. *Cerebral cortex (New York, NY : 1991).* 2003;13(8):845-51.
42. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature reviews Neuroscience.* 2000;1(3):191-8.
43. Newberry RC. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl Anim Behav Sci.* 1995;44(2):229-43.
44. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci.* 1998;55:369-82.
45. Moberg GP, Mench JA. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*: CABI Pub.; 2000. S. 12ff, 18 ff, 43ff.
46. De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2003;463(1):145-61.
47. Smith AL, Corrow DJ. Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR J.* 2005;46(2):140-7.
48. Kaliste EK, Mering SM, Huuskonen HK. Environmental modification and agonistic behavior in NIH/S male mice: nesting material enhances fighting but shelters prevent it. *Comp Med.* 2006;56(3):202-8.
49. Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J.* 2005;46(2):148-61.
50. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research. NC3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>.
51. Aske KC, Waugh CA. Expanding the 3R principles. More rigour and transparency in research using animals. 2017;18(9):1490-2.
52. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R). http://www.bfr.bund.de/de/deutsches_zentrum_zum_schutz_von_versuchstieren.html.
53. Empfehlung der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG).
54. Winnicker C, Gaskill BN, Garner JP, Pritchett-Corning K. *A Guide to the Behavior & Enrichment of Laboratory Rodents*: Charles River Laboratories; 2012.
55. Rowson KE, Michaels L. Injury to young mice caused by cottonwool used as nesting material. *Lab Anim.* 1980;14(3):187.
56. Jennings M, Batchelor GR, Brain PF, Dick A, Elliott H, Francis RJ, et al. Refining rodent husbandry: the mouse. Report of the Rodent Refinement Working Party. *Lab Anim.* 1998;32(3):233-59.

57. Bazille PG, Walden SD, Koniar BL, Gunther R. Commercial cotton nesting material as a predisposing factor for conjunctivitis in athymic nude mice. *Lab Anim (NY)*. 2001;30(5):40-2.
58. Haemisch A, Voss T, Gartner K. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiol Behav*. 1994;56(5):1041-8.
59. Haemisch A, Gartner K. The cage design affects intermale aggression in small groups of male laboratory mice: strain specific consequences on social organization, and endocrine activations in two inbred strains (DBA/2J and CBA/J). *J Exp Anim Sci*. 1994;36(4-5):101-16.
60. Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav*. 2003;43(2):281-92.
61. Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans V. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim*. 2003;37(4):300-13.
62. Van Loo PL, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen BF, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav*. 2001;72(5):675-83.
63. Tischkau SA, Mukai M. Activation of aryl hydrocarbon receptor signaling by cotton balls used for environmental enrichment. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009;48(4):357-62.
64. Buddaraju AK, Van Dyke RW. Effect of animal bedding on rat liver endosome acidification. *Comp Med*. 2003;53(6):616-21.
65. Sanford AN, Clark SE, Talham G, Sidelsky MG, Coffin SE. Influence of bedding type on mucosal immune responses. *Comp Med*. 2002;52(5):429-32.
66. Bayne K. Potential for unintended consequences of environmental enrichment for laboratory animals and research results. *ILAR J*. 2005;46(2):129-39.
67. Hedrich H. *The Laboratory Mouse*: Elsevier Science; 2004. S. 287ff.
68. Stanford University. Mouse Ethogram. <http://mousebehavior.org/ethogram/>.
69. Moons CP, Van Wiele P, Odberg FO. To enrich or not to enrich: providing shelter does not complicate handling of laboratory mice. *Contemp Top Lab Anim Sci*. 2004;43(4):18-21.
70. Lee MY, Yu JH, Kim JY, Seo JH, Park ES, Kim CH, et al. Alteration of Synaptic Activity-Regulating Genes Underlying Functional Improvement by Long-term Exposure to an Enriched Environment in the Adult Brain. *Neurorehabil Neural Repair*. 2013;27(6):561-74.
71. Friske JE, Gammie SC. Environmental enrichment alters plus maze, but not maternal defense performance in mice. *Physiol Behav*. 2005;85(2):187-94.
72. Augustsson H, van de Weerd HA, Kruitwagen CL, Baumans V. Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. *Lab Anim*. 2003;37(4):328-40.
73. Whitaker J, Moy SS, Godfrey V, Nielsen J, Bellinger D, Bradfield J. Effects of cage size and enrichment on reproductive performance and behavior in C57BL/6Tac mice. *Lab Anim (NY)*. 2009;38(1):24-34.
74. Kuleskaya N, Rauvala H, Voikar V. Evaluation of social and physical enrichment in modulation of behavioural phenotype in C57BL/6J female mice. *PLoS One*. 2011;6(9):e24755.
75. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav*. 1997;62(5):1019-28.
76. Nakamura Y, Ueno A, Nunomura Y, Nakagaki K, Takeda S, Suzuki K. Effects of inducing exercise on growing mice by means of three-dimensional structure in rearing environment. *Exp Anim*. 2016;65(4):403-11.

