

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

**und**

**dem Deutschen Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R)**

**des Bundesinstituts für Risikobewertung**

**Käfigausgestaltungselemente als Environmental Enrichment für Labormäuse- Einfluss  
auf das Heimatkäfigverhalten und ihre Eignung aus Tiersicht**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin**

**an der**

**Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Ute Hobbiesiefken**

**Tierärztin**

**aus Malchin**

**Berlin 2023**

**Journal-Nr.: 4426**

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
<b>1. Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Lars Lewejohann
<b>2. Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke
<b>3. Gutachter:</b>	PD Dr. Bettina Bert

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, laboratory mammals, small animal, pets, animal welfare, animal behaviour, animal housing, environment, enrichment

**Tag der Promotion: 01.12.2023**



**„Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A  
Life Worth Living”**

(Mellor, 2016)

Gewidmet den Versuchstieren durch deren Einsatz der Schutz von Menschen, Natur und  
Umwelt ermöglicht wird

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b> .....	<b>III</b>
<b>Definitionen</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literatur</b> .....	<b>3</b>
2.1 Tierschutzrecht für Versuchstiere in Europa und Deutschland .....	3
2.2 Die 3R: Replacement, Reduction, Refinement.....	4
2.3 Aktuelle Haltungsbedingungen von Versuchstieren in Deutschland.....	6
2.4 Refinementmaßnahme Environmental Enrichment .....	10
2.4.1 Environmental Enrichment für Versuchstiere .....	10
2.4.2 Definitionen von Environmental Enrichment.....	11
2.4.3 Arten von Environmental Enrichment .....	13
2.4.4 Ziele von Environmental Enrichment.....	14
2.5 Beurteilung der Eignung von Ausgestaltungselementen als Environmental Enrichment für Labormäuse.....	15
2.5.1 Erhebung von tierwohlbezogenen Gesundheitsparametern unter Enrichmenteinsatz bei Labormäusen .....	15
2.5.2 Präferenztests: Methoden zur Beurteilung von Environmental Enrichment aus Sicht der Maus.....	19
2.6 Ziel der Untersuchung .....	24
<b>3 Publikationen</b> .....	<b>25</b>
3.1 Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice .....	25
3.2 Rating enrichment items by female group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system.....	49
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>71</b>
4.1 Beurteilung des Heimatkäfigverhaltens und Nutzungsverhaltens von EE Elementen .....	72
4.2 Ermittlung von Präferenzen für Ausgestaltungselemente in heimatkäfigbasierten Präferenztests .....	79
4.3 Nutzungsverhalten versus heimatkäfigbasierter Präferenztest für EE Elemente .....	83
4.4 Limitationen .....	84
4.5 Fazit und Ausblick.....	85
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	<b>88</b>
<b>6 Summary</b> .....	<b>90</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>92</b>
7.1 Wissenschaftliche Literatur .....	92
7.2 Verordnungen und Gesetze .....	106

<b>8</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
8.1	Originalpublikationen .....	VI
8.2	Systematische Reviews .....	VI
8.3	Vorträge.....	VI
8.3.1	Kongressvorträge .....	VI
8.3.2	weitere Vorträge .....	VI
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>10</b>	<b>Finanzierungsquellen.....</b>	<b>IX</b>
<b>11</b>	<b>Interessenskonflikte.....</b>	<b>X</b>
<b>12</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>XI</b>

## Abkürzungen

3R	Replace, Reduce, Refine
ARB	abnormal repetitive behavior
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BGB	Bürgerliches Gesetzbuch
CE	Consensus Error
CON	konventionelle Maushaltung
CPP	Conditioned Place Preference
ENR	angereicherte Maushaltung
EE	Environmental Enrichment
EU	Europäische Union
GG	Grundgesetz
MoPSS	Mouse Position Surveillance System
NTP	Nichttechnische Projektzusammenfassung
PREPARE	Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence
RFID	Radio-Frequency Identification
RL	Richtlinie
TschG	Tierschutzgesetz
TschVersV	Tierschutz-Versuchstierverordnung
WV	Worth Value

## Definitionen

Animal Welfare Science	Forschungszweig, der sich mit der wissenschaftlichen Untersuchung des Wohlbefindens von Tieren beschäftigt
Environmental Enrichment	Anreicherung der unmittelbaren Haltungsverhältnisse von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren, um das Tierwohl zu steigern
Standardhaltung	Haltung von Labormäusen in Makrolonkäfigen mit Einstreu, Nestbaumaterial und einem Unterschlupf
Angereicherte Haltung	mit EE angereicherte Standardhaltung von Labormäusen
Organ-on-a-Chip	Biochip, der Zellen und Flüssigkeiten enthält, die eine physiologische Organfunktion nachbilden
3R-Prinzip	Nach Russel und Burch (1959) eingeführtes Prinzip des humanen Umgangs mit Tieren in der tierexperimentellen Forschung bestehend aus: Replacement (Vermeiden), Reduction (Verringern) und Refinement (Verbessern)



# 1 Einleitung

Es ist ein wichtiges Ziel der Richtlinie (RL) 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere das Leben derjenigen Versuchstiere, die nicht durch den Einsatz alternativer Methoden in der Forschung ersetzt werden können, zu verbessern und sie vor Schmerzen, Leiden und Schäden zu schützen. Dieses sogenannte Refinement stellt neben dem Ersatz von Tierversuchen (Replacement) und der Reduzierung der Anzahl der für wissenschaftliche Versuche verwendeten Tiere (Reduction) die konsequente Umsetzung des laut der RL 2010/63/EU geforderten 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine bzw. Vermeiden, Verringern und Verbessern von Tierversuchen) von Russel und Burch (1959) im Sinne des Tierwohls dar.

Allgemeine Anforderungen an Einrichtungen sowie an die Pflege und Unterbringung von Versuchstieren werden im Anhang III der RL ebenfalls definiert und empfehlen eine Ausgestaltung der direkten Haltungsumgebung, um den Versuchstieren die Ausprägung eines möglichst großen arttypischen Verhaltensspektrums zu ermöglichen und haltungsbedingten Verhaltensstörungen vorzubeugen. Resultierend aus der Abwägung der rechtlichen Mindestvorgaben zur Haltung von Versuchstieren, den Ansprüchen und der Standardisierung von Versuchen und Umsetzung von Hygieneaspekten in der Tierhaltung wird den Labormäusen üblicherweise ein Unterschlupf und Nestmaterial zu Verfügung gestellt (Mieske et al., 2022). Diese dennoch verarmte Unterbringung kann durch das Anbieten weiterer Ausgestaltungselemente, sogenannten Environmental Enrichment (EE) Elementen, zu einer komplexeren Lebensumgebung gestaltet werden.

Die positiven Auswirkungen ausgestalteter Haltungsbedingungen gegenüber kargeren, weniger abwechslungsreichen Bedingungen, konnten in zahlreichen Studien mit Mäusen bereits belegt werden. So führt eine Ausgestaltung der Käfige u.a. zu einer Verminderung abnormaler repetitiver Verhaltensweisen, sogenannter Stereotypien (Würbel et al., 1998; Garner, 2005; Bailoo et al., 2018), vermindert angst-assoziierte Verhaltenszustände (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Hüttenrauch et al., 2016; Bailoo et al., 2018), reduziert die Ausbildung depressiver Verhaltensphänotypen (Chourbaji et al., 2005) und verbessert Lern- und Gedächtnisleistungen (van Praag et al., 2000; Tang et al., 2001).

Trotz des bekannten positiven Einflusses von Ausgestaltungselementen auf das Tierwohl, führten diese wissenschaftlichen Erkenntnisse bisher nicht zur konsequenten Anwendung in der Versuchstierhaltung. Dies mag nicht zuletzt dem Fakt geschuldet sein, dass eine Vielzahl unterschiedlichster kommerziell erhältlicher Ausgestaltungselemente existiert und bisher keine Einigkeit vorherrscht, welche für eine Steigerung des Tierwohls geeignet sind. Um die

Implementierung von Enrichment zu fördern sind daher geeignete Bewertungsstrategien nötig, deren Ziel es sein sollte, die Bedürfnisse des Versuchstiers selbst zu berücksichtigen (Kahnau et al., 2020), um den tatsächlichen Nutzen aus tierbezogener Sicht widerzuspiegeln (Dawkins, 1990; Baumans, 2005; Baumans und van Loo, 2013; Lewejohann et al., 2020). Hierbei stellen, neben der Erhebung tierwohlbezogener Gesundheitsparameter, Präferenztests eine mögliche Methode dar, um die Eignung von spezifischen Ausgestaltungselementen durch eine Involvierung der Tiere selbst zu erfragen (Habedank et al., 2018; Lewejohann et al., 2020).

Um die Eignung verschiedener Ausgestaltungselemente aus den Kategorien *Hauselemente*, *Strukturelemente* und *Futtersuchelemente* aus Sicht der Maus zu ermitteln, wurden in der vorliegenden Arbeit adulte weibliche C57BL/6J Mäuse bezüglich des Einflusses von Enrichment auf tierwohl-assoziierte Verhaltensweisen, wie Stereotypien, Pflegeverhalten, Sozialverhalten und inaktivem Verhalten vergleichend zu einer konventionellen Haltung untersucht. Über die Bestimmung des Nutzungsverhaltens der dargebotenen Enrichments und einer anschließenden automatisierten Ermittlung des Wahlverhaltens in einem heimatkäfigbasierten Präferenztestsystem (Habedank et al., 2021b), konnte die Wichtigkeit der getesteten Enrichments und ihre Einordnung in ein Wertesystem aus Sicht der Maus erfolgen.

## 2 Literatur

### 2.1 Tierschutzrecht für Versuchstiere in Europa und Deutschland

Der Schutz von Versuchstieren obliegt in Europa und Deutschland besonderen rechtlichen Regularien, die im Laufe der letzten Jahre zunehmend verbessert wurden. Grund hierfür ist das steigende Interesse der Öffentlichkeit um die Kontroverse der Notwendigkeit von Tierversuchen, eine wachsende Wahrnehmung des Tieres als fühlendes Mitgeschöpf und der damit einhergehende Wandel der Mensch-Tier-Beziehung.

Erstmals wurden in Europa Wirbeltiere, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden, mit dem europaweiten Übereinkommen (ETS Nr. 123) unter Berücksichtigung ihrer Leidensfähigkeit und ihres Erinnerungsvermögens besonderem Schutz unterstellt. Das Übereinkommen wurde 1998 von 21 EU-Nationen angenommen (Beschluss 1999/575/EG). Versuche an Wirbeltieren wurden seit Einführung des Übereinkommens europaweit genehmigungs- und anzeigepflichtig und durften nur für bestimmte Zwecke durchgeführt werden. Zusätzlich fordert das Übereinkommen die Umsetzung des 3R Prinzips mit der Erforschung und Implementation von Ersatzmethoden, der Reduktion der verwendeten Tierzahlen sowie der Minimierung von Schmerzen, Leiden und Schäden, denen die Tiere im Versuch ausgesetzt sind. Die uneinheitliche Umsetzung in nationales Recht führte zu einem wirtschaftlichen Ungleichgewicht, sowie zu einer ungleichen Umsetzung des Tierschutzes innerhalb des EU-Binnenmarktes, weshalb 1986 durch die Richtlinie 86/609/EWG eine Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften zum Schutz, der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere folgte. Die RL 86/609/EWG stellte gefährdete Arten unter strengeren Schutz, die artgerechte und hygienische Pflege und Unterbringung der Tiere wurde spezifiziert und die regelmäßige Berichterstattung und Veröffentlichung von Art, Anzahl und Verwendungszweck der genutzten Versuchstiere vereinbart. Die RL 86/609/EWG wurde im Jahre 2003 durch die RL 2003/65/EG ersetzt und somit die europaweiten Vereinbarungen zu einem erhöhten Schutz und Wohlergehen von Tieren auch rechtlich konkretisiert. Im Jahr 2010 folgte die novellierte „Richtlinie des Europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere“ (RL 2010/63/EU). Demnach wurde dem Tier als fühlendes Wesen (nach Art. 13 AEU), angestoßen durch die Vereinbarungen aus dem Vertrag von Amsterdam 1997 und Lissabon 2007, ein besonderer Schutzstatus eingeräumt und so der Tierschutz im Versuch weiter verbessert. Hierbei legt die RL 2010/63/EU als Hauptziel den vollständigen Verzicht auf Tierversuche fest. Ein weiterer wichtiger Schwerpunkt der RL liegt auf der konsequenten Umsetzung des 3R-Prinzips für Tierversuche, um hohe Standards für das

Wohlergehen von Versuchstieren zu schaffen und den wirtschaftlichen Binnenmarkt weiterhin zu stärken. Zusätzlich wurde die Transparenz von Tierversuchen für die Öffentlichkeit durch Veröffentlichung nichttechnischer Projektzusammenfassungen (NTPs) in allgemein verständlicher Sprache verbessert. In Deutschland werden NTPs über die Datenbank AnimalTestInfo des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) (Schönfelder, 2015; Bert et al., 2017) erfasst und veröffentlicht.

Auch in Deutschland ist die Weiterentwicklung des Tierschutzgedankens für Versuchstiere in der rechtlichen Entwicklung abgebildet. Erstmals wurde 1971 dem Tierschutz durch Aufnahme in das deutsche Grundgesetz (GG Art. 74 Nr. 20) ein besonderer Wert zugemessen und durch die Ergänzung im Jahr 2002 (Art. 20a GG) bestärkt. Seit 1990 gelten mit Einführung des § 90a im Bürgerlichen Gesetzbuch (BGB) Tiere nicht mehr als Sachen und werden somit als fühlende Mitgeschöpfe auch rechtlich besser geschützt. Die Umsetzung des Schutzes von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (RL 2010/63/EU) erfolgte 2013 mit der Novellierung des Tierschutzgesetzes (TierSchG) und Einführung der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) in Deutschland. Eine Novellierung von TierSchG und TierSchVersV erfolgte zuletzt 2021 und diente dem Ziel, sich näher an den gesetzlichen Vorgaben der RL 2010/63/EU zu orientieren und verbesserte unter anderem den Stellenwert von Trainings- und Eingewöhnungsprogrammen vor dem Versuch sowie die Entwicklung und Anwendung geeigneter Refinementmaßnahmen für Tierversuche.

## **2.2 Die 3R: Replacement, Reduction, Refinement**

Im Hinblick auf den wachsenden wissenschaftlichen Fortschritt und die damit verbundene exponentielle Erhöhung der Zahl zu Forschungszwecken verwendeter Tiere, erarbeiteten und veröffentlichten Russel und Burch im Jahre 1959 „The Principles of Humane Experimental Technique“ (Russell und Burch, 1959). In ihrem Buch beschrieben die Forscher das 3R-Prinzip für den humanen Umgang mit Tieren in tierexperimenteller Forschung bestehend aus: Replacement (Vermeiden), Reduction (Verringern) und Refinement (Verbessern).

*Replacement*, als höchstes Ziel, stellt hierbei den Ersatz von Tierversuchen durch geeignete Methoden dar. Bestrebungen zielen unter anderem auf die Darstellung physiologischer Prozesse außerhalb des Körpers (in vitro) durch den Einsatz von Zellkulturen oder kombinierter Zellkulturen sog. „Organs-on-a-chip“ oder in Form von Computersimulation (in silico) (Watts, 2007; Adler et al., 2011; Herrmann et al., 2019) ab. Datenbanken, wie die Datenbank für Alternativmethoden zum Tierversuch die Non Animal Technologies Datenbank

(NAT) (Doctors Against Animal Experiments Germany, 2020), erleichtern die gezielte Suche nach Alternativen zum Tierversuch.

Kann ein Tierversuch nicht ersetzt werden und gilt somit als unerlässlich, ist die Anzahl der verwendeten Tiere im Sinne der *Reduction* so gering wie notwendig zu halten. Essentiell trägt hierbei eine gute Versuchsplanung nach aktuellen Leitlinien wie PREPARE (Smith et al., 2018), inklusive biometrischer Berechnung der benötigten Tierzahlen zur Erzielung robuster Ergebnisse (Piper et al., 2023) und eine Prä-Registrierung der geplanten Studie auf geeigneten Plattformen, wie der AnimalStudyRegistry (Bert et al., 2019), dazu bei, ungeplante Wiederholungsversuche zu vermeiden. Ebenso reduziert die Kombination von alternativen In-Vitro Methoden und Modellierung von klinischen Daten, die Zahl benötigter Tiere im Versuch (Chapman et al., 2013; Pappalardo et al., 2019). Durch neue Generierungsmethoden, gute Zuchtplanung, Verwendung beider Geschlechter (Wewetzer et al., 2023) und der erneuten Verwendung von Versuchstieren i.S.d. § 18 TierSchVersV kann die Anzahl von nicht für Versuchszwecke verwendete sog. „Überschusstiere“ perspektivisch reduziert werden. Eine retrospektive Evaluierung bereits vorhandener tierexperimenteller Daten in Systematischen Reviews (Farhat, 2021) vor Versuchsbeginn und die gemeinsame Nutzung von Geweben und Organen getöteter Tiere (Lang et al., 2018) sind weitere Möglichkeiten, die Zahl der verwendeten Tiere zu reduzieren.

*Refinement* stellt die Verbesserung von Versuchsmethoden, Umgang mit den Tieren (sog. Handling), Versuchstierhaltung und Pflege dar, mit dem Ziel, potenzielle Schmerzen, Leiden und Schäden für die verwendeten Tiere zu vermeiden oder zu verringern und das Tierwohl zu fördern. Hierzu zählen unter anderem Verbesserungen für eine angemessene Analgesie und Anästhesie für Versuchstiere (Golledge und Jirkof, 2016; Arras et al., 2021), die Anwendung tierschonenderer Handlungsmethoden (Hurst und West, 2010) und Versuchsmethoden, wie die nicht-invasive Temperaturmessung (Mei et al., 2018) oder Reduktion des Stresses durch die geeignete Wahl der Blutentnahmemethode (Meyer et al., 2020) sowie die Vorbereitung der Tiere auf den Versuch durch Trainingsprogramme und Habituation (O'Malley et al., 2022; Swan et al., 2023). Ebenso tragen tierartspezifische Leitlinien von Experten durch Information über die artgerechte Unterbringung und Pflege verschiedenster Versuchstierspezies, wie beispielsweise Ratte (Gesellschaft für Versuchstierkunde et al., 2017), Maus (Gesellschaft für Versuchstierkunde et al., 2014) und Fisch (Schuhmacher, 2013) zum Refinement von Tierversuchen bei.

Seit der Postulierung des 3R-Prinzips im Jahre 1959 für ethische Forschung im Rahmen tierexperimenteller Studien wurden weitere R, wie Responsibility (Verantwortung), Rigour/Reproducibility (Sorgfalt/ Reproduzierbarkeit), Remembering (Erinnern/Gedenken)

und Rehoming (Weitervermittlung) (Iliff, 2002; Klein und Bayne, 2007; NCad, 2016; Aske and Waugh, 2017) sowie Robustness (Robustheit), Registration (Registrierung) und Reporting (Berichterstattung) (Strech und Dirnagl, 2019) ergänzt. Ursächlich für diese Erweiterung ist die zunehmende Bedeutung des 3R-Prinzips seit dessen rechtlicher Implementierung (RL 2010/63/EU) und der zunehmende Diskurs um die ethische Vertretbarkeit von Tierversuchen (Max-Planck-Gesellschaft e.V. zur Förderung der Wissenschaften, 2016) und ihrem wissenschaftlichen Wert (Strech und Dirnagl, 2019).

Durch die aufgeworfene Problematik der unzureichenden Reproduzierbarkeit tierexperimenteller Studien (Baker und Penny, 2016) stellen neuere Überlegungen zur Erweiterung der ursprünglichen tierwohl-zentrierten Rs (Replacement, Reduction, Refinement), den wissenschaftlichen Wert durch Robustness, Registration und Reporting stärker in den Mittelpunkt (Strech und Dirnagl, 2019). Sie sollen durch Erhöhung des wissenschaftlichen Wertes zur Balance in der ethischen Schaden-Nutzen-Analyse von Tierversuchen (Würbel, 2017) beitragen. Teilweise bestehen Überschneidungen mit bereits bekannten Rs, die ebenfalls den wissenschaftlichen Wert fokussieren.

### **2.3 Aktuelle Haltungsbedingungen von Versuchstieren in Deutschland**

Um genehmigungsfähige Tierversuche an Wirbeltieren und Kopffüßern in Deutschland durchführen zu dürfen, müssen neben sachkundigem Personal, ausreichenden Finanz- und Sachmitteln auch geeignete Anlagen, so genannte Tierhäuser mit Tier- und Versuchsräumen zur Verfügung stehen (§ 8 (1) TierSchG). Weiterhin muss die Unterbringung von Versuchstieren eine art-, bedürfnis- und verhaltensgerechte Pflege und Ernährung gewährleisten sowie artgemäße Bewegungsfreiheit erlauben, um Schmerzen, vermeidbare Leiden und Schäden hieraus zu vermeiden (§ 2 TierSchG). Nähere Bestimmungen zur Unterbringung von Versuchstieren regelt die Tierschutzversuchstierverordnung (TierSchVerV). In § 1 und § 15 TierSchVerV wird die Einhaltung der Vorgaben aus Anhang III der RL 2010/63/EU zur Pflege und Unterbringung von Tieren gefordert und weiterhin eine Unterbringung (Gestalt, Konstruktion und Funktionsweise), die die Verwendung geringstmöglicher Anzahl an Tieren unter geringstmöglichen Schmerzen, Leiden und Schäden zur Erreichung zuverlässiger Versuchsergebnisse gewährleistet. Der Anhang III der RL 2010/63/EU definiert im Teil A allgemeine Anforderungen an Anlagen, Tierräume, Versuchsräume und Betriebsräume und setzt somit die im Jahre 2006 überarbeiteten Anforderungen aus dem Anhang A des Europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere (ETS 123) um. Durch Einarbeitung gegenwärtiger wissenschaftlicher und anwendungsspezifischer

Erkenntnisse von Expertengremien wird der Steigerung des Tierwohls in dieser Überarbeitung ein höherer Status eingeräumt. Vorab verabschiedete die EU-Kommission im Juni 2007 Empfehlungen mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Versuchstieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden (2007/526/EG), welche die erweiterte Leitlinie aus Anhang A des Europäischen Übereinkommens ETS 123 enthielt und dessen Inhalte zum Teil in der Erstellung des Anhang III der RL 2010/63/EU berücksichtigt wurden.

Allgemeine Anforderungen aus Anhang III der RL 2010/63/EU dienen dazu, die Hygiene, Sicherheit und Gesundheit der Tiere sicherzustellen und definieren hierzu Maßnahmen zur Tiergesundheitskontrolle, Tierpflege, Quarantänemaßnahmen, Belüftung, Temperaturregulierung, Beleuchtung, Umgebungslärmregulierung und adäquaten Alarmsystemen. Soziallebende Tiere müssen in stabilen Gruppen untergebracht werden, außer wenn dies zur Erreichung des Versuchszwecks oder aus Tierschutzgründen nicht umsetzbar ist. Die Einzelhaltung sollte dann so kurz wie notwendig gehalten und Kontakt zu Artgenossen über Sicht, Geruch oder Berührung ermöglicht werden. Hygienische und artgerechte Einstreu oder Schlafplätze, Ruheplätze, Zugang zu Futter und Wasser müssen den Tieren zur Verfügung stehen. Ebenso wurde dem Bedürfnis zur Thermoregulation und Nestbauverhalten (Gaskill et al., 2012, 2013), vor allem für trächtige Tiere durch die vorgeschriebene Bereitstellung von Nestmaterial Rechnung getragen. Der artspezifische Teil B des Anhangs III der RL 2010/63/EU stellt Mindestmaße der Bodenfläche und Käfighöhe für Unterbringungsmöglichkeiten nach den jeweiligen Anforderungen der Spezies, des Alters und Gewichts dar. Repräsentierte Tierarten sind hier Nagetiere, Kaninchen, Hunde, Katzen, Frettchen, nichtmenschliche Primaten, landwirtschaftliche Nutztiere, Miniaturschweine, Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische.

Neben den Grundanforderungen aus dem artspezifischen Teil des Anhang III der RL 2010/63/EU für Käfigmindestmaße enthalten die EU- Leitlinien 2007/526/EG spezifische Vorgaben zu Klimaanforderungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Licht, Lärm) und der Ausstattung der Tierkäfige bzw. -haltungen für verschiedene Tierarten. Weiterführende Empfehlungen zu Haltungsanforderungen für einige Tierarten, darunter Maus (Gesellschaft für Versuchstierkunde et al., 2014) und Ratte (Gesellschaft für Versuchstierkunde et al., 2017), wurden durch Fachgesellschaften, wie der Gesellschaft für Versuchstierkunde, erarbeitet und zur Verfügung gestellt.

Für die praktische Umsetzung der Unterbringung von Versuchstieren kommen neben den genannten rechtlichen Anforderungen für Sicherheit, Hygiene und Gesundheit allerdings weitere Faktoren, wie die Standardisierung im Sinne der Variabilitätsreduktion und Erhöhung

der Reproduzierbarkeit von tierexperimentellen Forschungsdaten (van Zutphen, L. F.; Baumans, V.; Beynen, 2001; Olsson und Dahlborn, 2002; Baumans und van Loo, 2013), ökonomische Anforderungen und personelle Realisierbarkeit hinzu (Olsson und Dahlborn, 2002; Baumans und van Loo, 2013). Dies resultiert zumeist in der Umsetzung der rechtlich genannten Mindeststandards für die Haltung von Versuchstieren mit geringer Berücksichtigung empfohlener tierwohlfördernder Maßnahmen. Für die in Deutschland meistverwendete Versuchstierart Maus (*Mus musculus*, Stand 2021) (Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), 2022) bedeutet dies zumeist eine Unterbringung in kleinen unstrukturierten Plastikkäfigen (Makrolon®) mit Einstreu und dem Anbieten von Nestmaterial sowie vereinzelt einer Nestbox, wie in Anhang A des ETS 123 als Mindestausstattung für kleine Nagetiere gefordert. Futter und Wasser werden den Tieren unter diesen Standardbedingungen frei, so genannter weise *ad libitum*, zur Verfügung gestellt (Würbel und Stauffacher, 1994).

Diese reizarme Umgebung kann bei den Versuchstieren zur so genannten Verhaltensdeprivation führen, die durch die Hinderung spezies-spezifischer Verhaltensweisen entsteht und zu Tierleid, wie Verhaltensstörungen, chronischem Stress und pathologischen Zuständen, führen kann (Dawkins, 1988; Würbel, 1996). Um diesen nachteiligen haltungsbedingten Auswirkungen im Sinne des *Refinements* entgegenzuwirken, wird die weitere Ausgestaltung der Unterbringung in der EU-Richtlinie ausdrücklich empfohlen, sodass den Tieren durch „[...] hinreichende Komplexität [...]“ die Ausübung „[...] einer großen Palette arttypischer Verhaltensweisen [...]“ (Art. 3.3. b) RL 2010/63 Anhang III) ermöglicht werden soll. Dies erlaubt den Tieren eine gewisse Kontrolle ihrer Umgebung, um stressbedingte Verhaltensmuster zu verringern (Mason und Rushen, 2006). Aktuelle Haltungsempfehlungen befürworten daher die Ausgestaltung der unmittelbaren Haltungsumgebung von Versuchstieren, beispielsweise durch so genanntes EE, um den Tieren artspezifische Verhaltensweisen „[...] einschließlich Bewegung, Futtersuche, manipulativem Verhalten und kognitivem Verhalten [...]“ (Art. 3.3. b) RL 2010/63 Anhang III) zu ermöglichen. Laut den EU-Leitlinien für die Unterbringung von Versuchstieren (2007/526/EG) sollte Nagetieren als wichtigste Ressourcen Einstreu, ein Unterschlupf und Nestmaterial zur Verfügung gestellt werden. Darüber hinaus wird für die Befriedigung des Nagertriebes empfohlen, Holzstöckchen als Ausgestaltungselement für Nager anzubieten. Weitere Elemente wie Röhren, Kisten und Kletterstangen, werden zur Erhöhung der Käfigkomplexität genannt, es werden jedoch keine weiteren Anforderungen an die Beschaffenheit dieser Elemente gestellt. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass den Tieren durch die Ausgestaltung die Ausübung normaler Verhaltensweisen ermöglicht und rivalisierendes Verhalten gemindert werden soll. Eine



Evaluation, ob die angebotenen Ausgestaltungselemente die genannten Zwecke erfüllen, ist somit essenziell, um das Tierwohl durch die Ausgestaltung positiv zu beeinflussen.

## **2.4 Refinementmaßnahme Environmental Enrichment**

### **2.4.1 Environmental Enrichment für Versuchstiere**

Eine Anreicherung der unmittelbaren Haltungsumgebung von in Gefangenschaft lebenden Tieren, so genanntes Environmental Enrichment (EE), mit dem Gedanken haltungsbedingte Verhaltensstörungen zu verringern und natürliches Verhalten zu fördern entstammt ursprünglich der Zootierhaltung (Fernandez and Martin, 2021). Der amerikanische Zoodirektor und Biologieprofessor Hal Markowitz gilt mit seiner Forschung für eine artgerechte Wildtierhaltung in Zoos als Pionier des EE (Markowitz, 1979; Markowitz und LaForse, 1987; Markowitz et al., 1995), welches bis heute in der Zootierhaltung für eine artgemäße Unterbringung Anwendung findet (Markowitz, 1998). In der Labortierhaltung wurde EE zunächst für die Primatenhaltung als Haltungsverbesserungsidee zur Steigerung des psychischen Wohlbefindens analog zur Zootierhaltung übernommen. Anreicherungsverfahren und Ziele von EE für Primaten und deren mögliche Übertragung auf andere Versuchstierspezies formulierten hier Beaver et al. (1989) sowie Chamove et al. (1989b, 1989c). Erste Untersuchungen zur Reduzierbarkeit von abnormal selbst gerichteten Verhaltensweisen und somit Steigerung des Tierwohls durch Einsatz von EE in eng verwandten Primatenspezies in Laborhaltung folgten (Weld et al., 1989).

Die Etablierung und Erforschung von EE für die Versuchsmodelle Maus und Ratte verfolgte zunächst nicht das Ziel der Steigerung des Tierwohls. Bereits in den 60ern wurden erste biochemische (Krech et al., 1960; Rosenzweig et al., 1962a, 1962b) und physiologische (Rosenzweig et al., 1962a, 1962b; Diamond et al., 1966) Veränderungen in Hirnen von Versuchsratten festgestellt, die vergleichend zu Artgenossen eine komplexere Lebensumgebung mit täglichem Zugang zu wechselnden Objekten als EE erhielten. Dennoch diente EE zunächst nicht der Steigerung des Tierwohls, sondern der Erforschung von Prozessen der Hirn- und Verhaltensentwicklung in der biomedizinischen Forschung und wird auch heute vorwiegend noch zu diesem Zweck in der biomedizinischen Forschung eingesetzt (Mieske et al., 2022). Mit wachsendem Interesse, auch dem Wohl des Tieres im Versuch gerecht zu werden und einer eigens geschaffenen Forschungsdisziplin, der „animal welfare science“, wurden erste Untersuchungen zur Verbesserung der Haltungsbedingungen von Maus und Ratte Ende der 80er Jahre begonnen (Scharmann, 1989). So wurde der Einfluss von Käfigteilern und unterschiedlich komplexen Käfigen auf die Emotionalität von Mäusen (Chamove, 1989a) untersucht und das Explorationsverhalten mit Objekten bei Ratten aus verarmten und angereicherten Haltungen verglichen (Renner und Rosenzweig, 1986). Eine Übersicht zu Konzepten und Herstellern von EE Elementen für Labortiere Maus (Olsson und Dahlborn, 2002; Key, 2004; Smith und Corrow, 2005) und Ratte (Patterson-Kane, 2001; Key,

2004; Smith und Corrow, 2005) und Protokolle für die Anwendung in der Labortierhaltung für Mäuse (Sztainberg und Chen, 2010; Slater und Cao, 2015) entstanden.

Das Grundkonzept von EE, durch die „Anreicherung“ der unmittelbaren Haltungsumgebung in irgendeiner Form das Wohlbefinden der Tiere zu steigern und somit eine Haltungsverbesserung zu erzielen, bleibt hierbei für alle Spezies gleich.

#### **2.4.2 Definitionen von Environmental Enrichment**

Bereits 1995 stellte Ruth Newberry fest, dass bis dato „Environmental Enrichment ein vages Konzept zur Verbesserung der Lebensbedingungen von in Gefangenschaft gehaltenen Tieren“ (Newberry, 1995) ist und beschreibt die Schwierigkeit einer einheitlichen Definitionsfindung, die bis heute kontextabhängig ist (Kim-McCormack et al., 2016). Dies mag nicht zuletzt dem Fakt geschuldet sein, dass EE Elemente gleichermaßen als biomedizinische Intervention sowie zur Steigerung des Tierwohls in der Versuchstierhaltung eingesetzt wurden. So beschreibt Beaver (Beaver, 1989) EE als „künstliche Gebilde“ und „andere Objekte zur Förderung von Erforschen und Aktivität“ bei in Gefangenschaft lebenden Tieren und bezieht sich so auf anthropozentrische Einschätzungen des Verhaltens mit EE Elementen. Chamove (Chamove, 1989c) spricht bei EE von einer „Vergrößerung des psychologischen Raumes von Tieren in Gefangenschaft“ und stellt somit eine bessere Raumnutzung durch EE Elementen mit einer Vergrößerung des psychologischen Raumes gleich, da beides gleichermaßen die Ausprägung eines breiteren Verhaltensrepertoires erlaubt. Stauffacher erklärt „Der Begriff "Umweltanreicherung" bezieht sich in der Regel auf alle Bemühungen, die Lebensbedingungen von Tieren in Gefangenschaft zu verbessern.“ und benennt EE weiterhin als „Anreicherung der standardisierten Haltung von Labortieren durch Objekte“ (Stauffacher, 1994). Die genannten Beispiele zeigen deutlich, dass bis dato die Verbesserung aus Sicht der Tiere nicht vollumfänglich für die Definition von EE einbezogen wurde, sondern vielmehr die Änderung der Haltungsumgebung an sich im Mittelpunkt stand. Mit dem wachsenden gesellschaftlichen Interesse, dem Schutz von Tieren ebenso im Tierversuchsumfeld gerecht zu werden und der Etablierung der „Animal Welfare Science“ erhielt das Tierwohl eine zentrale Bedeutung in der versuchstierkundlichen Forschung. Die Definitionen von EE entwickelten sich in diesem Zusammenhang ebenfalls weiter. So wurde EE zunächst als „eine Verbesserung der biologischen Funktionen von Tieren in Gefangenschaft durch Modifikationen in der Umgebung“ (Newberry, 1995) bezeichnet, welche dem Tier keine Emotionalität zuspricht. Eine darauffolgende Definition benennt EE als eine Verbesserung der Qualität der Haltungsumgebung, sodass den Tieren eine größere Möglichkeit der Aktivität und eine Kontrolle über die soziale und räumliche Umgebung gewährt wird (Newberry, 1995; Stauffacher, 1995). Dies impliziert bereits den Stellenwert der Selbstkontrolle der Tiere über

ihre Haltungsumgebung, um Stress zu reduzieren (Mason und Rushen, 2006). Van de Weerd stellt in ihrer Definition fest, dass durch EE in Form von eingebrachten Materialien und Objekten spezies-spezifisches Verhalten gefördert werden sollte und somit gleichermaßen nicht spezies-spezifische Verhaltensweisen gemindert werden (van de Weerd, 1996). Neuere Definitionen inkludieren die Steigerung des „physischen und physiologischen Wohlbefindens durch Stimuli, die spezies-spezifische Bedürfnisse erfüllen“ (Baumans und van Loo, 2013) und räumen so dem Tier als Mitgeschöpf eine emotionale Empfindungsfähigkeit ein. Auch in die rechtliche Definition der RL 2010/63/EU zur Ausgestaltung wurde der Gedanke, durch „Ausgestaltung“ „[...] eine große Palette arttypischer Verhaltensweisen [...]“ zu fördern sowie die Möglichkeit der Tiere ihre Umgebung „[...] in bestimmtem Maße selbst kontrollieren und auswählen [...]“ zu können, „[...] um stressbedingte Verhaltensmuster abzubauen. [...]“, integriert. Leach et al. (2000) geben ebenfalls an, dass alle Änderungen des Haltungssystems die Frequenz und Vielfalt positiver natürlicher Verhalten fördern, abnormales Verhalten mindern, die Nutzbarkeit der Umgebung für die Tiere erhöhen und den Tieren dabei helfen sollen, die Herausforderungen der Gefangenschaft zu bewältigen. Duncan und Olsson kritisieren dennoch, die inflationäre Nutzung von „Enrichment“ um „Verbesserungen“ der Haltung zu beschreiben, die eigentlich nur die Grundbedürfnisse der Tiere befriedigen und außer Acht lassen, dass damit eigentlich der Prozess die Haltung abwechslungsreicher zu gestalten und nicht die Linderung haltungsbedingter Schäden durch jedwede Erhöhung der Komplexität, ohne auf die Verbesserung der Lebensqualität der Tiere einzugehen, gemeint ist (Duncan and Olsson, 2001). Würbel und Garner stellen ebenfalls fest, dass manche EE nicht nur ethologisch wertlos, sondern sogar schädlich sein können und unterteilen EE anhand dessen Einflusses auf das Wohlbefinden der Tiere in drei Kategorien, (i) Pseudo- Enrichment, (ii) bedingt wohlbringendes Enrichment und (iii) wohlbringendes Enrichment (Würbel und Garner, 2007). So bleibt der Begriff EE im Wandel und kann nur relativ zum Standardhaltungssystem gesehen werden (Fraser, 1996; Würbel und Garner, 2007). Olson und Dahlborn stellen heraus, um den Ansprüchen von Tierschutz und der Qualität der Forschung gerecht zu werden, die Anreicherung zu einem verbesserten Tierwohl und zu einer verbesserten biologischen Funktion der Tiere führen sollte und bis zu diesem Ergebnis der Terminus „Enrichment“ hierfür nicht korrekt angewendet wurde (Olsson und Dahlborn, 2002). Auch R. Young stimmt der Einschätzung zu, dass es zur Bezeichnung als EE neben einem guten Grundverständnis von Tierwohl ebenso einer wissenschaftlichen Klarheit bedarf, dass durch die Anreicherung das Tierwohl gefördert wird (Young, 2003).

Dies macht deutlich, dass für eine erfolgreiche Implementierung von EE spezies-spezifische Bedürfnisse bekannt sein müssen und die EE-Strategien, wie in der RL vorgegeben „[...] regelmäßig überprüft und aktualisiert.“ (RL 2010/63/EU: Anhang III) werden müssen. Eine

Evaluierung von EE Elementen sollte daher auf Wissen um die verhaltensbezogenen Bedürfnisse der Tiere, Daten aus Enrichment-Studien und wissenschaftlichen Testungen basieren, bevor sie als generelle Empfehlung in die breite Anwendung in der Versuchstierhaltung übergehen (van Loo et al., 2005).

### 2.4.3 Arten von Environmental Enrichment

Der Terminus des EE beinhaltet eine Vielzahl an Ansätzen und Methoden, die durch eine Form der Anreicherung, so genanntes „Enrichment“, die direkte Haltungsumgebung, auch „Environment“, von in Gefangenschaft lebenden Tieren im Sinne des Tierwohls positiv beeinflussen. Dennoch können die unter EE zusammengefassten Maßnahmen in verschiedene Arten und Subarten unterteilt werden (Bloomsmith et al., 1991; Baumans, 1993, 2005; Young, 2003; Baumans und van Loo, 2013):

➤ *Soziales Enrichment*

*Direktes soziales Enrichment* (Social Contact Enrichment) kann durch den direkten Kontakt zu Artgenossen für sozial lebende Tierspezies sowie den positiven Kontakt mit dem Menschen in Form von Training, Handling und Sozialisierung hergestellt werden.

*Kontaktloses soziales Enrichment* (Social Noncontact Enrichment) beinhaltet den olfaktorischen, visuellen und auditorischen Kontakt zu Artgenossen oder dem Menschen, z.B. durch ein Gitter oder Netz kann eine Form des kontaktlosen Enrichments hergestellt werden.

➤ *Sensorisches Enrichment* kann beispielsweise durch visuelle Reize (Videos, Bilder, Fenster), auditorische Reize (Musik, Stimmen) oder andere Stimuli (olfaktorisch, taktil, gustatorisch) erreicht werden.

➤ *Ernährungsbezogenes Enrichment* beinhaltet alle Maßnahmen zum Fütterungsschema (Frequenz, Zeitplan, Darbietungsform, Verarbeitung) und der Futterart (neues versus bekanntes Futter, Vielfalt, Belohnungen, Futtersuche).

➤ *Beschäftigungsförderndes Enrichment* kann in Form *psychologischer Anreicherung* (Puzzle, Kontrolle über Umgebung) und *bewegungsfördernder Anreicherung* (Laufbänder/-räder, mechanische Apparaturen) angeboten werden.

➤ *Physisches Enrichment* beinhaltet die Varianz von Gehegegröße und Komplexität sowie das Anbieten von Ausgestaltungselementen, die entweder permanent (Gehegeaustattung, Gitter) oder temporär (Spielzeuge, Seile, Substrate) verfügbar sein können.

Durch den vielseitigen Charakter mancher EE-Maßnahmen ist es nicht immer möglich eine definierte Zuordnung zu einer Art des EE zu treffen, so können beispielsweise Rätselboxen,

die eine Futterbelohnung enthalten sowohl als *beschäftigungsförderndes Enrichment*, *ernährungsbezogenes Enrichment* und je nach Art der Futterbelohnung als *sensorisches Enrichment* oder generalisiert auf die Förderung des Problemlöseverhaltens als *kognitives Enrichment* bezeichnet werden (Clark, 2017).

