

**Tierärztliche Hochschule Hannover**

**Einfluss unterschiedlicher Handlingmethoden und eines  
strukturellen Enrichments auf aggressionsassoziierte  
Parameter in männlichen C57BL/6NCrl Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Sinja Susanna Mertens

aus Aachen

Hannover 2020

Wissenschaftliche Betreuung:

1. Prof. Dr. Bernhard Hiebl  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover;  
Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie

2. PD. Dr. Sabine Chourbaji  
Karl-Ruprecht-Universität Heidelberg;  
Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Hiebl

2. Gutachter: Prof. Dr. Stephanie Krämer

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2020

Diese Arbeit wurde anteilig durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG; (FOR 2591, GZ: GA427/12-1) gefördert.

Für Mama und Tom.



Teile dieser Dissertation wurden in folgender international anerkannten Fachzeitschrift zur Veröffentlichung angenommen:

- Sinja Mertens, Miriam A. Vogt, Peter Gass, Rupert Palme, Bernhard Hiebl, Sabine Chourbaji, **Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrl mice**. PLOS ONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367> (April 12, 2019).

Teile dieser Dissertation wurden zur Veröffentlichung eingereicht und befinden sich derzeit im Peer-Review Verfahren:

- Sinja Mertens, Peter Gass, Rupert Palme, Bernhard Hiebl, Sabine Chourbaji, **Effect of a partial cage dividing enrichment on aggression-associated parameters in group-housed male C57BL/6NCrl mice** (submitted to “Applied Animal Behaviour Science”)

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. EINLEITUNG .....                                                                           | 1  |
| 2. LITERATURÜBERSICHT .....                                                                   | 6  |
| 2.1 Die Maus als Versuchstier.....                                                            | 6  |
| 2.2 Das natürliche Verhalten der Maus .....                                                   | 6  |
| 2.3 Regulatorische Vorgaben zur Haltung von Mäusen in tierexperimentellen Einrichtungen ..... | 7  |
| 2.4 Aggressionsverhalten von Mäusen in tierexperimentellen Einrichtungen .....                | 9  |
| 2.5 Handling .....                                                                            | 10 |
| 2.5.1 Handling mit den Fingern.....                                                           | 10 |
| 2.5.2 Handling mit der Pinzette .....                                                         | 11 |
| 2.5.3 Handling mit dem Tunnel.....                                                            | 11 |
| 2.6 Enrichment .....                                                                          | 11 |
| 2.6.1 Strukturelles Enrichment und Aggressionsverhalten männlicher Mäuse .....                | 11 |
| 2.6.2 Strukturelles Enrichment und Varianz .....                                              | 14 |
| 3. TIERE, MATERIAL UND METHODEN.....                                                          | 15 |
| 3.1 Tiere und Tierhaltung.....                                                                | 15 |
| 3.1.1 Herkunft und Einsatz der Tiere .....                                                    | 15 |
| 3.1.2 Haltungsbedingungen .....                                                               | 15 |
| 3.1.3 Tierschutzrechtliche Genehmigung.....                                                   | 15 |
| 3.2 Versuchsplanung und Durchführung.....                                                     | 16 |
| 3.3.1 Handling .....                                                                          | 18 |
| 3.3.2 Enrichment .....                                                                        | 19 |
| 3.3.3 Aggressionsverhalten .....                                                              | 19 |
| 3.3.4 Verhaltenstests.....                                                                    | 19 |
| 3.3.4.1 Nestbautest (NT) .....                                                                | 20 |
| 3.3.4.2 Offenfeldtest .....                                                                   | 21 |
| 3.3.4.3 Sozialer Neu-Objekt-Test (sNOT) .....                                                 | 22 |
| 3.3.4.4 Hell/Dunkel-Box Test (HDBT).....                                                      | 22 |
| 3.3.4.5 Heizplattentest (Hotplate test, HPT).....                                             | 22 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4.6 Bewohner-Eindringling (Resident-Intruder, RI) Test .....         | 23 |
| 3.3.5 Barbering und Bisswunden.....                                      | 23 |
| 3.3.6 Körpergewicht .....                                                | 24 |
| 3.3.7 Stressinduzierte Hyperthermie .....                                | 24 |
| 3.3.8 Stressinduzierte Hyperglykämie.....                                | 25 |
| 3.3.9 Faecale Kortikosteronmetabolite (FCM).....                         | 25 |
| 3.3.10 Sektion und Organentnahme .....                                   | 26 |
| 3.3.11 Statistische Auswertung .....                                     | 26 |
| 4. MANUSKRIPTE .....                                                     | 26 |
| 4.1 Manuskript 1.....                                                    | 26 |
| 4.2 Manuskript 2 (submitted to “Applied Animal Behaviour Science“ )..... | 46 |
| 5. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION .....                                        | 73 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG.....                                                  | 79 |
| 7. SUMMARY .....                                                         | 81 |
| 8. LITERATURVERZEICHNIS .....                                            | 83 |
| 9. DANKSAGUNG.....                                                       | 93 |

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|                 |                                                                                                                                       |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Abb.            | Abbildung                                                                                                                             |
| 3R              | Replace, Reduce, Refine                                                                                                               |
| B6              | Mausstamm C57BL/6NCrl                                                                                                                 |
| BET (RIT)       | Bewohner-Eindringling Test (Resident-Intruder Test)                                                                                   |
| BMEL            | Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft                                                                                    |
| BRD             | Bundesrepublik Deutschland                                                                                                            |
| bzw.            | beziehungsweise                                                                                                                       |
| C3H             | Mausstamm CH3/HeJRj                                                                                                                   |
| ca.             | circa                                                                                                                                 |
| cm              | Zentimeter                                                                                                                            |
| cm <sup>2</sup> | Quadratzentimeter                                                                                                                     |
| e.g.            | um des Beispiels willen (lateinisch: exempli gratia)                                                                                  |
| et al.          | und andere (lateinisch: et alia)                                                                                                      |
| ETS Nr.123      | Europäisches Übereinkommen des Europarates zum Schutz der für<br>Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere |
| FELASA          | Federation of European Laboratory Animal Science Association                                                                          |
| FCM             | Fäkale Kortikosteronmetaboliten                                                                                                       |
| G               | Gauge, Feinheit des Außendurchmessers von Kanülen                                                                                     |
| GK              | Glukokortikoid                                                                                                                        |
| GV- SOLAS       | Gesellschaft für Versuchstierkunde - society of laboratory animal science                                                             |
| h               | Stunde (englisch: hour)                                                                                                               |
| HDBT (LDB)      | Hell/Dunkel-Box (Light/Dark-Box) Test                                                                                                 |

|          |                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| HPA      | Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (englisch: hypothalamic-pituitary adrenal axis) |
| HPT      | Heizplattentest                                                                           |
| i.d.R.   | in der Regel                                                                              |
| IVC      | individuell ventilierter Käfig                                                            |
| KGW      | Körpergewicht                                                                             |
| min      | Minuten                                                                                   |
| mind.    | mindestens                                                                                |
| n        | Anzahl                                                                                    |
| NT       | Nestbautest                                                                               |
| o.       | oder                                                                                      |
| OFT      | Offenfeldtest                                                                             |
| sec      | Sekunden                                                                                  |
| sNOT     | sozialer Neu-Objekt-Test                                                                  |
| sog.     | sogenanntes                                                                               |
| T        | Temperatur                                                                                |
| TierSchG | Tierschutzgesetz                                                                          |
| u.a.     | unter anderem                                                                             |
| vgl.     | vergleiche                                                                                |
| z.B.     | zum Beispiel                                                                              |



# 1. EINLEITUNG

## 3R- Prinzip

Tierversuche sind in der biomedizinischen Forschung unerlässlich, da nur durch sie komplexe Abläufe in lebenden Organismen nachvollziehbar sind und verstanden werden können. Aus ethischen Gründen sind sie jedoch auf ein unerlässliches Maß zu beschränken. Dieser Grundgedanke ist sowohl im §7 des Tierschutzgesetzes, als auch im ethischen Prinzip des 3R-Grundsatzes verankert. Das Konzept der 3R's „Replace“ (Vermeiden), „Reduce“ (Verringern) und „Refine“ (Verbessern) wurde erstmals 1959 von den beiden britischen Wissenschaftlern Rex Burch und William Russel in ihrem Buch „*The principles of humane experimental technique*“ (Russell et al., 1959) beschrieben und ist bis heute gültig: Tierversuche sollen, wenn möglich durch Alternativmethoden ersetzt (Replace), die Anzahl der Versuchstiere auf ein notwendiges Minimum reduziert (Reduction) und eine ständige Verbesserung der Umweltbedingungen der in Tierversuchen befindlichen Tiere angestrebt werden (Refine).

## Verwendung männlicher Mäuse in der biomedizinischen Forschung

Nach Angaben des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) wurden im Jahr 2017 rund 2,8 Millionen Versuchstiere in der BRD verwendet. Dabei stellen in Tierversuchen gemäß §7 (2) TierSchG Mäuse mit rund 67,5% den Großteil dar (BMEL, 2017). Überwiegend werden männliche Mäuse in der Forschung eingesetzt (Beery and Zucker, 2011b, Mogil and Chanda, 2005, Becker et al., 2005, Beery et al., 2011, Berkley, 1992, Hughes, 2007). Dies basiert u.a. auf der Annahme, dass Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren grundsätzlich irrelevant wären (Karp et al., 2017, Sorge et al., 2015). Diese Hypothese wurde bereits durch verschiedene Studien widerlegt. Untersuchungen von Sorge et al. wiesen z.B. nach, dass das Nervensystem von Männchen und Weibchen chronische Schmerzen unterschiedlich verarbeitet. Trotz dieser Erkenntnisse werden weiterhin fast ausschließlich männliche Mäuse in der Grundlagenforschung von Schmerz verwendet (Zucker and Beery, 2010).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Bevorzugung männlicher Tiere findet sich in der Physiologie weiblicher Tiere. Diese unterliegen, bedingt durch den Östrus, zyklischen Hormonschwankungen. Maus-Weibchen sind etwa ab dem 38. Lebenstag geschlechtsreif und mit einem alle vier Tage recurrierenden Sexualzyklus polyöstrisch (Green, 1966). Aufgrund der Konzentrationsschwankungen der sexuellen Steroidhormone in den vier Phasen des

Östruszyklus (Di-, Pro-, Met-, und Östrus) befürchten Forscher eine höhere Variabilität von Experimentaldaten im Vergleich zu männlichen Tieren. Obwohl die Theorie bereits in mehreren Studien widerlegt wurde (Fritz et al., 2017, Mogil and Chanda, 2005, Prendergast et al., 2014), werden trotz alledem männliche Tiere weiterhin favorisiert eingesetzt (Berkley, 1992, Mogil and Chanda, 2005, Becker et al., 2005, Hughes, 2007, Beery and Zucker, 2011a).

### **Konsequenzen der Verwendung männlicher Mäuse für den Menschen**

Die überwiegende Verwendung männlicher Tiere in der biomedizinischen Forschung führt zu Problemen, sowohl den Menschen, als auch die Tiere selbst betreffend. Krankheitsbilder, an denen zumeist Frauen erkranken (u.a. des Nervensystems wie Multiple Sklerose, Parkinson, Schizophrenie, Depressionen, Autismus oder Demenz) werden überwiegend an männlichen Tieren bzw. Zellen untersucht (Beery et al., 2011, Wald and Wu, 2010, Zucker and Beery, 2010). Das führt dazu, dass geschlechtsspezifische Unterschiede von Medikamenten nicht detektiert werden können. So wurde beispielsweise 1992 das Hypno-Sedativa Zolpidem Frauen millionenfach als Schlafhilfe entsprechend den Dosierungsempfehlungen verschrieben. Viele der Patientinnen berichteten am Morgen *post medicationem* von einer beeinträchtigten Aufmerksamkeit, welche sich unter anderem während des Autofahrens bemerkbar machte. Ursächlich hierfür ist eine unterschiedliche *clearance* des Medikaments bei Frauen im Vergleich zu Männern bei gleicher Dosierung (Zakaria et al., 2016). Wäre die Pharmakodynamik des Medikaments bereits in der präklinischen Entwicklungsphase auch an weiblichen- und nicht exklusiv an männlichen Tieren getestet worden, hätten geschlechtsspezifische Unterschiede vermutlich früher detektiert und die Folgen für Frauen verhindert werden können (Greenblatt et al., 2000, Maney, 2016).