77. Pasalic I, Bosnjak B, Tkalcevic VI, Jaran DS, Javorscak Z, Markovic D, et al. Cage enrichment with paper tissue, but not plastic tunnels, increases variability in mouse model of asthma. *Lab Anim.* 2011;45(2):121-3.
78. Wirz A, Mandillo S, D'Amato FR, Giuliani A, Riviello MC. Response, use and habituation to a mouse house in C57BL/6J and BALB/c mice. *Exp Anim.* 2015;64(3):281-93.
79. van der Staay FJ, Arndt SS, Nordquist RE. The standardization-generalization dilemma: a way out. *Genes Brain Behav.* 2010;9(8):849-55.
80. Mering S, Kaliste-Korhonen E, Nevalainen T. Estimates of appropriate number of rats: interaction with housing environment. *Lab Anim.* 2001;35(1):80-90.
81. Van de Weerd HA, Aarsen EL, Mulder A, Kruitwagen CL, Hendriksen CF, Baumans V. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci.* 2002;5(2):87-109.
82. Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Wurbel H. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature.* 2004;432(7019):821-2.
83. Lewejohann L, Reinhard C, Schrewe A, Brandewiede J, Haemisch A, Gortz N, et al. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes Brain Behav.* 2006;5(1):64-72.
84. Mellor D, Reid C. Concepts of animal well-being and predicting the impact of procedures on experimental animals. *Improving the Well-being of Animals in the Research Environment.* 1994:3-18.
85. FAWC. FAWC Report on Stockmanship and Farm animal welfare. London: 2007.
86. Prescott MJ, Lidster K. Improving quality of science through better animal welfare: the NC3Rs strategy. *Lab Anim (NY).* 2017;46(4):152-6.
87. Hawkins P, Morton DB, Burman O, Dennison N, Honess P, Jennings M, et al. A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. *Lab Anim.* 2011;45(1):1-13.
88. Tsai P. Impact of Environmental Enrichment and Caging on the Physiology and Behavior of mice. Hannover: Hannover Medical School, School of Veterinary Medicine Hannover; 2002.
89. Burkholder T, Foltz C, Karlsson E, Linton CG, Smith JM. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2012:145-65.
90. Spangenberg EM, Keeling LJ. Assessing the welfare of laboratory mice in their home environment using animal-based measures - a benchmarking tool. *Lab Anim.* 2015.
91. Jeong JY, Lee DH, Kang SS. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. *Endocrinol Metab.* 2013;28(4):288-96.
92. Lee S, Nam H, Kim J, Cho H, Jang Y, Lee E, et al. Body Weight Changes of Laboratory Animals during Transportation. *Asian Australas J Anim Sci.* 2012;25(2):286-90.
93. Kalliokoski O, Jacobsen KR, Darusman HS, Henriksen T, Weimann A, Poulsen HE, et al. Mice do not habituate to metabolism cage housing--a three week study of male BALB/c mice. *PLoS One.* 2013;8(3):e58460.
94. Gray SJ, Jensen SP, Hurst JL. Effects of resource distribution on activity and territory defence in house mice, *Mus domesticus*. *Anim Behav.* 2002;63(3):531-9.
95. Weber EM, Dallaire JA, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Garner JP. Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem? *Lab Animal.* 2017;46:157.