#### **2.4.4 Ziele von Environmental Enrichment**

Auch wenn bisher kein einheitlicher Konsens über die genaue Definition von EE vorherrscht (Smith und Corrow, 2005), so lassen sich mögliche Ziele dieser Ausgestaltungsstrategie im Sinne des Tierwohls ableiten (Baumans, 2005). Eine Formulierung dieser Ziele ist für die Evaluierung ihrer Eignung zur Steigerung des Tierwohls essenziell.

Folgende gemeinsame Ziele von EE können formuliert werden:

- Förderung der Diversität und Häufigkeit spezies-spezifischer/ natürlicher Verhaltensweisen (Beaver, 1989; van de Weerd, 1996; Leach et al., 2000; Olsson und Dahlborn, 2002; Baumans, 2005)
- Reduktion des Auftretens abnormaler Verhaltensweisen/ Verhaltensstörungen (van de Weerd et al., 1994; van de Weerd, 1996; Leach et al., 2000; Olsson und Dahlborn, 2002; Baumans, 2005)
- Steigerung des physiologischen und psychischen Wohlbefindens (Chamove, 1989c; Newberry, 1995; Baumans und van Loo, 2013)

Die Erreichung der genannten Ziele führt durch das Anbieten eines breiteren positiven Aktivitätsspektrums zu einer Erhöhung der Haltungsqualität und ermöglicht den Tieren eine gewisse Kontrolle über ihre Umgebung (Newberry, 1995; Stauffacher, 1995). Dies erhöht den positiven Nutzen der Haltungsumgebung für die Tiere (Baumans, 2005) und kann die Fähigkeit der Tiere mit Herausforderungen umzugehen verbessern (Young, 2003).

Im Sinne der „Reduction“ (Russell und Burch, 1959) sollte EE ebenfalls die Variabilität der Versuchsdaten nicht erhöhen (Smith und Corrow, 2005), um die Anzahl der für wissenschaftliche Forschungszwecke benötigten Tiere so gering wie möglich zu bemessen.

## **2.5 Beurteilung der Eignung von Ausgestaltungselementen als Environmental Enrichment für Labormäuse**

Im Hinblick auf die Eignung von Ausgestaltungsstrategien oder -elementen für Versuchstiere, sind vor allem die zu erreichenden Ziele im Sinne des Tierwohls im Fokus. Hierbei sollte zunächst definiert werden, was unter einer Steigerung des Tierwohls bzw. Wohlbefindens gemeint ist. Das Farm Animal Welfare Council im Vereinigten Königreich Großbritannien und Nordirland definiert Wohlbefinden in Form von 5 „Freiheiten“ (Webster, 1995; Farm Animal Welfare Council, 2009): Freiheit (1) von Hunger und Durst, (2) von Unbehagen, (3) von Schmerz, Verletzung und Krankheit, (4) von Angst und Disstress und (5) die Freiheit zur Ausübung von normalem Verhalten. Definierte Ziele von EE geben an durch die (i) Förderung spezies-spezifischer/ natürlicher Verhaltensweisen, die (ii) Reduktion abnormaler Verhaltensweisen/-störungen und der (iii) Steigerung des physiologischen und psychologischen Wohlbefindens (Baumans, 2005), zu einer Steigerung des Tierwohls beizutragen. Die Evaluierung der Eignung von EE ist somit eng mit der Beurteilung von Tierwohl sog. „Animal Welfare“ geknüpft. Die komplexe Zusammensetzung von „Animal Welfare“ aus physiologischen, psychologischen und verhaltensbiologischen Parametern legt den Rückschluss nahe, dass eine umfassende Evaluation der Eignung von Ausgestaltungselementen zur Wohlbefindenssteigerung von Tieren in Gefangenschaft ebenfalls auf einer kombinierten Untersuchung mehrerer Parameter beruhen sollte (Dawkins, 2006). Dawkins (Dawkins, 1990) unterscheidet hierzu zwei wesentliche Bereiche zur Bewertung von Tierwohlmaßnahmen: (i) Untersuchung von Tiergesundheitsparametern und (ii) Befragung der Tiere selbst. Dies stellt sicher, dass zum einen EE Maßnahmen einerseits einen positiven Einfluss auf die Tiergesundheit haben und zum anderen den Tieren etwas gegeben wird, das sie „wollen“ (Dawkins, 2006) und ihre Wahrnehmung somit aktiv in den Beurteilungsprozess mit einbezogen wird (Habedank et al., 2018; Kahnau et al., 2020; Lewejohann et al., 2020).

### **2.5.1 Erhebung von tierwohlbezogenen Gesundheitsparametern unter Enrichmenteinsatz bei Labormäusen**

Traditionelle Messwerte für Tiergesundheit inkludieren Veränderungen des Normalverhaltens, Auftreten von abnormalem Verhalten, Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse und des Nebennierenrindensystems, andere Hormonänderungen, Körpertemperatur, Immunkompetenz, Plasma Eisenspiegel und Körpergewicht (Manser, 1992; Mason et al., 1998; Olsson und Dahlborn, 2002). Neuere Ansätze zur Bewertung von Tierwohl inkludieren zunehmend ebenfalls den emotionalen Status der Tiere (Dawkins, 1993; Fraser, 1996; Mendl und Paul, 2004; Yeates und Main, 2008; Lewejohann et al., 2020), den

„affective state“, als vielschichtiges Ergebnis des Zusammenspiels aus neuronalen, physiologischen, verhaltensbezogenen, kognitiven und subjektiven Aspekten (Désiré et al., 2002; Mellor, 2011; Špinka, 2012). Der „Affektive State“ kann sowohl positiv beeinflusst werden, als auch negativ (Mellor, 2011; Špinka, 2012; Jirkof et al., 2019). Ziel von Tierwohlmaßnahmen, wie dem Einsatz von Ausgestaltungselementen als Enrichment-Maßnahme, ist das Erreichen eines möglichst positiven emotionalen Status der Tiere. Hierbei ist die Beurteilung des Verhaltens von zentraler Bedeutung, da es als Ausdruck komplexer physiologischer Prozesse einen Gesamtstatus des Wohlbefindens des Tieres darstellt (Olsson und Dahlborn, 2002) und somit bei der Interpretation uneindeutiger physiologischer Ergebnisse hilfreich sein kann (Dawkins, 1998). Die Förderung der physischen und psychischen Gesundheit stellt somit eine wichtige Zielgröße in der Bewertung von Enrichment-Maßnahmen (Newberry, 1995) dar. Zahlreiche Studien können bereits positive Effekte auf die Tiergesundheit von Versuchstieren beim Einsatz von Ausgestaltungselementen als Enrichment-Maßnahme (Olsson und Dahlborn, 2002) feststellen. Für die meistverwendete Versuchstierart Maus wurden folgende Parameter des Tierwohls gehäuft erhoben, dabei ist zu beachten, dass der Grad der Anreicherung der Umgebung durch EE Elemente (Bailoo et al., 2018) Einfluss auf die erhobenen Parameter hat.

### **Spezies-spezifische Verhaltensweisen**

Durch direkte oder videogestützte vergleichende Beobachtung des spontanen Heimatkäfigverhaltens von Mäusen in einer angereicherten Haltungsumgebung gegenüber konventioneller Haltung kann der Einfluss von Ausgestaltungselementen auf die Ausprägung normaler Verhaltensweisen sowie die Interaktion mit der Umgebung und den Artgenossen evaluiert werden. So fördern beispielsweise einige Ausgestaltungselemente die Interaktion und Aktivität von Mäusen mit ihrer Umwelt (Chamove, 1989a; Marques und Olsson, 2007; Bailoo et al., 2018), regen das Erkundungsverhalten (Leach et al., 2000; Marques und Olsson, 2007; Acklin und Gault, 2015) sowie das Nestbauverhalten an (van de Weerd et al., 1997a). Der Einfluss auf das Aggressionsverhalten gegenüber Käfiggenossen wurden zur Evaluation von EE ebenfalls herangezogen, mit ambivalenten Ergebnissen (Haemisch et al., 1994; van Loo et al., 2001; Tallent et al., 2018a, 2018b).

Durch die Nutzung spezifischer Verhaltenstests außerhalb des Heimatkäfigs, wie beispielsweise dem Open- Field Test, bei dem die Tiere in eine helle begrenzte Freifläche gesetzt werden, kann das Erkundungsverhalten und die Aktivität von Mäusen in einer neuen Umgebung bestimmt werden. Auch hier zeigte sich, dass eine komplexere Käfigausgestaltung das Erkundungsverhalten und die Aktivität bei Mäusen fördern kann (Chourbaji et al., 2005).



### **Abnormale Verhaltensweisen**

Ebenfalls durch Auswertung des Heimatkäfigverhaltens kann der Einfluss von Ausgestaltungselementen als EE auf die Häufigkeit abnormaler Verhaltensweisen bei Mäusen evaluiert werden. Zu den häufig vorkommenden abnormalen Verhaltensweisen bei in Gefangenschaft lebenden Mäusen zählen sogenannte Stereotypien oder ARBs (abnormal repetitive behavior), deren exzessiver sich stetig wiederholender gleicher Bewegung jegliche Funktion zu fehlen scheint und die mit einem verminderten Tierwohl in Verbindung stehen (Mason, 1991; Garner, 2005). Durch den Einsatz von Ausgestaltungselementen als EE konnten Stereotypien bei Mäusen, wie das exzessive Benagen von Gitterstäben (Würbel et al., 1998; Leach et al., 2000; Bailoo et al., 2018), das im Kreis laufen oder im Kreis klettern sowie das Rückwärtsspringen reduziert oder sogar verhindert werden (Gross et al., 2011a; Jones et al., 2011; Fureix et al., 2016; Bailoo et al., 2018). Auch Barbering, eine Form abnormalen Verhaltens, bei dem die Tiere exzessives Putzverhalten zeigen, tritt unter dem Einsatz von EE Elementen weniger häufig auf und kann daher ebenfalls als Evaluierungsparameter der Haltungsbedingung hinzugezogen werden (Bechard et al., 2011). Ebenso rückt inaktives Verhalten, welches mit einem erhöhten depressiven Verhalten bei Mäusen in Verbindung steht (Fureix et al., 2016) als Tierwohlparameter zur Beurteilung einer angereicherten Haltung in den Fokus. Untersuchungen konnten zeigen, dass inaktives Verhalten durch den Einsatz von Ausgestaltungselementen als EE reduziert werden kann (Marques und Olsson, 2007; Fureix et al., 2016).

### **Stress, Angst und Emotionalität**

Parameter, die mit Stress und Angst bei Mäusen assoziiert werden, wurden ebenfalls im Zusammenhang mit EE untersucht. So lassen sich Stresslevel durch die Bestimmung des Stress-Hormons Kortikosteron und seiner Metabolite in Blut (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Oatess et al., 2020), Harn (van de Weerd et al., 1997a; van Loo et al., 2001) und Kot (Acklin und Gault, 2015; Gjendal et al., 2017; Bailoo et al., 2018) erheben und Blutzuckerwerte (Resasco et al., 2021) von Mäusen zur Stressevaluation bestimmen; sowie Gewichte von Organen, die Stresshormone produzieren, erheben (van de Weerd et al., 1997a; van Loo et al., 2001; Bailoo et al., 2018; Oatess et al., 2020). Auswirkungen von EE auf die Ausprägung von Angstverhalten lassen sich in spezifischen Verhaltenstests, wie dem Elevated Plus Maze oder Elevated Zero Maze, in dem die Mäuse die Wahl haben, offene oder geschützte Arme eines Kreuzes oder Rings zu betreten, oder dem Open-Field Versuch bestimmen (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Gross et al., 2011b; Bailoo et al., 2018; Rabadán et al., 2019; Oatess et

al., 2020). Chourbaji et al. (2005) untersuchten die Emotionalität von Mäusen bezüglich erlernter Hilflosigkeit und depressivem Verhalten in spezifischen Tests. Der Einsatz von EE bei Mäusen bewirkte zumeist eine Verringerung von der mit Stress, Angst und negativer Emotionalität assoziierten Parameter (van de Weerd et al., 1997a; van Loo et al., 2001; Benaroya-Milshtein et al., 2004; Chourbaji et al., 2005; Acklin und Gault, 2015; Bailoo et al., 2018; Rabadán et al., 2019; Resasco et al., 2021) oder beeinflusste Angst- und Stressparameter nicht (Oatess et al., 2020).

### **Lernverhalten, Gedächtnis und neuronale Struktur**

Auch Parameter für Gedächtnisleistungen und die Auswirkung auf neuronale Strukturen wurden in vorangegangenen Studien zur Beurteilung der Eignung von EE für Mäuse herangezogen. So wurden histologisch die Bildung und der Erhalt von Nervenzellen in Mäusen untersucht (Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999; Hüttenrauch et al., 2016; Oatess et al., 2020; Resasco et al., 2021) und in spezifischen Lernversuchen das Gedächtnis und das Lernverhalten von Mäusen nach angereicherter Haltung beschrieben (van Praag et al., 2005; Hüttenrauch et al., 2016; van der Geest et al., 2021). Weitestgehend konnte durch EE die Neuroplastizität, Lernen und Gedächtnis bei Mäusen positiv beeinflusst werden (van Praag et al., 2000; Würbel, 2001; Mieske et al., 2022).

### **Weitere physiologische Parameter**

Zur Beurteilung von EE für Mäuse wurden zu den bereits genannten Hauptfaktoren eine Reihe weiterer Parameter erhoben, die mit der Evaluation von Tierwohl in Verbindung stehen und durch den Einsatz von EE positiv beeinflusst werden konnten. Zu Ihnen gehören u.a. die Bestimmung des Körpergewichts und -zusammensetzung (Chamove, 1989a; Tsai et al., 2002; Slater und Cao, 2015), die Menge an aufgenommenen Futter und Wasser (Chamove, 1989a), die Funktionalität des Immunsystems (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Slater und Cao, 2015), die Zusammensetzung des Bluts (Tsai et al., 2002), die motorischen Fähigkeiten (Mieske et al., 2022; Shi et al., 2023) und die Sterblichkeitsrate der Nachkommen (Leidinger et al., 2019). Cait et al. (2022) konnten in ihrer Metaanalyse bereits publizierter Fachartikel herausstellen, dass durch den Einsatz von EE die Krankheitsanfälligkeit und Sterblichkeit von Mäusen und Ratten in Tierversuchen gesenkt werden kann. So ist die Ausprägung der Parameter, die zur Evaluierung des Tierwohls im Zusammenhang mit EE erhoben werden können, sehr vielfältig.

## **2.5.2 Präferenztests: Methoden zur Beurteilung von Environmental Enrichment aus Sicht der Maus**

Die Beurteilung, ob eine Maßnahme, so auch EE Elemente, wirklich zu einer Steigerung des Tierwohls führt, sollte sich nicht ausschließlich auf physiologische und verhaltensbiologische Messparametern erstrecken. Die Wahrnehmung aus Sicht der Tiere muss ebenfalls zur Evaluation von EE einbezogen werden (Dawkins, 1990; Habedank et al., 2018). Die Befragung der Tiere selbst gestaltet sich allerdings weitaus schwieriger als die Erhebung physiologischer Messparameter. Um die Einschätzung der Tiere selbst zu ermitteln, besteht einerseits die Möglichkeit, die Tiere indirekt in sogenannten Wahlversuchen (Kirkden und Pajor, 2006), synonym Präferenztests über die verbrachte Zeit mit unterschiedlichen Ressourcen oder Elementen, zur Präferenz bezüglich der Haltungsumgebung zu befragen (Dawkins, 1988; Lewejohann und Sachser, 2000; Olsson und Dahlborn, 2002; Habedank et al., 2018) und andererseits durch Analyse des Nutzungsverhaltens der dargebotenen EE Maßnahmen Präferenzen der Tiere zu ihrer Haltungsumgebung zu evaluieren (van Loo et al., 2005; Soerensen et al., 2009). Zu den für Mäuse genutzten Methoden zur Präferenzanalyse gehören der T-Maze Test, der Conditioned Place Preference Test, heimatkäfigbasierte Wahlversuche und die Analyse des Nutzungsverhaltens speziell für EE Elemente. Die Beurteilung der Stärke einer Präferenz für eine Ressource kann durch sogenannte Consumer Demand Tests beurteilt werden (Kirkden und Pajor, 2006; Kahnau et al., 2020). Nachfolgend wird auf die genannten Methoden und deren Vor- sowie Nachteile bei der Evaluation von EE für Mäuse eingegangen.

### **T-Maze Test**

Ein simpler Testaufbau, um die Wahl von Mäusen zwischen zwei Gütern zu ermitteln, ist der T-Maze Test (je nach Anordnung der Labyrintharme, auch Y-Maze Test). Den Tieren wird hierbei in einem T- förmigen Labyrinth die Wahl zwischen 2 Armen, die unterschiedliche Güter enthalten, gegeben. Durch die Bestimmung der Häufigkeit der Wahl eines der beiden Arme in mehreren Versuchsdurchläufen (diskrete Trials) oder der Aufenthaltsdauer des Tieres im rechten und linken Arm des Labyrinths über eine definierte Zeitdauer (kontinuierliche Trials) wird die Präferenz für die dargebotenen Güter ermittelt. Der Arm, der am häufigsten gewählt wurde oder am längsten besucht wurde, wird als von den Tieren präferiert angesehen oder am wenigsten gemieden im Falle, dass aversive Stimuli verglichen werden (Kirkden und Pajor, 2006; Habedank et al., 2018). So wurden Mäuse beispielsweise zu Präferenzen bezüglich sozialem Kontakt (Moy et al., 2004; Schellino et al., 2016), Gerüchen (Yano et al., 2012) oder Geräuschen (Asaba et al., 2015) in Studien befragt. Im T-Maze Test kann zusätzlich das spontan auftretende Alternieren zwischen den beiden Armen des Mazes zur Untersuchung

des räumlichen Arbeitsgedächtnisses von Mäusen genutzt werden (Acklin und Gault, 2015; d'Isa et al., 2021). Für die Durchführung des T-Maze Tests zur Präferenzermittlung müssen die Tiere allerdings einzeln außerhalb ihres Heimatkäfigs getestet und häufig angefasst (sog. gehandelt) werden, was für Mäuse selbst als stressfördernd wahrgenommen wird (Hurst und West, 2010). Versuchsergebnisse werden durch das häufige Eingreifen des Versuchsdurchführenden ebenfalls stark beeinflusst (Deacon, 2006b). Weiterhin kann der T-Maze Test durch die genannten Limitationen in der Durchführung nur über einen kurzen Zeitraum durchgeführt werden, da die Tiere sich nicht in ihrem Heimatkäfig mit Zugang zu Futter, Wasser und einem Rastplatz befinden. So wurde im T-Maze Test zwar beispielsweise die Präferenz von Mäusen bezüglich verschiedenen Einstreumaterials verglichen (Moehring et al., 2016), aber die bereits genannten Limitationen in der Durchführung und die Schwierigkeit der Interpretation von T-Maze Tests (Deacon und Rawlins, 2006; Habedank et al., 2020) förderten bisher nicht die Anwendung zur Ermittlung von Präferenzen zur Haltungsumgebung bei Mäusen.

### **Conditioned Place Preference (CPP)**

Der Conditioned Place Preference Test beruht auf dem Prinzip der pawlowschen Konditionierung und kann zur Untersuchung motivationaler Auswirkungen von Objekten oder Erfahrungen oder aversiver Stimuli (Conditioned Place Aversion/CPA) bei Mäusen genutzt werden (Tzschentke, 2007; Prus et al., 2009). In der sogenannten Konditionierungsphase wird dem Tier ein unkonditionierter Stimulus in einem Bereich des Testapparats präsentiert. Durch wiederholte Präsentation des unkonditionierten Stimulus in diesem Bereich des Testapparats lernt das Tier die unmittelbare Testumgebung mit dem präsentierten Stimulus zu assoziieren. In einem zweiten Bereich des Testapparats wird dem Tier ein zweiter unkonditionierter Stimulus dargeboten und mit der zweiten unmittelbaren Testumgebung assoziiert. Ein Testapparat kann aus zwei oder mehr unterschiedlich gestalteten (Untergrund, Wandfarbe, Wandmuster) Bereichen bestehen, zwischen denen die Tiere unterscheiden können. Vor Beginn der Konditionierung sollte sichergestellt werden, dass keine Präferenz für einen der Bereiche des Testapparats besteht (Prus et al., 2009). Je nach Motivationseigenschaft des unkonditionierten Stimulus vermeidet (aversiver Stimulus) oder sucht das Tier vermehrt (belohnender Stimulus) den assoziierten Bereich auf. In der nachfolgenden Präferenztestphase kann das Tier zwischen beiden Bereichen des Testapparats frei wählen und die Aufenthaltszeit in jedem Bereich des Testapparats wird bestimmt. Der Bereich des Testapparats und mit dieser Umgebung konditionierte Stimulus wird als favorisiert oder weniger gemieden (aversive Stimuli) gesehen (Habedank et al., 2018). Der CPP-Test wird

häufig zur Bestimmung aversiver oder addiktiver Effekte von Pharmazeutika für Mäuse und Ratten genutzt (Prus et al., 2009; Wang et al., 2014). Es können allerdings auch weitere Stimuli, wie Futtersorten (Takeda et al., 2001) oder verschiedene Gerüche (Fitchett et al., 2006) anhand der CPP getestet werden. Bei Mäusen und Ratten wurde der CPP-Test vornehmlich zur Beurteilung des Effekts einer angereicherten Haltung auf das Suchtverhalten untersucht. So kann die Haltung in einer mit EE Elementen angereicherten Umgebung zur Reduktion bis hin zur Auslöschung von Suchtverhalten von Mäusen führen (Solinas et al., 2008, 2009). Studien zur vergleichenden Beurteilung von EE in Form einzelner Ausgestaltungselemente fehlen allerdings. Dies mag nicht zuletzt dem Fakt geschuldet sein, dass der CPP-Test durch die Konditionierung von Einzeltieren sehr aufwendig ist und die Tiere oft gehandelt und somit gestresst werden, was sich wiederum negativ auf die Versuchsdaten auswirken kann (Deacon, 2006b; Prus et al., 2009).

### **Heimatkäfigbasierte Wahlversuche**

In heimatkäfigbasierten Wahlversuchen für Mäuse, die meist aus zwei (Sherwin, 1996) oder mehr (Blom et al., 1992) mit Röhren oder Tunneln zusammengeschalteten Heimatkäfigen mit (Kawakami et al., 2007; Godbey et al., 2011) oder ohne (Veronez et al., 2020) zentralem Käfig bestehen, kann die Präferenz für eine Haltungsumgebung über die Aufenthaltsdauer in den einzelnen Heimatkäfigen ermittelt werden. Die Haltungsumgebung, in der die Mäuse den überwiegenden Teil der Testzeit verbringen, wird als favorisiert angesehen. Die Kalkulation der Aufenthaltsdauern kann über Videoauswertung (Godbey et al., 2011) oder automatisiert über die Detektion der Mäuse über Infrarot- Lichtschranken (Blom et al., 1992) oder RFID Transponder (Kirchner et al., 2012; Habedank et al., 2021b) erfolgen. Mäuse können so entweder einzeln (Blom et al., 1996) oder in ihrem sozialen Gruppenverband (Kirchner et al., 2012) zu Präferenzen befragt werden (Gaskill et al., 2009). Die Sozialstruktur muss bei der Interpretation von Daten aus in Gruppe getesteten Tieren berücksichtigt werden. Dadurch, dass die Mäuse in ihrem gewohnten Heimatkäfig mit Zugang zu Futter, Wasser und einer Rückzugsmöglichkeit verbleiben, kann die Testdauer für die verglichenen Haltungsumgebungen bis zu einem vollen Tageszyklus oder länger ausgedehnt werden, wobei die Auswertung je nach Fragestellung der aktiven oder inaktiven Zeit der Tiere erfolgen kann (Lewejohann und Sachser, 2000; Habedank et al., 2018). Ein vermehrtes Handling oder Training der Tiere entfällt bei heimatkäfigbasierten Wahlversuchen und die Tiere können „freiwillig“ am Versuch teilnehmen. Hierdurch kann der negative Einfluss dieser Faktoren auf die gewonnenen Versuchsergebnisse gemindert werden (Lewejohann und Sachser, 2000). Mäuse wurden mittels heimatkäfigbasierten Wahlversuchen zu ihrer Haltungsumgebung

beispielsweise zum Einstreumaterial (Blom et al., 1996; Ago, A; Gonda, 2002; Kirchner et al., 2012) und zur Einstreutiefe (Freymann et al., 2015), zur Art des Nestbaumaterials (van de Weerd et al., 1996), zur Ventilation (Baumans et al., 2002), zur Temperatur (Gaskill et al., 2009) und zu Käfigwechselintervallen (Godbey et al., 2011) befragt. Bisher sind allerdings noch nicht alle Fragen zur Wahl von Mäusen bezüglich ihrer Haltungsumgebung z.B. in Bezug auf das Makro- und Mikroklima untersucht worden. Bezüglich der Ausgestaltung des Käfigs ist zwar bekannt, dass Mäuse einen angereicherten gegenüber einem kargerem Käfig bevorzugen (van de Weerd et al., 1997b; Lewejohann und Sachser, 2000), zur Präferenz einzelner Ausgestaltungselemente, wie Unterschlüpfen, Klettergegenständen, Futterrätseln und strukturierenden Elementen, ist allerdings noch wenig bekannt. Einzelne Studien evaluierten Präferenzen zu einzelnen Ausgestaltungselementen in Heimatkäfigwahlversuchen bei Mäusen. So ermittelten van Loo et al., dass Mäuse Papierhäuser gegenüber einem dreieckigem roten Plastikhaus bevorzugen (van Loo et al., 2005), Sherwin et al. (1996) fanden heraus, dass Sägespäne von männlichen Mäusen gegenüber Tunneln zum Schlafen bevorzugt werden und Spiegel von einzeln gehaltenen Mäusen als Käfigausgestaltung nicht bevorzugt werden (Sherwin, 2004). Weitere Präferenzuntersuchungen zu Käfigausgestaltungen für Mäuse sind für die Wahl tiergerechter Ausgestaltungselemente zur Steigerung des Wohls von Versuchstieren essenziell.

### **Nutzungsverhalten in Heimatkäfigbeobachtungen**

Ebenfalls zur Beurteilung der Eignung von Ausgestaltungselementen für Mäuse kann das Nutzungsverhalten einzelner Elemente im Heimatkäfig durch direkte oder videobasierte Überwachung ausgewertet werden. Hierbei ist bei gut kenntlicher Markierung der Tiere ebenfalls eine Untersuchung in der sozialen Gruppe oder auch einzeln im vertrauten Heimatkäfig möglich. Der Einfluss des Experimentators auf das Nutzungsverhalten kann bei videobasierter Beobachtung gegenüber der direkten Beobachtung (Kirkden und Pajor, 2006) reduziert werden. So konnten Banjanin und Mrosovsky (2000) über Ermittlung der Radumdrehungszahl als Parameter für das Nutzungsverhalten feststellen, dass Mäuse Laufräder mit kleinem Durchmesser gegenüber standardgroßen Laufrädern bevorzugen. Sherwin et al. konnten in direkten Beobachtungen ermitteln, dass männliche Mäuse opaque gegenüber transparenten Tunneln bevorzugen (Sherwin, 1996). Coviello-Mclaughlin und Starr (1997) fanden durch Ermittlung der Interaktionen mit den Testobjekten heraus, dass Mäuse Baumwollnestmaterial und Pappröhren gegenüber Murmeln, Nestboxen, Legos®, Tinker Toys® und Holzblöcken vorziehen und Marques und Olsson (2007) konnten durch Auswertung von Videobeobachtungen zeigen, dass rote Nestboxen zum Schlafen von

C57BL/6J Mäusen weniger bevorzugt werden als Nestmaterial. So genannte Cage Climber (Vogt et al., 2020), Hanfseile (Gjendal et al., 2017) und käfigstrukturierende Inlays (Leach et al., 2000) sowie weitere Ausgestaltungselemente (Bailoo et al., 2018) wurden zur Ausübung spezies-spezifischen Verhaltens in Videoauswertungen von Mäusen frequent genutzt. Durch Untersuchung des Heimatkäfigverhaltens konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Lokalisation der Nestbox im Käfig (Kostomitsopoulos et al., 2007) und der Mausstamm (Soerensen et al., 2009) Einfluss auf das Nutzungsverhalten der untersuchten Nestboxen bei Mäusen hat. Eine systematische Präferenzuntersuchung verschiedenster Struktur-, Kletter-, Unterschlupf- und Futtersuchelemente durch das Nutzungsverhalten von Mäusen erfolgte bisher noch nicht. Ein Grund hierfür kann sein, dass die Auswertung von spezifischem Verhalten bzw. Nutzungsverhalten vornehmlich durch zeitaufwändige manuelle Videoanalysen erfolgen muss und noch nicht zuverlässig automatisiert durchgeführt werden kann.

### **Consumer Demand Test**

Um den Wert einer Ressource zu bestimmen, werden sogenannte Consumer Demand Tests eingesetzt. Hierbei wird durch das Einführen eines Preises, den das Tier zum Zugang zu einer Ressource bereit ist zu zahlen, die Wertigkeit und die Motivation für den Zugang zur Ressource ermittelt (Kirkden und Pajor, 2006; Kahnau et al., 2020). So können Mäuse und Ratten beispielsweise trainiert werden, einen Hebel zu drücken (Roper, 1973; Lewejohann und Sachser, 2000), über einen unangenehmen Untergrund zu laufen (Van De Weerd et al., 1998) oder eine andere Ressource aufzugeben (Fraser und Nicol, 2018), um zu einer favorisierten Ressource zu gelangen. Im Anschluss kann die Bestimmung der Stärke dieser Präferenz durch Erhöhung der Kosten (z.B. Erhöhung der benötigten Hebeldrücke) im so genannten „Consumer Demand“ Test, herangezogen werden (Dawkins, 1988; Sherwin und Nicol, 1997; Lewejohann und Sachser, 2000; Olsson und Dahlborn, 2002), um getestete Ressourcen in ihrer Wertigkeit zu vergleichen und einzuordnen. Ressourcen, für die ein Tier bereit ist zu arbeiten, können als förderlich für das Tierwohl angesehen werden (Fraser und Nicol, 2018). So arbeiten Mäuse beispielsweise für den Zugang zu Enrichment (Lewejohann und Sachser, 2000), mehr Platz (Sherwin und Nicol, 1997), Nestmaterial (Van De Weerd et al., 1998) und Futter (Atalayer und Rowland, 2011).

## 2.6 Ziel der Untersuchung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Anreicherung der direkten Haltungsumgebung mittels EE Elementen über den momentanen Handlungsstandard (Einstreu, Nestmaterial, Haus, Futter, Wasser) hinaus mit einem positiven Einfluss auf das Tierwohl von Mäusen in der Versuchstierhaltung verbunden ist. So kann den Mäusen durch das Anbieten einer komplexeren Haltungsumgebung, die sie in einem gewissen Grad verändern und somit kontrollieren können, die Möglichkeit gegeben werden ein breiteres Spektrum spezies-spezifischen Verhaltens, wie bereits im Tierschutzrecht (TschVersV i.V.m. RL 2010/63/EU) gefordert, auszuüben. Die Reduktion abnormaler Verhaltensweisen, Reduktion negativer Emotionalität und die Förderung von Motorik und Gedächtnisleistung sowie positiven Einfluss auf weitere tierwohl-assoziierte Parameter deuten auf einen tiefgreifenden förderlichen Einfluss von EE Elementen, respektive negativen Einfluss aktueller Handlungsstandards für Versuchsmäuse hin. Trotz dessen ist bisher wenig über die Wahrnehmung von EE Elementen aus Sicht der Mäuse bekannt, die ein wichtiger Baustein in der Gesamtbewertung von EE Elementen als tierwohlfördernde Maßnahme darstellt. In der vorliegenden Arbeit wird EE in Form von käfig-strukturierenden Elementen (Strukturelemente), Futtersuchelementen (Futterrätsel), verschiedenen Häusern und einer Laufscheibe auf ihre Eignung als tierwohlfördernde Maßnahme im Sinne des Refinements für weibliche C57BL/6J Mäuse untersucht. Dabei werden (i) tierwohl-assoziierte Parameter, wie die Ausprägung spezies-spezifischer Verhaltensweisen und die Reduktion abnormaler Verhaltensweisen, (ii) das Nutzungsverhalten der untersuchten EE Elemente als auch (iii) vergleichende heimatkäfigbasierte automatisierte Wahlversuche zur Beurteilung herangezogen. Die Sicht der Tiere soll so in den Beurteilungsprozess der EE Elemente aktiv mit einbezogen werden, um die bisher vorherrschende anthropozentrische Entscheidung der Darbietung von EE zu verbessern und so die Implementation von EE Elementen für Mäuse in die Versuchstierhaltung zu fördern.



## 3 Publikationen

### 3.1 Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice

**Autoren:** Ute Hobbiesiefken<sup>1</sup>, Paul Mieske<sup>1</sup>, Lars Lewejohann<sup>1,2</sup>, Kai Diederich<sup>1</sup>

<sup>1</sup>German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), German Center for the Protection of Laboratory Animals (Bf3R), Berlin, Germany

<sup>2</sup>Institute of Animal Welfare, Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

**Erhalten:** August 10, 2021; **Akzeptiert:** Dezember 10, 2021; **Publiziert:** Dezember 23, 2021

**Journal:** PlosOne

**URL:** <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0261876>

**DOI:** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876>

#### Beitrag der Autoren

<b>Ute Hobbiesiefken</b>	Datenerhebung, Formale Analyse, Untersuchung, Methodik, Visualisierung, Schreiben - originaler Entwurf
<b>Paul Mieske</b>	Review & Editieren
<b>Lars Lewejohann</b>	Konzeptentwicklung, Fördermittelakquise, Projektadministration, Supervision, Review & Editieren
<b>Kai Diederich</b>	Konzeptentwicklung, Projektmanagement, Supervision, Review & Editieren

This is an open-access article distributed under the terms of the

[Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

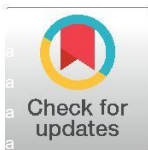
## RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice

Ute Hobbiesiefken<sup>1</sup>, Paul Mieske<sup>1</sup>, Lars Lewejohann<sup>1,2</sup>, Kai Diederich<sup>1\*</sup>

**1** German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), German Center for the Protection of Laboratory Animals (Bf3R), Berlin, Germany, **2** Institute of Animal Welfare, Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

\* [Kai.Diederich@bfr.bund.de](mailto:Kai.Diederich@bfr.bund.de)



## Abstract

Numerous studies ascertained positive effects of enriched environments on the well-being of laboratory animals including behavioral, physiological and neurochemical parameters. Conversely, such conclusions imply impaired animal welfare and health in barren husbandry conditions. Moreover, inappropriate housing of laboratory animals may deteriorate the quality of scientific data. Recommendations for housing laboratory animals stipulate that cages should be enriched to mitigate adverse effects of barren housing. In this context, it is not only unclear what exactly is meant by enrichment, but also how the animals themselves interact with the various items on offer. Focal animal observation of female C57BL/6J mice either housed in conventional (CON) or enriched (ENR) conditions served to analyze the impact of enriching housing on welfare related behavior patterns including stereotypical, maintenance, active social, and inactive behaviors. CON conditions resembled current usual housing of laboratory mice, whereas ENR mice received varying enrichment items including foraging, housing and structural elements, and a running disc. Active and inactive use of these elements was quantitatively assessed. CON mice showed significantly more inactive and stereotypical behavior than ENR mice. ENR mice frequently engaged with all enrichment elements, whereby riddles to obtain food reward and the running disc preferably served for active interactions. Offering a second level resulted in high active and inactive interactions. Structural elements fixed at the cagetop were least attractive for the mice. Overall, the presented data underline the positive welfare benefits of enrichment and that mice clearly differentiate between distinct enrichment types, demonstrating that the perspective of the animals themselves should also be taken into account when specifying laboratory housing conditions. This is particularly important, as the ensuring of animal welfare is an essential prerequisite for reliable, reproducible, and scientifically meaningful results.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Hobbiesiefken U, Mieske P, Lewejohann L, Diederich K (2021) Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice. PLoS ONE 16(12): e0261876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876>

**Editor:** Igor Branchi, Istituto Superiore Di Sanita, ITALY

**Received:** August 10, 2021

**Accepted:** December 10, 2021

**Published:** December 23, 2021

**Copyright:** © 2021 Hobbiesiefken et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

**Funding:** This study was funded by the Federal Institute for Risk Assessment, Max-Dohrn-Straße 8-10, 10589 Berlin, Germany. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

## Introduction

Refinement, i.e., reducing pain and distress for those animals in animal based research that cannot be replaced or reduced in numbers, is one of the major goals of the 3R principle of Russell and Burch [1]. Over the recent years, the term "refinement" was broadened to methods that enhance animal welfare [2]. Therefore, when using the term "refinement", most scientists are essentially talking about improving the experimental as well as the living conditions of laboratory animals in a way that is aimed at improving animal welfare. Our aim is to go beyond fulfilling the measures formulated as the five freedoms [3] to providing the necessities for a life worth living [4]. It is of note that current definitions of animal welfare emphasize that the status of the subjectively perceived quality of life of an individual is a core feature of animal welfare [5]. Thus, refinement should not only look good to us, but must also be perceived as an improvement by the animals themselves, thus creating a bridge between observed events such as behavior and physiological parameters and subjective perception from the animal's point of view [6].

Furthermore, this definition of animal welfare emphasizes that welfare is measured on more than one scale. This means that different welfare indicators interact and should be considered for an overall view. For example, the compromised welfare of a slightly injured animal can be enhanced by providing good feeding condition and sociopositive interactions at the same time. Therefore, also refined housing has a compensatory potential for other treatments that may not be as easily refined in animal studies.

Recent advances in laboratory animal science and modern legislation support the holistic refinement approach. For example, the EU Directive 2010/63 stipulates that animals should be provided with 'space of sufficient complexity to allow expression of a wide range of normal behavior', aiming to overcome behavioral deprivation caused by impoverished housing conditions [7]. Such formulations are vague and thus tend to describe the minimum standard. This standard usually implies providing laboratory mice with bedding material, nesting material and a shelter. As a side note, nesting and shelter are additions that 20 years ago were themselves described as enrichment compared to cages filled only with bedding [8]. For the purposes of this paper, we like to assume that shelter and nesting materials are now indeed considered to be the usual.

In fact, historically, any additions intended to raise the complexity of impoverished conventional housing has been considered as enrichment. By this "enrichment" has become an umbrella term for a variety of shelters, bedding and nesting materials, and various objects, or any combination thereof, and lacks a general theoretical framework of what should be considered enrichment [9].

Despite the ambiguity that therefore remains to be considered for the terminology, one can essentially find a number of positive effects on the well-being of laboratory mice through any refinement of the husbandry conditions. Regarding the influence on behavior, enriching the environment of mice led to a decreased expression of abnormal repetitive behaviors, i.e., stereotypies [10–13], is known to decrease behavioral measures of anxiety [10, 14, 15] and reduced the development of a depressive-like phenotype in mice [16]. Furthermore, enriching the housing conditions of mice led to improved memory function and learning abilities [17, 18] accompanied by an increase of hippocampal neurogenesis [15, 18, 19]. Growth and stress physiology [10, 20] was as well seen to be positively influenced in mice in enriched housing conditions compared to conventional housing conditions. Access to enrichment also mitigated stress responses and supported natural killer cell activity in mice as important well-being parameters [14]. Studies with rats have also shown a major influence of housing conditions on the affective state and cognitive bias, thus also the emotional well-being of laboratory animals

[21]. In the context of the reproducibility crisis, it is worth noting that concerns that enrichment in general increases the variation in experimental results have not been confirmed [10, 20, 22–25].

Summarizing the current literature, it can be taken as a fact that providing a more diverse living environment has a major impact on the well-being of laboratory animals. Indeed, most current recommendations for housing laboratory mice include the advice to provide environmental enrichment [5, 20, 26]. However, this has not yet led to a widespread implementation of any of these measures. Moreover, since various types of enrichment have been used over the recent years, it is not surprising that there is still no consensus on the most suitable types of enrichment for enhancing animal welfare, as they are based more on anthropomorphic feelings and convenience [9].

We therefore urgently need a strategy for an appropriate assessment of cage design. Enrichment can already be seen as an improvement with regard to the question of animal health, yet the second question demanded by Dawkins [27], what the animals themselves want in order to be able to see it as a real improvement in animal welfare, has so far remained largely unanswered.

In order to evaluate the suitability of enrichment items for enhancing animal welfare of laboratory animals, different approaches are feasible. Of special importance are animal centric strategies [28] to investigate how different items are perceived by the animals themselves [5, 29, 30]. A very promising approach is to "ask" the animals by performing home cage-based preference studies [31]. However, knowing that mice prefer an enriched environment to more barren conditions alone is not revealing the perceived importance of specific enrichment items. To do this, it is necessary to conduct a series of tests comparing preferences for different items, as we have accomplished in an article that is published in parallel [32]. In order to find out how the animals actually interact with the enrichment items, detailed direct behavioral observations are necessary. This is, however, laborious and time consuming and so far only little data has been published in that regard [22]. Here we observed a wide range of home cage behavior with and without enrichment items being present. Mice living in conventional laboratory housing conditions (bedding and nesting material plus a shelter) served as a control group. Different types of enrichment are likely to induce different ways of how the animals can interact. For example, a running wheel is essentially different from a plastic tube or a wooden angle although all items fall under the umbrella term enrichment. To address this lack of specificity we suggest a categorization according to the primary use to distinguish between different classes/categories of enrichment, namely cage structuring and climbing objects (structural enrichment), puzzles for active foraging engagement (foraging enrichment) and alternative shelters (housing enrichment). In direct observations, we analyzed the interaction with these items and thereby could assess how the animals themselves might perceive the enrichment.