### **Konsequenzen der Verwendung männlicher Mäuse für die Tierhaltung**

Auch die Versuchstierhaltung wird durch die vornehmliche Verwendung männlicher Mäuse vor Herausforderungen gestellt. Im §2 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) steht: „Wer ein Tier hält, betreut oder zu betreuen hat, muss das Tier seiner Art und seinen Bedürfnissen entsprechend angemessen ernähren, pflegen und verhaltensgerecht unterbringen (...)“. Da Mäuse soziale Tiere sind und in der freien Natur in einem komplexen territorialen Sozialsystem leben, ist die Gruppenhaltung somit grundsätzlich der Individualhaltung vorzuziehen. Das Aggressionslevel unter männlichen Tieren ist jedoch, sowohl in der freien Natur als auch in Gefangenschaft, generell höher als unter weiblichen. Während sich bei Weibchen in Gruppenkäfigen eine i.d.R. friedliche Sozialstruktur manifestiert, kämpfen ihre männlichen

Artgenossen, um eine Hierarchiestruktur zu formieren. Dieses agonistische Verhalten tritt vor allem nach dem obligatorischen wöchentlichen Umsetzen der Tiere in einen neuen, frisch eingestreuten Käfig auf. Das Fehlen der sogenannten *olfactory cues* (Geruchsmarken) in der frischen Einstreu, welche den Tieren zur Orientierung dienen und die gegebene Dominanzhierarchie widerspiegelt, führt Woche für Woche zum erneuten Ausfechten der Hierarchie und ggf. zur Dominanzumkehr (Van Loo et al., 2000). Verletzungen als Folge des Aggressionsverhaltens können gravierend sein. Folglich wird die Gruppe im Sinne des „Tierwohls“ getrennt, wodurch weitere Angriffe vermieden werden. Daraus resultieren infolge der als kritisch zu betrachtenden Individualhaltung gesteigerte Haltungskosten, aufgrund eines erhöhten Käfig- und Personalbedarfs.

### **Konsequenzen der Verwendung männlicher Mäuse für die Tiere**

Das permanente Ausfechten der Dominanzhierarchie in Form von Rankämpfen bedeutet, dass die Tiere individuell unterschiedlich chronischem Stress ausgesetzt sind. Dieser kann zu einer verminderten Resistenz gegenüber Pathogenen führen (Marashi et al., 2003). Zudem können Aggression und auch die damit einhergehenden Schmerzen zu Veränderung in zahlreichen physiologischen Parametern führen (Van Loo et al., 2007). Darüber hinaus kann es bedingt durch die Auseinandersetzungen zu schwerwiegenden Verletzungen bis hin zum Tod kommen (Abb. 1).

Sobald aggressives Verhalten beobachtet wird, müssen die Tiere daher getrennt werden, um weitere gesundheitliche Schäden zu vermeiden. Das Fehlen des Sozialpartners stellt jedoch nicht nur aus tierschutzrechtlicher Sicht ein Problem dar. Auch die Individualhaltung der Mäuse kann zu Veränderungen von physiologischen Parametern, *e.g.* des Immunsystems, und des Verhaltens führen (Bartolomucci et al., 2003, Van Loo et al., 2001a). Die Trennung aggressiver Gruppen fügt zudem eine weitere Variable in laufende Versuche hinzu, welche die statistische Power und die externe Validität der Daten reduzieren kann (Sherwin, 2004).

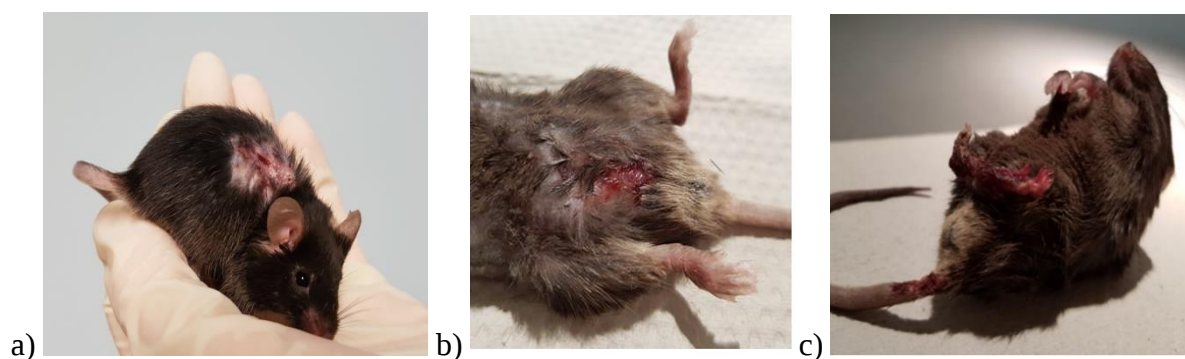


Abbildung 1: Männliche Mäuse, welche Aggressionsverhalten durch den Käfigpartner ausgesetzt waren. a) Abheilen einer tiefen Hautwunde, b) Penisamputation, c) schwere Schwanz- und Pfotenverletzung

### Lösungsansätze

Verschiedene Lösungsansätze existieren bereits, um das Problem der Aggression innerhalb der Gruppenhaltung männlicher Mäuse zu beheben (Weber et al., 2017).

Für das wöchentliche Umsetzen der Tiere-, sowie für das Durchführen von Experimenten müssen die Tiere gehandelt werden. Die Standard-Handlingmethode, um eine Maus aus ihrem Käfig hochzuheben, ist das Greifen des Tieres mit Daumen und Zeigefinger am proximalen bis mittleren Drittel des Schwanzes. Diese Prozedur ist aversiv und stressig für die Tiere (Balcombe et al., 2004). Stress wiederum kann zu erhöhtem Angst- und Aggressionsverhalten führen (Kovalenko et al., 2014, Veenema, 2009, Matsumoto et al., 2005, De Kloet et al., 2005). Deswegen werden in der Literatur weniger aversive Handlingformen empfohlen (Gouveia and Hurst, 2017, Gouveia and Hurst, 2013, Nakamura and Suzuki, 2018, Miller and Leach, 2016). Eine weitere Möglichkeit, Aggressionsverhalten zu reduzieren, ist die strukturelle Umweltanreicherung bzw. das strukturelle Enrichment. Durch diese Umweltmodifikation sollen Verhaltensbedürfnisse erfüllt und das Wohlbefinden der Tiere gesteigert werden. Bisher ist das einzig nachweislich aggressionsminimierende Enrichment Nestmaterial, welches jedoch die Aggression nicht vollständig eliminiert (Van Loo et al., 2002).

### Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von drei unterschiedlichen Handlingformen, sowie eines käfigunterteilenden Enrichments auf stress- und aggressionsassoziierte Parameter in männlichen C57BL/6NCrl Mäusen. Durch die Verwendung des C57BL/6N Stammes, welcher der am häufigsten verwendete genetische

Hintergrund von Mäusen ist (Battey et al., 1999), sollen möglichst viele Tiere von den Ergebnissen profitieren.

Unter Berücksichtigung verschiedener Haltungsformen (Einzel- und Gruppenhaltung) wurde im ersten Versuchsteil (Studie 1) das Handling der Tiere durch Greifen am proximalen bis mittleren Drittel des Schwanzes i.) mit einer Pinzette mit definierbarem Druck (Mouse Holding Forceps with Replaceable Tips, FST, Heidelberg, Deutschland), ii.) mit Daumen und Zeigefinger der behandschuhten Hand oder das Hochnehmen der Tiere iii.) mit einer passiven Transfertechnik (polycarbonate mouse handling tube, Datasand Group, Manchester, Großbritannien) bezüglich aggressions-assoziierter Parameter untersucht. Diejenige Handlingmethode, die sich als am wenigsten aversiv herausgestellt hat, wurde im zweiten Versuchsteil angewendet.

Im zweiten Versuchsteil (Studie 2) wurde ein kreuzförmiger Raumteiler als neu entwickeltes, geschlechtsspezifisches Enrichment in die Gruppenhaltung (n = 3) männlicher C57BL/6NCrl Tiere eingebracht (vgl. Abb. 5c). Ziel der kreuzförmigen Anreicherungsstruktur war es, den männlichen Mäusen eine Versteck-, Unterkunft- und Fluchtmöglichkeit zu bieten, ohne Handling und Adspektion der Tiere zu behindern. Zwei Formen des Enrichments, i) durchsichtig, sowie ii) schwarz-opak, wurden getestet, um mögliche Effekte bedingt durch deren Transparenz zu detektieren.

Folgende Hypothesen wurden für das Handling- und das strukturelle Enrichment aufgestellt:

- 1) Das Handling der männlichen Mäuse mit einer Pinzette führt zu einer Erhöhung des aggressiven Verhaltens im Vergleich zum Handling mit der Hand.
- 2) Das Handling männlicher Mäuse mittels eines Tunnels führt zu einer Verminderung des aggressiven Verhaltens, verglichen mit dem Handling mit der Hand.
- 3) Das Einbringen des kreuzförmigen Enrichments in die Gruppenhaltung männlicher Mäuse führt zu einer Reduktion des Aggressionsverhaltens, unabhängig von dessen Transparenz.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Die Maus als Versuchstier

Nagetiere sind weit verbreitete Modellorganismen, um vielfältige wissenschaftliche Fragestellungen zu untersuchen. Mit einer Anzahl von ca. 1,4 Millionen sind Mäuse das mit Abstand das am häufigsten eingesetzte Versuchstier in Deutschland 2017 (BMEL, 2017). Begründet ist dies unter anderem durch ihre kleine Körpergröße, dem daraus resultierenden geringem Platzbedarf und den verhältnismäßigen niedrigen Haltungskosten. Weitere wesentliche Vorteile machen die Maus zum Tiermodell der Wahl: Die hohe Fruchtbarkeit, das kurze Generationsintervall, sowie die Möglichkeit, spezifische Inzuchtstämme mit speziellen genetischen Eigenschaften zu produzieren (Vandenbergh, 2000, Rülcke, 2001).

### 2.2 Das natürliche Verhalten der Maus

Um den Haltungsanforderungen von Labormäusen gerecht zu werden, ist es zwingend erforderlich, deren wilde Vorfahren genauer zu studieren, da das Verhalten von Labormäusen immer noch in vielen Verhaltensweisen mit dem der Wildmäuse übereinstimmt (Hutchinson et al., 2005). Die Labormaus leitet sich ursprünglich von der Hausmaus (*mus musculus*) ab. Die weltweit verbreiteten nachtaktiven Nagetiere sind gute Kletterer, Springer, sowie Läufer und hinsichtlich ihres Sozialverhaltens eines der am besten untersuchten Säugetiere. Die Tiere leben, je nach Nahrungsangebot, in unterschiedlich großen, hierarchisch geordneten Familienverbänden, bestehend aus einem dominanten Männchen, einem oder mehreren adulten Weibchen und deren Jungtieren (Van Zegeren, 1980). Mit Eintritt der Geschlechtsreife fordern Männchen den Revierinhaber zum Kampf heraus, wobei es hierbei zu tödlichen Auseinandersetzungen kommen kann, oder sie wandern ab, um ein eigenes Revier aufzubauen (Latham and Mason, 2004). Falls die Besetzung eines eigenen Territoriums nicht gelingt, leben diese Männchen entweder dauerhaft nomadisch oder sie werden von einem dominanten Männchen in dessen Familienverband geduldet (GV-SOLAS, 2013). Die Rangordnung der Mäuseböcke wird dann durch Rangkämpfe festgelegt. Die untergeordneten Mäuseböcke senden zudem in dieser Gruppenkonstellation Signalstoffe aus, wodurch sie für die Weibchen unattraktiv wirken. Dadurch wird die Toleranz gegenüber dem dominanten Männchen erhöht (Macdonald, 2004).

Die Reviergrößen variieren, abhängig vom Nahrungsangebot und der Populationsdichte, zwischen 4 – 6 m<sup>2</sup> in Gebäuden (Close, 2005) bis hin zu mehreren Quadratkilometern in natürlichen Habitaten (Latham and Mason, 2004). Die Territorialgrenzen werden vom dominanten Mäusebock durch Harnmarken, welche einen familientypischen Duft besitzen, markiert (Humphries et al., 1999, Gosling et al., 2000), und gegenüber männlichen Artgenossen, welche nicht zum Familienverband gehören, hartnäckig verteidigt (Crowcroft and Rowe, 1963, Rowe and Redfern, 1969). Falls ein männlicher, nicht der Gruppe angehöriger Mäusebock diese Grenze überschreitet, provoziert dies in dem Halter des Territoriums Verfolgungs- und Aggressionsverhalten (Mackintosh, 1973, Mackintosh, 1970).

## 2.3 Regulatorische Vorgaben zur Haltung von Mäusen in tierexperimentellen Einrichtungen

Das TierSchG schreibt in §§1-2 vor, das Wohlbefinden von Tieren zu schützen und diese entsprechend ihrer Art und ihren Bedürfnissen verhaltensgerecht unterzubringen. Die Lebensweise der nachtaktiven Nagetiere in Familienverbänden muss daher auch in der Haltung der Tiere in Käfigen berücksichtigt werden.