96. Würbel H, Chapman R, Rutland C. Effect of feed and environmental enrichment on development of stereotypic wire-gnawing in laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci.* 1998;60(1):69-81.
97. Sarna JR, Dyck RH, Whishaw IQ. The Dalila effect: C57BL6 mice barber whiskers by plucking. *Behav Brain Res.* 2000;108(1):39-45.
98. Würbel H. The Motivational Basis of Caged Rodents' Stereotypies. In: Mason G, Rushen J, editors. *Stereotypic animal behavior: Fundamentals and Applications to Welfare.* 2nd ed. Wallingford: CABI Pub.; 2008.
99. Mason G, Rushen J. *Stereotypic Animal Behaviour: Fundamentals and Applications to Welfare:* CABI Pub.; 2008. S. 139f.
100. Garner JP, Dufour B, Gregg LE, Weisker SM, Mench JA. Social and husbandry factors affecting the prevalence and severity of barbering ('whisker trimming') by laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2004;89(3-4):263-82.
101. Garner JP, Weisker SM, Dufour B, Mench JA. Barbering (fur and whisker trimming) by laboratory mice as a model of human trichotillomania and obsessive-compulsive spectrum disorders. *Comp Med.* 2004;54(2):216-24.
102. Kurien BT, Gross T, Scofield RH. Barbering in mice: a model for trichotillomania. *BMJ (Clinical research ed).* 2005;331(7531):1503-5.
103. Mason G, Latham N. Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? *Anim Welf.* 2004;(13):57-69.
104. Lawson GW. Etiopathogenesis of mandibulofacial and maxillofacial abscesses in mice. *Comp Med.* 2010;60(3):200-4.
105. Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: The behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci.* 2004;86:261-89.
106. Tilly S-LC, Dallaire J, Mason GJ. Middle-aged mice with enrichment-resistant stereotypic behaviour show reduced motivation for enrichment. *Anim Behav.* 2010;80(3):363-73.
107. Gross AN, Engel AK, Richter SH, Garner JP, Würbel H. Cage-induced stereotypies in female ICR CD-1 mice do not correlate with recurrent perseveration. *Behav Brain Res.* 2011;216(2):613-20.
108. Nevison C, Hurst J, Barnard C. Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Anim Welf.* 1999;8(4):361-79.
109. Howerton CL, Garner JP, Mench JA. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2008;115(1-2):90-103.
110. Pawlowicz A, Demner A, Lewis MH. Effects of access to voluntary wheel running on the development of stereotypy. *Behav Processes.* 2010;83(3):242-6.
111. Leduc RY, Rauw G, Baker GB, McDermid HE. What Goes Around Can Come Around: An Unexpected Deleterious Effect of Using Mouse Running Wheels for Environmental Enrichment. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017;56(2):194-201.
112. Mason G, Clubb R, Latham N, Vickery S. Why and how should we use environmental enrichment to tackle stereotypic behaviour? *Appl Anim Behav Sci.* 2007;102(3):163-88.
113. King LA. Behavioral evaluation of the psychological welfare and environmental requirements of agricultural research animals: theory, measurement, ethics, and practical implications. *ILAR J.* 2003;44(3):211-21.

114. 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. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2008;47(6):25-31.
115. Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. *PLoS One.* 2012;7(3):e32799.
116. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim.* 1997;31(2):133-43.
117. Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2013;(82):51012.
118. Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim.* 2013;47(3):153-61.
119. Manser CE. The assessment of stress in laboratory animals. Horsham Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals; 1992.
120. National Research Council. Recognition and alleviation of distress in laboratory animals. Washington, D.C.: National Academies Press; 2008. S. 37f.
121. Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1040:162-71.
122. von Holst D. The Concept of Stress and Its Relevance for Animal Behavior. San Diego: Academic Press; 1998. S. 17f.
123. Tuli JS, Smith JA, Morton DB. Corticosterone, adrenal and spleen weight in mice after tail bleeding, and its effect on nearby animals. *Lab Anim.* 1995;29(1):90-5.
124. Armario A, Montero JL, Balasch J. Sensitivity of corticosterone and some metabolic variables to graded levels of low intensity stresses in adult male rats. *Physiol Behav.* 1986;37(4):559-61.
125. Romero LM. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol Evol.* 2004;19(5):249-55.
126. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.* 2009;200(1):3-22.
127. Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;130(3):267-78.
128. Busso JM, Ruiz RD. Excretion of Steroid Hormones in Rodents: An Overview on Species Differences for New Biomedical Animal Research Models. In: Diamanti-Kandarakis E, editor. *Contemporary Aspects of Endocrinology: InTech*; 2011.
129. Khan MZ, Altmann J, Isani SS, Yu J. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *Gen Comp Endocrinol.* 2002;128(1):57-64.
130. Buchanan KL, Goldsmith AR. Noninvasive endocrine data for behavioural studies: the importance of validation. *Anim Behav.* 2004;67(1):183-5.
131. Van Loo PL, Van der Meer E, Kruitwagen CL, Koolhaas JM, Van Zutphen LF, Baumans V. Long-term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains. *Lab Anim.* 2004;38(2):169-77.
132. Van der Meer E, Van Loo PL, Baumans V. Short-term effects of a disturbed light-dark cycle and environmental enrichment on aggression and stress-related parameters in male mice. *Lab Anim.* 2004;38(4):376-83.

133. Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T, Aguilar-Pimentel JA, Becker L, Calzada-Wack J, et al. Mouse phenotyping. *Methods*. 2011;53(2):120-35.
134. Fuchs H, Gailus-Durner V, Neschen S, Adler T, Afonso LC, Aguilar-Pimentel JA, et al. Innovations in phenotyping of mouse models in the German Mouse Clinic. *Mamm Genome*. 2012;23(9-10):611-22.
135. Gailus-Durner V, Fuchs H, Becker L, Bolle I, Brielmeier M, Calzada-Wack J, et al. Introducing the German Mouse Clinic: open access platform for standardized phenotyping. *Nat Methods*. 2005;2(6):403-4.
136. Schneider I, Tirsch WS, Faus-Kessler T, Becker L, Kling E, Busse RL, et al. Systematic, standardized and comprehensive neurological phenotyping of inbred mice strains in the German Mouse Clinic. *J Neurosci Methods*. 2006;157(1):82-90.
137. Burgess RW, Cox GA, Seburn KL. Neuromuscular disease models and analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;602:347-93.
138. Jones BJ, Roberts DJ. A rotarod suitable for quantitative measurements of motor incoordination in naive mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1968;259(2):211.
139. Fuchs H, Schughart K, Wolf E, Balling R, Hrabe de Angelis M. Screening for dysmorphological abnormalities--a powerful tool to isolate new mouse mutants. *Mamm Genome*. 2000;11(7):528-30.
140. Neff F, Flores-Dominguez D, Ryan DP, Horsch M, Schroder S, Adler T, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3272-91.
141. Rozman J, Rathkolb B, Neschen S, Fuchs H, Gailus-Durner V, Klingenspor M, et al. Glucose tolerance tests for systematic screening of glucose homeostasis in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2015;5(1):65-84.
142. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072-83.
143. Moreth K, Fischer R, Fuchs H, Gailus-Durner V, Wurst W, Katus HA, et al. High-throughput phenotypic assessment of cardiac physiology in four commonly used inbred mouse strains. *J Comp Physiol B*. 2014;184(6):763-75.
144. Prusky GT, Alam NM, Beekman S, Douglas RM. Rapid quantification of adult and developing mouse spatial vision using a virtual optomotor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(12):4611-6.
145. Covelli V. Guide to the Necropsy of the Mouse. Rome, Italy. http://eulep.pdn.cam.ac.uk/Necropsy_of_the_Mouse/index.php.
146. Scorrano F, Carrasco J, Pastor-Ciurana J, Belda X, Rami-Bastante A, Bacci ML, et al. Validation of the long-term assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats using hair corticosterone as a biomarker. *FASEB J*. 2015;29(3):859-67.
147. Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1117-9.
148. Efron B, Tibshirani RJ. An introduction to the bootstrap: CRC press; 1994.
149. Team R Core. R: A language and environment for statistical computing . Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2013.
150. Eaton GJ, Custer RP, Johnson FN, Stabenow KT. Dystrophic cardiac calcinosis in mice: genetic, hormonal, and dietary influences. *Am J Pathol*. 1978;90(1):173-86.
151. Serpi R, Klein-Rodewald T, Calzada-Wack J, Neff F, Schuster T, Gailus-Durner V, et al. Inbred wild type mouse strains have distinct spontaneous morphological phenotypes. *Histology and histopathology*. 2013;28(1):79-88.