## Material and methods

### Ethics statement

All experiments were approved by the Berlin state authority, Landesamt für Gesundheit und Soziales, under license No. G 0069/18 and were in accordance with the German Animal Protection Law (TierSchG, TierSchVersV). The study was preregistered in the Animal Study Registry (ASR, DOI [10.17590/asr.0000062](https://doi.org/10.17590/asr.0000062)).

### Animals and housing condition

The 24 female C57BL/6J mice used in this study were obtained from a commercial breeder (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) at an average age of 8 weeks. Mice were

randomly allocated to groups of four animals in Makrolon type III cages (L x W x H: 598 x 380 x 200 mm, Tecniplast, Italy) by a researcher not involved in the experiment; animals were alternately assigned to the groups (enriched and conventional) to avoid bias. Conventional housing contained aspen bedding material (Polar Granulate 2–3 MM, Altromin), paper (cellulose paper unbleached 20x20 cm, Lohmann & Rauscher International GmbH & CO KG), cotton roll nesting material (dental cotton roll size 3, MED-COMFORT), a 15 cm acrylic glass tunnel ( $\varnothing$  4cm PMMA xt1, Gehr1) and a red triangle plastic house (mouse house, TECNIPLAST1). Regular rodent food (autoclaved pellet diet, LAS QCDiet, Rod 16, Lasvendi, Germany) and tap water ad libitum were provided. The climate was maintained at a room temperature of 22°C (+/- 2), room humidity at 55% (+/- 15) and a 12/12 light/dark cycle regimen (lights off: 8 pm) with an automatically simulated 30 min sunrise in the morning using a wake-up light (HF3510, Philips, Germany). Mice were looked after daily and during weekly cage cleaning a more detailed visual health check was performed. For avoidance of stressful handling and implementing refinement methods, all animals were trained to tunnel handling [33] daily during an habituation phase of 3 weeks (for a detailed protocol see: [34]). Tunnel handling was used whenever the handling of the mice was needed during weekly cage cleaning and experiments.

At 11 weeks of age, the mice were transferred to the respective housing condition (conventional, n = 12; enriched, n = 12) and remained in their familiar social group of four mice.

The conventional housing group remained in their previous housing conditions but the acrylic glass tunnel that was used for habituation of tunnel handling was removed. Mice in the enriched housing groups received a running wheel with mouse igloo, paper nesting, and cotton rolls as permanently provided enrichment items (Table in S4 Table). In addition five weekly changing and randomly selected enrichment items from the categories "structural", "housing", "nesting", and "foraging" (Table in S5 Table) were provided. Change of the enrichment took place during the weekly cage cleaning process. The enrichment elements were randomized before the start of the husbandry period. The cages were then enriched and weekly changed according to this protocol. Structural elements hereby should serve as an element for exploration and resting purposes, housing elements for resting during the inactive phase and climbing throughout the active phases. Items from the category of "nesting" contained different nesting materials and the elements categorized as "foraging" contained different riddles for cognitive stimulation of the animals. As a reward for solving the riddles, the foraging elements were filled daily with a small amount (3.5 g) of millet seed (organic peeled golden millet, Spreewälder Hirsemühle or Bohlsener Mühle). 3D printing templates of two riddles can be found in the files in S1 File, S2 File). Mice of the conventional housing group received the same amount of millet seed presented as a pile on the bedding material. Prior to the home cage video observations, the mice were used in other experiments including indirect calorimetry and x-ray bone density measurement but remained in their respective housing conditions. The results of these investigations are not part of this manuscript. During the housing period and before the start of the first experimental observation, one mouse of the conventional housing condition had to be excluded due to congenital health problems not related to the experimental conditions. In total, the behavior of 11 conventional kept mice and 12 enriched kept mice was recorded. After completion of the experiments in this work, the animals remained in their housing conditions and were used for further studies.

### Animal identification

At the age of 9–10 weeks, all mice received a microchip transponder (ISO 11784/85, FDX-B transponders, Planet ID1) for individual identification. It was placed under the skin of the

dorsal neck region in rostrocaudal implantation direction under general isoflurane anesthesia and pain relieve (Metacam 1, Boehringer Ingelheim (Schweiz) GmbH). Pain medication was also administered orally the following three days after implantation. For direct optical identification, all mice were color-coded once a week on the base of the tail using permanent markers (Edding1 750).

### Body weight

Body weights of the mice of the conventional ( $n = 11$ ) and enriched ( $n = 12$ ) housing group were measured before the start of the first experiment after a housing period of 16 weeks in the respective conditions. Using tunnel handling, the mice were weighed in a weighing pan on a standard scale (Kem1 EMB 200–2).

### Experiment 1: Observation of homecage behavior

Home cage video observations of the enriched and conventional housed mice took place after 16 weeks of housing in the different housing conditions. Videos were recorded on three consecutive days. Two groups were filmed each day in a randomized order from 19:00 to 07:00 o'clock the following day under dim red- and IR- light (LED bar lights SBL-0140-RD, MBJ imaging GmbH; LED spot outdoor IR spotlight, Synergy21 ALLNET GmbH). An infrared camera (Basler USB [acA1920 – 40um]) was placed in front of the long side of the cage and connected to a laptop with recording software (iSpy Video Surveillance Software [v7.2.0.0]).

### Experiment 2: Observation of enrichment use

After a housing period of 29 weeks in the enriched cages, home cage video observation of five randomly assigned enrichment combinations was conducted for the evaluation of the use of the presented items. During the housing period, all enrichment items were presented for extensive habituation. All 12 mice from the enriched housing group were included in this video observation.

The observations took place once a week (five weeks in succession). The enrichment items consisted of the permanently provided items (running wheel with mouse igloo, paper nesting, rolled cotton wool) and five weekly changing randomized items from "structural", "housing", "nesting", and "foraging" categories.

Between 16:30 and 8:00, home cage behavior was recorded under dim red- and IR- light conditions. A second video recording was conducted the following day between 8:00 and 9:20 directly after filling the foraging enrichment items with millet seed to analyze the use of these interactive items.

Through this procedure, five different constellations of enrichment were observed. The dark phase observation served for analyzing the use of the running disc (Fig 1), structural (Fig 2) and housing (Fig 3) elements. The light phase observation served for analysis of the foraging enrichment elements (Fig 4), as the mice were habituated to receive their millet reward during this time period and were therefore active in this period. 3D Printing templates of the flap puzzle and treat ball can be found in the (S1 and S2 Files). The analysis of the usage of the foraging items was separated from the other categories in order to prevent biased data due to the feeding regime.

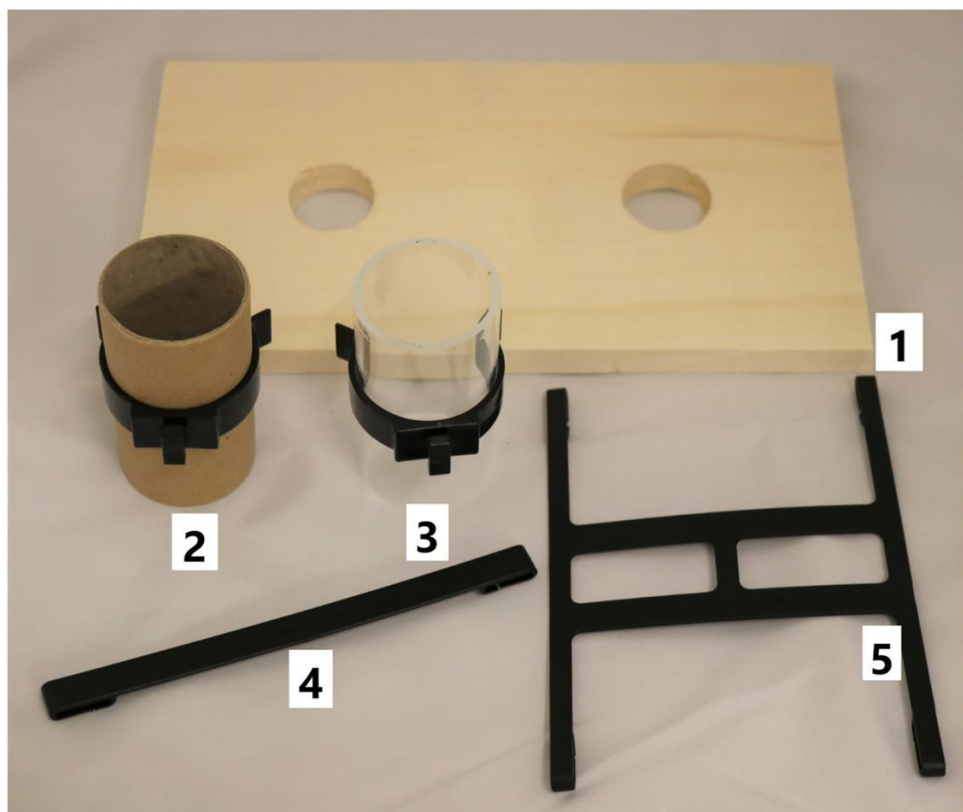
### Analysis

**Experiment 1: Observation of home cage behavior.** The behavior of each animal was analyzed in the first 15 min of the second (8 pm), third (9 pm), fourth (10 pm) and fifth (11



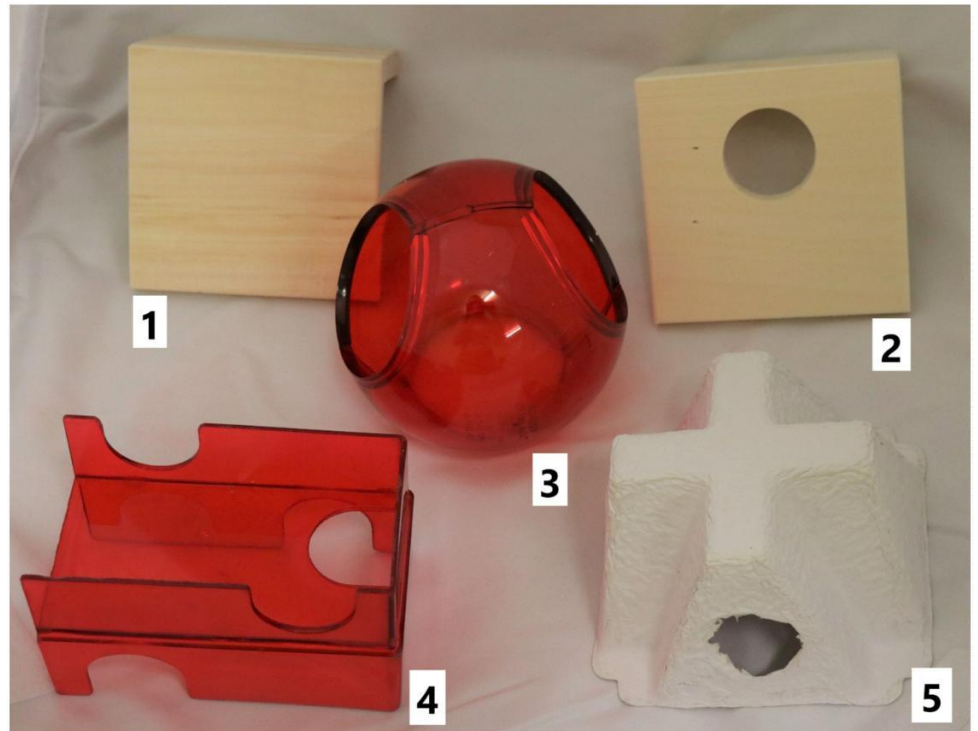
**Fig 1. Running disc.**

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g001>



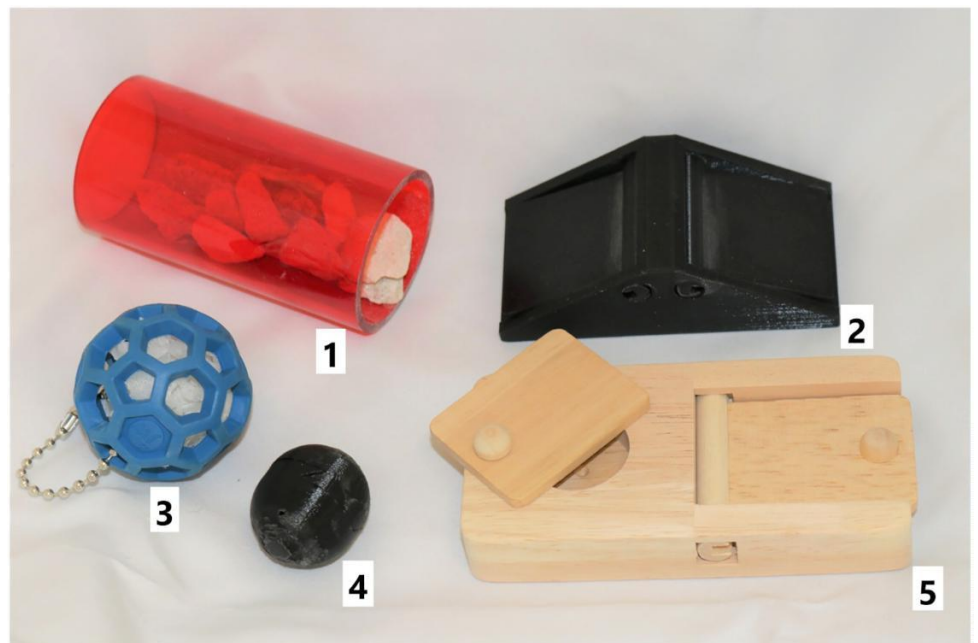
**Fig 2. Enrichment items from the category structural.** 1 second level 2 holes, 2 clip with paper tube, 3 clip with plastic tube, 4 mouse swing, 5 mouse swing double.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g002>



**Fig 3. Enrichment items from the category housing.** 1 wooden angle, 2 wooden angle with hole, 3 house ball 4 floor house 5 paper house.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g003>



**Fig 4. Enrichment items from the category foraging.** 1 tube with stones, 2 flap puzzle, 3 lattice ball, 4 treat ball, 5 sliding puzzle.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g004>



pm) hour of the dark phase using the one-zero sampling method with 15 sec intervals and focal animal sampling [35]. Video processing was done with computer software (ffmpeg v 4.2.2) resulting in 60 minutes video observation per cage processed in 240 datapoints per mice. Videos were then analyzed by one observer using an adapted ethogram (Table 1) in accordance with established ethograms of mice [36–38]. A selected behavior was counted if it was shown over a period of at least three seconds in a 15 second interval or repeated at least three times in succession within the 15 second interval. Behaviors of each mouse were then calculated as mean per 240 datapoints and given in percent.

**Inter rater reliability.** A subset of the videos of 12 randomly chosen mice (6 enriched, 6 conventional) was analyzed by a second observer. We calculated agreement for each of the 11 behaviors in all 240 data samples per mouse. This led to 2640 comparisons per mouse and an overall number of 31,680 samples for each of the two observers. It is of note that this sample is not a fully crossed rating of all observations but we deemed the sample size sufficient to calculate the Cohen's kappa as a measure of inter rater reliability [39].

**Experiment 2: Observation of enrichment use.** To analyze the use of the enrichment elements, behavior of the first 15 min of the second and third hour of the dark phase was analyzed using one-zero sampling with 15 s intervals and focal animal sampling [35]. The recordings were cut into 15 sec intervals (ffmpeg v 4.2.2) and were then analyzed visually by one observer and stored in an Excel table (Microsoft Excel (Version 2016)). Same procedure and analysis were performed with daytime video observations from 8:00 to 8:15 and 9:00 to 9:15 for the foraging enrichment items, which were then filled with millet seed. The 30 minutes of video recording at daytime led in total to 120 datapoints per mouse and observation. Please

**Table 1. Ethogram used for behavioral analysis in experiment 1.**

category	behavior	Definition
stereotypical behavior	route tracing	A mouse will trace out an identical, repeated route on the cage floor or on the cage floor involving the cage lid. At least 3 repetitions.
	jumping	Jumping is a repetitious upright motion towards the cage top. Sometimes when rearing, mice may jump up towards the cage lid. At least 3 repetitions.
	circling	A circling mouse repetitively traces a loosely circular path hanging on the cage top. While circling, the mouse may change its body orientation, alter its direction, and intermix other behaviors while following the path. At least 3 repetitions.
	bar- orientated	Chewing or sniffing at the cage bar for at least 3 seconds or at least 3 times in succession.
	wiping	A mouse rears against the side of the cage and sways from side to side. While the hind-legs usually remain stationary, the forepaws and head move in an arc from side to side that may reach down to the floor on either side of the body. At least 3 repetitions.
inactive	scratching	A mouse is scratching at the cagewall, usually in one corner of the cage, may be mixes with burrowing. At least 3 repetitions.
	inactive	Sitting or lying motionless at least 3 sec throughout the recording interval.
	maintenance behavior	drinking
feeding		The mouse rears up to gnaw at food pellets through the bars of the food hopper or sits on the hind-legs while chewing at a piece of food pellet in its forepaws.
self- grooming		Usually in a sitting position, the mouse will lick its fur, groom with the forepaws, or scratch with any limb.
active social	cagemate-grooming	A mouse licks the fur or body of another mouse (cagemate).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.t001>

note that observing behavior in group housing comes with a statistical caveat. The individual use of enrichment items within the same housing unit might not be independent of the use of the same items by cage mates. However, the one-zero sampling method with intervals of 15 seconds is considered a reasonable time window for every mouse to be able to interact independently with the desired items. By accumulating 120 independent observations, we were able to obtain a good overview of the actual interaction with the enrichment items. Enrichment items and the definition of their active and/or inactive use are listed in an ethogram (Table in S6 Table). Because the use of the different nesting materials could not be analyzed with sufficient precision, we excluded this category from the analysis. For all remaining enrichment items, the active use was defined as sitting on, running through/over, gnawing at, sniffing at, or manipulating the item. Inactive use was defined as sitting/resting/grooming in/under the item or sleeping on/inside. Active and inactive use of each item was then calculated as mean usage per 120 data points and displayed as percent.

## Statistics

**Body weight.** Body weights were analyzed using R (version 4.0.4., R Studio version 1.3.959). The Shapiro-Wilk test determined a normal distribution ( $p > 0.05$ ) for the weight data of the conventional ( $n = 11$ ) and enriched ( $n = 12$ ) housed group. The homogeneity of the variances could be confirmed by means of F-test ( $p > 0.05$ ), whereupon a t-test was performed.

**Experiment 1 and 2.** For the observation of the home cage behavior, exploratory statistical analyses were performed using R (version 4.0.4., R Studio version 1.3.959). The Shapiro-Wilk test determined non-normal distribution of the data ( $p < 0.05$ ). The Wilcoxon-Rank-Sum test was used to compare behavioral data between conventional and enriched housing. A value of  $p < 0.05$  was considered to represent a statistically significant difference. Data are presented either as boxplots (Fig 6) showing the median and interquartile range from 25th to 75th percentile or mean and standard deviation in the results text.

The data of the enrichment use, the mean percentage of active and inactive use of the items was calculated and presented as a stacked barplot with Microsoft Excel (Version 2103). Due to the individual optical tailmarks of each animal and the obvious enrichment items in the enriched housing group, the observer could not be blinded to the treatment condition.

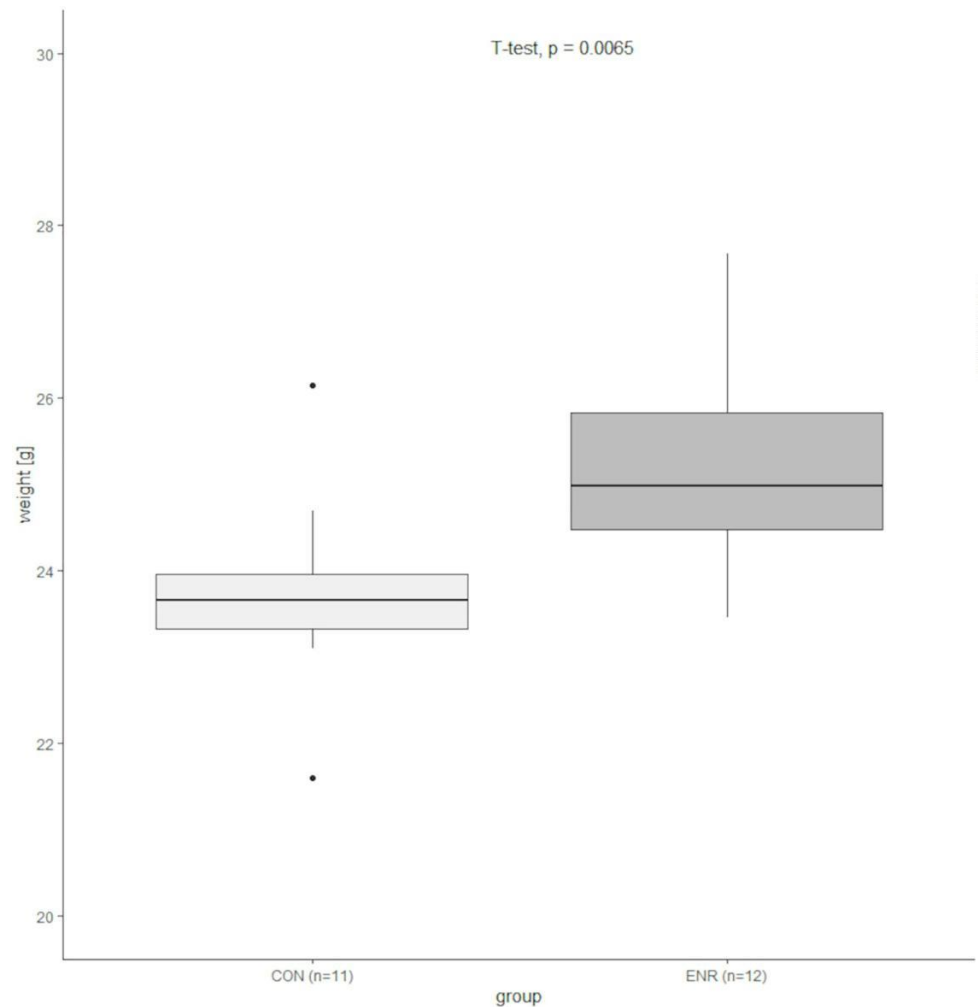
## Results

### Body weight

The results of the body weight measurements of the conventional ( $n = 11$ ) and enriched ( $n = 12$ ) housed group are shown in Fig 5. Enriched housed mice (median 24.99 g) weighed significantly more (t-test,  $p = 0.0065$ ) than their conventional (median 23.66 g) kept companions.

### Experiment 1: Observation of home cage behavior

The results of the compared behavioral observations are shown in Fig 6. Regarding the maintenance behaviors, no significant difference in occurrence could be shown neither in drinking (wilcoxon,  $p = 0.62$ ) nor in self-grooming (wilcoxon,  $p = 0.06$ ) between conventional (con) and enriched (enr) housed mice. Feeding behavior (wilcoxon,  $p = 0.036$ ) was significantly increased in enriched housed mice. Active sociopositive behavior measured as cagemate-grooming (wilcoxon,  $p = 0.73$ ) did not differ significantly between groups. Mice kept in conventional housing conditions showed significantly more inactive (wilcoxon,  $p = 0.022$ ) as well as stereotypical (wilcoxon,  $p = 0.0096$ ) behaviors compared with mice living in enriched



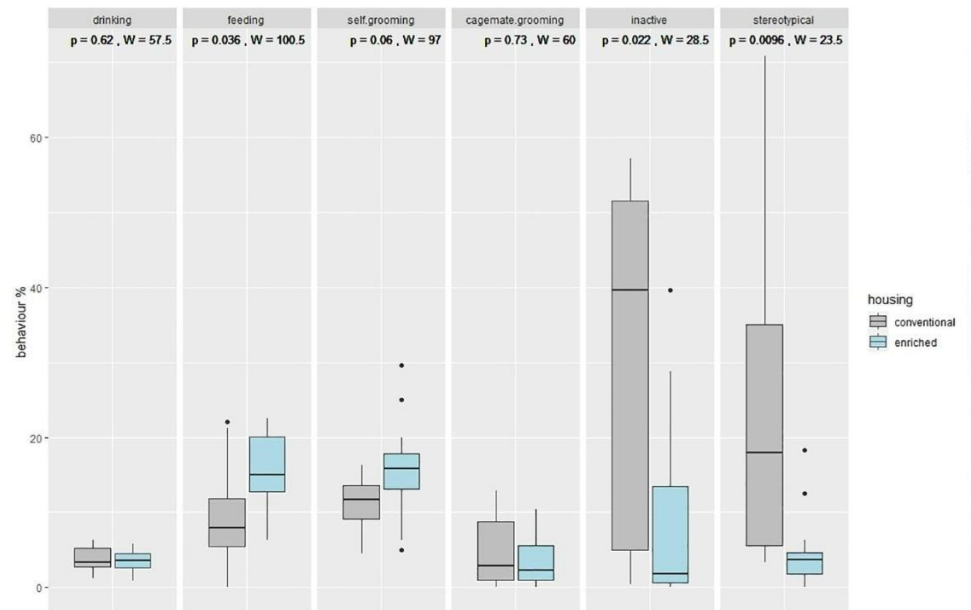
**Fig 5. Body weight of enriched (n = 12) and conventional (n = 11) housed mice in [g].** Boxplots depict the median value (horizontal line), the interquartile range from 25th to 75th percentile of the data (box), and the minimum and maximum values lying above or below the box within 1.5 times the interquartile range (vertical lines), outliers ( $<q0.25 - 1.5 \times IQR$  or  $> q0.75 + 1.5 \times IQR$ ) are drawn as filled circles.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g005>

housing. The following behavior patterns were summed up to stereotypical behavior: scratching, wiping, bar orientated behavior, circling, jumping, and route tracing. Raw data of all behaviors can be found in the (Table in [S1 Table](#).)

### Inter rater reliability

To verify whether the direct observations were reliable according to our ethogram, a subset of the videos from 12 randomly selected mice (6 enriched, 6 conventional) was analyzed by a second observer. The agreement between both observers was 97.8%  $\pm$  0.024 yielding a Cohen's kappa of 0.96 which is representing a very high inter rater reliability [39]. There was no significant difference in the inter rater reliability between observations of mice from enriched compared with observations of mice living in conventional housing conditions (t-test,  $t = -0.93$ ,  $df = 9.04$ ,  $p = 0.38$ ).



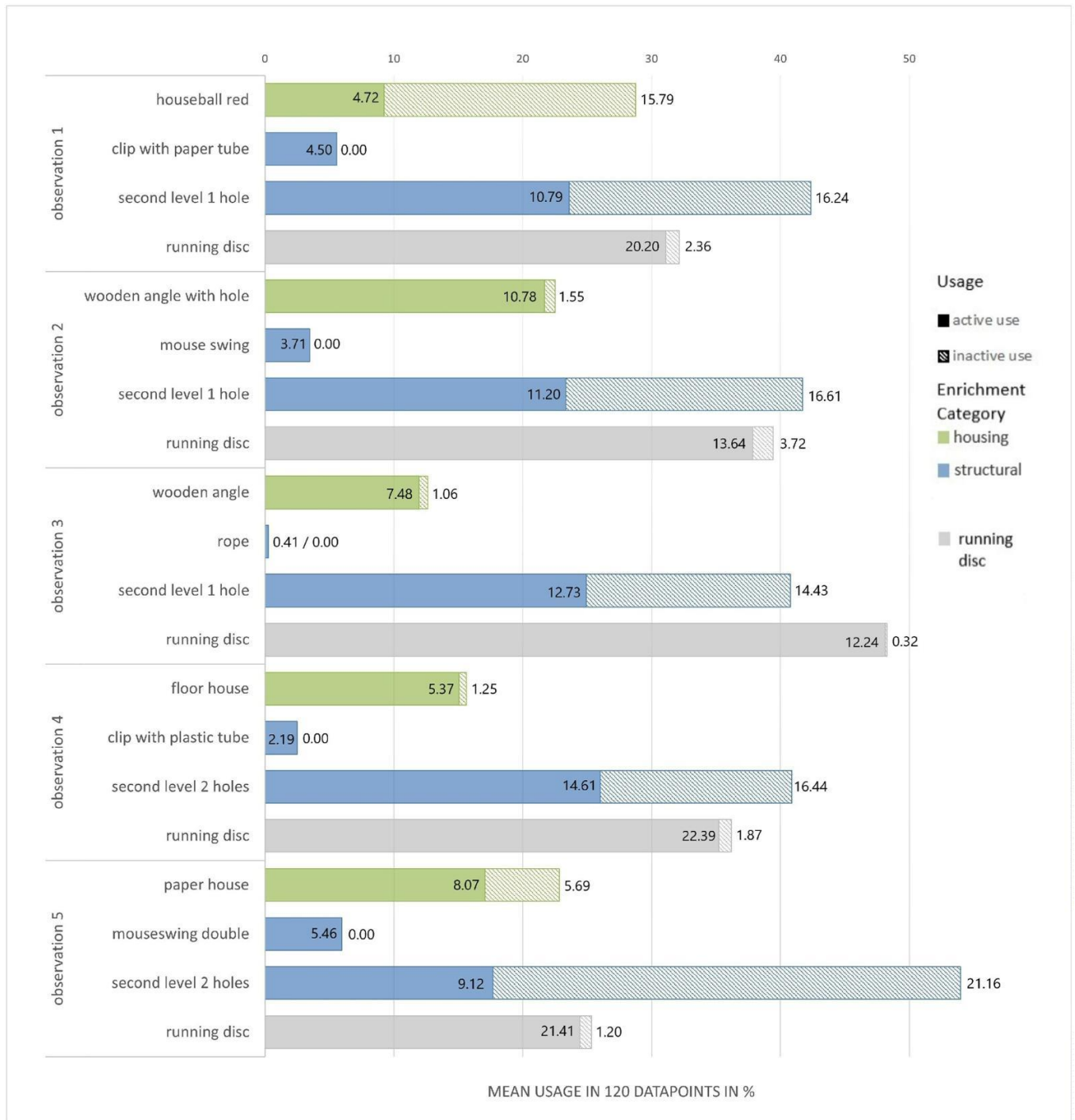
**Fig 6. Observed behavior patterns of enriched (n = 12) and conventional housed (n = 11) mice in % during the active phase.** Boxplots depict the median value (horizontal line), the interquartile range from 25th to 75th percentile of the data (box), and the minimum and maximum values lying above or below the box within 1.5 times the interquartile range (vertical lines), outliers ( $<q_{0.25} - 1.5 \times IQR$  or  $> q_{0.75} + 1.5 \times IQR$ ) are drawn as filled circles. The p-values of Wilcoxon-test results are above each boxplot. Stereotypical behavior includes scratching, wiping, bar orientated behavior, circling, jumping and route tracing.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g006>

## Experiment 2: Observation of enrichment use

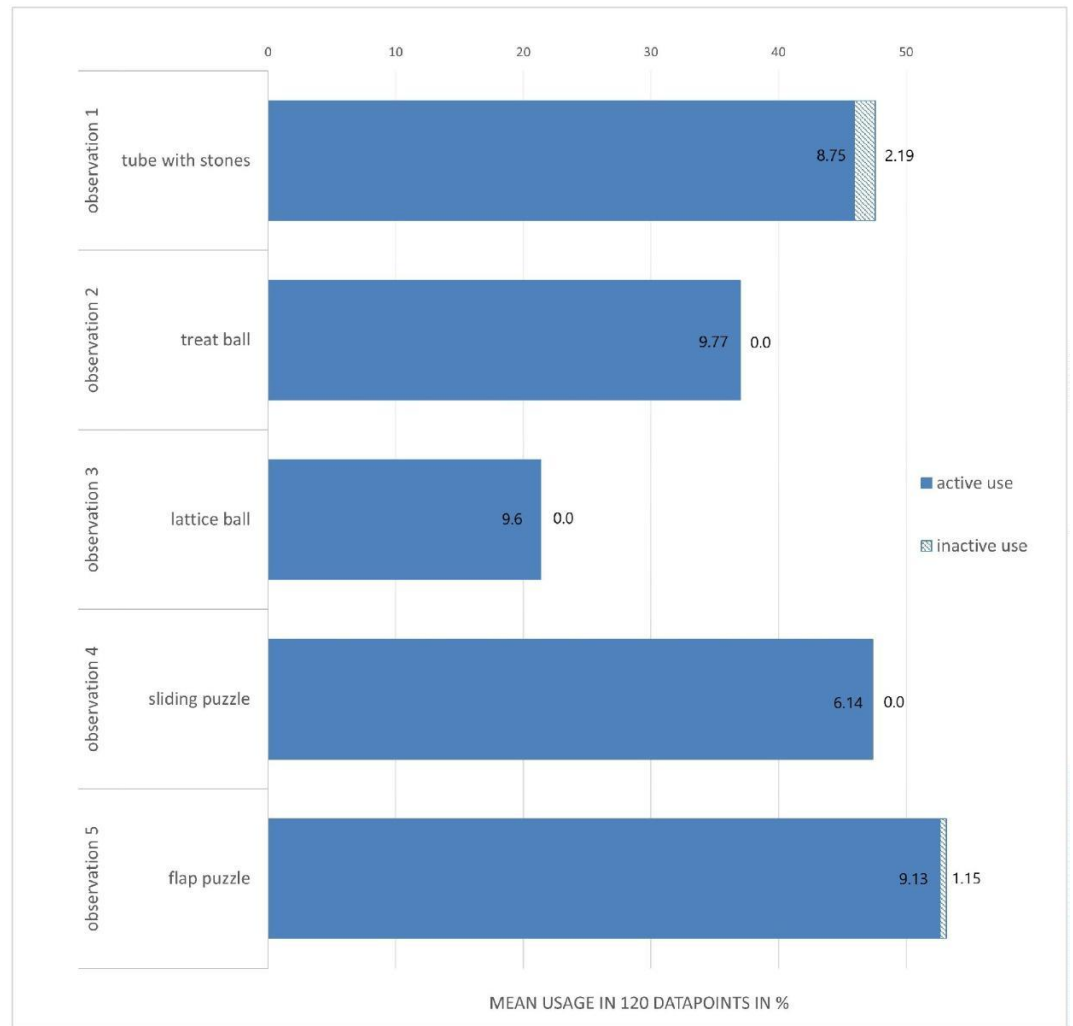
The results of the observation regarding the usage of the five enrichment setups are shown in Fig 7 and Fig 8 and as a table with the exact mean percentages in the (Table in S2 and S3 Tables). Fig 7 displays the use of 'structural enrichment', 'housing enrichment' and the running disc, Fig 8 shows the use of the 'foraging enrichment'.

Within the category of 'foraging enrichment' the elements were used mostly actively. Mean active usage of foraging elements was lowest for the lattice ball (21.4%) and highest for the flap puzzle (52.6%). The treat ball, lattice ball, and sliding puzzle were not used inactively while the flap puzzle and tube with stones were used inactively at a low mean percentage (0.5% and 1.7%, respectively). From the category of 'structural elements', especially the second level with one or two holes was used often with mean active usage between 17.7% (second level 2 holes in observation 5) and 26.0% (second level 2 holes in observation 4) and mean inactive usage between 14.9% (second level 2 holes in observation 4) and 36.3% (second level 2 holes in observation 5). Overall, the second level was nearly used the same amount of time for active engagement as for resting purposes. All structural elements fixed at the top of the cage were the least used with mean active usage between 2.5% (clip with plastic tube) to 6% (mouseswing double). Because these could only be accessed through active behavior, inactive use is 0% for clip with paper tube, mouse swing, rope, clip with plastic tube, and mouseswing double. The mean active usage of the 'housing enrichment' was between 9.2% (houseball red) and 21.7% (wooden angle with hole). The inactive use of 'housing enrichment' was between 0.6% (floor house) and 19.5% (houseball red). As the running disc was always present, we analyzed its use separately as a category of its own. The running disc was highly used, mostly in an active way with mean



**Fig 7. Video analysis of the active and inactive enrichment use in 5 observations of mice in enriched housing conditions (12 mice in 3 groups of 4 per cage) given as mean % of 120 datapoints.** The running disc was provided in every enrichment item combination. Solid parts of the bars depict the active use of the respective elements and dashed parts of the bars depict the inactive use. Standard deviations for each staged bar are given as numbers (inside bar for active use, outside for inactive use). Mice could use more than one item within each bout of 15s scan sampling therefore the added values of the bars might exceed 100.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g007>



**Fig 8. Video analysis of the active and inactive use of the foraging enrichments in 5 observations of mice in enriched housing conditions (12 mice in 3 groups of 4 per cage) given as mean % of 120 datapoints.** Foraging enrichments were filled with millet during the observation period. Solid parts of the bars depict the active use of the respective elements and dashed parts of the bars depict the inactive use. Standard deviations for each staged bar are given as numbers (inside bar for active use, outside for inactive use).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876.g008>

active usage between 24.4% (observation [obs.] 5) and 48.1% (obs. 3), while nearly no inactive use occurred with mean inactive usage between 0.1% (obs. 3) and 1.6% (obs. 2).

The most frequently used items by all mice from each category were the flap puzzle from the 'foraging enrichment' category (active use: 52.6%, inactive use: 0.5%), the second level with 2 holes in observation setup 5 (active use: 17.7%, inactive use: 36.3%) from the 'structural enrichment' category, the houseball red (active use: 9.2%, inactive use: 19.5%) from the 'housing enrichment' category. The running disc was present in all observations and its mean active usage was 35.4% and the mean inactive use was 0.9%.

## Discussion

Within the context of refining animal experimentation, the goal of this study was to investigate the influence of an enriched environment on home cage behavior in mice and to assess the

amount and kind of interaction with the presented enrichment items. It is already well known that shelters and nesting material are preferred by mice especially during the times when they rest [40]. Here we used focal animal sampling via video observations during the active phase of the mice for comparing behavior observed from enriched and conventional housed mice.

A second observation of the mice in enriched housing conditions within five sets of enrichment combinations served for analyzing the amount of either active or inactive interaction with the presented enrichment items.

Analyzing the influence of enrichment provision on home cage behavior revealed that drinking and cagemate-grooming were not influenced noticeably, whereas mice of the enriched housing conditions showed more self-grooming and more feeding behavior accompanied by heavier body weights. Due to the fact, that when comparing the rate of inactive behavior, mice in the conventional housing condition spent more time being inactive compared to the enriched housed group, it could be assumed that mice in enriched conditions may have higher caloric requirements as they show an increased interaction with their living environment and therefore display more feeding behavior. Studies examining the effect of an enriched environment on food intake remain inconclusive to date, as Andre' et al. [20] found no difference in food intake and body weight when enriching mice with a shelter and nesting material, others showed mice in conventional conditions without nesting material to consume more food and weighing less [41]. These discrepancies may arise due to the different enrichment items used in the studies as providing mice with nesting material is known to facilitate body temperature control and therefore could reduce loss of energy expenditure for thermal regulation [42]. However, providing mice with a shelter for hiding and as a refuge may have smaller effects on food intake and body weight than on behavioral parameters. Thus, when assessing the effect of enrichment on feeding behavior, the characteristics of the enrichment offered should be considered. As our study is not aiming to analyze the effect of nesting material on behavior and thermoregulation, both groups received appropriate nesting material and the effect of increased feeding behavior is more likely to be induced by the higher amount of activity shown by enriched housed mice.

Inactivity, if increased under barren housing conditions, can also be a parameter indicative for decreased well-being in mice. Being inactive but awake was shown to reflect a sign of boredom in mink housed in non-enriched conditions compared to enriched housed animals [43]. Awake inactivity has been discussed as being a reaction to chronic stress as an alternative to stereotypical behavior in animals [44] and also correlated with depressive-like behaviors e.g., increased immobility in the forced swim test in mice [45]. Nip et al. [46] also found mice, in conventional keeping conditions compared to enriched kept mice, to be more agonistic and developed higher rates of stereotypical and inactive-but-awake behavior suggesting a negative impact of the barren housing condition on welfare in mice. In our study, the lack of objects for mice to interact with in conventional housing could also be considered a chronic stressor for the animals. Further analyses are needed to determine whether the inactive behavior of mice in conventional housing conditions may be a direct indicator of impaired well-being.

Another established sensitive parameter for animal welfare is the amount of stereotypical behavior shown [47]. Stereotypical behavior is defined as fixed repeated behavioral patterns lacking recognizable goal or function [47]. It has been shown that stereotypical behavior is associated with impoverished keeping conditions in many species including mice [47, 48]. In addition it has been shown in various studies that stereotypies can be reduced and prevented by enrichment [11, 12, 49, 50]. The results of our study confirm and extend these findings and thereby underline the need for a varied environment for laboratory mice. We argue that reducing the development of behavioral deficits like stereotypical behavior, is a profound basis for enabling the development of a normal behavioral repertoire as requested by the EU Directive

2010/63. Mice in enriched housing conditions displayed significantly less stereotypical behaviors including fixed repeated behavior patterns of route tracing, jumping, circling, bar-mouthing behavior, wiping and scratching. Some of these behavior patterns are thought to represent redirected escape attempts from the captive, less stimulating housing condition [51, 52]. In addition, stereotypical behavior may be an indicator of boredom in captive animals if other more specific causative factors like brain dysfunction [53] or specific frustrations i.e., inadequate diets or absence of appropriate nesting materials can be excluded [54]. Boredom, and animal boredom in particular, is an elusive topic that has received too little attention from the scientific community. Peter Toohey formulates predictability, monotony, and confinement as key criteria for the development of boredom [55]. Although this refers to human boredom, these factors also epitomize the typical life of captive (laboratory) animals. Indeed, preliminary studies suggest that laboratory animals can experience boredom that can significantly affect their well-being [54, 56]. Considering the numerous studies that have found a causal relationship between enriched housing conditions and improved cognitive capacity and neuroplasticity, the obvious inverse conclusion is that a low-stimulus environment could have devastating effects on these very processes. We emphasize here that chronic, inescapable boredom indeed could be a crucial factor in this.