Während in freier Wildbahn adulte männliche Mäuse alleine mit mehreren Weibchen und deren Nachkommen in einer Gruppe leben, ist diese Konstellation in der Versuchstierhaltung nicht replizierbar. Männliche Mäuse werden entweder in gleichgeschlechtlichen Gruppen oder einzeln gehalten. Die Einzelhaltung entspricht jedoch keiner verhaltensgerechten Unterbringung und ist somit nach §2 TierSchG eigentlich nicht vertretbar. Präferenztests an Labormäusen haben gezeigt, dass Mäuseböcke ein Bedürfnis nach Sozialkontakten haben, auch mit anderen männlichen Tieren (Van Loo et al., 2004). Allerdings stellt die Gruppenhaltung von Mäuseböcken aufgrund des Aggressionsverhaltens zwischen den gleichgeschlechtlichen Artgenossen ein Tierschutzproblem dar (Kappel et al., 2017).

Deutschland ist als Mitglied des Europarates zudem rechtlich an das europäische Übereinkommen des Europarates zum Schutz der für Versuche und wissenschaftlichen Zwecke verwendeten Tiere (ETS Nr. 123) gebunden, in dessen Anhang A grundsätzlich die Forderung niedergeschrieben ist, soziale Tiere in Gruppen zu halten, solange diese stabil und harmonisch sind. Allerdings wird explizit darauf verwiesen, dass die Haltung männlicher Mäuse in Gruppen aufgrund schwerer Aggressivität zwischen Artgenossen problematisch sein kann und diese

Tiere einzeln untergebracht werden können, wenn ansonsten „mit unerwünschten Folgen oder Schäden zu rechnen ist“.

Im Jahr 2013 wurde die von der EU verabschiedete Richtlinie 2010/63/EU zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere in nationales Recht umgesetzt. Sowohl die Unterbringung als auch die Pflege von Versuchstieren wurden hier festgelegt. Tiere müssen in stabilen Gruppen mit anderen Tieren untergebracht werden, falls diese in der Natur nicht einzeln leben. Ist eine Einzelunterbringung der Tiere nach Artikel 33, Absatz 3, gerechtfertigt („aus wissenschaftlichen Gründen“, sowie aus „Gründen des Tierschutzes oder der Tiergesundheit“), muss die Dauer der Unterbringung auf das notwendige Mindestmaß beschränkt und Sicht-, Hör-, und/oder Berührungskontakt aufrechterhalten werden. Neben einem allgemeinen existiert auch ein artspezifischer Teil, der unter anderem konkrete Leitlinien für die Haltung von Nagetieren beschreibt. Für die artgerechte Unterbringung von Labormäusen wurden detaillierte Angaben zur Haltung in Käfigen festgesetzt (Tabelle 1.1. Mäuse, gekürzt). So werden abhängig vom Körpergewicht der Tiere eine Bodenfläche von 60 – 100 cm<sup>2</sup>/Tier und eine Käfighöhe von 12 cm gefordert.

Tabelle 1.1. Mäuse [2010/63/EU, gekürzt]

|                | Körpergewicht<br>(g) | Mindestgröße<br>der<br>Unterbringung<br>(cm <sup>2</sup> ) | Bodenfläche<br>je Tier<br>(cm <sup>2</sup> ) | Mindesthöhe<br>der<br>Unterbringung<br>(cm) | Datum gemäß<br>Artikel 33<br>Absatz 2 |
|----------------|----------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------|
| Vorratshaltung | bis zu 20            | 330                                                        | 60                                           | 12                                          | 1. Januar 2017                        |
| und während    | > 20 bis 25          | 330                                                        | 70                                           | 12                                          |                                       |
| der            | > 25 bis 30          | 330                                                        | 80                                           | 12                                          |                                       |
| Verfahren      | > 30                 | 330                                                        | 100                                          | 12                                          |                                       |

Für die tiergerechte Haltung von Labormäusen wurden zudem Empfehlungen von der GV-SOLAS herausgegeben (GV-SOLAS, 2014, GV-SOLAS, 2013). In den beiden Dokumenten wird darauf verwiesen, dass Mäuse soziale Tiere sind und folglich paarweise oder in Gruppen gehalten werden sollen. Diese Empfehlung gilt jedoch nicht uneingeschränkt, sondern bedarf einer geschlechtsspezifisch differenzierten Betrachtung: „Während für die Weibchen die allgemeine Empfehlung der Vermeidung von Einzelhaltung uneingeschränkt gilt, stellt bei Mäuseböcken die Einzelhaltung häufig die einzige vertretbare Haltungsform dar.“

## 2.4 Aggressionsverhalten von Mäusen in tierexperimentellen Einrichtungen

Die Folgen von Aggressionsverhalten sind die Haupttodesursache von jungen Labormäusen (Gaskill et al., 2016). Daher müssen die Tiere, sobald es zu vermehrten Kämpfen kommt, zum Eigenschutz getrennt werden. Rangordnungskämpfe werden in verstärkter Frequenz nach dem wöchentlichen Käfigwechsel ausgetragen (Van Loo et al., 2000, Gray and Hurst, 1995). Dies ist nicht verwunderlich, da sich die Tiere innerhalb des Käfigs über Duftspuren orientieren, welche sowohl für die Wiedererkennung als auch für die Stabilität der sozialen Toleranz zwischen den Käfigbewohnern eine wichtige Rolle spielen (Gray and Hurst, 1995, Van Loo et al., 2003, Van Loo et al., 2000, Hurst et al., 1993). Nach dem Käfigwechsel sind diese Orientierungsmarken nicht mehr existent. Die Tiere werden beim Aufnehmen durch den Tierpfleger/ Experimentator zudem fremdartigen Gerüchen ausgesetzt, und zusätzlich findet die Prozedur i.d.R. tagsüber bzw. in der Inaktivitätsphase der Tiere statt (Benedetti et al., 2008). All diese drei Faktoren könnten einen bedeutsamen Einfluss auf das Aggressionslevel der Tiere haben (Poole et al., 1987).

Die sich wiederholenden Rangordnungskämpfe, um die Hierarchiebeziehungen zu formieren, führen zu Stress bei allen Beteiligten - sowohl bei der dominanten Maus, die permanent ihren Status verteidigen muss, als auch bei den subordinaten Tieren, welche sich wiederholt verteidigen müssen (Kappel et al., 2017). Der chronische Stress kann u.a. zu einer verminderten Körpergewichtszunahme, adrenaler Hypertrophie, verringerter Risiko- und Explorationsbereitschaft und gesteigerter Ängstlichkeit führen (Singewald et al., 2009).

Empfehlungen der GV-SOLAS um eine möglichst ausgeglichene Gruppenhaltung von adulten männlichen Mäusen zu erreichen, ist die gemeinsame Aufzucht von Wurfgeschwistern, welche keine Zuchterfahrung haben. Weber et al. publizierten außerdem eine Übersicht, die alle bisherigen Ansätze die Aggression von Labormäusen zu reduzieren, zusammenfasst (Weber et al., 2017). Deutlich wird bereits in dem Titel „Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem?“, dass bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine zufriedenstellende Lösung gefunden wurde.

## 2.5 Handling

Der Begriff Handling beschreibt die Handhabung der Tiere, wobei verschiedene Handlingmethoden von Mäusen existieren. Grundsätzlich kann zwischen aversivem und nicht aversivem Handling unterschieden werden. Zum aversiven Handling zählen beispielsweise das Greifen der Tiere am proximalen bis mittleren Drittel des Schwanzes mittels Daumen und Zeigefinger oder einem Greifgerät, oder das Greifen der Tiere über die Nackenhautfalte mit Unterstützung am Körper bzw. Schwanz. Zum nicht aversiven Handling gehört das "Schöpfen" der Tiere auf die Handinnenfläche (sog. „cupping“ o. „cup-Handling“) oder der passive Transport der Mäuse mittels eines Tunnels (Gouveia and Hurst, 2017).

Unabhängig von der eingesetzten Technik bedeutet bereits minimales Handling nachgewiesenermaßen Stress für die Tiere (Balcombe et al., 2004, Deacon, 2006b). Unter anderem kommt es zu einer Erhöhung der Herzfrequenz, des Blutdrucks, sowie des Kortikosteron-Serumspiegels (Rasmussen et al., 2011). Diese physiologischen Veränderungen können über mehrere Stunden andauern und folglich wissenschaftliche Daten beeinflussen und deren Aussagefähigkeit beeinträchtigen (Gouveia and Hurst, 2013, Lewejohann et al., 2011).

### 2.5.1 Handling mit den Fingern

Die am häufigsten eingesetzte Handlingmethode, um Labormäuse aus ihrem Käfig zu entnehmen, ist das Greifen der Tiere am Schwanz mit dem Daumen und Zeigefinger (Gouveia and Hurst, 2013, Deacon, 2006b). Wichtig ist dabei, die Tiere im Bereich des proximalen bis mittleren Drittels des Schwanzes hochzunehmen, da es sonst aufgrund des Zugs des Körpereigengewichts dazu kommen kann, dass sich die Haut vom Schwanz löst. Das Tragen von Handschuhen ist bei dieser Methode nicht nur aus hygienischen Gründen essentiell, sondern auch unerlässlich, um die Beeinflussung der Tiere durch den Eigengeruch des Experimentators so gering wie möglich zu halten.

Diese Handlingmethode induzierte bei den Tieren in verschiedenen Verhaltenstests, z.B. im Hell/Dunkel-Box Test, ein höheres Aversions- und Angstlevel als bei der Anwendung nicht aversiver Handlingmethoden (Hurst and West, 2010). In Bezug auf Schmerzparameter, welche mittels der mouse grimace scale (Maus-Grimassen-Skala) evaluiert wurden, konnten Miller et al. jedoch keine Unterschiede zur nicht aversiven Methode (Handling mit einem Tunnel) feststellen (Miller and Leach, 2016).

### 2.5.2 Handling mit der Pinzette

Aus Gründen der Biosicherheit, des Arbeitsschutzes, und um Kreuz-Kontaminationen zwischen den Tieren zu vermeiden bzw. zu reduzieren, werden Tiere in Zuchtbetrieben, aber auch immunsupprimierte Tiere, am Schwanz auch mit speziell dafür hergestellten Pinzetten gegriffen, die eine Gewebequetschung verhindern (Flurkey and Currer, 2009). Eine systematische Auswertung dieser Form des Handlings liegt, nach unserem Kenntnisstand, bislang nicht vor, sodass keine vergleichende Literatur existiert.

### 2.5.3 Handling mit dem Tunnel

Eine Form des nicht aversiven Handlings stellt das Hochheben der Tiere mittels eines Tunnels dar. Tiere, welche mit dieser Methode gehandelt wurden, zeigten in verschiedenen Tests ein geringeres Angstverhalten (Hurst and West, 2010, Gouveia and Hurst, 2013). Zudem zeigten Mäuse in einer Studie von Gouveia und Hurst im Vergleich zum ebenfalls nicht aversiven Cupping und zum aversiven Handling mit den Fingern eine geringere Variabilität in den Experimentaldaten (Gouveia and Hurst, 2017).

## 2.6 Enrichment

Enrichment ist definiert als ein Vorgehen, das das Wohlbefinden der Tiere mittels sensorischer und motorischer Stimulation mittels Strukturen fördern soll, das Ausleben von spezie-typischen Verhalten erleichtert, und das psychologische Wohlbefinden der Tiere mittels physischer Aktivität und kognitiven Herausforderungen fördert (Baumans, 2000). Es gibt verschiedene Möglichkeiten des Enrichments, u.a. i) die Gruppenhaltung als Anreicherung der sozialen Umgebung, ii) Strukturen, welche die räumliche Komplexität des Käfigs erhöhen, sowie iii) das Einbringen von Nestbaumaterialien (GV-SOLAS, 2014).

### 2.6.1 Strukturelles Enrichment und Aggressionsverhalten männlicher Mäuse

Obwohl z.B. das Einbringen von strukturellem Enrichment in den Käfig in der Literatur ausdrücklich empfohlen wird, kann dadurch in der Gruppenhaltung von Mäuseböcken das Aggressionsverhalten gesteigert und folglich die Stressbelastung erhöht werden (Marashi et al., 2003). Neben der möglichen nachteiligen Auswirkung auf das Verhalten kann es auch zu Veränderungen von Experimentaldaten kommen (Van de Weerd et al., 2002).