152. Kim JS, Kubota H, Kiuchi Y, Doi K, Saegusa J. Subcapsular cell hyperplasia and mast cell infiltration in the adrenal cortex of mice: comparative study in 7 inbred strains. *Exp Anim.* 1997;46(4):303-6.
153. Scudamore CLC. *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*: Wiley; 2014. S. 34.
154. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science.* 1999;284(5420):1670-2.
155. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm SL, 2nd, Burkhart-Kasch S, Dorow J, et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol.* 2003;54(1):283-311.
156. Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banchaabouchi MA, Kallnik M, et al. Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics.* 2008;34(3):243-55.
157. Gurfein BT, Stamm AW, Bacchetti P, Dallman MF, Nadkarni NA, Milush JM, et al. The calm mouse: an animal model of stress reduction. *Mol Med.* 2012;18:606-17.
158. Karp NA, Speak AO, White JK, Adams DJ, Hrabe de Angelis M, Herculat Y, et al. Impact of temporal variation on design and analysis of mouse knockout phenotyping studies. *PLoS One.* 2014;9(10):e111239.
159. Karp NA, Melvin D, Mott RF. Robust and sensitive analysis of mouse knockout phenotypes. *PLoS One.* 2012;7(12):e52410.
160. Turner JG, Parrish JL, Hughes LF, Toth LA, Caspary DM. Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comp Med.* 2005;55(1):12-23.
161. Delahunty KM, Horton LG, Coombs HF, 3rd, Shultz KL, Svenson KL, Marion MA, et al. Gender- and compartment-specific bone loss in C57BL/6J mice: correlation to season? *J Clin Densitom.* 2009;12(1):89-94.
162. Sorge RE, Martin LJ, Isbester KA, Sotocinal SG, Rosen S, Tuttle AH, et al. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods.* 2014;11(6):629-32.
163. Lad HV, Liu L, Paya-Cano JL, Parsons MJ, Kember R, Fernandes C, et al. Behavioural battery testing: evaluation and behavioural outcomes in 8 inbred mouse strains. *Physiol Behav.* 2010;99(3):301-16.
164. Cao L, Liu X, Lin EJ, Wang C, Choi EY, Riban V, et al. Environmental and genetic activation of a brain-adipocyte BDNF/leptin axis causes cancer remission and inhibition. *Cell.* 2010;142(1):52-64.
165. Westwood JA, Darcy PK, Kershaw MH. Environmental enrichment does not impact on tumor growth in mice. *F1000Research.* 2013. http://f1000researchdata.s3.amazonaws.com/manuscripts/1596/5df49036-9fb1-484c-823f-a199703c9bf7_1419%20-%20kershaw%20-%2020140.pdf.
166. Karp NA, Mason J, Beaudet AL, Benjamini Y, Bower L, Braun RE, et al. Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits. *Nat Commun.* 2017;8:15475.
167. The Jackson Laboratory. Mouse Phenome Database. <https://phenome.jax.org>.
168. Gaskill BN, Gordon CJ, Pajor EA, Lucas JR, Davis JK, Garner JP. Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol Behav.* 2013;110-111:87-95.
169. Eskola S, Kaliste-Korhonen E. Aspen wood-wool is preferred as a resting place, but does not affect intracage fighting of male BALB/c and C57BL/6J mice. *Lab Anim.* 1999;33(2):108-21.
170. Militzer K, Wecker E. Behaviour-associated alopecia areata in mice. *Lab Anim.* 1986;20(1):9-13.

171. Carruthers E, Halkin S, King T, editors. Mouse barbering: investigations of genetic and experiential control. *Anim Behav Soc Abstr*; 1998.
172. Wurbel H. Ideal homes? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci*. 2001;24(4):207-11.
173. Myers D. C57BL/6J update—C57BL/6J skin lesion problem eliminated. *JAX mice animal health bulletins*. 1997.
174. Thorpe JB, Rajabi N, Decatanzaro D. Circadian rhythm and response to an acute stressor of urinary corticosterone, testosterone, and creatinine in adult male mice. *Horm Metab Res*. 2012;44(6):429-35.
175. Thorpe J, Gould K, Borman E. Circulating and Urinary Adrenal Corticosterone, Progesterone, and Estradiol in Response to Acute Stress in Female Mice (*Mus musculus*). *Horm Metab Res*. 2014;(EFirst).
176. Meijer MK, Lemmens AG, Van Zutphen BF, Baumans V. Urinary corticosterone levels in mice in response to intraperitoneal injections with saline. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2005;8(4):279-83.
177. Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, Shah ZH, Tuohimaa P. Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. *Behav Processes*. 2006;71(1):8-15.
178. Tynes VV. Behavioral dermatopathies in small mammals. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*. 2013;16(3):801-20.
179. Richter SH, Garner JP, Auer C, Kunert J, Wurbel H. Systematic variation improves reproducibility of animal experiments. *Nat Meth*. 2010;7(3):167-8.
180. Richter SH, Garner JP, Wurbel H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods*. 2009;6(4):257-61.
181. Richter SH, Garner JP, Zipser B, Lewejohann L, Sachser N, Touma C, et al. Effect of population heterogenization on the reproducibility of mouse behavior: a multi-laboratory study. *PLoS One*. 2011;6(1):e16461.
182. Wurbel H. More than 3Rs: the importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Lab Anim (NY)*. 2017;46(4):164-6.
183. Wodarski R, Delaney A, Ultenius C, Morland R, Andrews N, Baastrup C, et al. Cross-centre replication of suppressed burrowing behaviour as an ethologically relevant pain outcome measure in the rat: a prospective multicentre study. *Pain*. 2016;157(10):2350-65.
184. Kafkafi N, Golani I, Jaljuli I, Morgan H, Sarig T, Wurbel H, et al. Addressing reproducibility in single-laboratory phenotyping experiments. *Nat Methods*. 2017;14(5):462-4.
185. Paylor R. Questioning standardization in science. *Nat Methods*. 2009;6(4):253-4.
186. Science Exchange. Validation. www.reproducibilityinitiative.org.