With regard to concerns that enrichment may be a potential source for an increase in variability, our data showed the contrary: Most behavioral data did not differ in variability between mice from different housing conditions. However, a larger variability occurred in conventional housed mice for stereotypical behavior and for the time spent being inactive. This is in line with previous studies also showing no evidence that data from enriched housing was less reliable compared with data derived from conventional housing [20, 23, 57, 58]. Furthermore, laboratory animals in impoverished housing conditions may not be able to develop skills necessary for adequate performance in behavioral tests. This can consequently have a major impact on the validity of these tests, in addition to welfare implications.

The second observation of our study referred to the investigation of the utilization of the provided enrichment items. It is of note that views of what constitutes an enrichment item have changed over the years. In the past even providing nesting material to a barren cage was considered as enrichment and there is still no consensus definition of the term by now. We therefore classified the items by categorizing them according to their potential usefulness to the animals from an anthropomorphic position. These categories are "structural elements", "housing elements", and "foraging elements", and thus each serves different needs of the mice. As the mice got familiar with the enrichment elements and their use throughout the housing period and during observation within their home cage, there was no disturbance in possible group dynamics and the observations resemble their actual usage at the testing days, reflecting realistic laboratory conditions. It should be noted that the observation of animals kept in groups has a statistical limitation, as the use behavior within a cage unit may not be completely independent of the use of the same enrichment item by other cage mates. Since female mice are mostly socially living animals, this method for investigation of preferences for different enrichment items enabled to test the animals as a group [59] and maybe more applicable to the normal laboratory group housing situation [60].

Foraging enrichment elements were highly used in the 30 min observational time. As the favored item of this category, the flap puzzle with two reward holes covered by a flap on each side, was used the most during the observational time. We even observed all four mice of one group to be able to interact with it at once but did not quantify the amount of simultaneous interaction time. It is of note that the provision of treats as a classical reward is very common for companion animals. In laboratory animals treats are almost exclusively used in classical or operant conditioning as a means for increasing performance [5]. Although we did not directly



measure how important the enrichment items were in terms of motivational strength, we observed that the animals showed high interest in solving the riddles of the foraging enrichment category. The motivation to interact with these items certainly was enhanced by providing millet seeds as a reward. Being able to engage in activities perceived as rewarding likely serves to achieve a more positive welfare state [4]. Overall, we highly recommend providing treats hidden in puzzle boxes as a novel form of cognitive stimulation and activity engaging enrichment.

Distinctive usage rates were observed for the enrichment elements assigned to the "structural" category. Elements fixed on the cage top were the least used elements in all observations independent of the other design elements presented and seemingly less interesting for the mice. It must be kept in mind that they also offer the smallest interaction surface and this could have negatively influenced the outcome of the use. On the other hand, the second level, either with one or two holes, was highly used in the observational period. This second level was used actively for climbing, gnawing or as a viewing platform as well as inactively as a hiding place and a place to groom or rest. Both active and inactive use were contributing similar amounts to total usage of the second level. As an additional observation, enriched housed mice exclusively used the space under the second level for nest building. Therefore, we recommend the use of those structural enrichment elements, which increase the usable space in the home cage.

The running disc was considered a separate category and was used frequently in the 30 minute video observation. Variability of the intensity and type of use between the different observations indicates an influence of the presence of other enrichment elements in the given constellation that may be more interesting to the animals. In addition, a running disc provides the animals with the opportunity for physical activity in their home cage. Mice in the wild are physically active and move extensively to explore, mate, defend, and search for food [61]. The use of running wheels by captive animals may also serve to compensate for differences in the input and output of energy, to keep temperature and/or metabolism at an acceptable level [62]. However, excessive running on a running wheel is also discussed to reflect a form of stereotypical behavior, addictive behavior, or even a laboratory artifact [63]. In contrast, our data shows that if mice have access to different enrichment elements at the same time, the use of the running disc is not the predominant behavior. In the same vein, a recent study supports the notion that in group housed mice no signs of stereotypical running wheel behavior were found [64]. Moreover, the known positive effects of exercise on cell proliferation and neurogenesis [65, 66], as well as on spatial learning and memory formation in mice [67–69] must be considered. Finally, the running discs we used in this study do not force the mice to run in a bent position as in a small running wheel which has been discussed as a potential health and welfare concern due to ventral arching of the spine or an hyperflexion of the tail [63]. Overall, being physically active exerts beneficial effects on cognition, affect, and general health, and thus on animal welfare. Running wheels or discs offer the animals the opportunity to be physically active even in the very limited space of an conventional home cage and, if the experimental design of the study allows, should be considered in species-appropriate cage enrichment.

Housing elements are primarily used as resting or sleeping places. Since in this study the behavioral observation was carried out in the dark phase, i.e. in the active phase of the animals, only a limited statement can be made about the extent to which the housing elements provided were used as resting or sleeping places. Here work of van Loo [70] revealed that for resting during the inactive time mice preferred the Shepherd Shack (Shepherd Specialty Papers, Kalamazoo, Michigan US) over a triangular red plastic house (Tecniplast, Milan, Italy). Soerensen et al. [71] found strain differences in mice in the amount of usage of the triangular red plastic house as a resting place. Our work therefore shows that housing enrichment also suit well for

interactive engagement, like climbing on/over or gnawing at. We believe that providing a shelter should be considered to be standard for contemporary housing of laboratory mice. The fact that housing enrichment items were also used in an active way might be a useful additional information when deciding which type of housing shall be provided for laboratory mice.

It has to be kept in mind for making general conclusions about the tested enrichment items that there are possible interaction effects between the items that we presented in parallel. In order to minimize this interaction, we chose an interval length of 15s, which was sufficient to allow usage of all items if the mice would have wanted.

Our analysis of inter rater reliability from Experiment 1 furthermore revealed a Cohen's kappa value of .96 which corresponded to an almost perfect level of agreement according to McHugh [72] for our observational method. We attribute this high agreement to the one-zero sampling method using a reasonable time frame and a comprehensible ethogram. This method is therefore an easy-to-use approach to measure animal behavior and obtain reliable and reproducible results.

However, for a varied and stimulating housing environment, a simultaneous provision of different enrichment items is deemed necessary [73–75]. Our observational analysis of the interaction with the presented enrichment items represents one way of gaining knowledge about how differently categorized enrichment elements are perceived by mice. However, the anthropomorphic categorization of enrichment elements may not always reflect the actual interaction of mice with these elements. Nonetheless, our categorization may serve as an attempt to resolve the ongoing confusion caused by the use of "enrichment" as a generic term for any additional elements. Due to the elaborate method of manual evaluation of the videos, preference for different enrichment items could only be determined for a relatively short period of time and only during the active phase of the mice. Long-term studies using automated evaluation of preferences for different enrichment items over at least one circadian rhythm in mice [60] or the combined assessment of behavior and stay time [76], may provide further insights here. Combining automated tracking and behavioral analysis may be the most appropriate approach. Therefore, we would like to draw the attention to a related study in which we examined the preference of mice for enrichment items using multiple binary choice tests that were conducted over a 46-hour period [32].

## Conclusion

Our study corroborates the positive influence of a complex and enriched environment on the well-being of mice and underlines the importance of a diverse environment for healthy laboratory animals and thus for reliable animal models for biomedical research. Furthermore, systematic observation of the use of enrichment items in their home cages revealed pronounced preferences for specific enrichment items. There is widespread agreement that a stimulating living environment is vital to animal well-being. In order for laboratory animals to be able to perform their behavioral repertoire to the best of their ability, species-specific requirements must be implemented in the cage design.

## Supporting information

**S1 File. 3D printing template of the flap puzzle.**

(7Z)

**S2 File. 3D printing template of the treat ball.**

(7Z)

**S1 Table. Video analysis of the behaviors of 11 mice (conventional = 5, enriched = 6) in 240 datapoints during a 60-minute observational period displayed in percentage.**

(PDF)

**S2 Table. Video analysis of the mean active and inactive use of the enrichment items in 120 datapoints during a 30-minute observational period displayed in percentage from 5 observations in 12 mice.**

(JPG)

**S3 Table. Video analysis of the active and inactive use of the enrichment items in 120 datapoints during a 30-minute observational period displayed in percentage from 5 observations in 12 mice.**

(PDF)

**S4 Table. Permanently available items for the standard housed and enriched housed group.**

(PDF)

**S5 Table. Enrichment items used for the enriched housed mice during husbandry and experiments categorized by their intended type of use.**

(PDF)

**S6 Table. Ethogram for the analysis of the enrichment use of the enriched housed mice in experiment 2.**

(PDF)

## Acknowledgments

The authors thank the animal caretakers, especially Carola Schwarck, for their support in the animal husbandry.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Lars Lewejohann, Kai Diederich.

**Data curation:** Ute Hobbiesiefken.

**Formal analysis:** Ute Hobbiesiefken.

**Funding acquisition:** Lars Lewejohann.

**Investigation:** Ute Hobbiesiefken.

**Methodology:** Ute Hobbiesiefken.

**Project administration:** Lars Lewejohann, Kai Diederich.

**Supervision:** Lars Lewejohann, Kai Diederich.

**Visualization:** Ute Hobbiesiefken.

**Writing – original draft:** Ute Hobbiesiefken.

**Writing – review & editing:** Paul Mieske, Lars Lewejohann, Kai Diederich.

## References

1. Russell W, Burch R. The principles of Humane Experimental Technique. Methuen; 1959.

2. Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: The need for clarity in definition and purpose. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2015; 54(2):120–32. PMID: [25836957](#)
3. Webster J. Assessment of animal welfare: The five freedoms. In: *Animal welfare: A cool eye towards Eden*. Blackwell Science; 1995. p. 10–4.
4. Mellor DJ. Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living." *Animals*. 2016; 6(3).
5. Lewejohann L, Schwabe K, Ha'ger C, Jirkof P. Impulse for animal welfare outside the experiment. *Lab Anim*. 2020; 54(2):23677219891754. <https://doi.org/10.1177/0023677219891754> PMID: [32050843](#)
6. Dawkins MS. From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behav Brain Sci*. 2011/05/19. 1990; 13(1):1–9.
7. Dawkins MS. Behavioural deprivation: A central problem in animal welfare. *Appl Anim Behav Sci*. 1988; 20(3–4):209–25.
8. Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: A review of "environmental enrichment." *Lab Anim*. 2002; 36(3):243–70. <https://doi.org/10.1258/002367702320162379> PMID: [12144738](#)
9. Newberry RC. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl Anim Behav Sci*. 1995; 44(2–4):229–43.
10. Bailoo JD, Murphy E, Boada-Saña M, Varholick JA, Hintze S, Baussière C, et al. Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Front Behav Neurosci*. 2018 Oct 26; 12.
11. 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.
12. Jones MA, Mason G, Pillay N. Early environmental enrichment protects captive-born striped mice against the later development of stereotypic behaviour. *Appl Anim Behav Sci*. 2011; 135(1–2):138–45.
13. Garner JP. Stereotypies and Other Abnormal Repetitive Behaviors: Potential Impact on Validity, Reliability, and Replicability of Scientific Outcomes. *ILAR J*. 2013; 46(2):106–17.
14. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x> PMID: [15341605](#)
15. Hüttenrauch M, Salinas G, Wirths O. Effects of long-term environmental enrichment on anxiety, memory, hippocampal plasticity and overall brain gene expression in C57BL6 mice. *Front Mol Neurosci*. 2016; 9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00001> PMID: [26834556](#)
16. Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Spanagel R, Gass P. Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice. *Behav Brain Res*. 2005 Oct 14; 164(1):100–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.003> PMID: [16046006](#)
17. Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*. 2001; 41(6):779–90. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00122-8) PMID: [11640933](#)
18. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(3):191–8. <https://doi.org/10.1038/35044558> PMID: [11257907](#)
19. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997; 386(1995):493–5.
20. André V, Gau C, Scheideler A, Aguilar-Pimentel JA, Amarie O V., Becker L, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol*. 2018; 16(4):1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005019> PMID: [29659570](#)
21. Harding EJ, Paul ES, Mendl M. Cognitive bias and affective state. *Nature*. 2004; 427(6972):312. <https://doi.org/10.1038/427312a> PMID: [14737158](#)
22. Vogt MA, Mertens S, Serba S, Palme R, Chourbaji S. The 'Cage Climber'—A new enrichment for use in large-dimensioned mouse facilities. *Appl Anim Behav Sci*. 2020; 230(February):105078.
23. Lewejohann L, Reinhard C, Schrewe A, Brandewiede J, Haemisch A, Goertz N, et al. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes, Brain Behav*. 2006 Mar; 5(1):64–72. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x> PMID: [16436190](#)
24. Wolfer DP, Litvin O, Morf S, Nitsch RM, Lipp HP, Würbel H. Cage enrichment and mouse behaviour. *Nature*. 2004; 432(7019):821–2. <https://doi.org/10.1038/432821a> PMID: [15602544](#)

25. Kentner AC, Speno A V., Doucette J, Roderick RC. The contribution of environmental enrichment to phenotypic variation in mice and rats. *eNeuro*. 2021; 8(2):1–10. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0539-20.2021> PMID: 33622702
26. Busch M, Chourbaji S, Dammann P, Gerold S, Haemisch A, Jirkof P, et al. Tiergerechte Haltung von Labormäusen Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung [Internet]. 2014 [cited 2019 Aug 1]. Available from: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierhaltung/hal\\_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierhaltung/hal_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf)
27. Dawkins MS. A user's guide to animal welfare science. *Trends Ecol Evol*. 2006; 21(2):77–82. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.017> PMID: 16701478
28. Kahnau P, Habedank A, Diederich K, Lewejohann L. Behavioral methods for severity assessment. *Animals*. 2020; 10(7):1–13. <https://doi.org/10.3390/ani10071136> PMID: 32635341
29. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J*. 2005; 46(2):162–70. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.162> PMID: 15775025
30. Baumans V, Van Loo PLP. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *Vet J*. 2013; 195(1):24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.023> PMID: 23127868
31. Habedank A, Kahnau P, Diederich K, Lewejohann L. Severity assessment from an animal's point of view. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2018; 31(7–8):304–20.
32. Hobbiesiefken U, Urmersbach B, Jaap A, Diederich K, Lewejohann L. Rating enrichment items by group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system. *bioRxiv*. 2021;
33. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods*. 2010; 7(10):825–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500> PMID: 20835246
34. Hohlbaum K. Mouse handling [Internet]. 2020 [cited 2021 Mar 17]. Available from: [https://wiki.norecopa.no/index.php/Mouse\\_handling](https://wiki.norecopa.no/index.php/Mouse_handling)
35. Martin P, Bateson P. *Measuring Behaviour- An Introductory Guide*. Third Edit. Cambridge University Press; 2010. pp 49–55.
36. Latham N, Mason G. Frustration and perseveration in stereotypic captive animals: Is a taste of enrichment worse than none at all? *Behav Brain Res*. 2010; 211(1):96–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.018> PMID: 20230861
37. Novak J, Bailoo JD, Melotti L, Würbel H. Effect of Cage-Induced Stereotypies on Measures of Affective State and Recurrent Perseveration in CD-1 and C57BL/6 Mice. *PLoS One*. 2016; 11(5):e0153203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153203> PMID: 27145080
38. Stanford University. *Mouse Ethogram—An Ethogram For The Laboratory Mouse* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jan 16]. Available from: <https://mousebehavior.org/>
39. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas*. 1960 Apr 1; 20(1):37–46.
40. Lewejohann L, Sachser N. Evaluation of different housing conditions for male laboratory mice by means of preference tests. *KTBL SCHRIFT*. 2000;170–7.
41. van de Weerd HA, van Loo PLP, van Zutphen LFM, 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. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00232-1](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00232-1) PMID: 9333195
42. 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 Feb 17; 110–111:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.018> PMID: 23313562
43. Meagher RK, Mason GJ. Environmental Enrichment Reduces Signs of Boredom in Caged Mink. *PLoS One*. 2012 Nov 14; 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049180> PMID: 23155462
44. Cabib S. The neurobiology of stereotypy II: the role of stress. In: *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare*. Wallingford: CABI; 2006. p. 227–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.003> PMID: 16713106
45. Fureix C, Walker M, Harper L, Reynolds K, Saldivia-Woo A, Mason G. Stereotypic behaviour in standard non-enriched cages is an alternative to depression-like responses in C57BL/6 mice. *Behav Brain Res*. 2016; 305:186–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.02.005> PMID: 26876137
46. Nip E, Adcock A, Nazal B, MacLellan A, Niel L, Choleris E, et al. Why are enriched mice nice? Investigating how environmental enrichment reduces agonism in female C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice. *Appl Anim Behav Sci*. 2019; 217(April):73–82.

47. Mason GJ. Stereotypies: a critical review. Vol. 41, *Animal Behaviour*. Academic Press; 1991. p. 1015–37.
48. Powell SB, Newman HA, Pendergast JF, Lewis MH. A rodent model of spontaneous stereotypy/Initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiol Behav*. 1999 Apr 1; 66(2):355–63. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00303-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00303-5) PMID: 10336165
49. Gross AN, Engel AKJ, Richter SH, Garner JP, Wu'rbel H. Cage-induced stereotypies in female ICR CD-1 mice do not correlate with recurrent perseveration. *Behav Brain Res*. 2011 Jan 20; 216(2):613–20. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.09.003> PMID: 20837068
50. Lewejohann L, Reefmann N, Widmann P, Ambre'e O, Herring A, Keyvani K, et al. Transgenic Alzheimer mice in a semi-naturalistic environment: More plaques, yet not compromised in daily life. *Behav Brain Res*. 2009 Jul 19; 201(1):99–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.01.037> PMID: 19428622
51. Wu'rbel H, Stauffacher M, Holst D. Stereotypies in Laboratory Mice—Quantitative and Qualitative Description of the Ontogeny of 'Wire-gnawing' and 'Jumping' in Zur:ICR and Zur:ICR nu. *Ethology*. 1996 Apr 26; 102(3):371–85.
52. Wu'rbel H. The motivational basis of caged rodents' stereotypies. In: *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare*. CAB International Oxford; 2006. p. 86–120.
53. Richter H, Ambre'e O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, et al. Wheel-running in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: Protection or symptom? *Behav Brain Res*. 2008 Jun 26; 190(1):74–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.005> PMID: 18342378
54. Burn CC. Bestial boredom: a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation. *Anim Behav*. 2017; 130:141–51.
55. Toohey P. *Boredom: A lively history*. Yale University Press; 2011.
56. Mellor DJ. Comprehensive assessment of harms caused by experimental, teaching and testing procedures on live animals. In: *ATLA Alternatives to Laboratory Animals*. FRAME; 2004. p. 453–7. <https://doi.org/10.1177/026119290403201s73> PMID: 23581117
57. Bailoo JD, Murphy E, Boada-Sana M, Varholick JA, Hintze S, Baussiere C, et al. Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Front Behav Neurosci*. 2018; 12.
58. Vogt MA, Mertens S, Serba S, Palme R, Chourbaji S. The 'Cage Climber'—A new enrichment for use in large-dimensioned mouse facilities. *Appl Anim Behav Sci*. 2020; 230(June):105078.
59. Gaskill BN, Rohr SA, Pajor EA, Lucas JR, Garner JP. Some like it hot: Mouse temperature preferences in laboratory housing. *Appl Anim Behav Sci*. 2009 Jan 31; 116(2–4):279–85.
60. Blom HJM, van Vorstenbosch CJAHV, Baumans V, Hoogervorst MJC, Beynen AC, van Zutphen LFM. Description and validation of a preference test system to evaluate housing conditions for laboratory mice. *Appl Anim Behav Sci*. 1992; 35(1):67–82.
61. 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(3–4):261–89.
62. Sherwin CM. Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim Behav*. 1998 Jul; 56(1):11–27. <https://doi.org/10.1006/anbe.1998.0836> PMID: 9710457
63. Richter SH, Gass P, Fuss J. Resting is rusting: A critical view on rodent wheel-running behavior. *Neuroscientist*. 2014; 20(4):313–25. <https://doi.org/10.1177/1073858413516798> PMID: 24395338
64. Weegh N, Fu'ner J, Janke O, Winter Y, Jung C, Struve B, et al. Wheel running behaviour in group-housed female mice indicates disturbed wellbeing due to DSS colitis. *Lab Anim*. 2020; 54(1):63–72. <https://doi.org/10.1177/0023677219879455> PMID: 31674858
65. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci*. 1999; 2(3):266–70. <https://doi.org/10.1038/6368> PMID: 10195220
66. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci*. 2005; 25(38):8680–5. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005> PMID: 16177036
67. Halperin JM, Healey DM. The influences of environmental enrichment, cognitive enhancement, and physical exercise on brain development: Can we alter the developmental trajectory of ADHD? Vol. 35, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Pergamon; 2011. p. 621–34. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.006> PMID: 20691725
68. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Vol. 25, *Trends in Neurosciences*. Elsevier Current Trends; 2002. p. 295–301. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02143-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02143-4) PMID: 12086747

69. Diederich K, Bastl A, Wersching H, Teuber A, Strecker JK, Schmidt A, et al. Effects of different exercise strategies and intensities on memory performance and neurogenesis. *Front Behav Neurosci.* 2017; 11 (March):1–9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00047> PMID: 28360847
70. van Loo PLP, Blom HJM, Meijer MK, Baumans V. Assessment of the use of two commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. *Lab Anim.* 2005; 39(1):58–67. <https://doi.org/10.1258/0023677052886501> PMID: 15703125
71. Soerensen DB, Moeller MR, Larsen LR. The use of the Techniplast Mouse House® in four strains of mice. *Scand J Lab Anim Sci.* 2009; 36(2):179–83.
72. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Medica.* 2012; 22(3):276–82. PMID: 23092060
73. Gortz N, Lewejohann L, Tomm M, Ambree O, Keyvani K, Paulus W, et al. Effects of environmental enrichment on exploration, anxiety, and memory in female TgCRND8 Alzheimer mice. *Behav Brain Res.* 2008; 191(1):43–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.006> PMID: 18433890
74. Abramov U, Puusaar 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. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.07.075> PMID: 18687379
75. Sztainberg Y, Chen A. An environmental enrichment model for mice. *Nat Protoc.* 2010; 5(9):1535–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.114> PMID: 20725068
76. Ago A, Gonda T. Preferences for paper bedding material of the laboratory mice. *Exp Anim.* 2002; 51 (2):157–61. <https://doi.org/10.1538/expanim.51.157> PMID: 12012724





### 3.2 Rating enrichment items by female group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system

**Autoren:** Ute Hobbiesiefken<sup>1</sup>, Birk Urmersbach<sup>1</sup>, Anne Jaap<sup>1</sup>, Kai Diederich<sup>1</sup>, Lars Lewejohann<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), German Center for the Protection of Laboratory Animals (Bf3R), Berlin, Germany

<sup>2</sup>Institute of Animal Welfare, Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

**Erhalten:** August 23, 2022; **Akzeptiert:** November 21, 2022; **Publiziert:** Januar 19, 2023

**Journal:** PlosOne

**URL:** <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0278709>

**DOI:** <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709>

#### Beitrag der Autoren

<b>Ute Hobbiesiefken</b>	Datenerhebung, Formale Analyse, Untersuchung, Methodik, Visualisierung, Schreiben - originaler Entwurf
<b>Birk Urmersbach</b>	Software, Review & Editieren
<b>Anne Jaap</b>	Software, Review & Editieren
<b>Kai Diederich</b>	Projektadministration, Review & Editieren
<b>Lars Lewejohann</b>	Konzeptentwicklung, Fördermittelakquise, Projektadministration, Supervision, Review & Editieren

This is an open-access article distributed under the terms of the

[Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

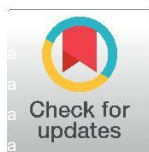
## RESEARCH ARTICLE

# Rating enrichment items by female group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system

Ute Hobbiesiefken<sup>1</sup>, Birk Urmersbach<sup>1</sup>, Anne Jaap<sup>1</sup>, Kai Diederich<sup>1</sup>, Lars Lewejohann<sup>1,2</sup>

**1** German Center for the Protection of Laboratory Animals (Bf3R), German Federal Institute for Risk Assessment (BfR), Berlin, Germany, **2** Animal Behavior and Laboratory Animal Science, Institute of Animal Welfare, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

· [Lars.Lewejohann@bfr.bund.de](mailto:Lars.Lewejohann@bfr.bund.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Hobbiesiefken U, Urmersbach B, Jaap A, Diederich K, Lewejohann L (2023) Rating enrichment items by female group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system. PLoS ONE 18(1): e0278709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709>

**Editor:** Andrey E. Ryabinin, Oregon Health and Science University, UNITED STATES

**Received:** August 23, 2022

**Accepted:** November 21, 2022

**Published:** January 19, 2023

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709>

**Copyright:** © 2023 Hobbiesiefken et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and its [Supporting](#)

## Abstract

Laboratory mice spend most of their lives in cages, not experiments, so improving housing conditions is a first-choice approach to improving their welfare. Despite the increasing popularity of enrichment, little is known about the benefits from an animal perspective. For a detailed analysis, we categorized enrichment items according to their prospective use into the categories 'structural', 'housing', and 'foraging'. In homecage-based multiple binary choice tests 12 female C57BL/6J mice chose between enrichment items within the respective categories over a 46-hour period. A new analyzing method combined the binary decisions and ranked the enrichment items within each category by calculating worth values and consensus errors. Although there was no unequivocal ranking that was true in its entire rank order for all individual mice, certain elements (e.g. lattice ball, second plane) were always among the top positions. Overall, a high consensus error in ranking positions reflects strong individual differences in preferences which could not be resolved due to the relatively small sample size. However, individual differences in the preference for enrichment items highlights the importance of a varied enrichment approach, as there does not seem to be one item that satisfies the wants and needs of all individuals to the same degree. An enrichment concept, in which the needs of the animals are central, contributes to a more specific refinement of housing conditions.

## Introduction

Attitudes toward animals as fellow living creatures have changed significantly in recent decades. There is growing concern about the conditions under which laboratory animals are kept, and it is therefore not surprising that legal requirements are also becoming increasingly demanding. In Europe, minimum requirements for housing laboratory animals are set out in Directive 2010/63/EU [1], which stipulates that animals must be housed according to the

**Information materials.** 3D printing templates of self-designed enrichments used in this study are openly available in Github under: <https://github.com/RefinementReferenceCenter/MoPSS-preference-test-supplement-new>.

**Funding:** The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

specific needs and characteristics of each species. Experimental animals should be provided with 'space of sufficient complexity to allow expression of a wide range of normal behavior' [1]. While the available space itself is a pressing issue for future improvements, the issue of complexity is usually approached through what is known as 'enrichment of housing conditions'. It is reasonable to assume that additional enrichment opportunities in barren cages will create a more complex environment, which is likely to be appreciated by the animals [2,3] and they are even willing to work for access to enrichment opportunities [4].

However, it is important to note that 'enrichment' has become an umbrella term that encompasses a wide variety of different elements. Therefore, it must be kept in mind that by no means a uniformly accepted enrichment is meant when speaking of effects of enrichment [2,3,5]. This being said, many research groups have indeed shown the benefits of enriched environments relative to conventional housing on well-being parameters in mice [3,6]. Abnormal repetitive behavior expression, behavioral measures of anxiety, as well as growth and stress physiology were influenced positively by providing mice with a more varying environment using enrichment items [7]. Access to enrichment leads to improved learning and memory function [8,9], increased hippocampal neurogenesis [9,10], attenuated stress responses and enhanced natural killer cell activity [11]. Importantly, studies showed no generalizable influence of a more diverse environment on variability of important parameters in biomedical research in mice [7,12,13]. With regard to the workload of animal caretakers only a slight increase was noted while their overall assessment of providing enrichment in light of enhanced well-being for laboratory rodents was reported as good [14]. Overall, there is increasing evidence that keeping animals in conventional housing conditions may be a negative factor in the development of behavioral disorders because of its impoverished character [15]. Thus, it must be borne in mind that mice from suboptimal housing conditions which show abnormal behavioral and brain development render a less predictive animal model for biomedical research.

To create a more varied and stimulating environment, the size of the home cage can be enlarged, the group size increased, and stimulating elements can be provided [16,17]. However, the human perspective does not necessarily reflect the wants and needs of mice [2]. Therefore, it is essential to ask the animals themselves about the adequacy of the enrichment items [18,19]. To determine how different items are perceived by the animals themselves [20], animal centric strategies like preference tests will help to assess and rate different items [19,21–23].

From the three typically used preference testing designs [22], T-Maze, conditioned place preference, and home cage based preference tests, the last one seems to be the most appropriate for rating enrichment items. Especially when it comes to the avoidance of frequent animal handling and the opportunity to extend testing periods up to a full circadian cycle or longer [22]. Additionally, choice tests conducted within the home cage without the influence of an experimenter correspond better to real laboratory keeping conditions [24,25]. Home cage based testing systems usually consist of two [26,27] or more [26,28] connected cages with or without a center cage. In such tests mice are able to stay in their preferred surroundings and the cage that is chosen with the longer period of stay is regarded as the preferred one, or, in case of aversive properties, as the one least avoided [22].

For our preference test, we used the Mouse Position Surveillance System (MoPSS), a new test system designed and constructed in our laboratory [29] to ask for enrichment item preferences in female C57BL/6J mice, a widely used strain in biomedical research [30]. The MoPSS allows automatic long-term calculation of time spent in each of two interconnected cages for every individual mouse in a group. In addition, it can be measured how much time individual mice spend together in the same compartment. The determined dwelling time is used to conclude the choice between different enrichment items from the point of view of a mouse. The offered items were categorized and tested by their intended purpose of structuring the cage

(structural enrichment), stimulating foraging engagement of the mice (foraging enrichment), and providing an alternative resting place (housing enrichment). To rank multiple items within those three categories with regard to the preference by the mice, we combined multiple binary choice tests and calculated so-called 'worth values' [31]. In order to further evaluate the quality with regard to consistency of choice among individual mice and within groups of mice living in the same cage we used a recently developed method for analyzing such worth value ratings [32]. The overall aim of assigning worth values to specific enrichment items by multiple comparisons, is to provide scientifically based assistance for improving housing conditions of laboratory mice. A better knowledge of the preferences and the importance of certain elements from the animals' point of view will certainly help to adjust the housing conditions in the laboratories to the animals' needs and thus increase animal welfare.

## Results

### Preference testing

By combining multiple binary choice tests, a worth value is calculated for each item indicating the relative probability of preferences (worth values, ranging from 0 to 1). In order to indicate the amount of disagreement of the tested animals on the calculated worth position, the consensus error (CE) is calculated. CEs of all 12 mice for the enrichment items of the categories foraging, structural, and housing during the entire 46-hours testing cycle and during active and inactive time are given in Fig 1. While the CE indicates the in-between agreement on the ranking positions of the items, the ratio of intransitivity informs about the amount of inconclusive rankings on an individual basis.

Of all foraging enrichment items, the lattice ball received the highest worth value (WV) during the 46-hour testing interval (mean WV: 0.51; CE: 29.17%), both during active (WV: 0.48; CE: 33.3%) and inactive time (WV: 0.42; CE: 45.83%). The overall ratio of intransitive choices was at 13.3%.

Over the total time of 46 hours, the highest worth values regarding the structural enrichments were attributed to the rope (WV: 0.24; CE: 45.83%). However, during the active time the second plane (WV: 0.27; CE: 70.83%) was at the highest position on the scale while during the inactive time both, the second plane (WV: 0.25; CE: 75%) and the rope (WV: 0.25; CE: 50%) reached the highest worth values. The overall ratio of intransitive choices was at 28.3%.

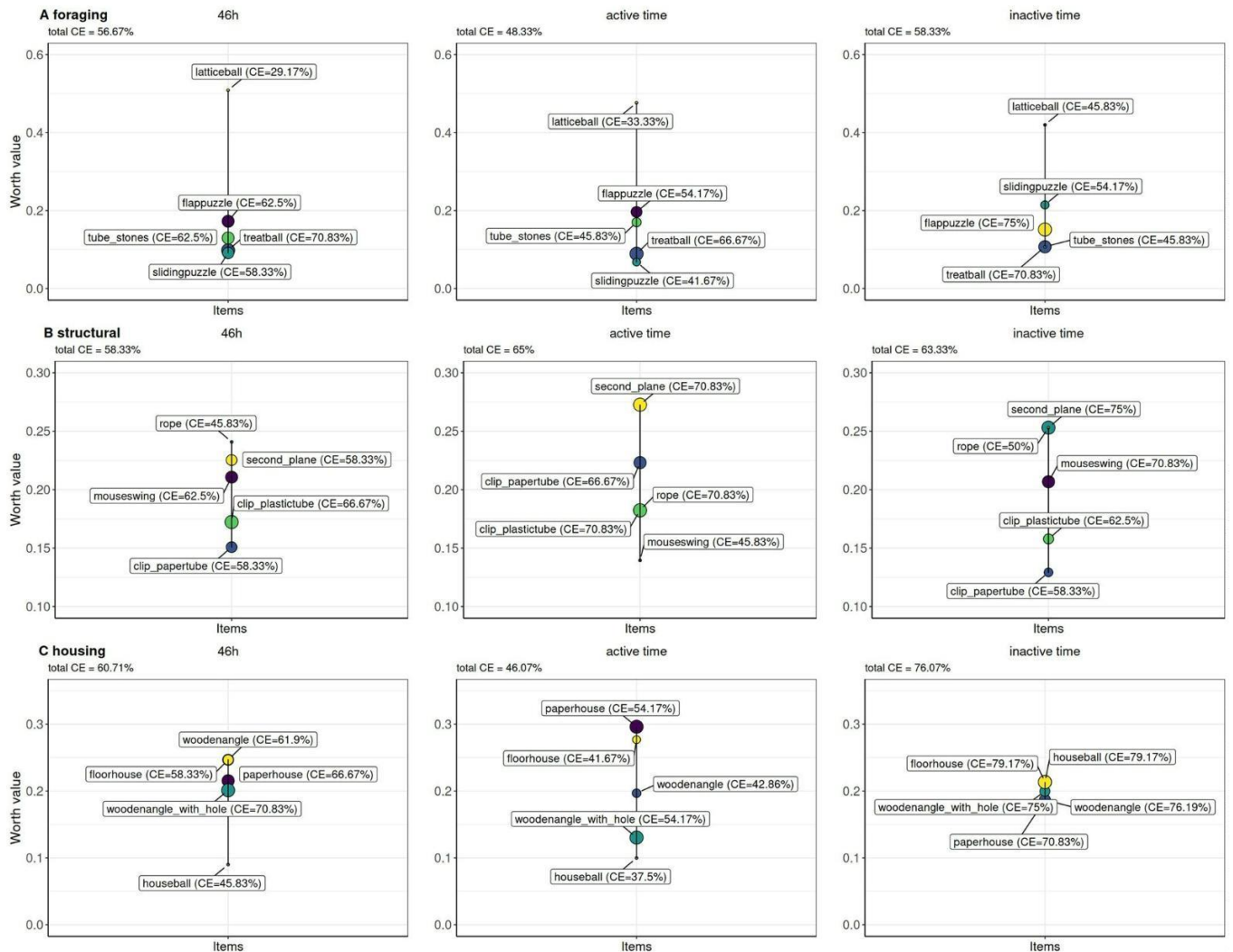
Out of the housing enrichments the wooden angle (WV: 0.25; CE: 61.9%) and the floorhouse (WV: 0.25; CE: 58.33%) were attributed with the highest WV over 46 hours. Within the active time the paper house (WV: 0.30; CE: 54.17%) had the highest WV. During the inactive time all items achieved very similar WV with the floorhouse (WV: 0.21; CE: 79.17%) and the houseball (WV: 0.21; CE: 79.17%) equally ranked in first position. The overall ratio of intransitive choices was at 25%.

Fig 2 illustrates the relative preferences (worth values) of the mice of Group 1 (n = 4), Group 2 (n = 4) and Group 3 (n = 4) for the enrichment items of the categories foraging, structural and housing during the entire 46-hours testing cycle.

Within the foraging enrichments group 1 ranked the lattice ball (WV: 0.26) and the tube with stones (WV: 0.26) on the first position, whereas group 2 and 3 ranked solely the latticeball (group 2 WV: 0.26; group 3 WV: 0.33) on the first position.

Among the structural enrichments group 1 ranked the rope (WV: 0.26) and the second plane (WV: 0.26) on the first position, group 2 ranked the rope (WV: 0.27) first and group 3 ranked the clip with the plastic tube (WV: 0.34) first.

Analyzing the ranking positions of the housing enrichments on group level, group 1 ranked the floorhouse and the wooden angle (both WV: 0.26), group 2 the floorhouse (WV: 0.33) and



**Fig 1. The relative probability of preferences (worth values) and consensus errors (in percent) of all mice (n = 12) for the tested enrichment items from the categories foraging, structural and housing in the single paired comparisons.** The 46-hour period depicts the complete testing cycle whereas the active time depicts the dark phase of the testing cycle and the inactive time depicts the light phase of the testing cycle.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.g001>

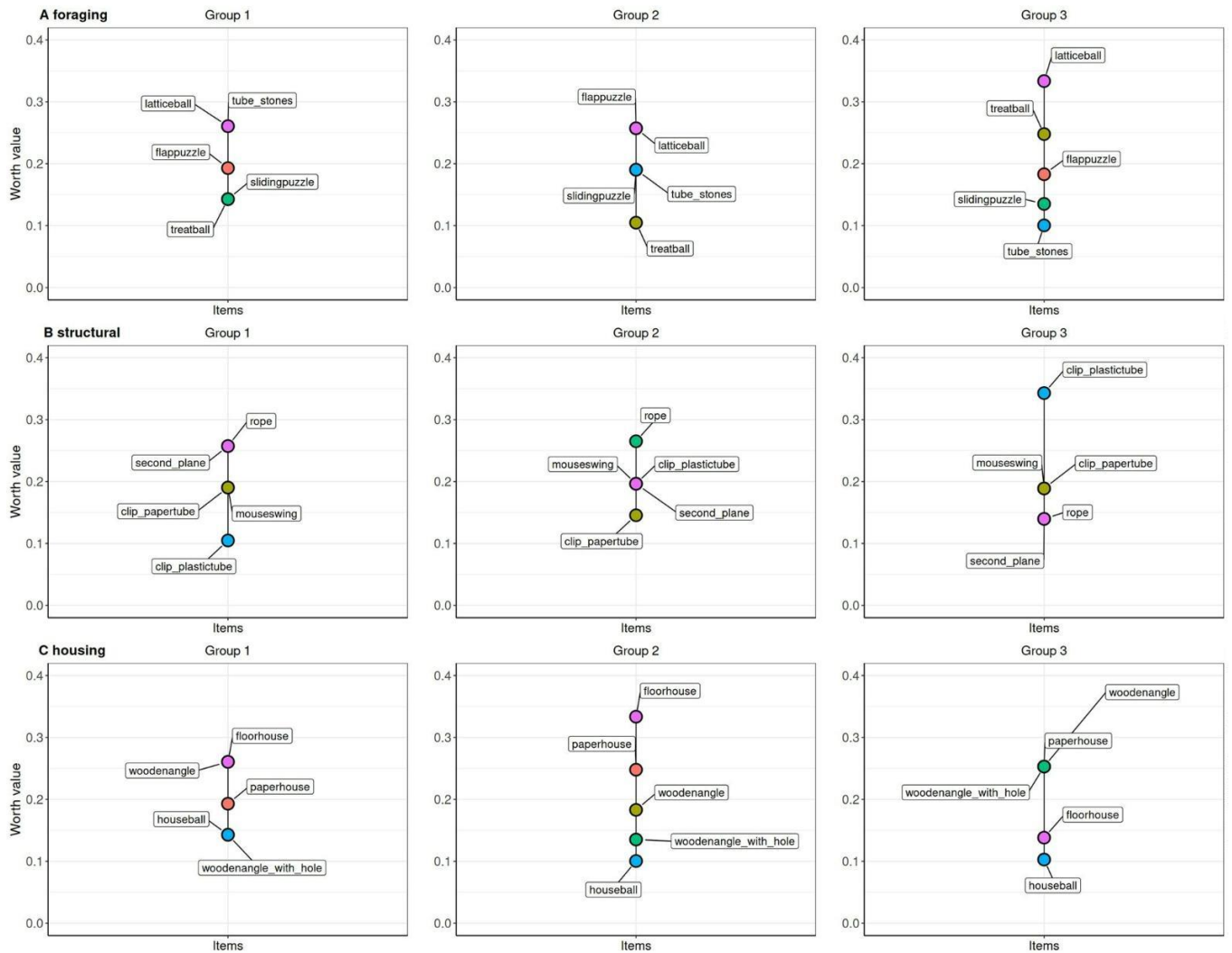
group 3 the wooden angle, the paper house, and the wooden angle with hole (all three WV:0.25) on the first position.

**Mutual influence within the groups**

To test whether the mice in each cage influenced each other's preference, we analyzed the transitions between cages that occurred in temporal proximity within 1 second. Table 1 presents the results of the follow events, the influence events and the proportion of follow events and influence events of the transitions per mouse.