Drei Maßnahmen, um Aggressionsverhalten zu reduzieren, können hervorgehoben werden (Weber et al., 2017):

- i) die Erniedrigung der Umgebungstemperatur,
- ii) die Formierung von stabilen Gruppen, am besten durch das Zusammensetzen von Wurfgeschwistern,
- iii) der Transfer von altem Nestmaterial während des Käfigwechsels.

Die Erniedrigung der Haltungstemperatur stellt bei Mäusen meist keine Option dar, da diese Tiere in der tierexperimentellen Standardhaltung bereits sub-thermoneutral gehalten werden (22 – 26 °C; ihre eigentliche thermoneutrale Temperatur liegt bei 30 – 32 °C) (Hylander and Repasky, 2016). Auch die Aufzucht von Wurfgeschwistern lässt sich aufgrund der Vielzahl der in Versuchen benötigten Tiere nicht immer realisieren, sodass der Transfer von altem Nestmaterial die einzig bekannte und umsetzbare Möglichkeit darstellt, Aggressionsverhalten zu vermindern.

Das Einbringen von Nestmaterial ist gegenwärtig das einzig bekannte Enrichment mit nahezu ausschließlich positivem Effekt: Bis zu 20% ihrer täglichen Aktivität beschäftigen sich die Tiere mit dem Material (Van de Weerd et al., 1997b). Es ermöglicht ihnen die Beeinflussung des Mikroklimas (Gaskill et al., 2012, Froberg-Fejko, 2010) und vermindert nachweislich das Aggressionsverhalten (Kaliste et al., 2006, Bayne and medicine, 2018). In keiner Studie wird ein negativer Effekt von Nestmaterial auf physiologische und ethologische Parameter der Tiere deutlich (Olsson and Dahlborn, 2002). Daher wird es in Käfigen von Mäusen standardmäßig eingebracht (Hess et al., 2008).

Eine Steigerung des Aggressionsverhaltens von Mäuseböcken ist zu beobachten beim Transfer von alter bzw. benutzter Einstreu, einer höheren Tierdichte pro Käfig (Typ II:  $n > 3$ ), wenn Jungtiere verfrüht (vor dem 14. Lebenstag) abgesetzt werden, und falls mehr als ein Unterschlupf angeboten wird (Weber et al., 2017). Der Transfer von benutzter Einstreu ist nicht nur aus hygienischen Gründen fragwürdig, sondern zerstört auch die Duftmarkierungen aus Urin und Fäzes des Ursprungskäfigs, sodass diese im Empfängerkäfig nicht mehr als Orientierungsmarken dienen. Folglich kommt es zu einer Steigerung der Aggression (Gray and Hurst, 1995). Mäuseböcke sollten zudem in Typ II-Käfigen in Gruppen von  $n = 3$  gehalten werden um Aggressionen und den damit einhergehenden Stress zu vermeiden (Van Loo et al., 2001b, Weber et al., 2017). Das normale Absetzalter von 21 Tagen sollte nicht unterschritten werden da es bei früherem Absetzen, *e.g.* vor dem 14. Lebenstag, bedingt durch die fehlende Interaktion zwischen Mutter und Jungtieren nicht zum Erlernen von spezifischen

Kommunikationsmustern kommt. Folglich ist es dem verfrüht abgesetzten Tier nicht möglich, adäquat auf mögliches Aggressionsverhalten eines Artgenossen zu reagieren. Es kommt zu Fehlkommunikation, welche zu gesteigerter Aggression führt (Kikusui et al., 2004).

Die Ergebnisse von Studien zur Auswirkung von Käfig-strukturierendem Enrichment (mit Ausnahme der Einstreu) auf das Aggressionsverhalten von in Gruppen gehaltenen Mauseböcken sind nicht einheitlich (Olsson and Dahlborn, 2002): Sowohl eine Verminderung (Ambrose and Morton, 2000, Van Loo et al., 2002, Vestal and Schnell, 1986, Belz et al., 2003), als auch eine Zunahme (Barnard et al., 1996, Haemisch and Gartner, 1994, Haemisch and Gartner, 1997, Henderson, 1976, Marashi et al., 2003, Tsai et al., 2002, Van de Weerd et al., 2004, Bergmann et al., 1995) des aggressiven Verhaltens oder gar kein Effekt (Haemisch and Gartner, 1997, Marashi et al., 2003, Van Loo et al., 2004, Van Loo et al., 2003, Van der Meer et al., 2004, Van Loo et al., 2002) werden beschrieben. Bei Mauseböcken können Käfig-strukturierende Enrichment-Maßnahmen zu einer Aktivierung ihres Territorialverhaltens führen, einhergehend mit vermehrt aggressiven Auseinandersetzungen zwischen den Käfigbewohnern und einer Destabilisierung der sozialen Dominanzstruktur innerhalb der Gruppe (Haemisch and Gartner, 1997, Howerton et al., 2008, Marashi et al., 2003). Eine mögliche Erklärung liefert folgender Ansatz von Weber et al.: „It is possible that insufficient enrichment is to blame. Only a small number of enrichment items fit inside a conventional mouse cage. Scarce, but important, resources are highly valued, and animals will compete over resources that they can monopolize. However, if resources are provided in abundance and/or spread out, one animal may not need to or be able to defend all of them“ (Weber et al., 2017). Zu der gleichen Erkenntnis kommen Van Loo et al. (Van Loo et al., 2002), sodass bei der Auswahl eines Käfig-strukturierenden Enrichments hinsichtlich dessen Dominierbarkeit durch ein Einzeltier Sorge getragen werden muss.

Einen neuen Ansatz verfolgte 2018 eine Forschergruppe um Bret R. Tallent, welche den Einsatz eines partiell käfigunterteilenden Enrichments in gruppengehaltenen männlichen Mäusen untersuchte. Durch die strukturelle Unterteilung des Käfigs wurde den Tieren vor allem in Stress-Situationen, wie beispielsweise dem Umsetzen, eine Flucht- bzw. Rückzugsmöglichkeit geboten, sodass sie potentiellen Angriffen ausweichen können. Dies führte zu einer signifikanten Verminderung des Aggressionsverhaltens männlicher Tiere (Tallent et al., 2018).

### 2.6.2 Strukturelles Enrichment und Varianz

Die Verwendung von Nestmaterial ist Teil der Standardhaltung von Mäusen. Die Befürchtung, dass durch weiteres Einbringen von Enrichment die Standardisierung der Käfighaltung eingeschränkt wird, und es zu einer erhöhten Varianz in den Experimentaldaten kommt, beschäftigt die Forschung schon seit Längerem. Eine geschlechterspezifisch differenzierte Betrachtung ist hier wesentlich, da Männchen und Weibchen verschieden auf Haltungsanreicherungen reagieren können (Tsai et al., 2002, Tsai et al., 2003, Tsai et al., 2006). Für Weibchen konnte bereits in mehreren Studien eine Erhöhung der Datenvariabilität widerlegt werden (Wolfer et al., 2004, Augustsson et al., 2003, Baumans et al., 2010). Für Mäuseböcke existieren nur wenige Daten, welche zudem inkongruent sind. Während eine retrospektive Analyse von Enrichment-Studien aus dem Jahr 1999 eine erhebliche Varianzerhöhung bei Mäuseböcken festgestellt hat, bei denen ungeeignete Enrichment-Maßnahmen (ersichtlich anhand einer pathophysiologischen Adaptation der Mäuse) zum Einsatz kamen (Gärtner, 1999), kam eine Forschergruppe rund um Baumans et al. 2010 zu der Erkenntnis, dass geschlechterunabhängig sowohl das eingebrachte Nestmaterial, als auch die strukturelle Käfiganreicherung, zu keiner Erhöhung der Datenvarianz führt (Baumans et al., 2010).

## 3. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Tiere und Tierhaltung

#### 3.1.1 Herkunft und Einsatz der Tiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden männliche Tiere des Mausstammes C57BL/6NCrl (B6; n = 72) für alle physiologischen Parameter und alle Verhaltenstests eingesetzt. Als Interaktionspartner im Rahmen der Verhaltenstestung wurden Männchen des Inzuchtstammes C3H/HeJRj (C3H; n = 18) verwendet. Die B6-Mäuse wurden in einem Alter von drei Wochen, die C3H-Mäuse in einem Alter von 10 Wochen eingesetzt.

#### 3.1.2 Haltungsbedingungen

Alle Tiere wurden in einer Barrierehaltung in Macrolon-Typ II Käfigen (370 cm<sup>2</sup>, Tecniplast, Mailand, Italien) der Internationalen Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) in Heidelberg gehalten. Der spezifisch pathogen-freie Status (SPF) in der Versuchstierhaltung wurde den FELASA-Empfehlungen entsprechend eingehalten (Maehler et al., 2015). Zwei eigens für die Haltung sowie Durchführung der Versuche ausgestattete Tierräume mit eingeschränktem Personenverkehr standen zur Verfügung, um eventuelle Störfaktoren auf ein Minimum zu reduzieren. Eine kontrollierte Raumtemperatur von  $21 \pm 2$  °C mit einer relativen Luftfeuchte von  $55 \pm 5$  % wurde eingehalten. Der Hell/Dunkel-Rhythmus betrug 12/12 Stunden mit einer Helligkeitsphase von 21 bis 9 Uhr. Aufgereinigtes Tränkwasser sowie Futterpellets (Rod 16-A LasVendi, Soest, Deutschland) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Als Einstreu wurde Espenholzgranulat (Abedd® LTE-001, Lab & Vet Service, Wien, Österreich) verwendet, welches wöchentlich gewechselt wurde. Jeder Käfig enthielt zudem als Umgebungsanreicherung ein Nestlet (Plexx B.V, AB Elst, Niederlande).

Der C3H-Inzuchtstamm wurden unter den gleichen abiotischen Bedingungen gehalten, wie die B6-Tiere, jedoch in einem separaten Tierraum, ohne umgekehrten Hell/Dunkel-Rhythmus (Helligkeitsphase von 9 – 21 Uhr).

#### 3.1.3 Tierschutzrechtliche Genehmigung

Das Versuchsvorhaben wurde nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes durchgeführt und vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter dem Aktenzeichen G-154/17 genehmigt.

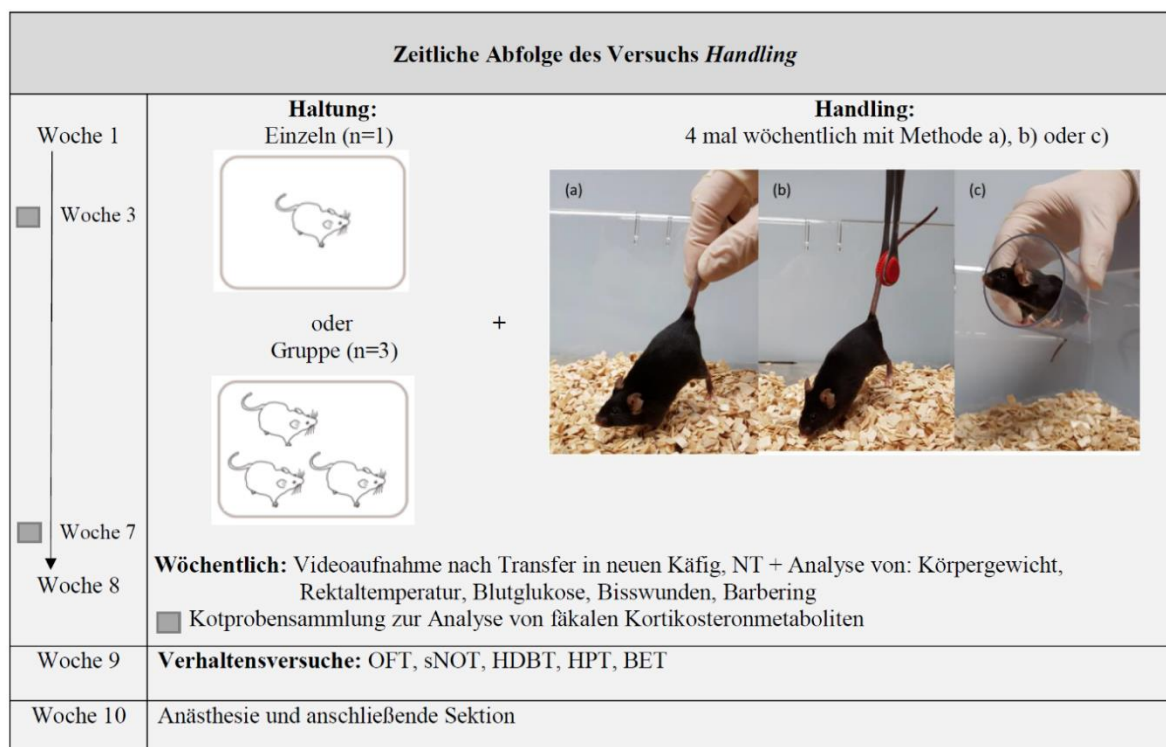
## 3.2 Versuchsplanung und Durchführung

Alle Experimente wurden in der Dunkelperiode durchgeführt, um die verschiedenen Verhaltensparameter der Tiere in ihrer Aktivitätsphase zu generieren. Zudem wurden alle Tests von einer weiblichen Person durchgeführt, um veränderte Stressreaktionen der Versuchstiere auf unterschiedliche Geschlechter der Experimentatoren, wie von Sorge et al. Beschrieben zu vermeiden (Sorge et al., 2014).