9 Anhänge

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Verschiedene Arten der Käfiganreicherung.....	11
Abbildung 2. Haltungsbedingungen der drei experimentellen Gruppen.....	24
Abbildung 3. Versuchsablauf zur Erhebung physiologischer Parameter.	26
Abbildung 4. Dokumentationstabelle zur Erhebung des allgemeinen Gesundheitszustandes.....	35
Abbildung 5. Schema zur Evaluierung des Alopezie-Scores.....	36
Abbildung 6. Fixation zur Urinprobengewinnung für die Validierungsexperimente.	41
Abbildung 7. Nest-Score-Schema adaptiert nach [147].	42
Abbildung 8. Farbschema zur Heatmap, die Veränderungen des Mittelwerts darstellt.	45
Abbildung 9. Einfluss der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) auf den Mittelwert physiologischer Parameter bei B6 und D2. Detailansichten auf den folgenden Seiten.	46
Abbildung 10. Geglättetes Histogramm, das den Einfluss der Hauptfaktoren auf den Mittelwert der untersuchten Parameter (n = 161) bei B6 darstellt.	51
Abbildung 11. Geglättetes Histogramm, das den Einfluss der Hauptfaktoren auf den Mittelwert der untersuchten Parameter (n = 160) bei D2 darstellt.....	55
Abbildung 12. Einfluss der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) auf die Variabilität physiologischer Parameter bei B6 und D2. Detailansicht auf den nächsten Seiten.....	64
Abbildung 13. Körpergewichtsentwicklung bei B6-Mäusen.....	70
Abbildung 14. Körpergewichtsentwicklung bei D2-Mäusen.....	71
Abbildung 15. Schweregrad der Barbering induzierter Alopezie bei männlichen B6- Mäusen.	75
Abbildung 16. Schweregrad der Barbering induzierter Alopezie bei weiblichen B6- Mäusen.	77
Abbildung 17. Parallelität.....	78
Abbildung 18. Einfluss von Verunreinigungen der Urinproben durch Kotpellets.....	80
Abbildung 19. Tagesprofil des Corticosterons im Urin.....	81
Abbildung 20. Darstellung der Stressreaktion (infolge von Fixation) im Urin.....	82
Abbildung 21. Corticosteron-Creatinin-Quotienten von B6-Mäusen.	83
Abbildung 22. Corticosteron-Creatinin-Quotienten von D2-Mäusen.	84
Abbildung 23. Ergebnisse des Nest-Scorings.....	86
Abbildung 24. Rohdaten der Hauptparameter des OFTs vor dem Hintergrund der Spannweite der normalen, biologischen Variabilität von B6-Mäusen.	89
Abbildung 25. Rohdaten der Parameter der Kraftmessung vor dem Hintergrund der Spannweite der normalen, biologischen Variabilität von B6-Mäusen.	94
Abbildung 26. Rohdaten der Parameter des Wärmeplattentests bei B6-Mäusen.	95