The mean proportion of follow events in the transitions was 1.39% and the proportion of influence events in the transitions was 1.31%. If the interval of temporal proximity of events was increased to 3 s, the proportion of follow events increased to 4.73%.

We also analyzed the time course of the co-location of each possible pair of mice in the same compartment (see S1 Fig). Overall, all mice spent a mean of 70.32% (group 1: 69.63%,



**Fig 2.** The relative probability preferences (worth values) of the mice from Group 1 (n = 4), Group 2 (n = 4) and Group 3 (n = 4) for the tested enrichment items from the categories foraging, structural and housing in the single paired comparisons over the entire 46-hour testing cycle.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.g002>

**Table 1.** The results from the follow and influence behavior analysis of 12 mice from the three experimental groups (1,2,3) of the complete data set.

Group	Mouse	Transitions	Follow Events	Follow %	Influence Events	Influence %
1	1	11608	69	0.594	68	0.568
1	2	11132	54	0.485	73	0.656
1	3	10919	77	0.705	58	0.531
1	4	9955	58	0.583	59	0.593
2	1	10387	229	2.205	183	1.762
2	2	10224	199	1.946	193	1.888
2	3	8442	207	2.452	213	2.523
2	4	7557	143	1.892	189	2.501
3	1	7480	93	1.243	81	1.083
3	2	8440	97	1.149	96	1.137
3	3	7428	88	1.185	89	1.198
3	4	6013	64	1.064	76	1.264

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.t001>

group 2: 70.73%, group 3: 70.59%) of the time together with each conspecific. There is no indication that any of the possible pairs avoid each other.

## Discussion

The aim of this study was to evaluate enrichment elements from the perspective of group housed female C57BL/6J mice. In a series of home cage based binary preference tests, mice could choose between different enrichment elements and their choice behavior was evaluated descriptively. The items were ranked according to a worth value that was calculated from combining the binary choices. In addition, the degree of disagreement in item selection between mice was measured as consensus error (CE) and the percentage of intransitive rankings (i.e.,  $A > B > C > A$ ).

All choice tests were performed while the mice were in their respective social group in one out of three test set-ups with four mice each. It is reasonable to assume that individuals within a social group can influence each other. Overall, all mice switched back and forth between the two cages very frequently. This shows that the items tested were sufficiently familiar and that switching between the cages can be considered an active choice. A closer look at the switches in close temporal intervals allows us to assess how strong the mutual influence on the choice decision was. Therefore, we conducted an analysis of follow and influence behavior, which shows how attached individual choice is to decisions of conspecifics. Data revealed that the three groups indeed did not come to the same conclusion with regard to choosing preferred items. However, there was no considerable attraction to individual mice that could explain the respective preference as a trend triggered by individual influencer mice. Overall, a mean follow rate of 1.39% is reflecting a negligible direct immediate impact on individual choices. Even if a longer, more conservative follow interval of 3 seconds was applied, more than 95% of all cage changes were not directly related to an influencer. Thereby we could demonstrate that group housed mice can explore a choice test apparatus without being directly led by others and thus an independent choice of location is likely. Even though the mice had the opportunity to freely decide for or against the cage with the tested items, other factors may have been more important for the decision and must be considered. For example, the preference for a certain cage may also depend on scent marks, or the spatial distribution of the group. It can be assumed that the shared nest is usually also located in the preferred cage. Once the nest is built, it could act as an amplifier and thus be a strong predictor of group choice, especially during the inactive phase. Overall, all groups showed a strong tendency to spend most of their time together, which underlines the strong social cohesion that certainly plays a role in the choice of where to stay, even if no direct influence is obvious. Nevertheless, our data reveals that those elements that were preferred more unequivocally (e.g., the lattice ball) led to an overall peak in time spent together while on days where more ambiguous elements were tested the time spent together decreased (see [S1 Fig](#)). Male and female mice behave differently and therefore sex may also have an influence on choice behavior in mice. However, with regard to housing conditions previous research so far has shown that sex differences are negligible in preference studies with mice [4,26,28,33]. However, it is worth noting that male mice are often housed singly in order to avoid aggressive behavior. Here we solely investigated preference in female mice, so no conclusion can be drawn on the influence of sex and group housing was chosen as the most representative social housing condition for female mice. Nevertheless, testing groups of mice will remain a challenging issue especially with regard to choosing the correct statistical unit [29,34,35]. On the other hand, mice are social animals in nature, and in accordance to underlying legislation [1], single housing should be avoided under experimental conditions if possible. Furthermore, it is arguable whether choice decisions of individually kept animals can

be transferred one-to-one to animals in a social group resembling realistic laboratory conditions [29]. Future studies with individually housed mice could add important data to improve housing conditions for single housed animals, which may be unavoidable under some experimental constraints. With regard to ranking the items, we argue, if the strength of individual preference is so small that it is overridden by the peer pressure of the social group that this is probably an indication of only a small difference between the valence of the two items. Thus, we decided against testing individual animals and used the option of the home cage based choice experiment to study the mice as socially living animals within the group [36]. Furthermore, in addition to analyzing the results of all mice over the total test duration of 46 h, we subdivided the results into an active phase (dark) and inactive phase (light) of the mice [4,37]. This served to evaluate possible preferences associated with active (e.g., climbing, gnawing) or inactive (e.g., sleeping, resting) behaviors of the enrichment items by the mice.

To investigate whether the mice agreed in their choice of preference, we calculated a consensus error (CE) to display the amount of disagreement. Since this measure has only recently been introduced for scaling preferences [32] it is probably not easily interpreted intuitively. Generally speaking, low CE scores indicated a high agreement, whereas high scores reflect a low agreement. The CE is calculated for each item, based on the comparison with all other items and gives the mean percentage of disagreement regarding the ranked position of the respective item. For example, a CE of 50% means that on average 9 out of 12 animals agreed in their preference regarding that specific item.

Overall, the evaluation at the level of all mice of the three groups revealed a high average CE in all analyses and thus a lower agreement in choice, indicating different perceptions of enrichment within a group of mice. The individual group analysis showed that the rank positions of the tested enrichment elements sometimes varied greatly within their categories, resulting in a high overall CE. However, our assessment of follow and influence rates showed that this cannot be explained easily by dominance and following behavior. Therefore, the social dynamics underlying choice within a group are deemed to be more complex. In addition, the test items were freely available through the preference test, so the mice may not have perceived the test as forcing them to choose one or the other. We suggest that the difference in valence between the presented enrichment items may not have been large enough to provoke an unequivocal choice. This is also indicated by the percentage of intransitive rankings which show that individual mice did not always have a clear linear ranking when combining all data. Indeed, it has been shown that the CE and ratio of intransitivity is larger in rankings with low valence ranges compared to large valence ranges in the data provided with the R-package *SimsalRbim* [32]. Therefore we assume that the differences of valences within the categories were not sufficient to come to unequivocal rankings.

Foraging enrichments were ranked with closely spaced worth values in all assessments. Only the lattice ball stands out with a high worth value, both at the group level and at the overall level. This is also reflected in the CE, which was the lowest in all calculations for the entire period at 29.17% (CE in 46 h of all mice; roughly speaking the CE indicates that on average 10 out of 12 mice preferred the lattice ball). Unlike the other enrichment items in the same category, the lattice ball was attached to the cage top using a metal ball chain, while the tube with stones, the flappuzzle, the slidingpuzzle, and the treatball were placed on the floor, resulting in high visual and functional differences. Due to the fact that after pulling paper out of the ball and eating the millet, the mice were still able to interact with the ball as a moving object to gnaw at or to climb on, it might have been more interesting and hence preferred to interact with. In addition, during the cleaning process, we observed that mice used the extracted paper strips from the lattice ball as additional nesting material. In fact, it has already been established that the combination of different materials for nest building is common in mice [28,38].



Indeed, nesting material is highly valued by mice [33,39] and the motivation to build nests is strong [40,41]. The direct association of the lattice ball with supplementary nesting material may explain the preference for this side of the testing system also during the inactive phase of the mice. Our parallel study investigating the use of the lattice ball in the home cage showed that the active interaction with this design element was less frequent than with other foraging elements of the same category during the active phase [42]. However, in that study the use was evaluated by direct observation during a 30-minute period in the presence of other enrichment elements from other categories. In the present study the data was obtained over two circadian cycles in a binary choice test which might be more conclusive with regard to the overall attractiveness. The elements 'treatball', 'slidingpuzzle', 'flappuzzle', and the 'tube filled with stones' led to inconsistent scores in the worth values and thus low ranking positions in the evaluation at individual group and overall level. Nevertheless, they might serve as cognitive stimulation for mice and enable natural behaviors like burrowing and foraging. This is especially true when considering the high active usage while the elements were filled with millet seeds as additional treats.

Structural elements did also not reveal a complete unequivocally ranking which is again indicated by high values for the CE. However, within this category the second plane and the rope were highly ranked during both the active and inactive time of the mice. The second plane serves as a climbing element as well as for gnawing and as a refuge and sleeping place. The multifunctionality offers a wider range of possibilities for interaction compared to simpler climbing enrichments (i.e., mouseswing, clip with paper or plastic tube, rope). Our previous study found a high rate of second plane-use by mice in video analyses, supporting this hypothesis [42]. Leach et al. [43] also acknowledged a platform-like insert for mouse cages as an appealing enrichment element for mice with its dual function as a resting place and as an object that encourages exploration, jumping, and hiding. In addition, we observed that mice frequently built their nests under the second plane, both during the previous housing period as well as under the test conditions. The other structural enrichment, which was also ranked in high position, was the rope. In contrast, the evaluation of short-term usage in a previous study revealed this item, along with other climbing enrichments that were fixed at the cage top, to be less used when it was presented in a combination of enrichments [42]. The rope was made of hemp and similar to the paper strips derived from the lattice ball, fragments of gnawed hemp ropes were used as additional nesting material. Therefore, the known attractiveness of nesting material [33,39] and the strong motivation to build nests [40,41] might explain the high rank of the cage containing the rope. This again shows that long-term observations are helpful to obtain more conclusive information about the overall attractiveness of the respective enrichment elements. Gjendal et al. [44] found hemp ropes to strengthen the participation in social behavior and encouraging climbing and gnawing behavior in male mice without adverse effects on anxiety levels, stress and aggressive behavior. Hemp ropes can therefore be applied as a simple and inexpensive enrichment for mice and serve as climbing, gnawing, and supplementary nesting material.

Housing enrichment worth values were closely spaced, with apparent differences between groups, and elements partially achieving a reversed ranking. Accordingly, the CEs were considerably high for the overall rating of housing enrichment. Especially in the inactive time, CE ranging from 71% to 79% indicate that only 7 to 8 out of 12 mice had a similar preference on average. Interestingly, van Loo et al. [26] found a paperhousing comparable to the one we used to be preferred over a triangular plastic house. Therefore, we expected the paperhouse to be valued highly more consistently, however, this could not be confirmed unequivocally in our preference tests for all individual groups. Nonetheless, the paperhouse achieved the second place rank during the total and first place rank during the active time in the overall ranking.

Indeed, a video observation revealed the frequent use of the paperhouse during the active phase of the mice [42]. Apparently, the lightweight and easily manipulated structure makes the paperhouse attractive as a movable and changeable object with which the home cage can be actively configured. The floorhouse was also rated highly and seems to promote behaviors such as climbing, hiding and exploring more strongly. Due to its platform-like structure, it also offers a larger additional surface area for these types of behavior. Conversely, the houseball provides the least surface and was ranked to the lowest positions overall and during active time. During the inactive phase, no housing enrichment achieved a clear preference and all houses ranked closely spaced. This suggests that even though nest boxes are perceived as important exploratory objects for mice during the active phase rather than just a mere refuge and sleeping area [33,45], there is little difference in use during the inactive period. It also shows that when mice are asked about their preference for provided items, the answer may be based on a different way of using these items than was expected by the experimenter. It is already established that mice prefer a cage with a nest box to a cage without a nest box [45]. Provision of nest boxes and nesting material increases animal welfare without negatively impacting data variability [14] and therefore, should be provided as an essential enrichment for mice [3]. Since the nest box serves more than just shelter, the choice of design should also take into account the activity-promoting effect of the housing enrichment. Therefore, factors such as additional space or the changeable structure make the floorhouse and paperhouse recommendable.

To determine the effectiveness of enrichment items, it is essential not only to conduct preference tests, but also to examine the ways in which enrichment items are used [20]. Evaluation of the type and amount of interaction via behavioral analysis is therefore deemed an important component to create more species-appropriate housing conditions for mice [42]. Although we cannot provide a statement about the motivational strength [4,22,46], the experimental design used here allows ranking of the different design elements. Determination of motivational strength to obtain resources can be achieved through consumer demand tests and represents the price, for example in form of lever presses or nose pokes [4,47] that an individual is willing to pay for access to certain enrichment elements [4,19,23]. Nevertheless, our study shows that when mice have a say, judgments about a reasonable type of enrichment can be made in a somewhat more evidence-based manner.

The age of the mice used in our study was approximately one year, which is generally an unusually old age for mice used in biomedical research. Data on the influence of age on preferences for enrichment is sparse, for example, van Loo et al, 2004 [48] found that preference in male mice for nest material was high at all ages, but preference for social contact increased with age. Although we would not expect dramatic changes in preference for the presented enrichment items with age, our results may be especially relevant for older mice, such as those used in Alzheimer's research or research on aging processes.

Overall, the high CEs in our study, especially for housing and structural enrichment, reflects individual differences in the assessment of the different enrichment elements from the perspective of each mouse. It should also be borne in mind that objects that are very similar cannot always be clearly distinguished from each other in terms of their valence [32]. However, the fact that not all animals have always made a clear choice does not in any way indicate in principle that enrichment is superfluous. On the contrary, a comprehensive body of literature [2–4,6–8,10–15,20,49] shows positive effects of enrichment. From our study, in addition to practical recommendations, we can also derive the possibility of using different enrichment elements as a means of variation without depriving the mice of any one enrichment item that they would desperately want.

Indeed, to create an interesting and stimulating living environment for mice, it is important to provide variety through regular exchanges. Varied housing can help prevent behavioral

deprivation [50,51] and behavioral disorders [52] in laboratory animals by enabling species-specific behaviors. Furthermore boredom in laboratory animals [53,54] in its severe chronic forms shares symptoms with learned helplessness and depression and should therefore be treated as an important animal welfare concern [55]. There might be concerns that improving housing conditions lead to changes of brain and behavior and thus data derived from these models being less comparable to literature data based upon impoverished housing. We argue that data that could only be reproduced under the same impoverished conditions would severely lack external validity and thus be scientifically doubtful [56]. In translational research it is aimed to infer conclusions from animal models to human conditions; any lack of normal behavioral development of the model species therefore must be seen as a factor which worsens the translational value. Therefore it should be the ambition of every experimenter to improve the well-being of laboratory animals and thus enhance the quality of animal experiments [57]. Legal husbandry regulations [1] should indeed be considered as a minimum requirement that does not place an upper limit on the genuine improvement of living conditions of laboratory animals [21].

## Conclusions

In our study, preferences for different enrichment items were evaluated in female C57BL/6J mice using a home cage based preference test system. This easy-to-use method for translating binary preferences into scaling a number of enrichment items according to calculated worth values facilitates decisions on the use of enrichment in laboratory husbandry. As foraging enrichment, the lattice ball with its multifunctional character of activity stimulation and its content of paper strips as additional nesting material achieved high worth values. A rope made of hemp also achieved high position in the worth scale and serves as a structural element for climbing, gnawing, and providing additional nesting material. As a structural enhancement, a second level of wood, used both as a resting place and for active engagement, was at the top of the ranking. No clear preferences were found for the type of housing during the inactive period of the mice. This indicates that all housings presented for selection were basically suitable as sleeping places.

High CEs within the studied rankings suggest a strong individuality in the perception of the enrichment elements. Therefore, a multifaceted enrichment approach should be considered to meet the needs of individual mice. Increasing the complexity of housing for laboratory mice toward a more stimulating environment allows them to exhibit a more species-specific behavioral repertoire, potentially leading to more reliable animal models in biomedical research.

## Materials and methods

### Ethical approval

All experiments were approved by the Berlin state authority, Landesamt für Gesundheit und Soziales, under license No. G 0069/18 and were in accordance with the German Animal Protection Law (TierSchG, TierSchVersV). The study was pre-registered in the Animal Study Registry (ASR, DOI [10.17590/asr.0000162](https://doi.org/10.17590/asr.0000162)) and is reported in accordance with ARRIVE guidelines (<https://arriveguidelines.org>).

### Animals and housing condition

Twelve female C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH (Sulzfeld). The sample size was chosen to ensure a statistical power of 80% and an alpha value of 0.05. Due to the exploratory experimental

approach, the effect size is unknown and had to be estimated on the basis of published studies with comparable experimental designs as well as own experiments from our laboratory. The mice were 7–8 weeks of age upon arrival in the animal facilities. Mice were randomly allocated to groups of four animals in Makrolon type III cages by a researcher not involved in the experiment; animals were alternately assigned to the groups (1,2,3) to avoid bias. During the first three weeks the animals were housed in groups of four animals in type III Makrolon cages (L x W x H: 425 x 265 x 150 mm, Tecniplast, Italy) with aspen bedding material (Polar Granulate 2–3 MM, Altromin), paper (cellulose paper unbleached 20x20 cm, Lohmann & Rauscher International GmbH & CO KG) and cotton roll nesting material (dental cotton roll size 3, MED-COMFORT), a 15 cm transparent plexiglas tube (Ø 4cm PMMA xt1, Gehr1) and a red triangle plastic house (mouse house, TECNIPLAST1). They were provided with regular rodent food (autoclaved pellet diet, LAS QC Diet, Rod 16, Lasvendi, Germany) and tap water ad libitum. Room temperature was maintained at 22°C (+/- 2), room humidity at 55% (+/- 15) and a 12/12 light/dark cycle regimen (lights off 20:00) with simulated sunrise between 7:30 and 8:00 using a Wake-up light (HF3510, Philips, Germany). To further implement refinement procedures according to the 3Rs [58] all mice were trained to tunnel handling [59] daily during the habituation phase and tunnel handling was used throughout the whole experiment.

At the age of eleven weeks mice were provided with cage enrichment. Cages were cleaned weekly and each mouse was subjected to a visual health check. The enrichment scheme consisted of permanently provided items (running disc with mouse igloo, paper nesting, cotton rolls, Table 2) and five weekly rotating items from structural, housing, nesting and foraging categories (See Tables 2 and 3). These enrichment items were randomly exchanged during the weekly cage cleaning. Randomization of the enrichment combination was done with the use of the function `randomize()` in the software R (version 4.0.4). To motivate the mice in solving the riddles of the foraging enrichment category, a small amount of millet seeds was provided in the morning inside the riddle during the daily animal inspection. Prior to the preference experiments, the mice were used in another behavioral experiment [42] to observe the usage of the enrichment items but they stayed in the above-mentioned housing conditions.

### Animal identification

For individual animal identification, all animals were provided with a RFID transponder (ISO 11784/85, FDX-B transponders, Planet ID1) under the skin of the dorsal neck region in rostro caudal implantation direction. This procedure took place at the age of 9–10 weeks under general isoflurane anesthesia and pain reliever (Metacam1).










Additionally, all mice were color-coded weekly on the tail with a permanent marker (Edding1 750) to easily distinguish them in daily visual and weekly health checks.

### Preference testing

After 43 weeks in the enriched housing condition, preference tests were conducted using the Mouse Positioning and Surveillance System (MoPSS) [29]. The system consisted of two macrolon type III cages, connected with a 30 cm plexiglas tube. Two RFID antennas were attached outside the tube. Inside the tube, plastic barriers were installed in order to slow down mouse movement (see Fig 3). The RFID antennas were connected to a reader, which recorded the mouse movements between the left and right cage through detection of the implanted RFID transponder.













The mice remained in their group of four animals, and three preference systems were used in parallel. The systems were positioned in a row on a steel table, in an experimental room with the same environmental conditions as during the housing period.

**Table 2. Used enrichment items.** Permanently available enrichment items used during housing period prior to or during MoPSS preference testing.

deployment	enrichment item	
standard house in MoPSS experiment	<p><b>triangular house</b> (mouse house, TECNIPLAST1)</p>	
housing used in housing period	<p><b>running wheel</b> (fast-trac + mouse igloo, Bio-Serv1)</p>	
permanently available (housing and MoPSS experiment)	<p><b>paper nesting</b> (cellulose paper unbleached 20x20 cm, Lohmann &amp; Rauscher International GmbH &amp; CO KG)</p>	
	<p><b>cotton roll</b> (dental cotton roll size 3, MED-COMFORT)</p>	
nesting used in housing period in home cage	<p><b>fine wood wool</b> (H0234-NBF, ABEDD1)</p>	
	<p><b>coarse wood wool</b> (H0234-NBU, ABEDD1)</p>	
	<p><b>square hemp pads</b> (H3279-10 eco- hemp, ssniff Spezialda'ten GmbH)</p>	
	<p><b>folded paper strips</b> (sizzlenest1, datesand Ltd)</p>	
	<p><b>mid coarse wood wool</b> (NBGE012, ABEDD1)</p>	






<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.t002>

Table 3. Tested enrichment items.

category	enrichment item	
housing	<b>houseball</b> (crawlball, Bio-Serv1)	
	<b>floorhouse</b> (safe harbor, Bio-Serv1)	
	<b>paperhouse</b> (LBS Serving Biotechnology)	
	<b>wooden angle</b> (climbing roof, ABEDD1)	
	<b>holed wooden angle</b> (holed climbing roof, ABEDD1)	
structural	<b>second plane, 1 hole</b> (1 hole lying boards for cage type III, ABEDD1)	
	<b>second plane, 2 holes</b> (2 hole lying boards for cage type III, ABEDD1)	
	<b>clip with paper tube</b> (38 x 1.25 x 75 mm play tunnel and tunnel clip, Datesand Ltd)	
	<b>clip with plastic tube</b> (Plexiglas tube transparent 70mm Ø, KUS and tunnel clip, Datesand Ltd)	
	<b>mouseswing</b> (single mouse swing, Datesand Ltd)	
	<b>mouseswing double</b> (double mouse swing, Datesand Ltd)	
	<b>rope</b> (jute yarn 6-ply, 6mm, Rayher 4200531)	

(Continued)

Table 3. (Continued)

category	enrichment item	
foraging	<p><b>treatball</b> (self-designed and printed with Filamentworld schneeweiß PLA, <a href="https://tinyurl.com/3dtreatball">https://tinyurl.com/3dtreatball</a>)</p>	
	<p><b>slidingpuzzle</b> (Interactive Smart Toy, Living World1 green)</p>	
	<p><b>tube with stones</b> (mouse tunnel, Bio-Serv1 and white marble pebbles 15–25 mm Ø, Min2C Natural Minerals)</p>	
	<p><b>lattice ball with metal chain</b> (Hol-ee Roller1 size mini, JW1)</p>	
	<p><b>flappuzzle</b> (self-designed and printed with Filamentworld PLA, <a href="https://tinyurl.com/3dflappuzzle">https://tinyurl.com/3dflappuzzle</a>)</p>	

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.t003>



Fig 3. The Mouse Positioning and Surveillance System (MoPSS).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709.g003>

To achieve the same lighting conditions for the left and right cage of the preference system, four LED lights (Brennenstuhl1 Dinora 5000 Baustrahler 47 W 5000 lm Tageslicht-Weiß 1171580) on tripods were set up pointing towards the ceiling. Light intensity in both test cages was checked with a lux meter (voltcraft1 light meter MS-1300).

The testing cages were outfitted with 150 g aspen bedding (Polar Granulate 2–3 MM, Altromin), a red translucent triangular plastic house, three uncolored paper towels, two cotton rolls, and water and rodent food (autoclaved pellet diet, LAS QCDiet, Rod 16, Lasvendi, Germany) ad libitum with same amount on each side (see Table 2 for equipment details). Enrichment items placed into the cages were visible so that a full blinded design was not achievable. However, the automated recording of the behavioral data in the absence of the experimenter excluded any possible influence.

Enrichment items of one category each were randomly presented twice for 23 hours starting at 10:00 am until 9:00 am the following day. Comparisons were made of two enrichments from the same category each time. This was done in order to come to results that are interpretable with regard to the prospective utility the items hold within their respective category. For example, during the inactive phase we would expect a clear preference for a cage where a housing enrichment was placed if no housing but an element of the foraging category was placed in the other cage. Therefore comparing only items from the same category helps to avoid misleading conclusions. Between the two sessions using the same items, the enrichment items were switched between the cages to counterbalance possible side preferences. In addition also the nesting material and bedding was mixed between the left and right cage and the mice were supplied with their daily amount of millet seeds. The first category tested was the 'structural enrichments' followed by the 'foraging enrichments' and the 'housing enrichments'. Two days before the first preference test, the mice were introduced to the experimental setup including the MoPSS for habituation. Over a period of 15 weeks, systematic comparisons were thus subsequently made to obtain the data for the preference analysis. After completion of the experiments in this work, the animals remained in their housing conditions and were used for further studies.

### Analysis of preference

The mouse tag detections were automatically saved onto a microSD card during the experiment and each detection was marked by a current timestamp with the antenna number (left/right) and the individual mouse RFID tag number. Data analysis and sanity checks with logical correction of missing detections were done using a data evaluation script in the software R (R version 4.0.4, R Studio version 1.3.959) specially developed for MoPSS data analysis [29]. No missing data were found, all mice were regularly detected and none had to be excluded from analysis of stay times. Stay times for each of the twelve mice in each cage side were calculated as times between cage changes when a mouse tag was detected at a new cage. It has been shown that the time spent in the tube is negligible for preference calculation [29] and therefore we did not subtract the time spent passing the tube. Stay durations over the 46 hours testing period of each single experiment were summed up for each mouse and then calculated as percentage of the total time. Over the entire test period, the mice spent almost 50% (49%–51%) of their stay time on each side of the preference test system, so a dominant side preference could not be found. All data was analyzed both at group/cage level and in relation to the length of stay of all individual mice over the total period of 46 hours and over the light and dark phase representing the activity phases of the mice. The calculated percentages of stay durations were then used for comparison of side preferences (left vs. right cage) for enrichment one and enrichment two including a side switch of the presented items. The raw data with stay durations in percentage during the complete 46 hours testing period and divided into the active and inactive time period can be found in the supplementary material (S1–S3 Tables).



To rank the tested enrichment items regarding the strength of the preference for each item, a method developed by Hatzinger et al. 2012 [31] of combining the multiple single binary choices to a 'worth value' was performed using R and the package `simsalRbim` [32]. A similar method was used by Hopper et al. 2019 to determine the worth value of different items of food rated by a male gorilla [60]. In short, to estimate the position of an item, the 'worth value' of each enrichment item was calculated based on the `prefmod` package [31] with its fit to a log-linear Bradley-Terry model (LLBT). The LLBT was specifically made for paired-comparison testing and estimates a subject's relative 'worth value' for each choice on a probability of preference scale that sums to 1 [31]. Greater probability of preference is represented here by a higher 'worth value'.

To determine the agreement amongst the mice regarding the 'worth value' for each ranked enrichment item and its estimated position on the scale, a consensus error (CE) was also calculated using the `simsalRbim` package [32]. A detailed example of the calculation of the CE can be found on the `simsalRbim` homepage [32]. In brief, the CE reflects the extent of agreement that the mice showed regarding the preference for a certain enrichment in binary choices over the other tested enrichment items. A value of 0% points to a perfect agreement of a ranking position and 100% indicates a full disagreement of all individual mice (i.e., 6 mice prefer item A while the other 6 mice prefer item B). It should be noted that CE is biased by the number of individuals, with low numbers resulting in CE being significantly more affected by a single animal. In our presentation of the cage wise preferences we therefore refrained from calculating the CE as the ratings are based on a choice of only 4 animals. As a second measure of quality of the determined rankings the percentage of intransitivity was calculated. In brief, an intransitive triplets is an indecisive ranking of three elements with  $A > B > C > A$ . In a ranking with 5 elements, these elements can be divided into 10 possible triplets. Intransitive choices are measured per individual and therefore with 12 mice there are overall 120 triplets in the rankings for each category that can be either transitive (consistent in their order) or intransitive. The ratio of intransitivity is calculated as the percentage of intransitive triplets from all 120 possible triplets using the `simsalRbim` package [32]. A high percentage of such intransitive triplets indicates that there is no clear individual consistency regarding the ranking of the items.

All analyses were run in R version 4.0.4 using RStudio (Version 1.3.959).

### Sample size

It is debated whether or not group housed animals can be unequivocally considered to act independently in their choice and therefore each cage would have to be considered as one independent sample [29,34,35,61]. This presents a dilemma because the mice would either have to be housed individually or the total number of experimental animals would have to be increased by the use of additional cages. As we are explicitly interested in the preference for enrichment items under common social conditions, housing mice singly was not an option. With regard to keeping the overall number of experimental animals as low as possible in the light of the 3Rs, we calculated that 12 mice would be a reasonable sample size if they indeed act independently. In order to demonstrate that individual preference was an independent choice, we conducted a follow and influence behavior analysis using R (Version 4.0.4) with our obtained experimental data from the MoPSS. A follow event was defined as a transition of one mouse directly detected within one second after another mouse. The leading mouse detected in this constellation received an influencer event. We further calculated a follow rate and influence rate as follows:

$$\text{follow rate} = \frac{\text{follow events}}{\text{total transitions}}$$

$$\text{influence rate } \frac{1}{4} = \frac{\text{influence events}}{\text{total transitions}}$$

In addition, we analyzed the time each possible pair of two mice spent in the same cage over the course of the study (S1 Fig). While a strong preference for a certain cage (or any given resource therein) will lead to an overall increase of the time all pairs spend together, this analysis especially allows to detect if certain individuals avoid each other. Such avoidance might indicate, for example, a dominance hierarchy in which one individual monopolizes a resource.

## Supporting information

**S1 Fig. The experimental time (days 1–60) in percent spent by the mice within the same compartment of the MoPSS test system (left and right cage) divided by Group 1 (n = 4), 2 (n = 4) and 3 (n = 4) and observational period (active time, inactive time, total time).** Mice were displayed as couples (m1-m2: mouse 1 and mouse 2, m1-m3: mouse 1 and mouse 3, m1-m4: mouse 1 and mouse 4, m2-m3: mouse 2 and mouse 3, m2-m4: mouse 2 and mouse 4, m3-m4: mouse 3 and mouse 4).

(TIF)

**S1 Table. Raw data with stay durations in percentage of the 12 mice during the whole 46 hours.**

(PDF)

**S2 Table. Raw data with stay durations in percentage of the 12 mice during the active time period.**

(PDF)

**S3 Table. Raw data with stay durations in percentage of the 12 mice during the inactive time period.**

(PDF)

## Acknowledgments

The authors thank the animal caretakers of the Federal Institute of risk assessment, especially Carola Schwarck and Lisa Gordijenko, for their support in the animal husbandry.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Ute Hobbiesiefken, Lars Lewejohann.

**Data curation:** Ute Hobbiesiefken.

**Formal analysis:** Ute Hobbiesiefken.

**Funding acquisition:** Lars Lewejohann.

**Investigation:** Ute Hobbiesiefken.

**Methodology:** Ute Hobbiesiefken.

**Project administration:** Kai Diederich, Lars Lewejohann.

**Software:** Birk Urmersbach, Anne Jaap.

**Supervision:** Kai Diederich, Lars Lewejohann.

**Visualization:** Ute Hobbiesiefken.

**Writing – original draft:** Ute Hobbiesiefken.

**Writing – review & editing:** Birk Urmersbach, Anne Jaap, Kai Diederich, Lars Lewejohann.

## References

1. The European Parliament, The Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Internet]. European Union; 2010. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>.
2. Newberry RC. Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl Anim Behav Sci*. 1995; 44(2–4):229–43.
3. Olsson IAS, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: A review of “environmental enrichment.” *Lab Anim*. 2002; 36(3):243–70.
4. Lewejohann L, Sachser N. Evaluation of different housing conditions for male laboratory mice by means of preference tests. *KTBL SCHRIFT*. 2000;170–7.
5. Duncan IJH, Olsson IAS. Environmental enrichment: from flawed concept to pseudo-science. In: *Proceedings International Congress of the ISAE 2001*, Davis, USA. 2001.
6. Hutchinson E, Avery A, VandeWoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J*. 2005; 46(2):148–61. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.148> PMID: 15775024
7. Bailoo JD, Murphy E, Boada-Sana M, Varholick JA, Hintze S, Baussiere C, et al. Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Front Behav Neurosci*. 2018 Oct 26; 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00232> PMID: 30416435
8. Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien JZ. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*. 2001; 41(6):779–90. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00122-8](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00122-8) PMID: 11640933
9. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(3):191–8.
10. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*. 1997; 386(1995):493–5.
11. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x> PMID: 15341605
12. Van de Weerd HA, Aarsen EL, Mulder A, Kruitwagen CLJJ, Hendriksen CFM, Baumans V. Effects of environmental enrichment for mice: Variation in experimental results. *J Appl Anim Welf Sci*. 2002; 5(2):87–109. [https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0502\\_01](https://doi.org/10.1207/S15327604JAWS0502_01) PMID: 12738579
13. Andre´ V, Gau C, Scheideler A, Aguilar-Pimentel JA, Amarie O V., Becker L, et al. Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol*. 2018; 16(4):1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005019> PMID: 29659570
14. Baumans V, van Loo PLP, 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):101–14.
15. Gross AN, Richter SH, Engel AKJ, Wu¨rbel H. Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behav Brain Res*. 2012 Sep 1; 234(1):61–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.06.007> PMID: 22721674
16. Key D. Environmental Enrichment Options for Laboratory Rats and Mice. *Lab Anim (NY)*. 2004; 33(2):39–44. <https://doi.org/10.1038/labon0204-39> PMID: 15235645
17. van de Weerd HA. Environmental Enrichment for Laboratory Rodents: Preferences and Consequences [Internet]. 1996. Available from: <http://ilarjournal.oxfordjournals.org/content/46/2/148.full>.
18. Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J*. 2005; 46(2):162–70. <https://doi.org/10.1093/ilar.46.2.162> PMID: 15775025
19. Dawkins MS. From an animal’s point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behav Brain Sci*. 2011/05/19. 1990; 13(1):1–9.
20. Baumans V, Van Loo PLP. How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *Vet J*. 2013; 195(1):24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.09.023> PMID: 23127868

21. Lewejohann L, Schwabe K, Ha'ger C, Jirkof P. Impulse for animal welfare outside the experiment. *Lab Anim.* 2020; 54(2):23677219891754. <https://doi.org/10.1177/0023677219891754> PMID: 32050843
22. Habedank A, Kahnau P, Diederich K, Lewejohann L. Severity assessment from an animal's point of view. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2018; 31(7–8):304–20.
23. Dawkins MS. A user's guide to animal welfare science. *Trends Ecol Evol.* 2006; 21(2):77–82. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.017> PMID: 16701478
24. Lewejohann L, Reinhard C, Schrewe A, Brandewiede J, Haemisch A, Goertz N, et al. Environmental bias? Effects of housing conditions, laboratory environment and experimenter on behavioral tests. *Genes, Brain Behav.* 2006 Mar; 5(1):64–72. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2005.00140.x> PMID: 16436190
25. Wahlsten D, Metten P, Phillips TJ, Boehm SL, 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. <https://doi.org/10.1002/neu.10173> PMID: 12486710
26. van Loo PLP, Blom HJM, Meijer MK, Baumans V. Assessment of the use of two commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. *Lab Anim.* 2005; 39(1):58–67. <https://doi.org/10.1258/0023677052886501> PMID: 15703125
27. Sherwin CM. Preferences of laboratory mice for characteristics of soiling sites. *Anim Welf.* 1996; 5(3):283–8.
28. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim.* 1997 Apr 1; 31(2):133–43. <https://doi.org/10.1258/002367797780600152> PMID: 9175010
29. Habedank A, Birk Urmersbach , Kahnau P, Lewejohann L. O mouse, where art thou? The Mouse Position Surveillance System (MoPSS)—an RFID-based tracking system. *Behav Res Methods.* 2021; <https://doi.org/10.3758/s13428-021-01593-7> PMID: 34346041
30. Mekada K, Abe K, Murakami A, Nakamura S, Nakata H, Moriwaki K, et al. Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim.* 2009; 58(2):141–9. <https://doi.org/10.1538/expanim.58.141> PMID: 19448337
31. Hatzinger R; RD. *prefmod: An R Package for Modeling Preferences Based on Paired Comparisons, Rankings, or Ratings.* Wiley Interdiscip Rev Comput Stat. 2012; 1(1):128–9.
32. Talbot S, Pfefferle D, Brockhausen R, Lewejohann L. *simsalRbim*—A package for preference test simulations [Internet]. [cited 2020 Jun 1]. Available from: <https://talbotsr.com/simsalRbim/index.html>.
33. 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(3–4):369–82.
34. Parsons NR, Teare MD, Sitch AJ. Unit of analysis issues in laboratory-based research. *Elife.* 2018; 7:1–25. <https://doi.org/10.7554/eLife.32486> PMID: 29319501
35. Bello NM, Kramer M, Tempelman RJ, Stroup WW, St-Pierre NR, Craig BA, et al. Short communication: On recognizing the proper experimental unit in animal studies in the dairy sciences. *J Dairy Sci.* 2016; 99(11):8871–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11516> PMID: 27614832
36. Gaskill BN, Rohr SA, Pajor EA, Lucas JR, Garner JP. Some like it hot: Mouse temperature preferences in laboratory housing. *Appl Anim Behav Sci.* 2009 Jan 31; 116(2–4):279–85.
37. Freymann J, Tsai P-P, Stelzer H, Hackbarth H. The amount of cage bedding preferred by female BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim (NY).* 2015; 44(1):17–22. <https://doi.org/10.1038/labanim.659> PMID: 25526055
38. Van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, Van Zutphen LFM. Nesting material as enrichment in two mouse strains. In: *Frontiers in Laboratory Animal Science: Joint International Conference of ICLAS, Scand-LAS and FinLAS.* 1996. p. 119–23.
39. Roper TJ. Nesting material as a reinforcer for female mice. *Anim Behav.* 1973; 21(4):733–40.
40. Deacon RMJ. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc.* 2006 Aug; 1(3):1117–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170> PMID: 17406392
41. 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(3):261–89.
42. Hobbiesiefken U, Mieske P, Lewejohann L, Diederich K. Evaluation of different types of enrichment—their usage and effect on home cage behavior in female mice. *PLoS One.* 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876> PMID: 34941949
43. Leach MC, Ambrose N, Bowell VJ, Morton DB. The Development of a Novel Form of Mouse Cage Enrichment. *J Appl Anim Welf Sci.* 2000; 3(2):81–91.

44. Gjendal K, Sørensen DB, Kiersgaard MK, Ottesen JL. Hang on: An evaluation of the hemp rope as environmental enrichment in C57BL/6 mice. *Anim Welf.* 2017; 26(4):437–47.
45. Van de Weerd HA, Van Loo PLP, Van Zutphen LFM, Koolhaus JM, Baumans V. Preferences for nest boxes as environmental enrichment for laboratory mice. *Anim WELFARE-POTTERS BAR-*. 1998; 7:11–26.
46. Kirkden RD, Pajor EA. Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. *Appl Anim Behav Sci.* 2006; 100(1–2):29–47.
47. Kahnau P, Jaap A, Diederich K, Gygas L, Rudeck J, Lewejohann L. Determining the value of preferred goods based on consumer demand in a home-cage based test for mice. *Behav Res Methods* subm. 2022.
48. van Loo PLP, van De Weerd HA, van Zutphen LFM, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim.* 2004; 38(2):178–88. <https://doi.org/10.1258/002367704322968867> PMID: 15070458
49. van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci.* 1999; 2(3):266–70. <https://doi.org/10.1038/6368> PMID: 10195220
50. Dawkins MS. Behavioural deprivation: A central problem in animal welfare. *Appl Anim Behav Sci.* 1988; 20(3–4):209–25.
51. Mason GJ, Burn CC. Behavioral Restriction. 2011;98–119.
52. Gross ANM, Engel AKJ, Würbel H. Simply a nest? Effects of different enrichments on stereotypic and anxiety-related behaviour in mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2011.
53. Meagher RK, Mason GJ. Environmental Enrichment Reduces Signs of Boredom in Caged Mink. *PLoS One.* 2012; 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049180> PMID: 23155462
54. Burn CC. Bestial boredom: a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation. *Anim Behav.* 2017; 130:141–51.
55. Meagher RK. Is boredom an animal welfare concern? *Anim Welf.* 2019; 28(1):21–32.
56. Voelkl B, Würbel H, Krzywinski M, Altman N. The standardization fallacy. *Nat Methods.* 2021; 18(1):5–7. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01036-9> PMID: 33408399
57. Richter SH, von Kortzfleisch V. Reply to 'It is time for an empirically informed paradigm shift in animal research.' *Nat Rev Neurosci.* 2020; 21(11):661–2.
58. Russell W, Burch R. *The principles of Humane Experimental Technique.* Methuen; 1959.
59. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods.* 2010; 7(10):825–6. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500> PMID: 20835246
60. Hopper LM, Egelkamp CL, Fidino M, Ross SR. An assessment of touchscreens for testing primate food preferences and valuations. *Behav Res Methods.* 2019; 51(2):639–50. <https://doi.org/10.3758/s13428-018-1065-0> PMID: 29949070
61. Kappel S, Hawkins P, Mendl MT. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals.* 2017; 7(88).