Bei Ankunft der Tiere wurden diese randomisiert in die jeweilige Haltungsform aufgeteilt. Die Randomisierung erfolgte durch zufällige Ziehung der Experimentaltiere aus der Grundgesamtheit („random sampling“).

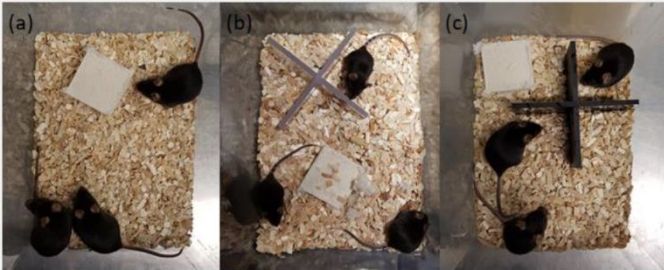
Zur Identifizierung der in Gruppen gehaltenen Tiere (drei je Käfig) wurden diese mittels Ohrlöchern (Maus eins = ein Ohrloch; Maus zwei = zwei Ohrlöcher, Maus drei = drei Ohrlöcher), sowie zusätzlich mit einem wasserfesten schwarzen Filzstift am Schwanz (Maus eins = ein Punkt; Maus zwei = zwei Punkte, Maus drei = drei Punkte) gekennzeichnet. Die Tiere in der Einzelhaltung im Versuch *Handling* wurden ebenfalls entsprechend markiert, damit alle Tiere zu Versuchsbeginn die gleiche Erfahrung gemacht hatten.

Abbildung zwei und drei stellen eine Übersicht über den Ablauf der ersten (Abb. 2) bzw. zweiten Studie (Abb. 3) dar.



NT = Nestbautest, OFT = Offenfeldtest, sNOT= sozialer Neu-Objekt-Test, HDBT = Hell/Dunkel-Box Test, HPT = Heizplattentest, BET = Bewohner-Eindringling Test

Abbildung 2: Zeitliche Abfolge des Versuchs *Handling*

| Zeitliche Abfolge des Versuchs <i>Enrichment</i>                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div> <div>Woche 1</div> <div>Woche 3</div> <div>Woche 7</div> <div>Woche 8</div> <div>Woche 9</div> <div>Woche 10</div> </div> | <div> <div> <b>Haltung:</b><br/>Gruppe (n=3)  </div> <div> <b>Enrichment:</b><br/>a) ohne, b) durchsichtig oder c) schwarz-opak  </div> </div> <div> <p><b>Wöchentlich:</b> Videoaufnahme nach Transfer in neuen Käfig, NT + Analyse von: Körpergewicht, Rektaltemperatur, Blutglukose, Bisswunden, Barbering</p> <p><b>Verhaltensversuche:</b> OFT, sNOT, HDBT, HPT, BET</p> <p>Anästhesie und anschließende Sektion</p> </div> |

NT = Nestbaustest, OFT = Offenfeldtest, sNOT= sozialer Neu-Objekt-Test, HDBT = Hell/Dunkel-Box Test, HPT = Heizplattentest, BET = Bewohner-Eindringling Test

Abbildung 3: Zeitliche Abfolge des Versuchs *Enrichment*

Die Beurteilung von Körpergewicht (KGW), Wunden, sowie Barbering wurde jede Woche anhand von Scores durchgeführt, welche als objektivierbare Abbruchkriterien des Tierversuchs definiert wurden:

- KGW
  - Score 0: kein Gewichtsverlust im Vergleich zur vorherigen Woche
  - Score 1: 0 – 5 % Gewichtsverlust im Vergleich zur vorherigen Woche
  - Score 2: 5 – 15 % Gewichtsverlust im Vergleich zur vorherigen Woche
  - Score 3: 15 – 20 % Gewichtsverlust im Vergleich zur vorherigen Woche
- Wunden
  - Score 0: keine
  - Score 1: oberflächlich oder < 1 cm
  - Score 2: tief oder 1 – 1,5 cm
  - Score 3: Ulzeration oder > 3 Wunden oder > 1,5 cm
- Barbering
  - Score 0: kein Haarverlust
  - Score 0,5: < 30 % Haarverlust

- Score 1: < 50 % Haarverlust
- Score 1,5: < 70 % Haarverlust
- Score 2: 100 % Haarverlust

Bei Zutreffen von einem

- i) Score von 3 in einer Kategorie,
- ii) Score von 2 in zwei Kategorien,
- iii) totalem Score von > 4,5

wurde die Euthanasie als Maßnahme zur Belastungsreduktion festgelegt. Eine Euthanasie infolge des Erreichens eines zu hohen Score-Wertes war jedoch bei keiner der verwendeten Tiere notwendig.

### 3.3 Material und Methoden

#### 3.3.1 Handling

Die Tiere wurden viermal wöchentlich mit der für sie ausgewählten Handlingmethode, *e.g.* Fingergriff-, Pinzettengriff- oder Tunnel-Technik (Abb. 4), gehandelt. Dafür wurden diese nach Öffnung des Käfigs mit der jeweiligen Technik auf das Käfiggitter platziert, die Fixierung bzw. das Handling kurzzeitig gelöst, und die Mäuse daraufhin wieder mit der gleichen Technik zurück in ihren Heimkäfig gesetzt. Die ersten beiden Wochen dienten als Akklimatisationsphase, sodass die in dieser Zeit gesammelten Daten nicht in die statistische Analyse mit einbezogen wurden.

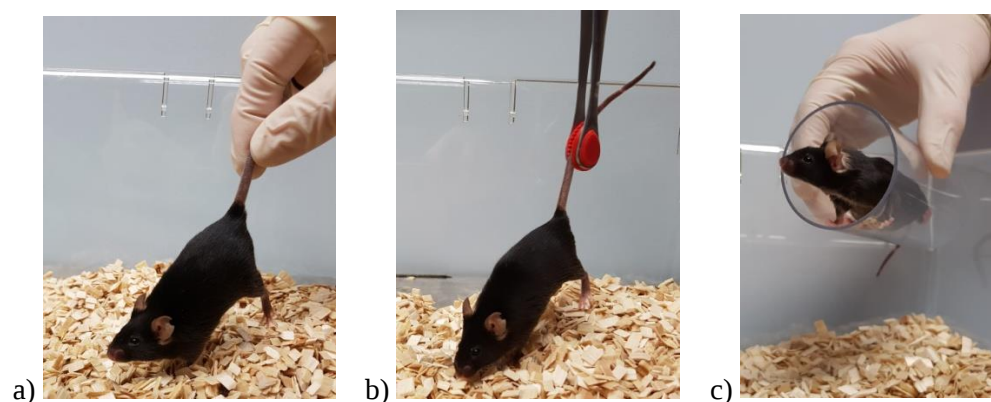


Abbildung 4: Handling mit a) den Fingern; b) der Pinzette; c) dem Tunnel

### 3.3.2 Enrichment

Das Enrichment wurde aus Polycarbonat als kreuzförmige Struktur, entweder transparent oder schwarz-opak, gefertigt und gliederte einen Teil des Käfigs in vier gleichgroße Kompartimente, sodass bei einer Besatzdichte von drei Böcken je Käfig jedem Tier wenigstens ein Kompartiment zur Verfügung stand. Die Enrichmentstruktur bestand aus zwei gleichgroßen Teilen (12 cm x 5 cm x 0,5 cm), welche über eine mittige Einkerbung zusammen- und auseinandergesteckt werden konnten (Abb. 5). Somit waren eine einfache hygienische Säuberung und eine platzsparende Lagerung möglich.

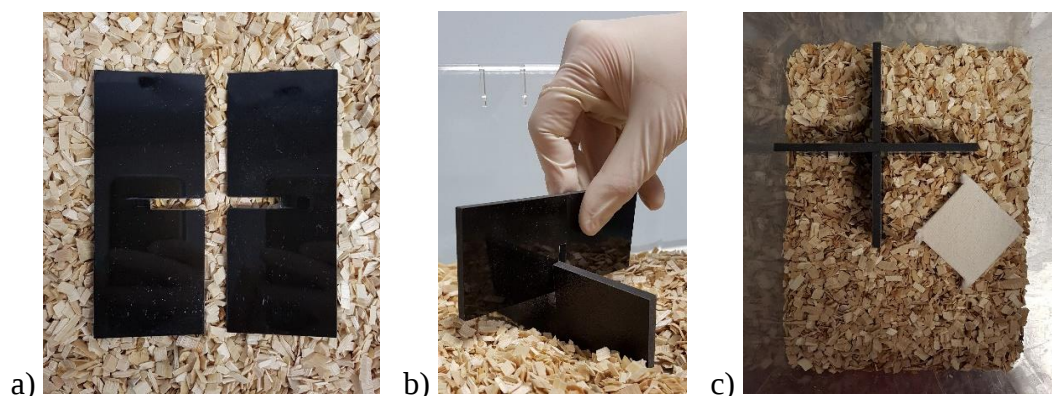


Abbildung 5: schwarz-opakes Kreuz-Enrichment a) Einzelteile; b) Ineinanderstecken; c) Endprodukt im Käfig (Typ II)

### 3.3.3 Analyse des Aggressionsverhaltens

Die in Gruppen gehaltenen Mäuseböcke wurden unmittelbar nach dem Umsetzen in einen frisch eingestreuten Käfig für 20 min von einer Kamera, welche oberhalb der Käfige positioniert wurde, aufgenommen. Die Beleuchtungsstärke betrug 30 - 35 Lux. Die Aufzeichnung wurde ausgewertet, indem das Aggressionsverhalten der Tiere hinsichtlich der Latenzzeit bis zum ersten Angriff, die Dauer des ersten Angriffs und die Gesamtzahl der Angriffe analysiert wurde. Ein Angriff wurde definiert als das Anspringen eines Partnertiers mit Bissen und Tritten (Joseph Garner, 2018).

### 3.3.4 Verhaltenstests

Den Empfehlungen für die repetitive Testung von Verhalten folgend wurden die Verhaltenstests anhand der anzunehmenden Stressbelastung von wenig zu viel durchgeführt (McIlwain et al., 2001, Chourbaji et al., 2008b, Maier, 2001). Der Mäusebock, welcher in den einzelnen Käfigen die Kennzeichnungsnummer drei erhielt, wurde in den Verhaltenstests, welche im Anschluss an die achtwöchige Haltungsperiode durchgeführt wurden, verwendet.

Zwischen den einzelnen Verhaltenstests wurde ein Zeitabstand von 24 h eingehalten. Zudem erfolgte eine Akklimatisierung der Mäuse an den Testraum für mind. 25 min vor Beginn der einzelnen Tests.

Die Verhaltenstests wurden in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- Nestbautest
- Offenfeldtest
- sozialer Neu-Objekt-Test
- Hell/Dunkel-Box Test
- Heizplattentest
- Bewohner-Eindringling Test.

#### 3.3.4.1 Nestbautest (NT)

Das Nestbauverhalten von Mäusen repräsentiert einen ethologisch relevanten Indikator des Wohlbefindens der Tiere. In der Wildnis werden Nester als Rückzugsort bei schlechten Umweltbedingungen, zum Schutz vor Fressfeinden und zum Schutz der Jungtiere verwendet (Latham and Mason, 2004). Die kleine Körpergröße von Mäusen macht diese zudem äußerst anfällig für Körpertemperaturverluste, weswegen sowohl männliche als auch weibliche Tiere Nester bauen, um den Verlust durch externe Isolierung zu minimieren (Deacon, 2006a). Diese Verhaltensweise ist daher eng mit dem Überleben der Mäuse assoziiert (Brown, 1953), und auch Labormäuse zeigen ein hoch motiviertes Nestbauverhalten, falls passende Materialien zur Verfügung stehen (Hess et al., 2008, Gaskill et al., 2012). Die Qualität der Nester kann anhand von Scores (hoher Score = hohe Nestqualität) bewertet werden, wobei eine negative Korrelation zwischen hohen Nest-Score und dem Aggressionsverhalten von männlichen Mäusen existiert (Gaskill et al., 2013).