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Klassifizierung von EE nach Würbel et al. [28].	5
Tabelle 2. Übersicht über die Versuchsgruppen der Hauptstudie in der GMC.	24
Tabelle 3 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Kits	37
Tabelle 4 Geräte	38
Tabelle 5. Allgemeine Pipettiervorlage für eine 96-Loch-Mikrotiter-Platte mit Angaben zum Probenauftrag für den Nachweis von Corticosteron	39
Tabelle 6. Anzahl der physiologischen Parameter, die durch die Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) beeinflusst wurden bei B6.	53
Tabelle 7. Anzahl der physiologischen Parameter, die durch die Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht, Kohorte) beeinflusst wurden bei D2.	56
Tabelle 8. Ergebnisse der SHIRPA-Untersuchung (Neurologie).	58
Tabelle 9. Zusammenfassung der Befunde der histopathologischen Untersuchung (Pathologie).	59
Tabelle 10. Zusammenfassung des Einflusses der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht und Kohorte) auf Variationskoeffizienten nach Modifizierung durch das Bootstrap-Verfahren bei B6.	61
Tabelle 11. Zusammenfassung des Einflusses der Hauptfaktoren (Enrichment, Geschlecht und Kohorte) auf Variationskoeffizienten nach Modifizierung durch das Bootstrap-Verfahren bei D2.	62
Tabelle 12. Ergebnisse der Gesundheitsuntersuchung.	72
Tabelle 13. Häufigkeit von Barbering induzierter Alopezie bei männlichen B6-Mäusen.	74
Tabelle 14. Häufigkeit von Barbering induzierter Alopezie bei weiblichen B6-Mäusen.	76
Tabelle 15. Präzision.	79
Tabelle 16. Wiederfindung.	79

10 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. Markus Brielmeier für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes, an dem ich mich immer sehr wohl gefühlt habe. Frau Dr. Angelika Scheideler danke ich von Herzen für ihre großartige Unterstützung. Ihr konstruktives Feedback, beruhigende und unterstützenden Worte sowie Taten haben in großem Maße zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Aigner danke ich vielmals für die ausgezeichnete Unterstützung und Betreuung von Seiten der tierärztlichen Fakultät der LMU. Neben fachlichen Rückmeldungen zu Projekt und Veröffentlichung, hat er während der Thesis-Committee-Meetings auch durch seine positive und humorvolle Art zu einer angenehmen und produktiven Atmosphäre beigetragen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem externen Betreuer, Herrn Dr. Heinz Brandstetter bedanken, der mich durch fundierte Hinweise und Ratschläge während der Thesis-Committee-Meetings bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. Fuchs und den GMC-Screenern für die gute und erfolgreiche Kooperation, sowie große Hilfsbereitschaft zu Fragen und Problemen rund um das Projekt.

Frau Dr. C. Gau und Frau Dr. M. Österreicher danke ich ganz herzlich für ihre große Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten, ihre Geduld und ihr Engagement, mit dem sie das Projekt unterstützt haben.

Mein weiterer Dank gilt den Tierpflegern von GMC und Kleintierhaus und den Technischen Assistenten der GMC, die mit ihrer bereitwilligen tatkräftigen Unterstützung zum Gelingen dieser Studie beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der AVM bedanken, für ein gutes Arbeitsklima und ihre tatkräftige Unterstützung bei fachlichen Fragen. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. C. Kiermayer für ihre Hilfsbereitschaft und eine geduldige Einführung ins Labor, Frau Dr. J. Zorn und Frau. Dr. S. Sabrautzki für Hilfe bei allen Fragen des Tierschutzes sowie für die Unterstützung bei der Weiterbildung zum Fachtierarzt und Frau D. Bulian und Herrn M. Opitz für hervorragende technische Unterstützung.

Ich danke außerdem Herrn Dr. M. Miller und Frau S. Schiffner, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mit denen jedes Event (von Helena über Vorlesungen und Meetings bis B2Run) zu etwas Besonderem wurde.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Freundinnen Evi und Mille bedanken, mit denen ich viel erlebt, gelernt, gefeiert und gelacht habe, und die mir hier in München stets zur Seite standen.

Von Herzen danke ich meiner Familie, meinen Eltern und Geschwistern, die immer an mich glauben, die mir Rückhalt geben und die mich trotz der Entfernung immer mit voller Kraft unterstützt haben.

Mein allergrößter Dank gilt Raphael und Leo, die mich unterstützen, zum Lachen bringen, alles relativieren und mich erden, die mein Leben bereichern und mir durch ihre uneingeschränkte Liebe und Zuversicht Kraft geben!