## 4 Diskussion

Auch wenn die Anzahl an tierversuchsfreien Alternativmethoden, beispielsweise für die biomedizinische Grundlagenforschung und Arzneimittelentwicklung, erfreulicherweise stetig steigt, kann bis dato noch nicht vollständig auf Tierversuche in der Forschung und Entwicklung verzichtet werden. Eine konsequente Umsetzung von Refinementmaßnahmen nach dem 3R-Prinzip, wie in der RL 2010/63/EU für Tierversuche gefordert, ist daher essenziell, um Schmerzen, Leiden und Schäden von Versuchstieren so gering wie möglich zu halten. Zu der Zeit, die Versuchstiere im eigentlichen kurzen Versuchsverfahren verbringen, zählt ebenfalls die nicht unerheblich lange Haltungszeit der Tiere außerhalb des eigentlichen Tierversuchs. Daher müssen sich Refinementmaßnahmen neben der Anwendung möglichst schonender Versuchsmethoden ebenfalls auf die Verbesserung der Haltungsbedingungen von Versuchstieren erstrecken. Momentane eher karge Haltungsstandards von Versuchstieren befriedigen Grundbedürfnisse, wie die Versorgung mit Nahrung und die Darbietung eines Schlafplatzes, erfüllen jedoch nicht die Darbietung einer hinreichend komplexen Umgebung, um die Ausübung spezies-spezifischen Verhaltens, wie in der RL 2010/63/EU gefordert, für die Tiere zu ermöglichen. Eine Maßnahme, um die Komplexität der direkten Haltungsumgebung von Versuchstieren zu erhöhen, ist es, die Käfige durch Ausgestaltungselemente, so genannte Environmental Enrichments, anzureichern. Ziel der angebotenen Ausgestaltungselemente sollte dabei immer die Steigerung des Tierwohls sein. Dies kann durch die Beurteilung von physiologischen, verhaltensbezogenen und neurochemischen Parametern für EE ermittelt werden und sollte ebenfalls die Sicht der Tiere selbst einbeziehen. So belegen zahlreiche Studien eine Steigerung tierwohl-assoziierter Parameter durch eine mit EE Elementen angereicherte Umgebung bei Versuchsmäusen (**Kapitel 2.5.1.**). Die bisher vornehmlich anthropozentrisch basierte Wahl der EE Elemente kann durch die Befragung der Tiere, wie sie selbst die Ausgestaltungselemente wahrnehmen, verbessert werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit der Frage, wie Mäuse, die meistverwendete Tierart in Tierversuchen, selbst die angebotenen Ausgestaltungselemente wahrnehmen und welchen Einfluss die Ausgestaltungselemente auf das Heimatkäfigverhalten haben. Weibliche Mäuse des Stammes C57BL/6J, auf dem viele Krankheitsmodelle der biomedizinischen Forschung beruhen, wurden zur Eignung verschiedener kommerziell erhältlicher sowie selbst gestalteter Ausgestaltungselemente als EE (**Übersicht siehe Kapitel 3.2. Table 3. Tested enrichments Items**) zur Steigerung des Tierwohls befragt. Die ausgewählten Ausgestaltungselemente wurden vorab nach ihrer voraussichtlichen Funktion für die Mäuse in Käfig strukturierende Elemente (*Strukturelemente*), Futterrätzel (*Futtersuchelemente*), Behausungen (*Hauselemente*) und

Nestbaumaterial (*Nestmaterial*) unterteilt, zusätzlich wurde den Tieren eine Laufscheibe zur Verfügung gestellt (**Kapitel 3.1. und 3.2.**). Zunächst wurde zur Beurteilung, ob ein EE Element als tierwohlfördernd aus Sicht der Mäuse beurteilt werden kann, die Auswirkung auf das Heimatkäfigverhalten als Zusammenspiel komplexer physiologischer Prozesse des Gesamtstatus des Wohlbefindens (Olsson und Dahlborn, 2002) und das Körpergewicht im Vergleich zu einer wenig ausgestalteten Standardhaltungsbedingung untersucht (**Kapitel 3.1**). Zur Befragung der Mäuse selbst zur Wahl der EE Elemente wurde nachfolgend einerseits das Nutzungsverhalten der einzelnen Ausgestaltungselemente durch die Tiere in Videoaufnahmen des Heimatkäfigs analysiert (**Kapitel 3.1**) als auch automatisierte heimatkäfigbasierte binäre Wahlversuche zur Einordnung der EE Elemente in ein Präferenz-Wertesystem durchgeführt (**Kapitel 3.2**).

#### **4.1 Beurteilung des Heimatkäfigverhaltens und Nutzungsverhaltens von EE Elementen**

Um den Einfluss einer angereicherten gegenüber einer Standardhaltung auf das Heimatkäfigverhalten von Mäusen zu untersuchen, wurden weibliche C57BL/6J Mäuse über einen Zeitraum von 16 Wochen entweder in einer Standardhaltung („conventional“ oder CON mit Einstreu, Nestbaumaterial: Watterollen, Papiertüchern, dreieckigem Plastikhaus: TECNI-PLAST® mouse house) oder einer angereicherten Haltung („enriched“ oder ENR: Standardhaltung erweitert mit Ausgestaltungselementen) mit einer wöchentlich wechselnden Kombination von EE Elementen gehalten. Videoaufnahmen aus der aktiven Nachtzeit der Tiere wurden via Scan Sampling ausgewertet. Die Evaluation des Nutzungsverhaltens der EE Elemente fand nach 29 Wochen Haltungsphase in gleicher Weise videobasiert statt. Da die reguläre Befüllung der Futtersucheelemente am frühen Morgen erfolgte und die Tiere an dieses Prozedere gewöhnt waren und aktiv die angebotene Hirse erarbeiteten, wurden ebenfalls Videoaufnahmen am Morgen zur Analyse des Nutzungsverhaltens der *Futtersucheelemente* herangezogen. Eine detaillierte Methodenbeschreibung kann aus **Kapitel 3.1.** entnommen werden.

Vergleichend zur CON-Gruppe zeigte die ENR-Gruppe in tierwohl- assoziierten Verhaltensparametern eine Verringerung stereotyper Verhaltensweisen und inaktivem Verhalten und eine Erhöhung von eigenem Putzverhalten sowie Fressverhalten im Zusammenhang mit einem höheren Körpergewicht (**Kapitel 3.1. Fig. 5 und Fig. 6**). Es konnte kein Unterschied in der Zeit, die mit Trinken oder Putzen der Käfiggenossen verbracht wurde, zwischen CON und ENR festgestellt werden. Die Ausprägung stereotyper Verhaltensweisen kann als sensitiver Parameter zur Beurteilung des Tierwohls (**siehe Kapitel 2.5.1.**)



herangezogen werden und wird ursächlich mit einer reizarmen Haltungsbedingung in verschiedenen Tierarten, so auch Mäusen, in Verbindung gebracht (Powell et al., 1999; Mason und Rushen, 2006). Unser EE-Protokoll führte zu einer Reduktion stereotyper Verhaltensweisen bei den angereichert gehaltenen Mäusen, ähnlich zu den Ergebnissen vorangegangener Studien in Mäusen (Würbel et al., 1998; Lewejohann et al., 2009; Gross et al., 2011a; Jones et al., 2011). Zu den in dieser Arbeit reduzierten stereotypen Verhaltensweisen zählten das im Kreis laufen oder klettern (engl. route tracing und circling), das Rückwärtsspringen (engl. back flipping), repetitive Pendelbewegung des Oberkörpers entlang der Käfigwand (engl. wiping), das exzessive Buddeln auch ohne Substrat (engl. scratching) sowie das exzessive Benagen der Gitterstäbe (engl. bar-mouthing) (**Kapitel 3.1.**). Einige der genannten Verhaltensweisen entstehen bei den Mäusen aus Versuchen der kargen Haltung in Gefangenschaft zu entrinnen (Würbel et al., 1996; Würbel, 2006). Zunehmend wird stereotypes Verhalten beim Tier als negativ assoziierter Tierwohlparameter mit einem emotionalen Status der Langeweile bei Tieren in Verbindung gebracht (Burn, 2017; Mieske et al., 2022). Langeweile entsteht vornehmlich durch Vorhersagbarkeit, Monotonie und Begrenztheit (Toohey, 2011) und wurde bis dato vornehmlich beim Menschen untersucht. Diese von Toohey definierten Ursachen für die Entstehung von Langeweile treffen ebenso auf das Leben von Tieren in Gefangenschaft, wie Labortieren, zu. Neuere Studien, die sich mit der Untersuchung von Langeweile beschäftigen, bestätigen den Zusammenhang karger nicht angereicherter Haltungsbedingungen und der Entwicklung abnormaler Verhaltensweisen, wie Stereotypen (Mieske et al., 2022). Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz von EE Elementen inaktives Verhalten bei den Labormäusen reduziert werden, welches als alternative Reaktion zu stereotypem Verhalten unter chronischem Stress bei Mäusen gesehen wird (Cabib, 2006; Fureix et al., 2016). Inaktives Verhalten wird ebenso mit einem verminderten Tierwohl von Labortieren unter kargen Standardhaltungsbedingungen in Verbindung gebracht und erfährt zunehmendes Forschungsinteresse im Sinne des Tierwohls. Ein kausaler Zusammenhang von kargen Haltungsbedingungen und inaktivem Verhalten wurde von Nip et al. (2019) bei Mäusen beobachtet. In der genannten Studie zeigten Mäuse aus kargen Haltungsbedingungen im Vergleich zu Mäusen aus angereicherter Haltung vermehrt waches inaktives Verhalten (engl. awake inactivity) und stereotype Verhaltensweisen, zudem verhielten sich Mäuse aus der Standardhaltung agonistischer im Vergleich zu Mäusen die in angereicherten Haltungsbedingungen lebten. Weiterhin konnten Fureix et al. (2016) eine positive Korrelation von depressivem Verhalten und vermehrtem wachen inaktiven Verhalten bei verschiedenen Mausstämmen feststellen. Das in der vorliegenden Arbeit reduzierte inaktive Verhalten der ENR Mäuse während ihrer Aktivitätsphase kann daher als Steigerung des Tierwohls durch die eingesetzten EE Elemente beurteilt werden.

Die ENR Haltung der Mäuse führte in dieser Arbeit zu einer Steigerung des Fressverhaltens und einem erhöhten Gewicht gegenüber der CON Haltung (**Kapitel 3.1.**). Vorangegangene Studien kamen zu konträren Einflüssen von ENR auf das Gewicht und das Fressverhalten. So wurde einerseits eine Steigerung des Körpergewichts bei geringerer Futteraufnahme (van de Weerd et al., 1997a) als andererseits auch kein Einfluss auf das Körpergewicht und die Futteraufnahme bei Mäusen (André et al., 2018; Oatess et al., 2020) in ENR Haltung gegenüber einer CON Haltung festgestellt. Ein Grund für diese Diskrepanz kann die Art, Kombination und Nutzungsdauer der untersuchten EE Elemente sowie der untersuchte Mausstamm liefern (André et al., 2018). So erhielten ENR Mäuse in der Studie von van de Weerd et al. (1997a) zusätzlich zur CON Gruppe, die nur auf Einstreu gehalten wurde, Nestbaumaterial als Enrichment, was sich erheblich auf die Thermoregulation und somit den Energiebedarf der Tiere ausgewirkt haben kann. Nestbaumaterial sollte heutzutage nicht mehr als Enrichment gesehen werden, sondern zur Standardhaltung zählen, da es wichtig für die Thermoregulation während der Ruhezeit der Mäuse ist (Gaskill et al., 2013). Ohne isolierendes Nestbaumaterial müssen Mäuse demnach mehr Energie für den Erhalt der Körpertemperatur aufbringen. Da beide Haltungsgruppen ENR und CON in der vorliegenden Arbeit standardmäßig adäquates Nestbaumaterial erhielten, lassen sich Unterschiede im Körpergewicht und Fressverhalten auf das EE Element und das angewandte EE-Protokoll selbst zurückführen. Die Steigerung der Aktivität der ENR Mäuse während ihrer Wachphase kann zu einem erhöhten Energiebedarf gegenüber der CON Gruppe geführt haben und das erhöhte Fressverhalten der ENR- Gruppe erklären. Zudem könnte die gesteigerte Aktivität, beispielsweise durch Erhöhung von Muskelmasse und einhergehender erhöhter Knochendichte zu einer Steigerung des Gewichts der ENR- Tiere geführt haben (Kaye und Kusy, 1995; Schmitt et al., 2020). Bei älteren Mäusen wurde von Mieske et al. (2023) das gesteigerte Gewicht der ENR Gruppe gegenüber der CON Gruppe vornehmlich durch eine erhöhte Fettmasse erklärt und kein Einfluss auf die Knochendichte, Muskelmasse oder Muskelkraft festgestellt. Die Effekte der Alterung können in dieser Studie allerdings den positiven Effekt einer gesteigerten Aktivität auf das muskuloskeletale System der Mäuse verringert haben.

Zusammenfassend lässt sich mit Blick auf die untersuchten tierwohl-assozierten Parameter dieser Arbeit sagen, dass das Anbieten einer angereicherten Haltungsumgebung für Labormäuse erheblich dazu beiträgt, den Tieren die Ausprägung eines spezie-spezifischen Verhaltens zu ermöglichen und so einer Verhaltensrestriktion (Mason und Burn, 2011) sowie Langeweile im Sinne der Tierwohlförderung vorzubeugen hilft.

Die lange Haltungsdauer in Standardhaltung und angereicherter Haltung als auch der wöchentliche Wechsel der dargebotenen EE-Elementkombinationen führte zu einer stabilen Verbesserung tierwohl-assoziierter Verhaltensparameter. Dabei kann davon ausgegangen

werden, dass der Grad der Käfigkomplexität durch höhere gleichzeitige Verfügbarkeit von EE Elementen (Bailoo et al., 2018) den positiven Effekt auf das Heimatkäfigverhalten begünstigt. Ebenfalls belegen Enrichment- Protokolle, dass der regelmäßige Wechsel der angebotenen EE Elemente angst-assoziiertes Verhalten mindert (Sztainberg und Chen, 2010) und einen protektiven Effekt auf Übergewicht und die Entwicklung von Krebs (Slater und Cao, 2015) bei Mäusen erzeugt. Ein positiver Effekt von EE Elemente auf tierwohl-assoziierte Parameter kann bereits mit Haltungsdauern unter 30 Tagen (Mieske et al., 2022) mit nachhaltigem Effekt auch nach Überführung in die Standardhaltung (Gross et al., 2012) erreicht werden. Das verwendete Enrichment- Protokoll war somit geeignet, einen ausreichenden und detektierbaren tierwohlfördernden Effekt bei weiblichen C57BL/6J Mäusen zu erreichen. Die lange Haltungsdauer vor der Beurteilung des Nutzungsverhaltens der einzelnen Ausgestaltungselemente stellte zudem sicher, dass die Tiere ausreichend an die angebotenen EE Elemente habituiert waren und somit ein realistisches Bild der Nutzung unter Laborbedingungen geschaffen wurde.

Zur Analyse des Nutzungsverhaltens wurde die *aktive* sowie *inaktive* Nutzung der EE Elemente durch die Mäuse während ihrer Aktivitätszeit und am folgenden Morgen in Videoaufnahmen ausgewertet (**Kapitel 3.1.**). Als *inaktives* Nutzungsverhalten wurden beispielsweise das Ruhen oder Verweilen in/auf/unter dem EE Element gewertet, wohingegen beispielsweise das Benagen oder Beklettern als *aktives* Nutzungsverhalten bewertet wurde. Die Auswertung des Nutzungsverhaltens der EE Elemente erfolgte dabei aus fünf Stichproben unterschiedlich zusammengesetzter EE-Elementkombinationen der Kategorien strukturierende Elemente (Strukturelemente), Rätselemente zur Futtersuche (Futtersucheelemente), Unterschlupfmöglichkeiten (Hauselemente) und Nestbaumaterial (Nestmaterial), zusätzlich wurde den Tieren dauerhaft eine Laufscheibe zur Verfügung gestellt. Auf die Auswertung des Nutzungsverhaltens des angebotenen Nestbaumaterials wurde verzichtet. Einerseits war es nicht möglich, die Interaktion mit dem Nestbaumaterial, das sich nach dem Nestbau in den Behausungen befand, aus den Videoaufnahmen sicher zu bestimmen. Andererseits wurde die Präferenz für Nestbaumaterialien bei Mäusen bereits in zahlenreichen Studien untersucht (van de Weerd et al., 1997b; Van De Weerd et al., 1998; van Loo et al., 2004; Kawakami et al., 2007). Da Nestbaumaterial für Mäuse unverzichtbar für eine adäquate Thermoregulation ist und daher nicht mehr als EE Element bezeichnet werden sollte, sondern zur Standardhaltung eines jeden Mausekäfigs zählen muss, wurde den Tieren eine ausreichende Menge Nestbaumaterial in einem wöchentlichen Wechsel aus verschiedenen Naturmaterialien (z.B. Hanfpads, Holzwohle, Papier, Baumwollwatterollen, Papiertücher) angeboten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mäuse aus der ENR Haltung alle angebotenen EE Elemente gut angenommen haben und häufig nutzten (**Kapitel 3.2.**). In **Fig. 7 und Fig. 8 in Kapitel 3.3.** ist die detaillierte Darstellung der Nutzungshäufigkeit der EE Elemente in 120 Datenpunkten in % dargestellt, daher wird nicht *en detail* auf jedes EE in diesem Diskussionsteil eingegangen, sondern auf das Nutzungsverhalten besonders prägnanter Ergebnisse und eine nachfolgende kurze Diskussion innerhalb der Kategorien Strukturelemente, Hauselemente und Futtersuchelemente geführt.

Das Nutzungsverhalten der Strukturelemente unterschied sich sehr stark zwischen den einzelnen EE Elementen dieser Kategorie innerhalb des 30-minütigen Beobachtungszeitraums. So waren für die Mäuse EE Elemente der Kategorie Strukturelemente, die von innen am Käfigdeckel befestigt waren, am unattraktivsten. Die am Käfigdeckel befestigten Strukturelemente wurden zu einem sehr geringen Maße aktiv und inaktiv genutzt. Zu diesen Strukturelementen am Käfigdeckel zählten eine einfache oder doppelte Mausschaukel, ein Plastikclip mit Pappröhre/Plastikröhre und ein Hanfseil. Am Käfigdeckel befestigte EE Elemente wurden nicht nur innerhalb der eigenen Kategorie, sondern auch im Vergleich zu anderen Kategorien am wenigsten verwendet. Zu Bedenken ist hier, dass sie aufgrund der Größe auch die geringste Interaktionsfläche für die Mäuse boten, beispielsweise kann ein Hanfseil aktiv benagt und beklettert werden, ist als Ruheplatz jedoch nicht geeignet. Es konnte jedoch während des wöchentlichen Käfigwechsels beobachtet werden, dass die Mäuse das Hanfseil nach dem Abnagen vom Käfigdeckel als zusätzliches Nestmaterial verwendeten. Eine Studie, die den Effekt von 1, 2 oder 7 Hanfseilen als EE auf physiologische Parameter und das Verhalten in männlichen C57BL/6J untersuchte, stellte ebenfalls eine kontinuierliche Interaktion mit Hanfseilen durch Benagen und Beklettern fest (Gjendal et al., 2017). Zudem zeigte die Studie von Gjendal et al., dass keine gesteigerte Aggressivität durch die Hanfseile bei den männlichen Mäusen induziert wurde, sondern die Mäuse mehr Zeit mit positivem Sozialverhalten verbrachten sowie keine negativen Auswirkungen auf das Stresslevel und Angstverhalten durch Hanfseile festgestellt werden konnte. In direktem Kontrast zu den am Käfigdeckel befestigten Strukturelementen stand das Nutzungsverhalten der zweiten Ebene, welches in Summe betrachtet innerhalb der Strukturelemente und im Vergleich zwischen den Kategorien sehr hoch war. Die zweite Ebene, ein hölzernes horizontal in den Käfig eingeklemmtes Brett mit einem oder zwei Löchern aus der Kategorie Strukturelemente, wurde häufig und gleichermaßen für aktives und inaktives Nutzungsverhalten von den Mäusen verwendet. Die zweite Ebene wurde benagt und beklettert, als Aussichtspunkt zum Verweilen verwendet oder der Bereich unter der Ebene als Versteck und Schlafplatz genutzt. Die Mäuse der ENR Gruppe bauten ausschließlich ihr Gruppennest unter der zweiten Ebene und nicht in den zeitgleich dargebotenen Hauselementen. Möglicherweise hatten die Tiere unter der zweiten Ebene mehr Platz für den

Bau eines großen Gruppennestes und das hölzerne Material schirmte von oben den Lichteinfall durch die Raumbelichtung stark ab, was in einem sehr dunklen Käfigbereich resultierte. Auch Leach et al. (2000) untersuchten die Nutzung eines plattformähnlichen Käfig-Einsatzes und stellten heraus, dass diese Plattform einen vielseitigen Nutzen für die Mäuse für das Ausüben verschiedenster Verhaltensweisen, wie Explorieren, Springen, Verstecken und Ruhen bietet. Eine zweite Plattform erhöht somit die nutzbare Fläche innerhalb des Käfigs und bietet für die Mäuse die Möglichkeit verschiedenste spezie-spezifische Verhaltensweisen auszuüben. Sie kann daher als EE Element für weibliche C57BL/6J Mäuse empfohlen werden. Das Nutzungsverhalten der untersuchten Hauselemente: ein halboffener roter Plastikball, ein Holzwinkel mit und ohne Loch, ein rotes Plastikhaus mit zwei Etagen und ein viereckiges Papierhaus wurden ebenfalls in der 30-minütigen Beobachtungszeit evaluiert. Da die Beobachtungszeit in der Dunkelphase der Mäuse und somit der Aktivitätsphase der Tiere lag, kann die Nutzung als Ruheplatz nicht vollständig beurteilt werden. Wie bereits beschrieben, bauten die Mäuse der ENR Gruppe ihre Nester unterhalb der zweiten Ebene, was darauf hindeuten könnte, dass die Hauselemente nicht alleinig zum Schlafen und als Ruheplatz während der Inaktivitätsphase der Mäuse genutzt wurden (**Kapitel 3.2.**). Vorangegangene Studien konnten jedoch zeigen, dass Mäuse in ihrer Inaktivitätszeit ein Papierhaus gegenüber einem durchsichtigen Plastikhaus bevorzugten (van Loo et al., 2005) und mausstammspezifische Unterschiede in der Nutzung eines dreieckigen Plastikhauses als Ruheplatz bestehen (Soerensen et al., 2009). Dennoch wurden die Hauselemente in der vorliegenden Arbeit von den Mäusen im Beobachtungszeitraum neben der inaktiven Nutzung als Ruheplatz ebenfalls für aktive Interaktionen, wie Klettern oder Nagen, verwendet. Dies zeigt ebenfalls die Versatilität des Nutzens von Hauselementen für Mäuse auf. Ein negativer Einfluss auf die Variabilität von Versuchsdaten durch das Anbieten eines simplen Hauselements für Mäuse konnte bisher nicht belegt werden, dahingegen aber ein tierwohlfördernder Effekt (André et al., 2018). Hauselemente als Orte, die während der Ruhephase für die nachtaktiven Mäuse die Raumbelichtung abschirmen und wie in dieser Arbeit gezeigt auch zu aktiven Interaktionen während der Aktivitätsphase genutzt werden können, sollten daher als Standardeinrichtung für Mausekäfige gelten.

Futtersuchrätsel sind aus der Haltung von Haustieren bekannt und können durch positive Interaktionen die Bindung zum Tierhalter stärken. In der Labortierhaltung wird hingegen die Futterbelohnung an sich zur klassischen oder operanten Konditionierung in Verhaltensversuchen eingesetzt (Lewejohann et al., 2020) und bisher nicht wegen der positiven Auswirkung auf das Tierwohl an sich. Dabei ist bekannt, dass das Erarbeiten einer Futterbelohnung das Wohl von Tieren steigern kann (Mellor, 2016). Die in dieser Arbeit untersuchten Futterrätsel wurden im 30minütigen Beobachtungszeitraum von den Mäusen

häufig und aktiv zur Erarbeitung der angebotenen Hirse als Futterbelohnung genutzt. Dabei wurde das Klappenrätsel, ein viereckiger Holzblock mit zwei von Holzklappen bedeckten Vertiefungen, innerhalb der Kategorie Futtersuchrätsel am häufigsten verwendet. Alle vier Mäuse der Haltungsgruppe konnten sich durch die relative große Fläche und die zwei Klappen (eine Schiebe- und eine Deckelklappe) zeitgleich mit diesem EE Element beschäftigen. Generell wurden alle Futtersuchrätsel von den Mäusen zur Erarbeitung von Hirse angenommen. Den Mäusen konnte so die Möglichkeit gegeben werden, an einer belohnenden Aktivität teilzunehmen und so ihr Wohlbefinden zu steigern (Mellor, 2016). Dabei können Futtersuchrätsel als neue Form von kognitivem EE Element für Mäuse einen positiven Einfluss auf Explorationsverhalten und in der Reduktion von Langeweile haben. Studien zum Effekt von Futtersuchrätseln auf diese Parameter fehlen jedoch bisher.

Ebenfalls sehr häufig und fast ausschließlich aktiv von den Mäusen genutzt wurde die angebotene Laufscheibe, die in allen fünf untersuchten EE Elementkombinationen angeboten wurde. Im Beobachtungszeitraum konnten auf der verwendeten Laufscheibe alle vier Mäuse der Haltungsgruppe zeitgleich auf dem Laufteller laufen. Die Nutzungshäufigkeit der Laufscheibe variierte dabei zwischen den fünf EE Element Kombinationen, was darauf hindeutet, dass eine Beeinflussung des Nutzungsverhaltens zwischen den zeitgleich angebotenen EE Elementen im Käfig stattgefunden hat. Der Einsatz einer Laufscheibe bzw. eines Laufrads als EE Element für Mäuse wird kontrovers diskutiert. So stellen Richter et al. (2014) in ihrem Review verschiedene Interpretationen und Theorien von Laufradverhalten bei Labornagern aus vorangegangenen Studien dar.

Laufradverhalten kann demnach eine Form stereotypen Verhaltens darstellen, ebenso ein Suchtverhalten oder ein Artefakt der Labortierhaltung. Neuere Studien widerlegen jedoch den stereotypen Charakter von Laufradverhalten bei Mäusen (Weegh et al., 2020). Auch in dieser Arbeit war die Nutzung der Laufscheibe nicht das dominierende Verhalten der Mäuse, da die Nutzungshäufigkeit der Laufscheibe je nach EE Elementkombination variierte. Zudem erfolgte die Nutzung der Laufscheibe durch die Mäuse mit Unterbrechungen für Fressen und Sozialverhalten, was ebenfalls gegen einen stereotypen Charakter von Laufradverhalten spricht. Die freiwillige Nutzung eines Laufrads kann bei vielen Tieren unter Laborhaltung festgestellt werden und wird als selbstverstärkendes Verhalten und für die Tiere als wichtig wahrgenommen (Sherwin, 1998b). Labormäuse sind motiviert für den Zugang zu einem Laufrad zu arbeiten (Sherwin, 1998a), was den Stellenwert als wichtige Ressource für Labormäuse unterstreicht. Zusätzlich wirkt die freiwillige Nutzung eines Laufrades bei Mäusen neuroprotektiv, neuroregenerativ (van Praag et al., 1999) und fördert das Lernen und das Gedächtnis (van Praag et al., 2005; Halperin und Healey, 2011; Diederich et al., 2017). Weiterhin kann die Nutzungsdauer eines Laufrads selbst als tierwohlbezogener Parameter

beispielsweise in einem Darmentzündungsmodell (Weegh et al., 2020) oder zur Überwachung der Aktivität und circadianem Rhythmus der Maus genutzt werden (Banjanin und Mrosovsky, 2000). Da Mäuse in freier Wildbahn sehr viel Zeit aktiv, unter anderem mit Exploration, Futtersuche und der Suche nach Fortpflanzungspartnern verbringen (Latham und Mason, 2004), kann das Anbieten einer Laufscheibe diese körperliche Aktivität den in Gefangenschaft gehaltenen Mäusen ermöglichen und so dazu beitragen, den Energiemetabolismus der Mäuse auszubalancieren (Sherwin, 1998b). Bei der Auswahl eines Laufelements für Labormäuse muss zwingend darauf geachtet werden, dass eine physiologische Laufposition ermöglicht wird (Richter et al., 2014), um physiologische Haltungsschäden zu verhindern. Mäuse präferieren zudem Laufräder mit einer soliden oder stoffbespannten Lauffläche gegenüber einer Metallgitterfläche und bevorzugen größere Laufraddurchmesser gegenüber kleineren Durchmessern (Banjanin und Mrosovsky, 2000). In dieser Studie wurde daher eine Laufscheibe mit solider Lauffläche gewählt, da sie gegenüber einem Laufrad die Mäuse nicht zwingt, in einer Hyperflexion von Schwanz und Wirbelsäule zu laufen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Laufscheibe in dieser Arbeit von den Mäusen sehr häufig aktiv genutzt wurde und wegen der genannten zahlreichen positiven Einflüsse auf tierwohlbezogenen Parameter Labormäusen als EE Element zur Verfügung gestellt werden sollte, wenn das Versuchsdesign dem nicht entgegensteht.

## 4.2 Ermittlung von Präferenzen für Ausgestaltungselemente in heimatkäfigbasierten Präferenztests

Zusätzlich zur Evaluation des Nutzungsverhaltens wurden in der vorliegenden Arbeit die weiblichen C57Bl/6J Mäuse zu ihren Präferenzen zu den Ausgestaltungselementen der Kategorien *Strukturelemente*, *Hauselemente* und *Futtersuchelemente* in einem heimatkäfigbasierten Wahlsystem befragt (**Kapitel 3.2.**). Auf die Präferenzuntersuchung von *Nestmaterial* wurde wie in **Kapitel 3.1.** ebenfalls aus den in der vorangegangenen Diskussion (**Kapitel 4.1.**) genannten Gründen verzichtet. Das heimatkäfigbasierte Wahlsystem, *Mouse Position Surveillance System*, wurde innerhalb der Fachgruppe von Habedank et al. (2021a) speziell für Mäuse konstruiert und evaluiert. Es besteht aus zwei Heimatkäfigen, die durch eine Röhre mit integrierten RFID-Antennen verbunden sind, und ermöglicht es so, die Aufenthaltsdauer der Mäuse in Gruppenhaltung im linken oder rechten Käfig des Systems durch eigens programmierte Software zu ermitteln. So wurden in vergleichenden binären Wahlversuchen über 15 Wochen die Mäuse zu ihrer präferierten Käfigausstattung befragt. Die Ausgestaltungselemente wurden jeweils innerhalb ihrer Kategorie gegeneinander verglichen und durch einen Seitenwechsel der Ausgestaltungselemente während der Testzeit konnte eine möglicherweise bedingte Seitenpräferenz für den linken oder rechten Käfig ausgeglichen

werden. In beiden Testkäfigen herrschten zusätzlich gleiche Umgebungsbedingungen sowie die gleiche Basisausstattung, um keine Seitenpräferenzen zu forcieren (**siehe Fig 3., Kapitel 3.2.**). Durch die Nutzung eines heimatkäfigbasierten Präferenzsystems konnte die Aufenthaltsdauer für jeden Einzelvergleich auf zwei circadiane Zyklen ausgeweitet werden. Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit die Aufenthaltsdauern im linken und rechten Käfig über einen Zeitraum von 46 Stunden ermittelt, eine Stunde am Morgen zwischen 9 und 10 Uhr wurde jeweils zur Gesundheitskontrolle der Mäuse und zum Seitenwechsel der getesteten EE Elemente genutzt. Durch die Kombination der binären Entscheidungen der verglichenen Ausgestaltungselemente konnte der Wert oder sogenannte „worth value“ (WV) der EE Elemente bestimmt werden und die Einordnung in eine Werteskala aus Sicht der Mäuse deskriptiv erfolgen (Hatzinger, 2012). Ein neues Software Paket, *simsalRbim* auf Basis der Programmiersoftware R, wurde zur Kalkulation der WV, dem Grad der Übereinstimmung der Entscheidungen zwischen den Mäusen als sogenannter „Consensus Error (CE)“ und dem prozentualen Anteil der intransitiven Entscheidungen (z.B.  $A > B > C > A$ ) genutzt (Talbot et al., n.d.) (**siehe auch Kapitel 3.2. Material and Methods**). Die Analyse wurde sowohl für die Gesamttestdauer von 46 Stunden als auch für die aktive und inaktive Zeit der Mäuse durchgeführt. Dies ermöglichte eine Beurteilung der Präferenzen der getesteten EE Elemente nach ihrer voraussichtlichen Verwendbarkeit als beispielsweise Ruheort bei *Hauselementen* und aktivitätsfördernden *Futtersuchelementen*. Zusätzlich wurde die Analyse der Präferenzen der drei Mausgruppen einzeln ausgewertet, um einen Einblick zu erhalten ob einzelne Gruppen in der Einordnung der EE Elemente in ihrer Rangfolge stark variierten. Um zu untersuchen, ob einzelne Mäuse das Wahlverhalten durch Dominanz- oder Wahlverhalten innerhalb einer Gruppe stark beeinflussten, wurde zudem der Anteil der detektierten Käfigwechsel ermittelt, bei dem Mäuse einander folgten (sog. follow rate) oder einer einzelnen Maus direkt gefolgt wurde (sog. influence rate).

In allen Auswertungen wurde auf Ebene aller Mäuse der drei Gruppen relativ hohe durchschnittliche CE Werte in den Rangordnungen ermittelt, was für eine geringe Übereinstimmung der Wahlentscheidungen innerhalb der Mausgruppe spricht und auf eine sehr individuelle Wahrnehmung der EE Elemente durch einzelne Mäuse hindeutet. Dies wird zudem durch die hohen CEs in den Einzelgruppenauswertungen gestützt, bei dem die Rangordnung der getesteten EE Elemente innerhalb der Gruppe stark variiert. Ein Blick auf die niedrigen Werte der follow rate von durchschnittlich 1,39 % zeigt jedoch, dass die Ursache der uneinheitlichen Rankings wahrscheinlich nicht durch Dominanz- und Folgeverhalten erklärt werden kann. Der Einfluss einer komplexeren Gruppendynamik auf die Wahlentscheidungen kann mit den vorliegenden Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Weitere Einflussfaktoren auf das Wahlverhalten können im Käfig gesetzte Duftmarken (Fitchett



et al., 2006), die räumliche Verteilung der Gruppe und das gebaute Gruppennest sein (Roper, 1973), welches das Wahlverhalten vor allem in der inaktiven Zeit bestimmen kann. Zudem konnten die Mäuse die beiden verglichenen Objekte jederzeit frei explorieren und es bestand kein Zwang, sich für eines der Objekte aktiv zu entscheiden (Kirkden und Pajor, 2006; Habedank et al., 2018). Hauptsächlich für nicht lineare Rangfolgen kann in der vorliegenden Arbeit jedoch ein niedriger Unterschied in der Wertigkeit zwischen den verglichenen EE Elementen sein, worauf ein hoher Prozentsatz intransitiver respektive nicht klar linearer Rangfolgen bei der Gesamtauswertung aller Daten hindeutet. In Beispieldatensätzen des R-Pakets *SimsalRbim* (Talbot et al., n.d.) wird ein ähnlicher Effekt deutlich, so erzeugen Rangfolgen mit niedrigen Valenzbereichen einen höheren Anteil an intransitiven Wahlentscheidungen und niedrigere CEs im Vergleich zu Rangfolgen mit höheren Valenzbereichen. Der Valenzbereich der in dieser Arbeit innerhalb ihrer Kategorien getesteten EE Elemente reicht vermutlich nicht aus, um eine eindeutige Rangfolge zu provozieren. Trotzdem sich die Mäuse als soziale Gruppe generell viel zusammen in einem Käfig aufhielten, führten EE Elemente die eindeutig bevorzugt wurden, wie der Gitterball, dennoch gegenüber weniger bevorzugten EE Elemente zu einem Anstieg der gemeinsam verbrachten Zeit in einem Testkäfig (**siehe Kapitel 3.2. S1 Fig**).

Innerhalb der *Futtersuchelemente* wurde der Gitterball eindeutig bevorzugt. Der Gitterball erreichte auf Gruppenebene und in der Gesamtauswertung aller Gruppen hohe WV und den niedrigsten CE von 29,17 % aller Rangfolgenkalkulationen. Dieser CE Wert bedeutet, dass umgerechnet 10 von 12 Mäusen den Gitterball gegenüber den anderen getesteten Futtersuchelementen bevorzugten. Generell wurden die *Futtersuchelemente* jedoch mit nah beieinander liegenden WV in allen Auswertungen von den Mäusen eingeordnet. Weitere getestete EE Elemente der Kategorie *Futtersuchelemente* waren eine rote Kunststoffröhre, gefüllt mit weißen Kiesel, ein Klappenrätsel, ein Holzschieberätsel und ein Futterball mit Löchern, die auf dem Käfigboden platziert waren und alle niedrige WV erreichten. Der starke funktionelle Unterschied des Gitterballs, ein am Käfigdeckel hängender Hohlball mit Füllung aus Papierstreifen, kann die hohe Wertigkeit für die Mäuse erklären. Die Mäuse konnten nach dem Herausziehen der Papierstreifen und Fressen der darin enthaltenen Hirse weiterhin an dem Gitterball klettern und ihn benagen. Zusätzlich konnten die gewonnenen Papierstreifen als zusätzliches Nestmaterial verwendet werden, was durch Auffinden von Papierstreifen im Nest während der Käfigreinigung bestätigt wurde. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass Mäuse den Nestbau aus mehreren Materialien bevorzugen (van de Weerd et al., 1996, 1997b), Mäuse eine starke Motivation zum Nestbau haben (Latham und Mason, 2004; Deacon, 2006a) und Nestmaterial von Mäusen als wichtige Ressource gewertet wird (Roper,

1973; Van De Weerd et al., 1998). Die geschilderte Präferenz von Mäusen zu Nestbaumaterial kann die hohe Wertigkeit des Gitterballs auch während der inaktiven Zeit der Mäuse erklären.

Auch die *Strukturelemente* erreichten keine eindeutige Rangfolge in den Präferenzauswertungen. Hohe CEs spiegelten auch hier die Uneinigkeit der Wahlentscheidung der einzelnen Mäuse wider. Trotz dessen wurden das Hanfseil und die zweite Ebene in der aktiven und inaktiven Zeit der Mäuse mit hohen WV eingeordnet. Das Hanfseil wurde aktiv benagt, als Kletterelement und ebenfalls in Teilen für den Nestbau von den Mäusen verwendet. Auch Gjendal et al. (2017) konnten eine starke aktive Nutzung durch Klettern und Benagen von Hanfseilen sowie eine Stärkung der Sozialstruktur in männlichen Mäusen feststellen. Die bereits geschilderte Attraktivität von zusätzlichem Nestmaterial und die hohe Nestbaumotivation von Mäusen kann die hohen WV für das Hanfseil auch während der inaktiven Phase der Tiere erklären. Auch die zweite Ebene wurde von den Mäusen mit hohen WV während der inaktiven und aktiven Zeit eingeordnet. Sie kann ebenso als vielseitig nutzbares Element für aktive Interaktionen, wie Klettern oder Benagen genutzt werden, aber gleichermaßen als Aussichtsplattform und Ruhebereich. Eine Studie von Leach et al. (2000) bekräftigt den Mehrnutzungscharakter von Plattform-ähnlichen Elementen für Mäuse zur Förderung von Explorationsverhalten, zum Klettern aber ebenso als Ruheplatz. Weniger attraktive und somit mit niedrigeren WV assoziierte EE Elemente der Kategorie *Strukturelemente* waren eine Mausschaukel und ein Clip am Käfigdeckel mit Pappröhre oder transparenter Plastikröhre. Sie hatten gegenüber dem Hanfseil und der zweiten Ebene keinen Mehrnutzungscharakter, was die niedrigen WVs erklären kann.

Die größte Uneinigkeit in der Rangfolgeneinordnung erreichten die *Hauselemente*. Ihre Rangfolge differierte sehr stark zwischen den Gruppen, teilweise wurden Elemente in einer Gruppe an erster Stelle gelistet und von einer anderen Gruppe an letzter Stelle eingeordnet. Daraus resultieren für Hauselemente hohe CE Werte. Die WV der einzelnen Elemente lagen zudem sehr nah beieinander. Während der inaktiven Phase der Mäuse konnte keine klare Rangfolge der *Hauselemente* ermittelt werden, was darauf hindeutet, dass alle EE Elemente dieser Kategorie gleichermaßen die Bedürfnisse der Mäuse als Rückzugsmöglichkeit befriedigen. Dennoch konnten während der aktiven Phase der Mäuse das Etagenhaus und das Papierhaus hohe WV erreichen. Das Etagenhaus bot mit den zwei Ebenen eine größere Interaktionsfläche zum Klettern und als Aussichtsplattform, wohingegen das Papierhaus von den Mäusen aktiv durch Benagen manipuliert und durch das leichte Gewicht durch den Käfig bewegt werden konnte. Dadurch bot das Papierhaus den Mäusen die Möglichkeit die Umwelt aktiv zu gestalten. Auch van Loo et al. (2005) konnten feststellen, dass Papierhäuser gegenüber den in der Versuchstierhaltung als Standard verwendeten dreieckigen Plastikhäusern bevorzugt wurden. Auf den letzten Rangplatz während der aktiven Phase und

der Gesamtauswertung wurde der Hausball von den Mäusen gewertet. Er bot mit seiner glatten kugeligen Oberfläche tendenziell am wenigsten Interaktionsmöglichkeiten. Die aktive Manipulierbarkeit und Interaktionsmöglichkeit spielte für die Mäuse daher für die Einordnung in ein Wertesystem eine wichtige Rolle und sollten neben der Verwendung als Rückzugsmöglichkeit Beachtung finden (van de Weerd, 1998). Das Etagenhaus und das Papierhaus können daher auch für die aktive Verwendung aus den getesteten Hauselementen empfohlen werden. Da Mäuse Käfige mit Nestboxen gegenüber solchen ohne Nestboxen bevorzugen (van de Weerd, 1998) und das Anbieten von Nestboxen und Nestmaterial als EE Elemente für Mäuse keinen negativen Einfluss auf die Variabilität von Versuchsdaten hat (Baumans et al., 2010), sollten sie als Standardausstattung in der Mäushaltung Anwendung finden (Olsson und Dahlborn, 2002).