Bei der wöchentlichen Umsetzung der Tiere in einen frisch eingestreuten Käfig wurde ein Standard Nestlet (Plexx B.V, AB Elst, Niederlange), sowie ungefähr 0,5 g des alten Nestmaterials transferiert. Nach 5 h und 24 h wurde die Qualität der Nester nach dem definierten Punktesystem von Deacon (geringgradig modifiziert) bewertet:

- Score 0 = Das Nestlet ist unberührt;
- Score 1 = Das Nestlet ist fast unberührt (> 90 % sind intakt);
- Score 2 = Das Nestlet ist teilweise aufgerissen (50 – 90 % sind noch intakt);
- Score 3 = Das Nestlet ist zum größten Teil zerfetzt (50 – 90 % des Nestlets sind aufgerissen) oder < 50 % des Nestlets sind intakt oder < 90 % des Nestlets befinden sich

in einem Viertel des Käfigbereichs oder die Baumwolle ist nicht zu einem Nest geformt, sondern im Käfig verteilt;

- Score 4 = Ein identifizierbares, flaches Nest (> 90 % sind aufgerissen) oder das Material befindet sich in Nestform innerhalb eines Viertels des Käfigbereichs oder das Nest ist flach und weniger als 50 % des Umfangs der Nestwand sind höher als die Körperhöhe der zusammengerollten Maus;
- Score 5 = Ein nahezu perfektes Nest (> 90 % sind aufgerissen) und das Nest gleicht einem Krater: Mehr als 50 % des Umfangs der Nestwand sind höher als die Körperhöhe der zusammengerollten Maus;
- Score 6 = Perfektes Nest.

### 3.3.4.2 Offenfeldtest

Mäuse vermeiden offene Flächen ohne Schutzmöglichkeiten vor Fressfeinden. Eine Exposition der Tiere mit einer unbekannten Umgebung verursacht Stress und beeinflusst deren Verhalten. Das resultierende Verhaltensmuster ist durch Ambivalenz bestimmt, da einerseits die Neugier der Tiere diese zur Umgebungserkundung antreibt, zum anderen jedoch die Angst vor der neuen Umgebung und damit einhergehenden möglichen Gefahren existiert (Sturm, 2014).

Der ursprünglich von Calvin Hall für Ratten entwickelte Verhaltenstest (Hall and Ballachey, 1932) erfasst das Erkundungs- und Bewegungsverhalten, sowie das Angstniveau der Labortieren qualitativ und quantitativ (Carola et al., 2002). Aufgrund seiner einfachen Durchführbarkeit und der Möglichkeit große Datenmengen zu generieren stellt er einen der häufigsten und populärsten Verhaltenstests in der Forschung dar (Prut and Belzung, 2003, Geerse et al., 2006). Als Maß für die lokomotorische Aktivität wird die zurückgelegte Distanz der Tiere analysiert, welche als Messgröße für das Explorations-, sowie Angstverhalten dient. Zudem wird die verbrachte Zeit im Zentrum der Arena gemessen. Der vermehrte Aufenthalt in diesem definierten Areal ist ein Maß für ein verringertes Vermeidungs- oder Angstverhalten, da die Tiere diese freie Fläche normalerweise im Gegensatz zum Rand, welcher an schützenden Wänden liegt, meiden (Lipkind et al., 2004).

Für die Durchführung wurde ein mit 25 Lux beleuchtetes schwarzes Offenfeld (50 x 50 cm<sup>2</sup>), welches in vier gleichgroße separate Arenen unterteilt ist, verwendet. Jede Maus wurde einzeln in die Mitte des Offenfeld platziert und die Aktivität von drei Tieren simultan für 10 min über eine Kamera (Ikegami Digital, Ikegami Electronics GmbH, Neuss, Deutschland) aufgezeichnet. Die Testzeit lag zwischen 10 – 13.30 Uhr, um Schwankungen in der tageszeitabhängigen

Aktivität der Tiere so weit wie möglich zu reduzieren. Die Videoauswertung erfolgte mittels eines automatischen Messsystems (Noldus EthoVision 4.0, Noldus Information Technology, Wageningen, Niederlande). Nach Ablauf der Testzeit wurde der soziale Neu-Objekt-Test (sNOT) durchgeführt.

#### 3.3.4.3 Sozialer Neu-Objekt-Test (sNOT)

Im Anschluss an den Offenfeldtest wurde eine unbekannte männliche C3H-Maus in einem Drahtkäfig (7 cm x 7 cm x 8 cm) in das Zentrum der Arena platziert (Wandabstand jeweils 10 cm). Dieses Tier repräsentiert ein soziales Neu-Objekt. Neben dem Explorations- und Angstverhalten der Versuchstiere wurde hier ferner das Sozialverhalten der Tiere untersucht. Sowohl die Latenzzeit, die Zeitspanne, als auch die Anzahl der Annäherungen an die unbekannte gleichgeschlechtliche Maus wurden gemessen. Nach Beendigung des Tests wurden die untersuchten Mäuse wieder in ihre Käfige gesetzt und daraufhin die Fäzes jedes Tieres aus der jeweiligen Arena eingesammelt und gezählt. Die Anzahl der abgegebenen Kot-Pellets korreliert positiv mit der Emotionalität der Tiere für Angst (Lister and therapeutics, 1990).

#### 3.3.4.4 Hell/Dunkel-Box Test (HDBT)

Das Angstverhalten der Tiere wird in diesem Test adressiert, indem der Konflikt zwischen dem Erkundungstrieb einer neuen Umgebung und dem aversiven Stimulus des hellen Raums ausgenutzt wird. Die HDB besteht aus einem kleinen abgeschlossenen dunkeln Bereich (22,5 x 22,5 cm<sup>2</sup>, ca. 1 Lux), welcher über eine zentrale Öffnung den Zugang zu einem hellen Bereich (31.5 x 22.5 cm<sup>2</sup>, ca. 600 Lux) ermöglicht. Bei Testbeginn (der Zeitabstand zum sNOT betrug mind. 24 h) wurden die Mäuse in den abgedunkelten Bereich gesetzt, und das Verhalten über einen Zeitraum von fünf Minuten mittels einer Kamera aufgezeichnet. Die Latenzzeit, bis die Mäuse den hellen Bereich explorierten, und die dort verbrachte Zeit wurden gemessen.

#### 3.3.4.5 Heizplattentest (Hotplate test, HPT)

Die stressbedingte Analgesie ist ein bekanntes Phänomen in der Neurobiologie. Diese wird sowohl durch Alter, Geschlecht, aber auch durch frühere Erfahrungen mit stressigen, schmerzhaften oder anderen Umweltreize beeinflusst (Butler and Finn, 2009).

Zur Untersuchung des Schmerzempfindens der Tiere wurde die Maus, nach Einhaltung einer 24 h Pause zum HDB Test, auf eine  $53 (\pm 0,3) ^\circ\text{C}$  temperierte Heizplatte (Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100, Ugo Basile, Gemonio, Italien) gesetzt. Diese Temperatur ist hoch genug, um von den Mäusen als unangenehm empfunden zu werden, führt aber nicht zu Verletzungen. Die Latenz bis zur ersten Kontaktvermeidungsreaktion (Anheben der Pfoten, Lecken der Pfoten oder Springen) wurde als Maß für die Schmerzempfindung gemessen. Sobald die Maus diese Verhaltensweisen zeigte, wurde sie direkt von der Heizplatte entfernt. Als zusätzliche Sicherheit wurde eine Cut-off Zeit von 45 sec gewählt (Chourbaji et al., 2005).

#### 3.3.4.6 Bewohner-Eindringling (Resident-Intruder, RI) Test

Bei der Durchführung des Tests wurden diejenigen Versuchstiere, welche die Wochen zuvor in Gruppenhaltung gehalten wurden, nicht wie sonst üblich gemeinsam mit einem weiblichen Tier in einem Heimkäfig gehalten, um territoriales Verhalten auszulösen, da sonst mögliche Gruppeneffekte nicht mehr statistisch hätten ausgewertet werden können. Lediglich das wöchentliche Umsetzen in einen frisch eingestreuten Käfig wurde eine Woche zuvor unterlassen, um das Territorialverhalten zu fördern (Koolhaas et al., 2013). Alle Tiere verblieben in ihrer anfänglich zugeordneten Haltung (Einzel-, bzw. Gruppenhaltung), und die Mäuseböcke mit der Kennzeichnungsnummer eins und zwei wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn aus dem Heimkäfig entfernt.

Der Test wurde mit einem 24 h Mindestzeitabstand zum vorherigen HPT durchgeführt. Resident Nummer drei wurde in seinem Heimkäfig für 10 min mit einem unbekannten männlichen Eindringling konfrontiert und eine Videoaufzeichnung erstellt, anhand derer die Erstellung eines entsprechenden Ethogramms möglich war. Dafür wurden alle sozialen, als auch nicht-sozialen und agonistischen Verhaltensweisen aufgezeichnet. Die Dauer des offensiven Verhaltens, als auch die Anzahl der Beißattacken und Drohungen, ausgehend vom Bewohner, wurden analysiert. Nach Ablauf der 10 min wurde der Interaktionspartner aus dem Käfig entfernt und der verbliebene Mäusebock für 30 min, bis zur anschließenden Organentnahme, im Käfig belassen.

#### 3.3.5 Analyse von Barbering und Bisswunden

Neben der täglichen Adspektion der Tiere, wurde einmal wöchentlich das äußere Erscheinungsbild der Tiere beurteilt: Anzeichen für Bisswunden und Barbering wurden

untersucht. Zur Wundcharakterisierung wurde neben der Anzahl, der Lokalisation und dem Schweregrad der Wunden auch deren Größe sowie deren Heilungsprozess mit einbezogen. Barbering („rasieren“, ein dominantes Tier nagt das Fell eines in der Dominanzhierarchie niedriger stehendem Tier ab) hat eine multifaktorielle Genese, bei der sowohl Stress, als auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen (Kalueff et al., 2006).

### 3.3.6 Körpergewichtsanalyse

Durch Stress wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (hypothalamic-pituitary adrenal axis; HPA) aktiviert, was letztlich zu einer Freisetzung des Glukokortikoid (GK) Kortikosteron aus der Nebennierenrinde führt. Während akute Stresssituationen zu einer kurzzeitigen Ausschüttung des GK führen, kommt es in chronischen Stresssituationen zu einer länger andauernden Erhöhung des Glukokortikoidspiegels. Dieser wiederum hat modulierende Eigenschaften sowohl auf den Fett-, als auch auf den Glukosestoffwechsel. Chronisch gestresste Mäuse sind unter anderem durch einen Gewichtsverlust und Hyperglykämie gekennzeichnet.

Der Gewichtsverlauf der Tiere wurde einmal wöchentlich dokumentiert. Hierfür wurde der Mäusebock mit der zugeordneten Handlingmethode in einen leeren Käfig transferiert, welcher zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt wurde, und sich auf einer Waage befand. Nach der Gewichtsdocumentation wurden die Mäuse wiederum mit der entsprechenden Transfertechnik auf das Käfiggitter eines mit Einstreu eingestreuten Käfigs gesetzt, um die Rektaltemperatur zu messen.

### 3.3.7 Analyse stressinduzierter Hyperthermie

Das Handling von Mäusen führt zu einer akuten Stressantwort, welche sich u.a. im Anstieg der Körperkerntemperatur widerspiegelt (Meijer et al., 2007).

Nach Erfassung des Körpergewichts wurden die Tiere mit der jeweiligen Handlingmethode auf ein Käfiggitter eines leeren Käfigs platziert, um keine zusätzliche Stressreaktion in den darunter sitzenden Tieren zu provozieren. Rektal wurde ein Thermometer (Testo 108, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Germany + MLT1404 Rectal Probe, 182 ADInstruments Ltd, Oxford, England) einen cm tief inseriert, welches zuvor in eine ausreichende Menge Gleitmittel getaucht wurde. Nach der ersten Temperaturmessung (T1) erfolgte 30 min später eine weitere Temperaturmessung (T2). Die Differenz der beiden  $\Delta T$  ( $= T2 - T1$ ) entspricht der stressinduzierten Hyperthermie.

### 3.3.8 Analyse stressinduzierter Hyperglykämie

Bei Mäusen, welche chronisch sozialem Stress ausgesetzt sind, führt die Aktivierung der HPA über eine Modulation des Glukosestoffwechsels zu einer Erhöhung des Glukosespiegels (van der Kooij et al., 2018). Man spricht von einer stressinduzierten Hyperglykämie.

Nach Messung der T1 verblieben die Tiere zunächst auf dem Käfiggitter. Die laterale Vena caudalis mediana wurde durch Fingerdruck am Schwanzansatz leicht gestaut, eine 23 G Kanüle in einem Winkel von ca. 30° eingeführt und die Vene punktiert. Die Blutzuckermessung erfolgte mittels eines automatischen Blutzuckermessgeräts (Medisana® MediTouch 2, Promed GmbH, Deutschland). Nach Beendigung der Messung wurde das Tier in seinen Käfig zurückgesetzt.