#### **4.3 Nutzungsverhalten versus heimatkäfigbasierter Präferenztest für EE Elemente**

In der vorliegenden Arbeit wurde das Nutzungsverhalten aus Videobeobachtungen sowie ein systematischer Vergleich von EE Elementen verschiedener Kategorien in einem heimatkäfigbasierten Präferenztest von weiblichen Mäusen beurteilt. Für beide Untersuchungen wurden dieselben EE Elemente der Kategorien *Futtersuchelemente*, *Strukturelemente* und *Hauselemente* genutzt. Dieses Vorgehen ließ eine Beurteilung des kurzzeitigen Nutzungsverhaltens (Kurzzeitpräferenz) aus den Videobeobachtungen und die längerfristige Beurteilung der Präferenz (Langzeitpräferenz) über zwei circadiane Zyklen im heimatkäfigbasierten Präferenztest zu. Dieses kombinierte Vorgehen von Nutzungsverhaltensanalyse und Präferenztest kann bei der Beurteilung der Wertigkeit des angebotenen EE Elements aus Sicht der Mäuse und bei der Interpretation von Ergebnissen hilfreich sein. So wurde der Gitterball als *Strukturelement* als wenig genutztes EE Element in den Videoauswertungen bewertet, in der Langzeitpräferenz erhielt er aufgrund seines Mehrnutzungscharakters gegenüber EE Elementen derselben Kategorie dahingehend einen hohen WV von den Mäusen. Dabei kann das Nutzungsverhalten in den Videobeobachtungen durch die Anwesenheit weiterer EE Elemente anderer Kategorien beeinflusst worden sein. Zudem ist das 30minütige Beobachtungsintervall während der aktiven Phase der Mäuse gegenüber der Langzeitpräferenz über zwei circadiane Zyklen als weniger aussagekräftig zur Beurteilung der Gesamtattraktivität dieses EE Elements für die Mäuse zu werten. Auch die Beurteilung der Attraktivität des Hanfseils als EE Element für Mäuse kam zu einem ähnlich konträren Ergebnis in der Bewertung des kurzzeitigen Nutzungsverhaltens und der Beurteilung der Langzeitpräferenz. In der kurzzeitigen Beobachtung der Nutzung des Hanfseils war es gegenüber den parallel angebotenen EE Elementen der anderen Kategorien zwar weniger

genutzt, allerdings konnte das abgenagte Hanfmaterial, ähnlich den Papierstreifen aus dem Gitterball, als zusätzliches Nestmaterial genutzt werden. Das zusätzliche Nestmaterial führte in der Langzeitpräferenz dazu, dass der Käfig mit Hanfseil vor allem in der inaktiven Phase der Mäuse als attraktiver gewertet wurde gegenüber anderen *Strukturelementen*. Neben den beiden Beispielen Gitterball und Hanfseil, bei denen es zu einer Divergenz zwischen Kurzzeit- und Langzeitbeurteilung der Gesamtattraktivität für die Mäuse kam, wurde die zweite Ebene als *Strukturelement* in beiden Beobachtungen für die Mäuse als wertvolles Anreicherungselement mit versatiler Nutzung und hohem WV bewertet. Die Auswertung des Nutzungsverhaltens von EE Elementen kann dennoch nützlich sein, so wurde durch die Videobeobachtungen beispielsweise deutlich, dass *Hauselemente* entgegen ihrem eigentlichen Nutzungswert als Ruheplatz ebenso für unterschiedliche aktive Verhaltensweisen, wie Klettern und Benagen genutzt werden können und diese somit fördern. Wenn immer möglich sollte demnach das eher kurzfristige Nutzungsverhalten in Kombination mit Präferenztests über mindestens einen circadianen Rhythmus zur Beurteilung der Eignung von Ausgestaltungselementen für Mäuse heran gezogen werden (Baumans und van Loo, 2013), um ein umfassendes Bild der Nutzbarkeit von EE Elementen für Mäuse zu erhalten.

#### 4.4 Limitationen

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche C57BL/6J Mäuse, die zu Studienbeginn 27 Wochen (**Kapitel 3.1.**) bzw. 54 Wochen (**Kapitel 3.2.**) alt waren, innerhalb ihrer Haltungsguppe untersucht. Das Alter der verwendeten Mäuse ist demnach unüblich hoch für Versuche im biomedizinischen Forschungskontext. Üblicherweise werden die Tiere nach dem Absetzen vom Muttertier direkt der Verwendung zum Versuchszweck zugeführt. Zum Einfluss des Alters auf das Präferenzverhalten von Mäusen ist bisher wenig bekannt. Eine Studie von van Loo et al. (2004), fand heraus, dass die Präferenz zu Nestmaterial bei männlichen Mäusen über das Alter gleich blieb, wohingegen die Präferenz zu Sozialkontakt mit dem Alter abnahm. Es kann demnach sein, dass die Präferenz für EE Elemente mit zunehmendem Alter ebenfalls gleichbleibt. Da es sich in der Studie von van Loo et al. allerdings einerseits um männliche Mäuse handelte und andererseits das Alter der Tiere mit bis zu 38 Wochen wesentlich geringer war, als in der vorliegenden Arbeit sind weitere Studien zur Einschätzung der Präferenz von EE Elementen erforderlich. Trotzdem können die Ergebnisse der vorliegenden Studie für Tiermodelle der Altersforschung, wie Alzheimer und Demenz, Relevanz besitzen.

Als Mausstamm wurden weibliche C57BL/6J Mäuse gewählt, ein Stamm der als genetischer Hintergrund für viele biomedizinische Forschungs-Modelle dient. Bei der Übertragung der Ergebnisse dieser Studie auf andere Mausstämmen muss bedacht werden, dass sowohl das Präferenzverhalten (Coviello-McLaughlin und Starr, 1997; Soerensen et al., 2009) als auch der

Effekt von Enrichment auf verhaltensbezogene und biomedizinische Parameter (van de Weerd et al., 1994; Tsai et al., 2002; Abramov et al., 2008) zwischen Mausstämmen variieren können und demnach die Ergebnisse dieser Arbeit nicht für alle Mausstämme gleichermaßen anwendbar sind.

Die abweichende Gruppendynamik und Sozialverhalten von weiblichen Mäusen gegenüber in Gruppe gehaltenen männlichen Mäusen kann weiterhin eine Einschränkung bei der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Präferenzstudien zu EE Elementen zwischen den Geschlechtern darstellen. Bei männlichen Mäusen kann beispielsweise das Anbieten eines Laufrads (Howerton et al., 2008), einer Behausung (van Loo et al., 2001) oder einer Plattform (Haemisch et al., 1994) das Aggressionsverhalten in der Gruppe steigern, jedoch hatte Nestmaterial (van Loo et al., 2001; Lockworth et al., 2015), ein oder mehrere Hanfseile zum Klettern (Gjendal et al., 2017) und eine Haus Laufrad-Kombination (Lockworth et al., 2015) keinen Effekt auf das Aggressionsverhalten. Dahingegen zeigen weibliche Mäuse in der Gruppe in angereicherten Haltungsbedingungen ein harmonischeres Sozialverhalten mit weniger agonistischem Verhalten als Mäuse in kargen Käfigen (Nip et al., 2019). Auch wenn der Einfluss der Gruppendynamik auf die Ergebnisse der Präferenztests und das Heimatkäfigverhalten nicht auszuschließen sind, so spiegelt die Gruppenhaltung von weiblichen Mäusen die aktuelle Haltung zu Versuchszwecken besser wider als eine Untersuchung von weiblichen Mäusen in Einzelhaltung (Blom et al., 1992; Kirchner et al., 2012). Eine weitere Limitation der dargestellten Arbeit ist, dass zwar eine Einordnung der getesteten EE Elemente anhand einer Werteskala erfolgte, die Mäuse jedoch für den Zugang zu den EE Elementen nicht aktiv arbeiten mussten und demnach nicht den Zwang empfanden, sich für eine Ressource zu entscheiden (Kirkden und Pajor, 2006; Habedank et al., 2018). Um die Motivation zu ermitteln, wie viel ein Lebewesen bereit ist für eine Ressource zu investieren oder zu arbeiten, können sogenannte Consumer Demand Tests hilfreich sein. In Consumer Demand Tests wird die Maus darauf trainiert beispielsweise einen Hebel zu drücken (Lewejohann und Sachser, 2000) oder mit der Nase einen Sensor zu berühren (Kahnau et al., 2022), um Zugang zu einer Ressource zu erhalten. Dennoch ist die Kombination der Beurteilung der Verwendung der EE Elemente durch die Mäuse und die systematische Durchführung binärer Präferenztests wertvoll, um die Sicht der Maus bei der Wahl des geeigneten Ausgestaltungselements mit einzubeziehen.

### **4.5 Fazit und Ausblick**

Durch die in dieser Arbeit in einem wöchentlichen Wechsel verwendeten Ausgestaltungselemente zur Käfiganreicherung konnte das Verhalten von weiblichen C57BL/6J Mäusen in tierwohlfördernder Weise beeinflusst werden. So wurden stereotype

Verhaltensweisen und inaktives Verhalten bei den Mäusen, als mit negativem Tierwohl assoziierte Parameter, deutlich reduziert und die Interaktion der Mäuse in spezies-spezifischen Verhaltensweisen wie beispielsweise Nagen, Klettern, Buddeln ermöglicht. Das Anbieten einer abwechslungsreichen Haltungsumgebung ist somit ein wichtiger Faktor, um das Tierwohl für weibliche C57BL/6J in der Labortierhaltung zu fördern. Zahlreiche Studien belegen einen positiven Einfluss einer angereicherten Haltungsumgebung auf die Emotionalität, das Angstverhalten, Lernen und Gedächtnis, zahlreiche physiologische Parameter und Ausprägung spezies-spezifischer Verhaltensweisen (**Kapitel 2.1.5**). Im Umkehrschluss ist somit von einem negativen Einfluss der aktuellen Standardhaltungsbedingungen auf das Tierwohl von Mäusen auszugehen (Würbel, 2001). Der Implementation einer abwechslungsreichen Haltungsumgebung stehen vornehmlich die Sorgen um eine Erhöhung der Variabilität von Daten aus Tierversuchen (Bayne, 2005; Hutchinson et al., 2012) und ein negativer Einfluss auf das Tierwohl entgegen (Haemisch et al., 1994; Howerton et al., 2008). Dem widersprechend konnten Studien, die den Einfluss einer angereicherten Haltungsumgebung auf Versuchsdaten untersuchten, bisher keine nennenswerte Erhöhung der Datenvariabilität feststellen (van de Weerd et al., 2002; Wolfer et al., 2004; Würbel, 2007; Baumans et al., 2010; Kentner et al., 2021; Mieske et al., 2023). Auch die Auswertung des Heimatkäfigverhaltens der Mäuse dieser Arbeit konnte keine Erhöhung der Variabilität der Versuchsdaten in der ENR Gruppe zeigen. Die Verhaltensdaten der CON Gruppe zeigten sogar eine tendenziell höhere Variabilität beispielsweise durch die auftretenden Stereotypen. Der Argumentation führender Wissenschaftler des Animal Welfare Bereichs folgend führt die Haltung von Mäusen unter verarmten Standardbedingungen zu weniger robusten Tiermodellen (Garner, 2005), mit negativen Folgen auf die Reproduzierbarkeit und Translation von Tierversuchsdaten auf den Menschen (Richter et al., 2009; Richter und von Kortzfleisch, 2020; Würbel et al., 2020). Smith und Corrow legen in ihrem Review zudem dar, dass auch unter standardisierten verarmten Haltungsbedingungen mit einer Variabilität in reproduzierten Daten zu rechnen ist (2005). Ein Ansatz, um die Reproduzierbarkeit von Daten aus Tierversuchen zu erhöhen, kann das Einführen einer systematischen Heterogenität, z.B. durch Erheben von Daten unter verschiedenen Laborbedingungen (von Kortzfleisch et al., 2020) oder abwechslungsreicheren Haltungsbedingungen, beispielsweise mit EE Elementen sein (Abramov et al., 2008). So kann das Anbieten einer abwechslungsreicheren Umgebung mit Ausgestaltungselementen sowohl zum Refinement, als auch zur Verbesserung von Tierversuchen und den darin gewonnenen Daten beitragen. Die aktive Förderung des Tierwohls durch EE Elemente kann sich positiv auf die Arbeitszufriedenheit von Tierpflegenden auswirken (Baumans et al., 2010) und durch Verbesserung der Mensch-Tier-Beziehung die „Culture of Care“ im Tierversuchsbereich durch das Teilen positiver Erfahrungen stärken (Bertelsen und Øvlisen, 2021; Robinson et al., 2021).

Um bei der Wahl geeigneter Ausgestaltungselemente die Sicht der Mäuse mit einzubeziehen und die Implementation von EE Elemente in der Labortierhaltung zu steigern, sind die Auswertung des Nutzungsverhaltens und heimatkäfigbasierte Präferenztests geeignet. In der vorliegenden Arbeit konnte so die Nutzung der einzelnen EE Elemente ermittelt werden und eine Einordnung in ein Wertesystem erfolgen. Dabei ist zu schlussfolgern, dass weibliche C57BL/6J Mäuse die angebotenen EE Elemente sehr individuell wahrnehmen und die anthropozentrische Einordnung der EE Elemente nicht immer der Sicht der Mäuse entspricht. In der kombinierten Auswertung des Heimatkäfigverhaltens und automatisierten heimatkäfigbasierten Präferenztests wurde aus den getesteten EE Elementen die zweite Ebene aus Holz und ein gefüllter hängender Gitterball als Futtersuchelement innerhalb Ihrer Kategorien kontinuierlich als wertvoll von den Mäusen eingeordnet. Weitere Präferenztests mit männlichen Mäusen sowie häufig eingesetzten Mausstämmen der biomedizinischen Forschung, wie NMRI und BALB/c in unterschiedlichen Altersklassen, sollten folgen, um stamm- und geschlechtsspezifische Unterschiede in der Eignung von EE Elementen aus Maussicht darzustellen. Die in dieser Arbeit verwendeten einfachen Methoden, Analyse des Nutzungsverhaltens und heimatkäfigbasierter Präferenztest, könnten bei der Urteilsfindung in den Tierhaltungen selbst beispielsweise bei Zuchttieren verwendet werden, um für einzusetzende EE Elemente den tierwohlfördernden Wert zu ermitteln und eine Art standardisiertes Haltungsprogramm basierend auf Studienergebnissen umzusetzen (Fischer et al., 2021). Dies könnte die Anwendung von EE Element als Refinementmaßnahme in der Haltung von Labormäusen fördern und so durch Ausnutzung der zahlreichen positiven Auswirkungen von EE auf tierwohl-assoziierte Parameter einen wichtigen Beitrag zum Schutz von Versuchstieren bewirken.

## 5 Zusammenfassung

### **Käfigausgestaltungselemente als Environmental Enrichment für Labormäuse-Einfluss auf das Heimatkäfigverhalten und ihre Eignung aus Tiersicht**

Auch wenn zunehmend tierfreie Alternativmethoden, im Sinne des *Replacements* (Vermeiden) nach dem *3R-Prinzip* von *Russel und Burch* in der biomedizinischen Forschung und in regulatorischen Arzneimittelprüfungen entwickelt werden und zum Einsatz kommen, so sind Forschende vor allem im Bereich der Grundlagenforschung noch auf Tierversuche angewiesen. Ist ein Tierversuch zur Beantwortung der Forschungsfragestellung unerlässlich, so fordert die RL 2010/63/EU i.V.m. dem Tierschutzgesetz die konsequente Umsetzung von *Reduction* (Verringern) und *Refinement* (Verbessern) nach dem *3R-Prinzip*. Dies impliziert, dass nur die notwendige Anzahl an Versuchstieren eingesetzt wird und Schmerzen, Leiden und Schäden für die Versuchstiere durch die verwendeten Verfahren auf ein geringstmögliches Minimum reduziert werden müssen. Haltungsbedingungen von Versuchstieren müssen laut RL 2010/63/EU ebenfalls konsequent reevaluiert und verbessert werden, um so den fortschreitenden Wissenszuwachs im Bereich des Animal Welfares zur Haltung von Versuchstieren zu berücksichtigen. Die Empfehlungen der EU zu Maßen und Ausgestaltung der direkten Haltungsumgebung sind dabei nur als Mindeststandard für die Haltung von Versuchstieren zu verstehen. Die direkte Haltungsumgebung muss den Versuchstieren durch eine hinreichende Komplexität und Strukturierung ermöglichen, ein breites Repertoire spezies-spezifischem Verhaltens auszuüben. Eine Möglichkeit, die Komplexität der Haltungsumgebung zu erhöhen, besteht darin, den Tieren verschiedene Käfigausgestaltungselemente in Form von beispielsweise Kletterelementen und Unterschlüpfen als sogenanntes Environmental Enrichment (EE) anzubieten. Die Ausgestaltung der Haltungsumgebung von Versuchstieren wird in der RL 2010/63/EU ausdrücklich empfohlen. Bei Labormäusen konnten bereits zahlreiche positive Auswirkungen von EE auf tierwohlbezogene Gesundheitsparameter nachgewiesen werden. Jedoch sind nicht alle aus anthropozentrischer Sichtweise dargebotenen EE Elemente mit positiven Auswirkungen für das Tierwohl verbunden. Zur Evaluierung, ob eine angebotenes Ausgestaltungselement als *Refinementmaßnahme* geeignet und somit als Enrichment der Haltungsumgebung gewertet werden kann, sollte daher die Sichtweise der Mäuse mit einbezogen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Ausgestaltungselemente der Kategorien *Strukturelemente*, *Hauselemente* und *Futtersuchelemente* auf ihre Eignung für die meistverwendete Versuchstierart Maus *Mus musculus*, im Speziellen weibliche C57BL/6J Mäuse, zu untersuchen. Die Evaluation der Eignung der untersuchten Ausgestaltungselemente für Mäuse beinhaltete die vergleichende Auswertung des



Heimatkäfigverhaltens und des Körpergewichts als tierwohlbezogene Gesundheitsparameter, von angereichert gehaltenen Mäusen mit wöchentlich wechselnden Ausgestaltungskombinationen sowie einer Laufdisc, im Vergleich zu Mäusen in einer laborpraxisüblichen reizarmen Standardhaltung. Die quantitative Auswertung des aktiven und inaktiven Nutzungsverhaltens während der Aktivitätszeit der Mäuse gab Aufschluss über die Interaktionsmöglichkeiten mit den dargebotenen Ausgestaltungselementen. Anschließend folgte die direkte Befragung der angereichert gehaltenen Mäuse in heimatkäfigbasierten binären Präferenztests zum Wert (WV) und Entscheidungskonsens (CE) der Ausgestaltungselemente aus Tiersicht. Die Mäuse konnten im Präferenzsystem, bestehend aus zwei verbundenen Heimatkäfigen, innerhalb ihrer Gruppe zur Wahlentscheidung befragt werden. Basierend auf den ermittelten WV der vergleichenden Einzelanalysen wurde eine Rangfolge der untersuchten Ausgestaltungselemente innerhalb ihrer Kategorien ermittelt.

Mäuse in der Standardhaltung zeigten signifikant häufigeres inaktives und stereotypes Verhalten, verglichen mit angereichert gehaltenen Mäusen. Angereichert gehaltene Mäuse erreichten ein höheres Körpergewicht und wandten mehr Zeit für Fressverhalten auf. Alle angebotenen Ausgestaltungselemente wurden von den Mäusen häufig für aktive und inaktive Interaktionen genutzt. Für aktive Interaktionen wurden *Futtersuchelemente* mit enthaltener Futterbelohnung und die Laufdisc vermehrt genutzt. Mit am Käfigdeckel befestigten *Strukturelementen* wurde von den Mäusen am wenigstens interagiert. Dahingegen wies eine zweite Ebene aus Holz bevorzugte Nutzung der Mäuse für inaktives und aktives Verhalten auf.

In der Präferenzbefragung der Mäuse konnten keine einheitlichen Rangfolgen und Positionen der Ausgestaltungselemente mit allgemeingültigem Charakter für alle individuellen Mäuse ermittelt werden. Dennoch rangierten einige Ausgestaltungselemente, wie der Gitterball und die zweite Ebene, durchgehend auf höheren Positionen in der Rangfolge. Der hohe CE der Ranglisten spiegelt die starke individuelle Wahrnehmung der untersuchten Ausgestaltungselemente für die Mäuse wider und zeigt auf, dass der regelmäßige Wechsel der Ausgestaltungselemente im Käfig dazu beitragen kann die Bedürfnisse jeder individuellen Maus im Laufe der Haltungsperiode zu befriedigen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ausgestaltungselemente waren zusammenfassend geeignet, um tierwohlbezogene Verhaltensparameter bei C57BL/6J Mäusen im Sinne des *Refinements* von Tierversuchen positiv zu beeinflussen. Die individuellen Bedürfnisse der Tiere müssen bei der Planung der Haltung berücksichtigt werden. Ein Ausgestaltungskonzept, das die individuellen Bedürfnisse der Mäuse berücksichtigt, trägt durch eine Erhöhung des Tierwohls zu zuverlässigen, reproduzierbaren und somit aussagekräftigen Versuchsergebnissen bei.

## 6 Summary

### **Cage design elements as environmental enrichment for laboratory mice-influence on home cage behavior and their suitability from an animal perspective**

Even though animal-free alternative methods in the sense of *replacement* according to the *3R principle of Russel and Burch* are increasingly being developed and used in biomedical research and in regulatory drug testing, researchers are still dependent on animal experiments, especially in the field of fundamental research. If animal testing is essential to answer the research question, Directive 2010/63/EU requires the consistent implementation of *reduction* and *refinement* according to the 3Rs principle. This implies that only the necessary number of laboratory animals is used and that pain, suffering and harm to the laboratory animals must be reduced to a minimum by the procedures used. According to Directive 2010/63/EU, the conditions under which laboratory animals are kept must also be consistently re-evaluated and improved in order to take account of the progressive increase in knowledge in the field of animal welfare with regard to the keeping of laboratory animals. The recommendations of the EU on the dimensions and design of the direct housing environment are to be understood only as a minimum standard for the keeping of laboratory animals. The direct housing environment must be sufficiently complex and structured to allow the laboratory animals to perform a broad repertoire of species-specific behavior. One way to increase the complexity of the enclosure environment is to offer the animals various cage design elements in the form of, for example climbing elements and shelters as so-called environmental enrichment (EE). The complex cage design for laboratory animals is explicitly recommended in Directive 2010/63/EU. In laboratory mice, numerous positive effects of EE on animal welfare-related health parameters have already been demonstrated. However, not all EE elements presented from an anthropocentric perspective are associated with positive effects for animal welfare. Therefore, to evaluate whether an offered enrichment element is suitable as a potential *refinement* and thus can be considered as an enrichment of the housing environment, the mice's point of view should be included.

Therefore, the aim of the present work was to evaluate design elements of the categories *structural elements*, *housing elements* and *foraging elements* for their suitability for the most commonly used experimental species mouse *Mus musculus*, specifically female C57BL/6J mice. The evaluation of the suitability of the investigated enrichment elements for mice included the comparative evaluation of home cage behavior and body weight as animal welfare related health parameters, of enriched housed mice with weekly changing enrichment combinations as well as a running disc, in comparison to mice in a laboratory practice standard low stimulus housing. Quantitative evaluation of the active and inactive usage behavior during the mice's activity time provided information about the interaction possibilities with the

presented enrichment elements. This was followed by directly asking the enriched housed mice in home cage-based binary preference tests on the worth value (WV) and consensus error (CE) of the enrichment elements from an animal perspective. Group-housed mice could be asked about choice decision in the preference system, consisting of two connected home cages. Based on the determined WV of the comparative individual analyses, a ranking of the studied design elements within the categories was determined.

Mice in standard housing showed significantly more inactive and stereotypic behaviors compared to enriched housed mice. Enriched mice achieved higher body weights and spent more time on feeding behaviors. All enrichment elements offered were frequently used by mice for active and inactive interactions. For active interactions, foraging elements with food rewards included and the running disc were used preferably. Structural elements attached to the cage lid were the least interacted with by the mice. In contrast, a second level made of wood showed preferred use by the mice for inactive and active behavior.

In the homepage preference test, no consistent rankings and positions of the design elements could be determined for all individual mice. Nevertheless, some design elements, such as the lattice ball and the second plane consistently ranked in higher positions in the rankings. The high CE of the rankings reflects the strong individual perception of the studied enrichment elements for the mice and indicates that the regular change of enrichment elements in the cage can help to meet the needs of each individual mouse during the housing period.

In summary, the design elements investigated in the present work were suitable to positively influence animal welfare-related behavioral parameters in C57BL/6J mice in terms of refinement of animal experiments. The individual needs of the animals must be considered in the design of the housing. A design concept that takes into account the individual needs of the mice contributes to reliable, reproducible and thus meaningful experimental results by increasing animal welfare.

## 7 Literaturverzeichnis

### 7.1 Wissenschaftliche Literatur

- Abramov, U., Puussaar, T., Raud, S., Kurrikoff, K., and Vasar, E. (2008). Behavioural differences between C57BL/6 and 129S6/SvEv strains are reinforced by environmental enrichment. *Neurosci. Lett.* 443, 223–227. doi: 10.1016/j.neulet.2008.07.075.
- Acklin, C. J., and Gault, R. A. (2015). Effects of natural enrichment materials on stress, memory and exploratory behavior in mice. *Lab Anim. (NY)*. 44, 262–267. doi: 10.1038/labani.735.
- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., Van Benthem, J., Zuang, V., et al. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: Current status and future prospects-2010. *Arch. Toxicol.* 85, 367–485. doi: 10.1007/s00204-011-0693-2.
- Ago, A; Gonda, T. (2002). Preferences for paper bedding material of the laboratory mice. *Exp. Anim.* 51, 157–161. doi: 10.1538/expanim.51.157.
- André, V., Gau, C., Scheideler, A., Aguilar-Pimentel, J. A., Amarie, O. V., Becker, L., et al. (2018). Laboratory mouse housing conditions can be improved using common environmental enrichment without compromising data. *PLoS Biol.* 16, 1–24. doi: 10.1371/journal.pbio.2005019.
- AnimAlt-ZEBET (2010). Datenbank für Alternativmethoden zum Tierversuch der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET). Available at: <https://apps.bfr.bund.de/animalt-zebet/index.cfm> [Accessed October 5, 2021].
- Arras, M., Becker, K., Bergadano, A., Durst, M., Eberspächer-schweda, E., Fleischmann, T., et al. (2021). Expert information Pain management for laboratory animals. 1–70. Available at: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publikation/Anaest.\\_Analgesie/2021-04\\_Pain\\_Management\\_for\\_laboratory\\_animals.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/Anaest._Analgesie/2021-04_Pain_Management_for_laboratory_animals.pdf) [Accessed October 5, 2021].
- Asaba, A., Kato, M., Koshida, N., and Kikusui, T. (2015). Determining Ultrasonic Vocalization Preferences in Mice using a Two-choice Playback Test. *J. Vis. Exp.*, e53074–e53074. doi: 10.3791/53074.
- Aske, K. C., and Waugh, C. A. (2017). Expanding the 3R principles. *EMBO Rep.* 18, 1490–1492. doi: 10.15252/embr.201744428.
- Atalayer, D., and Rowland, N. E. (2011). Structure of motivation using food demand in mice. *Physiol. Behav.* 104, 15–19. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.042.
- Bailoo, J. D., Murphy, E., Boada-Sana, M., Varholick, J. A., Hintze, S., Baussiere, C., et al. (2018). Effects of Cage Enrichment on Behavior, Welfare and Outcome Variability in Female Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 12. doi: 10.3389/fnbeh.2018.00232.
- Baker, M., and Penny, D. (2016). Is there a reproducibility crisis? *Nature* 533, 452–454. doi: 10.1038/533452A.
- Banjanin, S., and Mrosovsky, N. (2000). Preferences of mice, *Mus musculus*, for different types of running wheel. *Lab. Anim.* 34, 313–318. doi: 10.1258/002367700780384681.
- Baumans, V. (1993). Husbandry and welfare of laboratory rodents and rabbits: the relevance of behavioural studies. in *Welfare and science: proceedings of the Fifth Symposium of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations, 8-11 June 1993*,

- Brighton, UK (London: Royal Society of Medicine Press, 1994.).
- Baumans, V. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits, and research. *ILAR J.* 46, 162–170. doi: 10.1093/ilar.46.2.162.
- Baumans, V., Schlingmann, F., Vonck, M., and Van Lith, H. A. (2002). Individually Ventilated Cages: Beneficial for Mice and Men? *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 41, 13–19.
- Baumans, V., and van Loo, P. L. P. (2013). How to improve housing conditions of laboratory animals: The possibilities of environmental refinement. *Vet. J.* 195, 24–32. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.09.023.
- Baumans, V., van Loo, P. L. P., and Pham, T. M. (2010). Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: Utilisation, practicality and variation in experimental results. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 37, 101–114.
- Bayne, K. (2005). Potential for unintended consequences of environmental enrichment for laboratory animals and research results. *ILAR J.* 46, 129–139. doi: 10.1093/ilar.46.2.129.
- Beaver, B. V. (1989). Environmental Enrichment for Laboratory Animals. *Ilar News* 31.
- Bechard, A., Meagher, R., and Mason, G. (2011). Environmental enrichment reduces the likelihood of alopecia in adult C57BL/6J mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50, 171–174.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., et al. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur. J. Neurosci.* 20, 1341–1347. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x.
- Bert, B., Dörendahl, A., Leich, N., Vietze, J., Steinfath, M., Chmielewska, J., et al. (2017). Rethinking 3R strategies: Digging deeper into AnimalTestInfo promotes transparency in in vivo biomedical research. *PLOS Biol.* 15, e2003217. doi: 10.1371/journal.pbio.2003217.
- Bert, B., Heintz, C., Chmielewska, J., Schwarz, F., Grune, B., Hensel, A., et al. (2019). Refining animal research: The Animal Study Registry. *PLOS Biol.* 17, e3000463. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000463>.
- Bertelsen, T., and Øvlisen, K. (2021). Assessment of the Culture of Care working with laboratory animals by using a comprehensive survey tool. *Lab. Anim.* doi: 10.1177/00236772211014433.
- Blom, H. J. M., van Tintelen, G., van Vorstenbosch, C. J. A. H. V., Baumans, V., and Beynen, A. C. (1996). Preferences of mice and rats for types of bedding material. *Lab. Anim.* 30, 234–244. doi: 10.1258/002367796780684890.
- Blom, H. J. M., van Vorstenbosch, C. J. A. H. V., Baumans, V., Hoogervorst, M. J. C., Beynen, A. C., and van Zutphen, L. F. M. (1992). Description and validation of a preference test system to evaluate housing conditions for laboratory mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 35, 67–82. doi: 10.1016/0168-1591(92)90017-6.
- Bloomsmith, M. A., Brent, L. ., and Schapiro, S. J. (1991). Guidelines for Developing and Managing an Environmental Enrichment Program for Nonhuman Primates. *Lab. Anim. Sci.* 41.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) (2022). Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2021. Available at:

- [https://www.bf3r.de/de/verwendung\\_von\\_versuchstieren\\_im\\_jahr\\_2021-309160.html](https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2021-309160.html)  
[Accessed April 18, 2023].
- Burn, C. C. (2017). Bestial boredom: a biological perspective on animal boredom and suggestions for its scientific investigation. *Anim. Behav.* 130, 141–151. doi: 10.1016/j.anbehav.2017.06.006.
- Cabib, S. (2006). "The neurobiology of stereotypy II: the role of stress.," in *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare* (Wallingford: CABI), 227–255. doi: 10.1079/9780851990040.0227.
- Cait, J., Cait, A., Scott, R. W., Winder, C. B., and Mason, G. J. (2022). Conventional laboratory housing increases morbidity and mortality in research rodents: results of a meta-analysis. *BMC Biol.* 20, 1–22. doi: 10.1186/s12915-021-01184-0.
- Chamove, A. (1989a). Cage design reduces emotionality in mice. *Lab. Anim.* 23, 215–219.
- Chamove, A. S. (1989b). Enrichment in chimpanzees: unpredictable ropes and tools. *Ratel* 16, 139–141.
- Chamove, A. S. (1989c). Environmental enrichment: a review. *Anim. Technol.* 40, 155–178.
- Chapman, K. L., Holzgrefe, H., Black, L. E., Brown, M., Chellman, G., Copeman, C., et al. (2013). Pharmaceutical toxicology: Designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 66, 88–103. doi: 10.1016/j.yrtph.2013.03.001.
- Chourbaji, S., Zacher, C., Sanchis-Segura, C., Spanagel, R., and Gass, P. (2005). Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice. *Behav. Brain Res.* doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.003.
- Clark, F. (2017). Cognitive enrichment and welfare: Current approaches and future directions. *Anim. Behav. Cogn.* 4, 52–71. doi: 10.12966/abc.05.02.2017.
- Coviello-Mclaughlin, G. M., and Starr, S. J. (1997). Rodent Enrichment Devices - Evaluation of Preference Efficacy. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 36, 66–68.
- d'Isa, R., Comi, G., and Leocani, L. (2021). Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Sci. Rep.* 11, 1–13. doi: 10.1038/s41598-021-00402-7.
- Dawkins, M. S. (1988). Behavioural deprivation: A central problem in animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 20, 209–225. doi: 10.1016/0168-1591(88)90047-0.
- Dawkins, M. S. (1990). From an animal's point of view: Motivation, fitness, and animal welfare. *Behav. Brain Sci.* 13, 1–9. doi: DOI: 10.1017/S0140525X00077104.
- Dawkins, M. S. (1993). *Through Our Eyes Only?: The Search for Animal Consciousness*. Oxford University Press.
- Dawkins, M. S. (1998). Evolution and animal welfare. *Q. Rev. Biol.* 73, 305–328. doi: 10.1086/420307.
- Dawkins, M. S. (2006). A user's guide to animal welfare science. *Trends Ecol. Evol.* 21, 77–82. doi: 10.1016/j.tree.2005.10.017.
- Deacon, R. M. J. (2006a). Assessing nest building in mice. *Nat. Protoc.* 1, 1117–1119. doi: 10.1038/nprot.2006.170.
- Deacon, R. M. J. (2006b). Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral

- experiments. *Nat. Protoc.* 1, 936–946. doi: 10.1038/nprot.2006.120.
- Deacon, R. M. J., and Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.* 1, 7–12. doi: 10.1038/nprot.2006.2.
- Désiré, L., Boissy, A., and Veissier, I. (2002). Emotions in farm animals:: a new approach to animal welfare in applied ethology. *Behav. Processes* 60, 165–180. doi: [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(02\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(02)00081-5).
- Diamond, M. C., Law, F., Rhodes, H., Lindner, B., Rosenzweig, M. R., Krech, D., et al. (1966). Increases in cortical depth and glia numbers in rats subjected to enriched environment. *J. Comp. Neurol.* 128, 117–125. doi: 10.1002/cne.901280110.
- Diederich, K., Bastl, A., Wersching, H., Teuber, A., Strecker, J. K., Schmidt, A., et al. (2017). Effects of different exercise strategies and intensities on memory performance and neurogenesis. *Front. Behav. Neurosci.* 11, 1–9. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00047.
- Doctors Against Animal Experiments Germany (2020). Non Animal Technologies Database (NAT-Database). Available at: <https://nat-database.org/> [Accessed May 10, 2023].
- Duncan, I. J. H., and Olsson, I. A. S. (2001). Environmental enrichment: from flawed concept to pseudo-science. in *Proceedings International Congress of the ISAE 2001, Davis, USA*.
- Farhat, N. (2021). Systematic review in evidence-based risk assessment. *ALTEx* 39, 1–19. doi: 10.14573/altex.2004111.
- Farm Animal Welfare Council (2009). Farm Animal Welfare in Great Britain: Past Present and Future. Available at: [https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/319292/Farm\\_Animal\\_Welfare\\_in\\_Great\\_Britain\\_-\\_Past\\_\\_Present\\_and\\_Future.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/319292/Farm_Animal_Welfare_in_Great_Britain_-_Past__Present_and_Future.pdf) [Accessed September 18, 2019].
- Fernandez, E. J., and Martin, A. L. (2021). Animal Training, Environmental Enrichment, and Animal Welfare: A History of Behavior Analysis in Zoos. *J. Zool. Bot. Gard.* 2, 531–543. doi: 10.3390/jzbg2040038.
- Fischer, M. L., Rodrigues, G. S., Agüero, W. P., Zotz, R., and Simão-Silva, D. P. (2021). Refinement as ethics principle in animal research: Is it necessary to standardize the environmental enrichment in laboratory animals? *An. Acad. Bras. Cienc.* 93, 93. doi: 10.1590/0001-3765202120191526.
- Fitchett, A. E., Barnard, C. J., and Cassaday, H. J. (2006). There's no place like home: Cage odours and place preference in subordinate CD-1 male mice. *Physiol. Behav.* 87, 955–962. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2006.02.010.
- Fraser, D. (1996). Preference and motivational testing to improve animal well-being. *Lab Anim.*
- Fraser, D., and Nicol, C. J. (2018). "Preference and motivation research.," in *Animal welfare* (CABI), 213–231. doi: 10.1079/9781786390202.0213.
- Freymann, J., Tsai, P.-P., Stelzer, H., and Hackbarth, H. (2015). The amount of cage bedding preferred by female BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim. (NY)*. 44, 17–22. doi: 10.1038/labani.659.
- Fureix, C., Walker, M., Harper, L., Reynolds, K., Saldivia-Woo, A., and Mason, G. (2016). Stereotypic behaviour in standard non-enriched cages is an alternative to depression-like responses in C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 305, 186–190. doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.005.

- Garner, J. P. (2005). Stereotypies and Other Abnormal Repetitive Behaviors : Potential Impact on Validity , Reliability , and Replicability of Scientific Outcomes. *ILAR J.* 46, 106–117. doi: 10.1093/ilar.46.2.106.
- Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., and Garner, J. P. (2012). Heat or Insulation: Behavioral Titration of Mouse Preference for Warmth or Access to a Nest. *PLoS One* 7, e32799. doi: 10.1371/journal.pone.0032799.
- Gaskill, B. N., Gordon, C. J., Pajor, E. A., Lucas, J. R., Davis, J. K., and Garner, J. P. (2013). Impact of nesting material on mouse body temperature and physiology. *Physiol. Behav.* 110–111, 87–95. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.12.018.
- Gaskill, B. N., Rohr, S. A., Pajor, E. A., Lucas, J. R., and Garner, J. P. (2009). Some like it hot: Mouse temperature preferences in laboratory housing. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 116, 279–285. doi: 10.1016/j.applanim.2008.10.002.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde, Busch, M., Chourbaji, S., Dammann, P., Gerold, S., Haemisch, A., et al. (2014). Tiergerechte Haltung von Labormäusen - Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung. Available at: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierhaltung/hal\\_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierhaltung/hal_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf) [Accessed August 1, 2019].
- Gesellschaft für Versuchstierkunde, Busch, M., Chourbaji, S., Finger-Baier, K., Gerold, S., Haemisch, A., et al. (2017). Fachinformation aus dem Ausschuss für Tiergerechte Labortierhaltung - Tiergerechte Haltung von Laborratten. Available at: [http://www.gv-solas.de/fileadmin/user\\_upload/pdf\\_publication/Tierhaltung/2017Rattenhaltung.pdf](http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publication/Tierhaltung/2017Rattenhaltung.pdf) [Accessed September 1, 2020].
- Gjendal, K., Sørensen, D. B., Kiersgaard, M. K., and Ottesen, J. L. (2017). Hang on: An evaluation of the hemp rope as environmental enrichment in C57BL/6 mice. *Anim. Welf.* 26, 437–447. doi: 10.7120/09627286.26.4.437.
- Godbey, T., Gray, G., and Jeffery, D. (2011). Cage-change interval preference in mice. *Lab Anim. (NY)*. 40, 225–230. doi: 10.1038/labani0711-225.
- Golledge, H., and Jirkof, P. (2016). Score sheets and analgesia. *Lab. Anim.* 50, 411–413. doi: 10.1177/0023677216675387.
- Gross, A. N., Engel, A. K. J., Richter, S. H., Garner, J. P., and Würbel, H. (2011a). Cage-induced stereotypies in female ICR CD-1 mice do not correlate with recurrent perseveration. *Behav. Brain Res.* 216, 613–620. doi: 10.1016/j.bbr.2010.09.003.
- Gross, A. N. M., Engel, A. K. J., and Würbel, H. (2011b). Simply a nest? Effects of different enrichments on stereotypic and anxiety-related behaviour in mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* doi: 10.1016/j.applanim.2011.06.020.
- Gross, A. N., Richter, S. H., Engel, A. K. J., and Würbel, H. (2012). Cage-induced stereotypies, perseveration and the effects of environmental enrichment in laboratory mice. *Behav. Brain Res.* 234, 61–68. doi: 10.1016/J.BBR.2012.06.007.
- Habedank, A., Birk Urmersbach, -, Kahnau, P., and Lewejohann, L. (2021a). O mouse, where art thou? The Mouse Position Surveillance System (MoPSS)-an RFID-based tracking system. *Behav. Res. Methods.* doi: 10.3758/s13428-021-01593-7.
- Habedank, A., Kahnau, P., Diederich, K., and Lewejohann, L. (2018). Severity assessment from an animal's point of view. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 31, 304–320. doi: 10.2376/0005-9366-18007.
- Habedank, A., Kahnau, P., and Lewejohann, L. (2020). Alternate without alternative: Neither preference nor simple learning behaviour shown by C57BL/6J mice in the T-maze.



*bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.11.11.377788.

- Habedank, A., Urnersbach, B., Kahnau, P., and Lewejohann, L. (2021b). O mouse, where art thou? The Mouse Position Surveillance System (MoPSS) - An RFID based tracking system. *Behav. Res. Methods*, 1–23. doi: /10.3758/s13428-021-01593-7.
- Haemisch, A., Voss, T., and Gärtner, K. (1994). Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiol. Behav.* 56, 1041–1048. doi: 10.1016/0031-9384(94)90341-7.
- Halperin, J. M., and Healey, D. M. (2011). The influences of environmental enrichment, cognitive enhancement, and physical exercise on brain development: Can we alter the developmental trajectory of ADHD? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 621–634. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.07.006.
- Hatzinger, R. ; R. D. (2012). premod: An R Package for Modeling Preferences Based on Paired Comparisons, Rankings, or Ratings. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 1, 128–129. doi: 10.1002/wics.10.
- Herrmann, K., Pistollato, F., and Stephens, M. L. (2019). Food for thought ... beyond the 3Rs: Expanding the use of human-relevant replacement methods in biomedical research. *ALTEX* 36, 343–352. doi: 10.14573/altex.1907031.
- Howerton, C. L., Garner, J. P., and Mench, J. A. (2008). 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.* 115, 90–103. doi: 10.1016/j.applanim.2008.05.004.
- Hurst, J. L., and West, R. S. (2010). Taming anxiety in laboratory mice. *Nat. Methods* 7, 825–826. doi: 10.1038/nmeth.1500.
- Hutchinson, E. K., Avery, A. C., and VandeWoude, S. (2012). Environmental enrichment during rearing alters corticosterone levels, thymocyte numbers, and aggression in female BALB/c mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 51, 18–24.
- Hüttenrauch, M., Salinas, G., and Wirths, O. (2016). Effects of long-term environmental enrichment on anxiety, memory, hippocampal plasticity and overall brain gene expression in C57BL6 mice. *Front. Mol. Neurosci.* 9, 1–11. doi: 10.3389/fnmol.2016.00062.
- Iliff, S. A. (2002). An additional “R”: Remembering the animals. *ILAR J.* 43, 38–47. doi: 10.1093/ilar.43.1.38.
- Jirkof, P., Rudeck, J., and Lewejohann, L. (2019). Assessing affective state in laboratory rodents to promote animal welfare—what is the progress in applied refinement research? *Animals* 9, 1–16. doi: 10.3390/ani9121026.
- Jones, M. A., Mason, G., and Pillay, N. (2011). Early environmental enrichment protects captive-born striped mice against the later development of stereotypic behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 135, 138–145. doi: 10.1016/j.applanim.2011.08.015.
- Kahnau, P., Habedank, A., Diederich, K., and Lewejohann, L. (2020). Behavioral methods for severity assessment. *Animals* 10, 1–13. doi: 10.3390/ani10071136.
- Kahnau, P., Jaap, A., Diederich, K., Gygax, L., Rudeck, J., and Lewejohann, L. (2022). Determining the value of preferred goods based on consumer demand in a home-cage based test for mice. *Behav. Res. Methods* *subm.* doi: <https://doi.org/10.3758/s13428-022-01813-8>.
- Kawakami, K., Shimosaki, S., Tongu, M., Kobayashi, Y., Nabika, T., Nomura, M., et al.

- (2007). Evaluation of bedding and nesting materials for laboratory mice by preference tests. *Exp. Anim.* 56, 363–368. doi: 10.1538/expanim.56.363.
- Kaye, M., and Kusy, R. P. (1995). Genetic lineage, bone mass, and physical activity in mice. *Bone* 17, 131–135. doi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(00\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00164-2).
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., and Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493–495. doi: 10.1038/386493a0.
- Kentner, A. C., Speno, A. V., Doucette, J., and Roderick, R. C. (2021). The contribution of environmental enrichment to phenotypic variation in mice and rats. *eNeuro* 8, 1–10. doi: 10.1523/ENEURO.0539-20.2021.
- Key, D. (2004). Environmental Enrichment Options for Laboratory Rats and Mice. *Lab Anim. (NY)*. 33, 39–44. doi: 10.1038/labanim0204-39.
- Kim-McCormack, N. N. E., Smith, C. L., and Behie, A. M. (2016). Is interactive technology a relevant and effective enrichment for captive great apes? *Appl. Anim. Behav. Sci.* 185, 1–8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2016.09.012>.
- Kirchner, J., Hackbarth, H., Stelzer, H. D., and Tsai, P. P. (2012). Preferences of group-housed female mice regarding structure of softwood bedding. *Lab. Anim.* 46, 95–100. doi: 10.1258/la.2011.010173.
- Kirkden, R. D., and Pajor, E. A. (2006). Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 100, 29–47. doi: 10.1016/j.applanim.2006.04.009.
- Klein, H. J., and Bayne, K. A. (2007). Establishing a culture of care, conscience, and responsibility: Addressing the improvement of scientific discovery and animal welfare through science-based performance standards. *ILAR J.* 48, 3–11. doi: 10.1093/ilar.48.1.3.
- Kostomitsopoulos, N. G., Paronis, E., Alexakos, P., Balafas, E., van Loo, P., and Baumans, V. (2007). The influence of the location of a nest box in an individually ventilated cage on the preference of mice to use it. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 10, 111–121. doi: 10.1080/10888700701313256.
- Krech, D., Rosenzweig, M. R., and Bennett, E. L. (1960). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 53, 509–519.
- Lang, A., Saam, J., Ebadi, R., and Zimmer, B. (2018). AniMatch: reducing lab animal usage. Available at: <https://www.animatch.eu/> [Accessed October 5, 2021].
- Latham, N., and Mason, G. (2004). From house mouse to mouse house: The behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86, 261–289. doi: 10.1016/j.applanim.2004.02.006.
- Leach, M. C., Ambrose, N., Howell, V. J., and Morton, D. B. (2000). The Development of a Novel Form of Mouse Cage Enrichment. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 3, 81–91. doi: 10.1207/s15327604jaws0302\_1.
- Leidinger, C. S., Thöne-Reineke, C., Baumgart, N., and Baumgart, J. (2019). Environmental enrichment prevents pup mortality in laboratory mice. *Lab. Anim.* 53, 53–62. doi: 10.1177/0023677218777536.
- Lewejohann, L., Reefmann, N., Widmann, P., Ambrée, O., Herring, A., Keyvani, K., et al. (2009). Transgenic Alzheimer mice in a semi-naturalistic environment: More plaques, yet not compromised in daily life. *Behav. Brain Res.* 201, 99–102. doi: 10.1016/j.bbr.2009.01.037.

- Lewejohann, L., and Sachser, N. (2000). Evaluation of different housing conditions for male laboratory mice by means of preference tests. *KTBL SCHRIFT*, 170–177.
- Lewejohann, L., Schwabe, K., Häger, C., and Jirkof, P. (2020). Impulse for animal welfare outside the experiment. *Lab. Anim.* 54, 23677219891754. doi: 10.1177/0023677219891754.
- Lockworth, C. R., Kim, S.-J., Liu, J., Palla, S. L., and Craig, S. L. (2015). Effect of Enrichment Devices on Aggression in Manipulated Nude Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 54, 731–6.
- Manser, C. E. (1992). The assessment of stress in laboratory animals. *Assess. Stress Lab. Anim.*
- Markowitz, H. (1979). Environmental enrichment and behavioral engineering for captive primates. *Captiv. Behav. Primates Breed. Colon. Lab. zoos*, 217–238.
- Markowitz, H. (1998). Enrichment for animals. *Encycl. Anim. Right Anim. Welf.*, 156–157.
- Markowitz, H., Aday, C., and Gavazzi, A. (1995). Effectiveness of acoustic “prey”: Environmental enrichment for a captive African leopard (*Panthera pardus*). *Zoo Biol.* 14, 371–379. doi: 10.1002/zoo.1430140408.
- Markowitz, H., and LaForse, S. (1987). Artificial prey as behavioral enrichment devices for felines. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 18, 31–43. doi: 10.1016/0168-1591(87)90252-8.
- Marques, J. M., and Olsson, I. A. S. (2007). The effect of preweaning and postweaning housing on the behaviour of the laboratory mouse (*Mus musculus*). *Lab. Anim.* 41, 92–102. doi: 10.1258/002367707779399482.
- Mason, G. J. (1991). Stereotypies: a critical review. *Anim. Behav.* 41, 1015–1037. doi: 10.1016/S0003-3472(05)80640-2.
- Mason, G. J., and Burn, C. C. (2011). “Behavioural restriction.,” in *Animal welfare* (CAB International 2011.), 98–119. doi: 10.1079/9781845936594.0098.
- Mason, G., McFarland, D., and Garner, J. P. (1998). A demanding task: using economic techniques to assess animal priorities. *Anim. Behav.* 55, 1071–1075. doi: <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0692>.
- Mason, G., and Rushen, J. (2006). *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare*. Cabi.
- Max-Planck-Gesellschaft E.V. zur Förderung der Wissenschaften (2016). Tierversuche in der Max-Planck-Gesellschaft. Available at: [https://www.mpg.de/10882259/MPG\\_Whitepaper.pdf](https://www.mpg.de/10882259/MPG_Whitepaper.pdf) [Accessed October 7, 2021].
- Mei, J., Riedel, N., Grittner, U., Endres, M., Banneke, S., and Emmrich, J. V. (2018). Body temperature measurement in mice during acute illness: Implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Sci. Rep.* 8, 1–10. doi: 10.1038/s41598-018-22020-6.
- Mellor, D. (2011). Affective States and the Assessment of Laboratory-Induced Animal Welfare Impacts. *Proc. 8th World Congr. Altern. Anim. Use Life Sci.*, 445–449. Available at: [http://www.altex.ch/resources/445449\\_Mellor121.pdf](http://www.altex.ch/resources/445449_Mellor121.pdf).
- Mellor, D. J. (2016). Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the “Five Freedoms” towards “A Life Worth Living.” *Animals* 6. doi: 10.3390/ani6030021.
- Mendl, M., and Paul, E. S. (2004). Consciousness, emotion and animal welfare: insights from cognitive science. *Anim. welfare.* 13, S17–S25. doi: 10.1017/S0962728600014330.

- Meyer, N., Kröger, M., Thümmeler, J., Tietze, L., Palme, R., and Touma, C. (2020). Impact of three commonly used blood sampling techniques on the welfare of laboratory mice: Taking the animal's perspective. *PLoS One* 15, 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0238895.
- Mieske, P., Hobbiesiefken, U., Fischer-Tenhagen, C., Heini, C., Hohlbaum, K., Kahnau, P., et al. (2022). Bored at home?—A systematic review on the effect of environmental enrichment on the welfare of laboratory rats and mice. *Front. Vet. Sci.* 9. doi: 10.3389/fvets.2022.899219.
- Mieske, P., Scheinpflug, J., Yorgan, T. A., Brylka, L., Palme, R., Hobbiesiefken, U., et al. (2023). Effects of more natural housing conditions on the muscular and skeletal characteristics of female C57BL/6J mice. *Lab. Anim. Res.* 39, 9. doi: 10.1186/s42826-023-00160-9.
- Moehring, F., O'Hara, C. L., and Stucky, C. L. (2016). Bedding Material Affects Mechanical Thresholds, Heat Thresholds, and Texture Preference. *J. Pain* 17, 50–64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.08.014>.
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., et al. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain Behav.* 3, 287–302. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1848.2004.00076.x>.
- NCad (2016). Opinion of the Netherlands National Committee for the protection of animals used for scientific purposes (NCad). Available at: <https://english.ncadierproevenbeleid.nl/documents/publications/16/7/19/adoption-of-former-laboratory-animals> [Accessed October 5, 2021].
- Newberry, R. C. (1995). Environmental enrichment: Increasing the biological relevance of captive environments. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 44, 229–243. doi: 10.1016/0168-1591(95)00616-Z.
- Nip, E., Adcock, A., Nazal, B., MacLellan, A., Niel, L., Choleris, E., et al. (2019). Why are enriched mice nice? Investigating how environmental enrichment reduces agonism in female C57BL/6, DBA/2, and BALB/c mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 217, 73–82. doi: 10.1016/j.applanim.2019.05.002.
- O'Malley, C. I., Hubley, R., Tambadou, H., and Turner, P. V. (2022). Refining restraint techniques for research pigs through habituation. *Front. Vet. Sci.* 9. doi: 10.3389/fvets.2022.1016414.
- Oatess, T. L., Harrison, F. E., Himmel, L. E., and Jones, C. P. (2020). Effects of Acrylic Tunnel Enrichment on Anxiety-Like Behavior, Neurogenesis, and Physiology of C57BL/6J Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* doi: 10.30802/aalas-jaalas-19-000159.
- Olsson, I. A. S., and Dahlborn, K. (2002). Improving housing conditions for laboratory mice: A review of “environmental enrichment.” *Lab. Anim.* 36, 243–270. doi: 10.1258/002367702320162379.
- Pappalardo, F., Russo, G., Tshinanu, F. M., and Viceconti, M. (2019). In silico clinical trials: Concepts and early adoptions. *Brief. Bioinform.* 20, 1699–1708. doi: 10.1093/bib/bby043.
- Patterson-Kane, E. G. (2001). Environmental enrichment for laboratory rats: a review. *Anim. Technol.* 52, 77–84.
- Piper, S. K., Zocholl, D., Toelch, U., Roehle, R., Stroux, A., Hoessler, J., et al. (2023). Statistical review of animal trials—A guideline. *Biometrical J.* 65, 1–12. doi: 10.1002/bimj.202200061.

- Powell, S. B., Newman, H. A., Pendergast, J. F., and Lewis, M. H. (1999). A rodent model of spontaneous stereotypy: Initial characterization of developmental, environmental, and neurobiological factors. *Physiol. Behav.* 66, 355–363. doi: 10.1016/S0031-9384(98)00303-5.
- Prus, A. J., James, J. R., and Rosecrans, J. A. (2009). "Conditioned Place Preference," in *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience* (CRC Press/Taylor & Francis).
- Rabadán, R., Ramos-Campos, M., Redolat, R., and Mesa-Gresa, P. (2019). Physical activity and environmental enrichment: Behavioural effects of exposure to different housing conditions in mice. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*. 79, 374–385. doi: 10.21307/ane-2019-035.
- Renner, M. J., and Rosenzweig, M. R. (1986). Object interactions in juvenile rats (*Rattus norvegicus*): Effects of different experiential histories. *J. Comp. Psychol.* 100, 229.
- Resasco, A., Foltran, R. B., Carbone, C., and Diaz, S. L. (2021). Effect of simple and complex enrichment added to standard-sized cages in behavioral, physiological, and neurological variables in female Swiss mice (*Mus musculus*). *Behav. Neurosci.* 135, 380–388. doi: 10.1037/BNE0000417.
- Richter, S. H., Garner, J. P., and Würbel, H. (2009). Environmental standardization: Cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat. Methods* 6, 257–261. doi: 10.1038/nmeth.1312.
- Richter, S. H., Gass, P., and Fuss, J. (2014). Resting is rusting: A critical view on rodent wheel-running behavior. *Neuroscientist* 20, 313–325. doi: 10.1177/1073858413516798.
- Richter, S. H., and von Kortzfleisch, V. (2020). Reply to 'It is time for an empirically informed paradigm shift in animal research.' *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 661–662. doi: 10.1038/s41583-020-0370-7.
- Robinson, S., White, W., Wilkes, J., and Wilkinson, C. (2021). Improving culture of care through maximising learning from observations and events: Addressing what is at fault. *Lab. Anim.* doi: 10.1177/00236772211037177.
- Roper, T. J. (1973). Nesting material as a reinforcer for female mice. *Anim. Behav.* 21, 733–740. doi: 10.1016/S0003-3472(73)80099-5.
- Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., and Diamond, M. C. (1962a). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55, 429.
- Rosenzweig, M. R., Krech, D., Bennett, E. L., and Zolman, J. F. (1962b). Variation in environmental complexity and brain measures. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55, 1092.
- Russell, W., and Burch, R. (1959). *The principles of Humane Experimental Technique*. Methuen.
- Scharmann, W. (1989). Verbesserung der Versuchstierhaltung - ein Beitrag zum Tierschutz. *Bundesgesundheitsblatt* Nr. 8.
- Schellino, R., Trova, S., Cimino, I., Farinetti, A., Jongbloets, B. C., Pasterkamp, R. J., et al. (2016). Opposite-sex attraction in male mice requires testosterone-dependent regulation of adult olfactory bulb neurogenesis. *Sci. Rep.* 6, 1–15. doi: 10.1038/srep36063.
- Schmitt, A., Herzog, P., Röchner, F., Brändle, A. L., Fragasso, A., and Munz, B. (2020). Skeletal muscle effects of two different 10-week exercise regimens, voluntary wheel running, and forced treadmill running, in mice: A pilot study. *Physiol. Rep.* 8, 1–15. doi: 10.14814/phy2.14609.

- Schönfelder, G. (2015). German initiative opens up animal data. *Nature* 519, 33. doi: 10.1038/519033d.
- Schuhmacher, A. (2013). Fachinformation aus dem Ausschuss für Ernährung der Versuchstiere - Fütterungskonzepte und -methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch - Fische -. GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde.
- Sherwin, C. M. (1996). Preferences of individually housed TO strain laboratory mice for loose substrate or tubes for sleeping. *Lab. Anim.* 30, 245–251. doi: 10.1258/002367796780684926.
- Sherwin, C. M. (1998a). The use and perceived importance of three resources which provide caged laboratory mice the opportunity for extended locomotion. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 55, 353–367. doi: 10.1016/S0168-1591(97)00049-X.
- Sherwin, C. M. (1998b). Voluntary wheel running: a review and novel interpretation. *Anim. Behav.* 56, 11–27. doi: 10.1006/anbe.1998.0836.
- Sherwin, C. M. (2004). Mirrors as potential environmental enrichment for individually housed laboratory mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 87, 95–103. doi: 10.1016/j.applanim.2003.12.014.
- Sherwin, C. M., and Nicol, C. J. (1997). Behavioural demand functions of caged laboratory mice for additional space. *Anim. Behav.* 53, 67–74. doi: 10.1006/anbe.1996.0278.
- Shi, L., Wang, C., Yu, K., Wu, J., and Zhang, Q. (2023). An Enriched Environment Promotes Motor Function through Neuroprotection after Cerebral Ischemia. 2023.
- Slater, A. M., and Cao, L. (2015). A Protocol for Housing Mice in an Enriched Environment. *J. Vis. Exp.*, 1–8. doi: 10.3791/52874.
- Smith, A. J., Clutton, R. E., Lilley, E., Hansen, K. E. A., and Brattelid, T. (2018). PREPARE: guidelines for planning animal research and testing. *Lab. Anim.* 52, 135–141. doi: 10.1177/0023677217724823.
- Smith, A. L., and Corrow, D. J. (2005). Modifications to husbandry and housing conditions of laboratory rodents for improved well-being. *ILAR J.* 46, 140–147. doi: 10.1093/ilar.46.2.140.
- Soerensen, D. B., Moeller, M. R., and Larsen, L. R. (2009). The use of the Techniplast Mouse House® in four strains of mice. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* 36, 179–183. doi: 10.23675/sjlas.v36i2.183.
- Solinas, M., Chauvet, C., Thiriet, N., El Rawas, R., and Jaber, M. (2008). Reversal of cocaine addiction by environmental enrichment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 17145–17150. doi: 10.1073/pnas.0806889105.
- Solinas, M., Thiriet, N., El Rawas, R., Lardeux, V., and Jaber, M. (2009). Environmental Enrichment During Early Stages of Life Reduces the Behavioral, Neurochemical, and Molecular Effects of Cocaine. *NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY* 34, 1102–1111. doi: 10.1038/npp.2008.51.
- Špinka, M. (2012). Social dimension of emotions and its implication for animal welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 138, 170–181. doi: 10.1016/j.applanim.2012.02.005.
- Stauffacher, M. (1994). Ethologische Konzepte zur Entwicklung tiergerechter Haltungssysteme und Haltungsnormen für Versuchstiere. *Tierarztl. Umsch* 49, 560–569.
- Stauffacher, M. (1995). Environmental enrichment, fact and fiction. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*
- Strech, D., and Dirnagl, U. (2019). 3Rs missing: Animal research without scientific value is

- unethical. *BMJ Open Sci.* 3. doi: 10.1136/bmjos-2018-000048.
- Swan, J., Boyer, S., Westlund, K., Bengtsson, C., Nordahl, G., and Törnqvist, E. (2023). Decreased levels of discomfort in repeatedly handled mice during experimental procedures, assessed by facial expressions. *Front. Behav. Neurosci.* 17, 1–9. doi: 10.3389/fnbeh.2023.1109886.
- Sztainberg, Y., and Chen, A. (2010). An environmental enrichment model for mice. *Nat. Protoc.* 5, 1535–1539. doi: 10.1038/nprot.2010.114.
- Takeda, M., Sawano, S., Imaizumi, M., and Fushiki, T. (2001). Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci.* 69, 847–854. doi: 10.1016/S0024-3205(01)01180-8.
- Talbot, S., Pfefferle, D., Brockhausen, R., and Lewejohann, L. (n.d.). *simsalRbim* - A package for preference test simulations. Available at: <https://talbotsr.com/simsalRbim/index.html> [Accessed June 1, 2020].
- Tallent, B. R., Law, L. M., Rowe, R. K., and Lifshitz, J. (2018a). Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. doi: 10.1177/0023677217753464.
- Tallent, B. R., Saber, M., Law, M., and Lifshitz, J. (2018b). Impact of partial cage division on aggression and behavior on long-term housing in co-housed male C57bl/6 mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 57, 616.
- Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M., and Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779–790. doi: 10.1016/S0028-3908(01)00122-8.
- Toohey, P. (2011). *Boredom: A lively history*. Yale University Press.
- Tsai, P. P., Pachowsky, U., Stelzer, H. D., and Hackbarth, H. (2002). Impact of environmental enrichment in mice. 1: Effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab. Anim.* 36, 411–419. doi: 10.1258/002367702320389071.
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462. doi: 10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x.
- van de Weerd, H. A. (1996). Environmental Enrichment for Laboratory Rodents: Preferences and Consequences.
- van de Weerd, H. A. (1998). “Preferences for nest boxes as an environmental enrichment for laboratory mice,” in *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR-* (Universities Federation for Animal Welfare), 11–25.
- van de Weerd, H. A., Aarsen, E. L., Mulder, A., Kruitwagen, C. L. J. J., Hendriksen, C. F. M., and Baumans, V. (2002). Effects of Environmental Enrichment for Mice: Variation in Experimental Results. *J. Appl. Anim. Welf. Sci.* 5, 125–137. doi: 10.1207/S15327604JAWS0502.
- van de Weerd, H. A., Baumans, V., Koolhaas, J. M., and van Zutphen, L. F. (1994). Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *J. Exp. Anim. Sci.* 36, 117–127. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/7948063>.
- van de Weerd, H. A., Baumans, V., Koolhaas, J. M., and Van Zutphen, L. F. M. (1996). Nesting material as enrichment in two mouse strains. in *Frontiers in Laboratory Animal Science: Joint International Conference of ICLAS, Scand-LAS and FinLAS*, 119–123.

- van de Weerd, H. A., van Loo, P. L. P., van Zutphen, L. F. M., Koolhaas, J. M., and Baumans, V. (1997a). Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol. Behav.* 62, 1019–1028. doi: 10.1016/S0031-9384(97)00232-1.
- van de Weerd, H. A., van Loo, P. L. P., van Zutphen, L. F. M., Koolhaas, J. M., and Baumans, V. (1997b). Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab. Anim.* 31, 133–143. doi: 10.1258/002367797780600152.
- Van De Weerd, H. A., Van Loo, P. L. P., Van Zutphen, L. F. M., Koolhaas, J. M., and Baumans, V. (1998). Strength of preference for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 55, 369–382. doi: 10.1016/S0168-1591(97)00043-9.
- van der Geest, J. N., Spoor, M., and Frens, M. A. (2021). Environmental Enrichment Improves Vestibular Oculomotor Learning in Mice. *Front. Behav. Neurosci.* 0, 113. doi: 10.3389/FNBEH.2021.676416.
- van Loo, P. L. P., Blom, H. J. M., Meijer, M. K., and Baumans, V. (2005). Assessment of the use of two commercially available environmental enrichments by laboratory mice by preference testing. *Lab. Anim.* 39, 58–67. doi: 10.1258/0023677052886501.
- van Loo, P. L. P., Kruitwagen, C. L. J. J., Koolhaas, J. M., van De Weerd, H. A., van Zutphen, L. F. M., and Baumans, V. (2001). Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 76, 65–81. doi: 10.1016/S0168-1591(01)00200-3.
- van Loo, P. L. P., van de Weerd, H. A., van Zutphen, L. F. M., and Baumans, V. (2004). Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab. Anim.* 38, 178–188. doi: 10.1258/002367704322968867.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (1999). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat. Neurosci.* 2, 266–270. doi: 10.1038/6368.
- van Praag, H., Kempermann, G., and Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 191–198. doi: 10.1038/35044558.
- van Praag, H., Shubert, T., Zhao, C., and Gage, F. H. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J. Neurosci.* 25, 8680–8685. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-05.2005.
- van Zutphen, L. F.; Baumans, V.; Beynen, A. C. (2001). *Principles of Laboratory Animal Science Revised Edition, 1st Edition.*
- Veronez, T., Brück, M., Inês, M., Rossi, D., Oliveira, G., and Oliveira, G. (2020). Mouse Lab Behaviour : How to Listen to Their Preference During Maintenance in House Facilities. 2, 535–543. doi: 10.38125/OAJBS.000208.
- Vogt, M. A., Mertens, S., Serba, S., Palme, R., and Chourbaji, S. (2020). The ‘ Cage Climber ’ - A new enrichment for use in large-dimensional mouse facilities. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 230, 105078. doi: 10.1016/j.applanim.2020.105078.
- von Kortzfleisch, V. T., Karp, N. A., Palme, R., Kaiser, S., Sachser, N., and Richter, S. H. (2020). Improving reproducibility in animal research by splitting the study population into several ‘mini-experiments.’ *Sci. Rep.* 10, 1–16. doi: 10.1038/s41598-020-73503-4.
- Wang, J.-L., Wang, B., and Chen, W. (2014). Differences in cocaine-induced place preference persistence, locomotion and social behaviors between C57BL/6J and BALB/cJ mice. *Dong wu xue yan jiu = Zool. Res.* 35, 426–435. doi:



10.13918/j.issn.2095-8137.2014.5.426.

- Watts, G. (2007). Alternatives to animal experimentation. *Bmj* 334, 182. doi: 10.1136/bmj.39058.469491.68.
- Webster, J. (1995). "Assessment of animal welfare: The five freedoms," in *Animal welfare: A cool eye towards Eden* (Blackwell Science), 10–14.
- Weegh, N., Fünér, J., Janke, O., Winter, Y., Jung, C., Struve, B., et al. (2020). Wheel running behaviour in group-housed female mice indicates disturbed wellbeing due to DSS colitis. *Lab. Anim.* 54, 63–72. doi: 10.1177/0023677219879455.
- Weld, K., Metz, B., and Erwin, J. (1989). Environmental enrichment for laboratory primates: Use of manipulable objects. in *first annual meeting of the American Psychological Society, Alexandria, VA.[JST]*.
- Wewetzer, H., Wagenknecht, T., Bert, B., and Schönfelder, G. (2023). The fate of surplus laboratory animals. *EMBO Rep.* 24, 1–5. doi: 10.15252/embr.202256551.
- Wolfer, D. P., Litvin, O., Morf, S., Nitsch, R. M., Lipp, H. P., and Würbel, H. (2004). Cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 432, 821–822. doi: 10.1038/432821a.
- Würbel, H. (1996). Stereotypies in Laboratory Mice - Quantitative and Qualitative Description. *Ethology* 102, 371–385.
- Würbel, H. (2001). Ideal homes ? Housing effects on rodent brain and behaviour. *Trends Neurosci.* 24, 207–211.
- Würbel, H. (2006). "The motivational basis of caged rodents' stereotypies," in *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare* (CAB International Oxford), 86–120. doi: 10.1079/9780851990040.0086.
- Würbel, H. (2007). Environmental enrichment does not disrupt standardisation of animal experiments. *ALTEX* 24, 70–73.
- Würbel, H. (2017). More than 3Rs: The importance of scientific validity for harm-benefit analysis of animal research. *Lab Anim. (NY)*. 46, 164–166. doi: 10.1038/labani.1220.
- Würbel, H., Chapman, R., and Rutland, C. (1998). Effect of feed and environmental enrichment on development of stereotypic wire-gnawing in laboratory mice. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 60, 69–81. doi: 10.1016/s0168-1591(98)00150-6.
- Würbel, H., and Garner, J. P. (2007). Refinement of rodent research through environmental enrichment and systematic randomization. *NC3Rs* #9, 2007. doi: 10.1016/S1353-8020(08)70759-4.
- Würbel, H., and Stauffacher, M. (1994). Standard-Haltung für Labormäuse—Probleme und Lösungsansätze. *Tierlaboratorium* 17, 109–118.
- Würbel, H., Stauffacher, M., and Holst, D. (1996). Stereotypies in Laboratory Mice - Quantitative and Qualitative Description of the Ontogeny of 'Wire-gnawing' and 'Jumping' in Zur:ICR and Zur:ICR nu. *Ethology* 102, 371–385. doi: 10.1111/j.1439-0310.1996.tb01133.x.
- Würbel, H., Voelkl, B., Altman, N. S., Forsman, A., Forstmeier, W., Gurevitch, J., et al. (2020). Reply to 'It is time for an empirically informed paradigm shift in animal research.' *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 661–662. doi: 10.1038/s41583-020-0370-7.
- Yano, S., Sakamoto, K. Q., and Habara, Y. (2012). Estrus cycle-related preference of BALB/c female mice for C57BL/6 males is induced by estrogen. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1311–1314.

Yeates, J. W., and Main, D. C. J. (2008). Assessment of positive welfare: A review. *Vet. J.* 175, 293–300. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.009>.

Young, R. J. (2003). *Environmental enrichment for captive animals*. UFAW Animal Welfare Series. Blackwell Science Ltd.

## 7.2 Verordnungen und Gesetze

**Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland (GG)** in der im Bundesgesetzblatt Teil III, Gliederungsnummer 100-1, veröffentlichten bereinigten Fassung, das zuletzt durch Artikel 1 u. 2 Satz 2 des Gesetzes vom 29. September 2020 (BGBl. I S. 2048) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/gg/BJNR000010949.html](http://www.gesetze-im-internet.de/gg/BJNR000010949.html) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Richtlinie 86/609/EWG** des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt Nr. L 358 vom 18/12/1986 S. 0001 – 0028. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=celex%3A31986L0609](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/ALL/?uri=celex%3A31986L0609) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV)** vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. August 2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html](http://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Tierschutzgesetz (TierSchG)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html](http://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html) (aufgerufen am 30.09.2021).

**1999/575/EG**: Beschluß des Rates vom 23. März 1998 über den Abschluß des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere durch die Gemeinschaft. Amtsblatt Nr. L 222 vom 24/08/1999 S. 0029 – 0030. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:31999D0575](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:31999D0575) (aufgerufen am 30.09.2021)

**Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. (ETS 123)** Sammlung Europäischer Verträge - Nr. 123. vom 18. März 1986 (BGBl. 1990 II S. 1486), zuletzt geändert durch ÄndVO vom 15. 6. 2006 (BGBl. 2007 II S. 1714). [rm.coe.int/168007a697](http://rm.coe.int/168007a697) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Anhang A des Europäischen Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere. (ETS 123) Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die zu Versuchszwecken und anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden. (Cons 123 (2006) 3) vom 15. Juni 2006**  
<https://rm.coe.int/168007a445> (aufgerufen am 30.09.2021)

**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 (Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K (2007) 2525) (2007/526/EG)** <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32007H0526> (aufgerufen am 30.09.2021)

**Verordnung zu der Annahmeerklärung vom 15. Juni 2006 über die Änderung von Anhang A des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere** Vom 15. November 2007; Bundesgesetzblatt Jahrgang 2007 Teil II Nr. 37, ausgegeben zu Bonn am 26. November 2007; [https://dejure.org/BGBI/2007/BGBI.\\_II\\_S.\\_1714](https://dejure.org/BGBI/2007/BGBI._II_S._1714) (aufgerufen am 30.09.2021)

**Bürgerliches Gesetzbuch (BGB)** in der Fassung der Bekanntmachung vom 2. Januar 2002 (BGBI. I S. 42, 2909; 2003 I S. 738), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBI. I S. 3515) geändert worden ist. [www.gesetze-im-internet.de/bgb/BJNR001950896.html](http://www.gesetze-im-internet.de/bgb/BJNR001950896.html) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Protokoll über den Tierschutz und das Wohlergehen der Tiere zum Vertrag von Amsterdam** zur Änderung des Vertrages über die Europäische Union, der Verträge zur Gründung der Europäischen Gemeinschaften sowie einiger damit zusammenhängender Rechtsakte, Amtsblatt Nr. C 340 vom 10/11/1997 S. 0110. [www.europarl.europa.eu/topics/treaty/pdf/amst-de.pdf](http://www.europarl.europa.eu/topics/treaty/pdf/amst-de.pdf) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Richtlinie 2003/65/EG** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Juli 2003 zur Änderung der Richtlinie 86/609/EWG des Rates zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt Nr. L 230 vom 16/09/2003 S. 0032 – 0033. [eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0065&from=EN](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003L0065&from=EN) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Vertrag von Lissabon** zur Änderung des Vertrages über die Europäische Union und des Vertrages zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft (EUVtr Liss), Amtsblatt Nr. C 306, vom 17. Dezember 2007. Teil B Abschnitt II, Art. 5 b Anm. 21. 2007/C 306/01. eur-

[lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A12007L%2FTXT](http://lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A12007L%2FTXT) (aufgerufen am 30.09.2021).

**Richtlinie 2010/63/EU** des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, Amtsblatt Nr. L276/33-L276/79. [eur-lex.europa.eu/legal-content/de/ALL/?uri=CELEX:32010L0063](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/de/ALL/?uri=CELEX:32010L0063) (aufgerufen am 30.09.2021).

## 8 Publikationsverzeichnis

### 8.1 Originalpublikationen

**Hobbiesiefken, U.**, Mieske, P., Lewejohann, L., Diederich, K. (2021). Evaluation of different types of enrichment - their usage and effect on home cage behavior in female mice. PLOS ONE 16(12): e0261876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261876>

**Hobbiesiefken, U.**, Urnersbach, B., Jaap, A., Diederich, K., Lewejohann, L. (2023). Rating enrichment items by female group-housed laboratory mice in multiple binary choice tests using an RFID-based tracking system. PLOS ONE 18(1): e0278709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0278709>

Kahnau, P., Jaap, A., **Hobbiesiefken, U.**, Mieske, P., Diederich, K., Thöne-Reineke, C., Hohlbaum, K. (2022). A preliminary survey on the occurrence of barbering in laboratory mice in Germany. Animal Welfare, 31(4), 433-436. doi:10.7120/09627286.31.4.009

Mieske P., Scheinpflug J., Yorgan T.A., Brylka L., Palme R., **Hobbiesiefken U.**, Preikschat J., Lewejohann L., Diederich K. (2023). Effects of more natural housing conditions on the muscular and skeletal characteristics of female C57BL/6J mice. Lab Anim Res. 2023 May 16;39(1):9. doi: 10.1186/s42826-023-00160-9. PMID: 37189184; PMCID: PMC10186785.

### 8.2 Systematische Reviews

Mieske, P., **Hobbiesiefken, U.**, Fischer-Tenhagen, C., Heintz, C., Hohlbaum, K., Kahnau, P., et al. (2022). Bored at home? - A systematic review on the effect of environmental enrichment on the welfare of laboratory rats and mice. Front. Vet. Sci. 9. doi: 10.3389/fvets.2022.899219.

### 8.3 Vorträge

#### 8.3.1 Kongressvorträge

**Hobbiesiefken, U. (2020):** Präferenzen für unterschiedliche Ausgestaltungselemente aus Sicht der Maus. 58. Jahrestagung der GV- SOLAS und 19.IGTP Fortbildung. Onlineformat - 17.09.2020

**Hobbiesiefken, U. (2021):** Preferences for different enrichment items in laboratory mice. Thementagung der Ethologischen Gesellschaft, 2021. Onlineformat - 26.02.2021

**Hobbiesiefken, U. (2021):** Preference for different enrichment items from a mouse's point of view. EUSAAT Virtual Seminar Series, 2021. Onlineformat - 24.06.2021

#### 8.3.2 weitere Vorträge

**Hobbiesiefken, U. (2019):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren - angereicherte Haltung im Vergleich zu konventioneller Haltung, Doktorandenseminar Prof. Thöne-Reineke, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde, FU Berlin; 02.09.2019

**Hobbiesiefken, U. (2019):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren - Präferenztests, Mentorentreffen Prof. Thöne-Reineke, BfR, 22.10.2019

**Hobbiesiefken, U. (2019):** Strategies for recording and reducing boredom symptoms in laboratory animals - standard vs. enriched housing condition, predoc Symposium, BfR, 21.11.2019

**Hobbiesiefken, U. (2020):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren, hausinterner Vortrag für Tierpflegende, BfR, 21.01.2020

**Hobbiesiefken, U. (2020):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren – Präferenztests, Mentorentreffen Prof. Thöne-Reineke, BfR, 27.05.2020

**Hobbiesiefken, U. (2020):** Preferences for different enrichment items in laboratory mice. Laborseminar der Abteilung 9, Bundesinstitut für Risikobewertung, 20.09.2020

**Hobbiesiefken, U. (2020):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren - Präferenzen für unterschiedliche Ausgestaltungselemente aus Sicht der Maus, Doktorandenseminar Prof. Thöne-Reineke, Fachbereich Veterinärmedizin, Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde, FU Berlin; 26.09.2020

**Hobbiesiefken, U. (2021):** Strategien zur Erfassung und Reduktion der Langeweile-Symptomatik bei Versuchstieren – Verhaltensbeobachtung und Präferenztests, Mentorentreffen Prof. Thöne-Reineke, BfR, 26.05.2021

## 9 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen lieben Menschen bedanken, die mich auf dem Weg zur Erstellung der vorliegenden Forschungsarbeit unterstützend und wohlwollend begleitet haben. Besonderer Dank gilt hierbei **Prof. Dr. Lars Lewejohann**, dem ich die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas im Bereich des Refinements von Tierversuchen verdanke. Die Möglichkeit des Austausches mit Forschenden, die verschiedenste Aspekte des Schutzes für Versuchstiere voranbringen, haben meine Arbeits- und Denkweise in positiver Weise nachhaltig geprägt.

Ebenfalls möchte ich **Prof. Dr. Christa Thöne-Reinecke**, meiner weiterbildenden Fachtierärztin für Tierschutz danken, die mir den wichtigen Bereich des Tierschutzes für Versuchstiere durch Vermittlung an meinen Doktorvater aufzeigte, in dem ich bis heute glücklich verblieben bin.

**Dr. Kai Diederich** danke ich für die warmherzige Betreuung während meiner Promotionsphase. Ich konnte mich immer vertrauensvoll mit Sorgen, Ängsten und Problemen an dich wenden und du hattest selbst in stressigen Phasen immer ein offenes Ohr und ein Lächeln frei.

Mein besonderer Dank gilt meinen Büronachbarn **Birk Urmersbach** und **Paul Mieske**, mit euch konnte ich trotz der zeitweiligen Achterbahnfahrt immer auch herzlich lachen. Und ohne eure Unterstützung wäre ich wahrscheinlich im Programmierchaos von R versunken. Meinen Kollegen **Dr. Anne Jaap**, **Pia Kahnau**, **Dr. Juliane Preikschat** und **Dr. Annalena Riedasch** möchte ich ebenfalls für die spannenden Einblicke in Eure Arbeit und den konstruktiven Austausch danken. Besonders danken möchte ich ebenfalls allen Tierpflegenden, die sich rührend um meine Mäuschen gekümmert haben und mich tatkräftig bei den Versuchen, trotz technischer Hürden, unterstützt haben. Allen voran eure lieben Worte, **Carola Schwarck** und **Lisa Godjenko** haben mich immer ermutigt am Ball zu bleiben.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie danken, die mich immer daran erinnert haben, auch das Leben neben der Arbeit zu „enrichen“ und zu genießen. Auf eure Unterstützung und Rückhalt kann ich mich stets verlassen, dafür bin ich sehr dankbar. Nicht zu vergessen, möchte ich ebenfalls meinem felligen Begleiter Pepe danken, der mir mit seiner verschmust quirligen Art über viele emotionale Stolpersteine geholfen hat.

## **10 Finanzierungsquellen**

Die Arbeiten wurden finanziell unterstützt durch das Deutsche Zentrum zum Schutz von Versuchstieren (Bf3R) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR).



## **11 Interessenskonflikte**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## **12 Selbstständigkeitserklärung**

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

Berlin, den 01.12.2023

Ute Hobbiesiefken