### 3.3.9 Bestimmung faecaler Kortikosteronmetabolite (FCM)

Im Kot der Tiere kommt es im Vergleich zum Plasma erst nach ein bis zwei Tagen zu einer stressinduzierten Erhöhung der GK-Konzentration (Palme et al., 2005, Touma and Palme, 2005). Somit eignet sich die FCM-Analyse zur Evaluierung des Wohlbefindens der Mäuse über einen längeren Zeitraum. Zudem stellt sie eine nicht invasive Methode dar, sodass der aversive Effekt der Blutentnahme ausbleibt (Touma et al., 2004).

In der dritten und siebten Woche wurden von einer Maus pro Käfig (in der Gruppenhaltung diejenige, welche die Kennzeichnungsnummer drei hatte) Kotproben gesammelt. Dafür wurde das Tier zwischen 12.00 – 14.45 Uhr für maximal 50 min in einen separaten leeren Macrolon Typ II Käfig transferiert und anschließend wieder in den Ursprungskäfig zurückgesetzt. Die Ausschüttung des Glukokortikoids erfolgt pulsatil und unterliegt einer circadianen Rhythmik (Touma et al., 2003), weswegen die Einhaltung des eng definierten Zeitraums von äußerster Wichtigkeit ist, um die Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Die Kotproben wurden anschließend in Polypropylenröhrchen bei -20 °C bis zur Extraktion der FCM eingefroren.

Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Palme et al. (Palme et al., 2013): Die Kotpellets wurden für 1 h in einem Trocknergerät bei ca. 70 °C getrocknet, daraufhin homogenisiert und anschließend 0,05 g Kot mit 80 % Methanol versetzt (1 ml zu 0,05 g, bei weniger Kot proportional weniger Methanol). Die Proben wurden anschließend für drei Minuten von Hand geschüttelt, für fünf Minuten zentrifugiert und 0,5 ml des Überstands bei -20 °C gelagert. Die weitere Analyse der Extraktion fand mit einem 5 $\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-one Enzym Immunoassay statt (Touma et al., 2003, Touma et al., 2004).

### 3.3.10 Sektion und Organentnahme

Im Anschluss an die 30-minütige Ruhephase nach Durchführung des RIT, erfolgte eine Narkose der Tiere mit Ketamin (195 mg/kg i.p., Bremer Pharma GmbH, Warburg) und Xylazin (30 mg/kg i.p., Ecuphar GmbH, Greifswald). Die Beurteilung der Narkosetiefe erfolgte durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes. Das Ausbleiben der Reaktion auf diesen Schmerzreiz gilt als chirurgisches Toleranzstadium, in dem die Schmerzwahrnehmung ausgeschaltet ist (Klide, 1992). Als Indikator für das erlebte Stressniveau der Tiere wurden folgende Organe zur Gewichtsbestimmung entnommen: Thymus, Milz, Nebennieren, sowie beide Samenbläschen (SB) und Hoden. Anschließend wurden die Organe gewogen.

### 3.3.11 Statistische Auswertung

Die biometrische Planung und die statistische Analyse wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung für medizinische Biometrie durchgeführt. Alle Daten wurden statistisch mittels SPSS Version 25.0 ausgewertet, wobei abhängig von deren Verteilung (überprüft mittels Q-Q-Plots oder Shapiro-Wilk Test) parametrische und nicht-parametrische Tests verwendet wurden. Normalverteilte Daten wurden parametrisch mittels einer ein- oder mehrfaktoriellen Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) getestet. Die Variablen „Handling“ und „Haltung“ im ersten und „Opazität“ im zweiten Teilversuch wurden berücksichtigt und Signifikanzen mittels des Tukey Post-hoc-Test ermittelt. Ein Signifikanzlevel von 5% wurde determiniert. Für die Parameter Körpergewicht und stressinduzierte Hyperglykämie wurde eine Varianzanalyse mit Messwiederholung (repeated measures analysis of variance) durchgeführt. Nicht normal verteilte Daten wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests, des Mann-Whitney-U-Tests, des Kruskal-Wallis Tests und des Friedman-Tests analysiert. Zudem wurde die Standardabweichung aller Werte kalkuliert, welche als Messwert für die Variation der Daten dient. Der Levene Test gab dabei Auskunft ob die Unterschiede in den Messwertvariationen signifikant waren.

## 4. MANUSKRIPTE

### 4.1 Manuskript 1

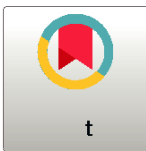
## RESEARCH ARTICLE

# Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrI mice

Sinja Mertens<sup>1,2\*</sup>, Miriam A. Vogt<sup>1,2</sup>, Peter Gass<sup>3</sup>, Rupert Palme<sup>4</sup>, Bernhard Hiebl<sup>1</sup>, Sabine Chourbaji<sup>2</sup>

**1** Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Farm Animal Behaviour and Virtual Center for Replacement—Complementary Methods to Animal Testing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany, **2** University of Heidelberg, Interfaculty Biomedical Research Facility (IBF), Heidelberg, Germany, **3** University of Heidelberg, Central Institute of Mental Health (CIMH), Mannheim Faculty, Heidelberg, Germany, **4** University of Veterinary Medicine Vienna, Unit of Physiology, Pathophysiology and Experimental Endocrinology, Vienna, Austria

\* [sinja.mertens@ibf.uniheidelberg.de](mailto:sinja.mertens@ibf.uniheidelberg.de)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Mertens S, Vogt MA, Gass P, Palme R, Hiebl B, Chourbaji S (2019) Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrI mice. PLoS ONE 14(4): e0215367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367>

**Editor:** Kathleen R. Pritchett-Corning, Harvard University Faculty of Arts and Sciences, UNITED STATES

**Received:** August 31, 2018

**Accepted:** April 2, 2019

**Published:** April 12, 2019

**Copyright:** © 2019 Mertens 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 project was supported in part by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 2591, GZ: GA427/12-1) to P.G. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the

## Abstract

Mice are social animals hence group-housing of mice is preferred over individual housing. However, aggression in group-housed male mice under laboratory housing conditions is a well-known problem leading to serious health issues, including injury or death. Therefore, group-housed mice are frequently separated for welfare reasons. In this study, we investigated the effect of 3 different handling methods (tail, forceps, tube) in 2 different housing conditions (single vs. group) on the variance of aggression-associated parameters in male C57BL/6NCrI mice over 8 weeks. Blood glucose concentration, body weight, body temperature, plus number and severity of bite wounds and barbering intensity in group-housed mice were recorded. An assessment of nest complexity was also performed weekly. Feces were collected in week 3 and 7 for analysis of corticosterone metabolites. We also monitored the level of aggression by recording the behavior of group-housed animals after weekly cage cleaning. An open field test followed by a social novel object test, a light/dark box test, a hotplate and a resident-intruder test were performed at the end of the 8-week handling period. Post-mortem, we assessed organ weights. We found that forceps-handled mice, independent of the housing condition, had significantly higher levels of stress-induced-hyperthermia and enhanced aggression after cage cleaning, and they performed worse in the nest complexity test. In addition, handling male mice by the tail seems to be most effective to reduce aggressiveness after transferring animals into new cages, thereby representing an appropriate refinement.

## Introduction

Before being used in experimental procedures, laboratory mice spend most of their lives in their home cages. According to European Union legislation, maintenance procedures for rodents

manuscript. There was no additional external or internal funding received for this study.

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

must modify environment and handling to the behavioral and physiological needs of animals [1]. A major challenge in this context is that there is not much literature systematically addressing which measures and procedures cause stress or well-being, respectively, which is an essential prerequisite both for the well-being of experimental animals and reliable *in vivo* research [2].

Housing social animals in groups is required where applicable. However, group-housing of male mice is a concern in most animal facilities due to potential welfare concerns. Despite daily animal observations, aggression may not be adequately monitored since it can arise spontaneously resulting in pain, injury or death of the animals [3]. Besides affecting welfare and numbers of animals needed, aggression may result in serious problems with data validity [3].

While there are sophisticated refinement approaches with regard to housing conditions, such as by providing enrichment, it is necessary to thoroughly evaluate such measures, since additional cage equipment may also induce aggression as demonstrated by Howerton *et al.* [4]. Similarly, Marashi *et al.* showed negative effects of housing environment with regard to related physiological and immunological stress parameters [5]. Such findings indicate the importance of adequate awareness not only for experimental design, but also in regards to the animals' history.

Besides housing, animal handling is a regular necessity in the animal facility. Handling is the most common procedure experienced by laboratory mice because it is necessary for routine husbandry (*i.e.* cage cleaning) and research procedures (*i.e.* injections or blood sampling). Due to pragmatic reasons, handling usually takes place in a context in which the animals any-how experience stress, *i.e.* when disturbed in their inactive phase [6]. It is necessary to consider all potential interacting stressful factors for any kind of refinement program—handling being one of those. The distress of male laboratory mice is attributed to housing and experimental procedures for which handling is necessary, and handling related distress in the pre-experimental history of the animals represents aversive experiences and may exert long-lasting effects [7]. Conversely, animal distress may be reduced by certain procedures implemented in handling, thus taming their anxiety [8].

Bearing in mind that many neurobehavioral disorders are investigated in male mice [9], it is necessary to address how refinements of housing and handling may influence male aggressive responses. One paradox here is that males have been historically preferred over females due to the perception of "better" data quality due to less hormonal variability [9]. Whether aggression and dominance structures in males may affect inconsistency of data is mostly neglected. This is interesting, because males, but not females, housed in unisex groups demonstrate several behavioral [10] and physiological alterations [11].

In our study we studied the effects of routinely conducted handling by tail in the context of cage changing and compared this procedure with forceps and tube handling. As readout we focused on behavioral effects which were assessed in a behavioral test battery comprising tests for exploration (open field test), emotional states (light/dark box) and aggression (resident-intruder test). This was complemented by health monitoring (fur state) and assessment of clinical parameters, *i.e.* blood glucose assessment, physiological measures of stress, *i.e.* stress-induced hyperthermia, fecal corticosterone metabolites (FCM) as well as final organ weight determination. To analyze handling effects on animal welfare, we conducted a nest building assay (after Deacon *et al.* [12, 13]). To evaluate potential consequences of handling on agonistic behaviors, single- and group-housed males were examined with regard to data variability by looking at the standard deviation of means. We hypothesized that signs of stress and aggression should be reduced in both single- and group-housed mice if the handling condition is less stressful to the mice. Additionally, we hypothesized stress would lower the scores in the nest building test, the well-being parameter, in which we observed the mice's nest building performance over time.

## Materials and methods

### Ethics statement

The study was conducted according to the guidelines of the German Animal Welfare Act and was approved by the Karlsruhe State Authority (permit number: G-154/17).

### Animals

72 male C57BL/6NCrl mice (Charles River, Sulzfeld, Germany) arrived at the facility at the age of 3 weeks. The C57BL/6 strain is frequently used and one of the most common background strains for transgenic mouse models [14]. All mice were housed in Macrolon II cages (370cm<sup>2</sup>, Tecniplast, Milan, Italy), provided with aspen wood bedding (ABEDD LTE-001, Lab & Vet Service, Vienna, Austria) and a nestlet (Plexx B.V., AB Elst, The Netherlands). Tap water and food pellets (Rod 16-A LasVendi, Soest, Germany) were provided *ad libitum*. The animal room had a controlled temperature (21°C), photoperiod (reversed 12/12 h light/dark cycle: lights on between 21:00–09:00 h) and relative humidity (50–60%). The hygienic status was specific pathogen-free (SPF) according to Federation of European Laboratory Animal Science Association's (FELASA) recommendations [15].

Out of all mice, 54 mice were divided into groups of 3 (18 cages) and the remaining 18 mice were housed individually for a total of 36 cages. Single ( $n = 18$ ) and group-housed ( $n = 54$ ) mice were arbitrarily allocated into three subgroups (transferring mice by picking them up by their tails with gloved hand using thumb and index finger (latex powder-free gloves, sempercare, premium by sempermed), single tail SH/ group tail GH,  $n = 6/18$ ; by tube, single tube ST/ group tube GT,  $n = 6/18$  or by forceps, single forceps SF/ group forceps GF,  $n = 6/18$ ) according to the order they were unpacked. All animals were marked on the tail with a black waterproof marker (renewed weekly) and in addition by ear punches on arrival. In the group-housed condition only the mouse marked on arrival as number three was exposed to behavioral testing.

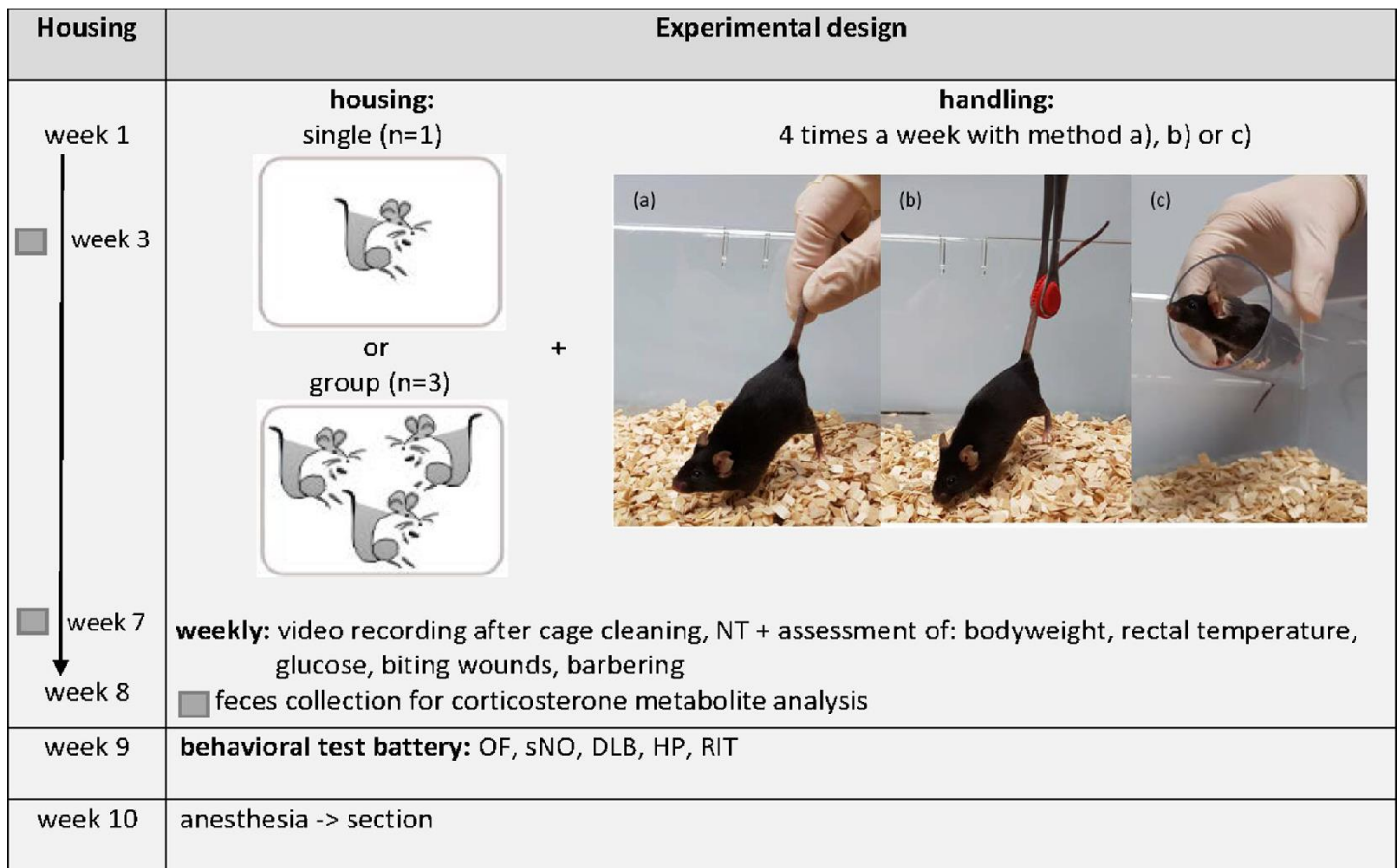
Interaction-partners for behavioral testing (sNO and RIT testing) were 8 weeks old male mice of the C3H/HeJRj inbred strain (Janvier, Laval, France), which arrived at the facility 1 week before being used for the resident-intruder test (RIT). This strain was selected because of its brown color (easier to distinguish from the black C57BL/6NCrl mice in the RIT) and due to their even tempers (personal communication with commercial breeders). They were housed under the same abiotic conditions as the experimental subjects, but in a separate room which had no reversed light/dark cycle (lights on between 09:00–21:00 h).

### Experimental setup

Experiments and handling were conducted during the dark phase, as illustrated in Fig 1. Mice were handled 4 times a week by one female experimenter by the assigned handling method, i.e. tail handling, forceps handling (Mouse Holding Forceps with Replaceable Tips, FST, Heidelberg, Germany) or tube handling (polycarbonate mouse handling tube, Datesand Group, Manchester, United Kingdom). Mouse cages were opened and mice were lifted one by one via their allocated handling method, placed on the wire lid, and then returned to their home cage. As the first 2 weeks of handling served as acclimation, the data collected in this period were not used for statistical analysis.

Cage cleaning and the nest building test were performed weekly on the same day (except before the RIT). Immediately after transferring the group-housed mice into clean cages, their behavior was recorded by a camera (Ikegami Digital) for 20 min.

One day after cage cleaning, mice were weighed, their fur was examined for wounds or barbering signs according to a standardized score sheet (S1 Fig). Tail blood was taken by



NT = nest-test, OF = Openfield, sNO = social Novel-Object, DLB = Dark-Light-Box, HP = Hotplate, RIT = Resident-Intruder test

**Fig 1. Experimental design.** Overview of the procedures for single- and group-housed cohorts: (a) = tail; (b) = forceps; (c) = tube. Behavioral analysis (except the NT) of mice started at week 9 and lasted until the animals were euthanized at 10 weeks.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367.g001>

puncturing the vein with a cannula for glucose determination and body temperature was measured by gently inserting a rectal thermometer 1cm twice, 30 min apart, to determine stress-induced hyperthermia (SIH). To minimize circadian influences on behavior, the starting point in the order of mice being handled and the order of cages cleaned, recorded and measured was changed weekly. All animal care and testing were carried out by the same person. Six days after cage cleaning (weeks 3 and 7) feces were collected for FCM analysis.

To investigate potential handling-, and housing-induced aggression, one mouse (number 3) out of each cage was subjected to 4 behavioral tests at the age of 11–12 weeks: The open field test (OF) followed by a social novel-object test (sNO), light/dark box test (LDB), hot-plate (HP) and RIT. On each testing day mice were transferred to the testing room 25 min before behavioral testing for acclimatization, and only one test was conducted sequentially per day.

## Behavioral analysis

**Nest building test.** A standard nestlet (Plexx B.V, AB Elst, The Netherlands) and approximately 0.5 g of the old nesting material (to decrease aggression in male mice [3, 16])

was transferred into the clean cage at the day of cage change. The nest quality was analyzed after 5 and 24 h using a scoring system modified from Deacon [13]. Score 1: nestlet untouched, score 2: nestlet largely untouched (> 90% intact), score 3: nestlet mostly shredded (< 50% intact nestlet), score 4: identifiable, but flat nest (> 90% torn up), score 5: partial cup, score 6: full dome.

**Behavioral scoring of aggression-associated parameters.** Only group-housed mice were weekly recorded after cage cleaning for 20 min at 35 lux by a camera positioned above the home cages. We assessed the i) attack latency, ii) the first attacks' duration and iii) the number of attacks from the video. In accordance to Garner *et al.* [17] an attack was defined as the rushing and leaping at a partner with bites and kicks.

**Open field and social novel-object test.** Mice were examined in an open field test (OFT) for measurement of locomotion, anxiety and exploration [18] for 2 days between 10.00 a.m. to 1.30 p.m. The animal was placed using its assigned handling method into a square, black OFT arena (50 x 50 cm<sup>2</sup>) placed on an infrared light surface illuminated with 25 lux from above. Up to 3 mice were tracked simultaneously in separate arenas for 10 min and filmed by a camera from above. 'Velocity', 'distance moved' and the time spent in defined areas of the OF, *i.e.* 'center time' were evaluated [19]. Subsequently a social novel-object (SNO) test was conducted. After 10 min of habituation to the empty OFT arena, an unfamiliar C3H mouse in a small grid-box (7 cm x 7 cm x 8 cm) was placed in the center of the arena (10 cm distance to walls), representing a social novel object. By evaluating the 'latency', 'the time' and 'the number of approaches' (an approach = mouse is nearing the grid box in close vicinity with head turned in the direction of the box) in the SNO, we measured exploration and social behaviors. Finally, number of fecal boli produced during the OFT as well as the SNO test was counted as an indicator of emotionality [20]. The videos were processed within Noldus EthoVision 4.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands).

**Light/dark box test.** A Light/dark box test was performed to examine anxiety-like behaviors. The mouse was placed into the dark compartment (22.5 x 22.5 cm<sup>2</sup>, approximately 1 lux) which was connected by an aperture with the light compartment (31.5 x 22.5 cm<sup>2</sup>, approximately 600 lux). Number and latency of exits into, as well as time spent in the lit compartment was recorded for 5 min by a camera positioned above the box as previously described [21]. An exit was defined as the placement of all four paws into the light chamber [22].

**Hotplate test.** To test a mouse's reaction to thermal pain, it was placed in the center of a clear Plexiglas cylinder (20 cm diameter) atop a hot plate (Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100, Ugo Basile, Gemonio, Italy) which was maintained at  $53 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ . The time until the mouse first lifted its hind paw followed by clear paw flinching or licking movements was recorded and the animal was then removed from the plate. To avoid possible tissue damage the cut off time for an animal to react was set at 45 s [23].

**Resident-intruder test.** Using a RIT, mice were tested towards a stranger to monitor aggressive-like behaviors [24, 25]. 12 days prior to the test the home cage was not changed to maintain territoriality, which is strongly dependent on the presence of olfactory cues in the bedding [26]. The test began when the intruder (unfamiliar C3H male) was placed in the resident cage. Interactions between the test mouse and the intruder were recorded (camera from above, 3 lux) for a period of 10 min.

Behavior was scored from video [17] (focusing only on the behavior of the tested mouse). The duration of threat behavior (tail rattling, thrust, mounting) and aggressive behavior (attack latency, boxing, aggressive bite, attack, fighting, chase) were measured. Mice that did not fight during the test were excluded from the statistical outcome. Severe injuries of the C3H mouse would have led to an immediate termination of the test.

## Clinical parameters

Barbering and biting wounds were recorded throughout the study by means of a standardized score sheet (S1 Fig).

**Body weight.** The body weight of each mouse was measured once a week.

**Blood glucose.** Weekly blood glucose levels were measured prior to determination of body temperature. Mice were placed on a cage top using their assigned handling method. Blood samples were obtained from the tail vein by puncture. Assessment of blood glucose level was done by means of a glucometer (Medisana MediTouch 2, Promed GmbH, Germany).

**Body temperature.** Body temperature was measured as an indicator of stress-induced hyperthermia (SIH) by using a rectal thermometer (Testo 108, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Germany + MLT1404 Rectal Probe, ADInstruments Ltd, Oxford, United Kingdom) which was inserted, after dipping it into a lubricant (Vidisic, Bausch + Lomb, Germany), for a length of 1 cm into the rectum of the mice at time point  $T_1$  (min) and time point  $T_2$  (min,  $T_1 + 30$  min). This required brief restraint by the tail: After being placed with their determined method on a wire top of an empty cage, their tail was hold up by the researchers' hand to insert the rectal probe, hence all animals were touched on their tails. The difference,  $T$  ( $= T_2 - T_1$ ) is the measure for SIH, which is defined as a relative short lasting body temperature elevation in response to stress [27]. Only temperature differences at point  $T$  of more than  $0.5^\circ\text{C}$  were defined as SIH.

**Feces collection and FCM analysis.** Stress hormone levels of mice were monitored non-invasively by measuring fecal corticosterone metabolites (FCM). Feces collection from the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> week was performed at day 6 after cage cleaning around 2 pm. Mice were placed individually in empty Macrolon Type II cages (370cm<sup>2</sup>, Tecniplast, Milan, Italy) for a maximum of 50 min. The sampling occurred in a limited time frame as corticosterone concentration has a circadian rhythm, so once the required number of fecal boli was reached ( $\pm 6$  droppings), the mouse was returned to the home cage.

Feces were stored in polypropylene tubes at  $-20^\circ\text{C}$ . FCM were extracted in accordance with Palme *et al.* [28]: Feces were dried for 1 h at a temperature of  $70^\circ\text{C}$  and homogenized. An aliquot of 0.05 g was extracted with 1 ml of 80% methanol and the extracts stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Later they were analyzed using a  $5\alpha$ -pregnane- $3\beta$ , $11\beta$ , $21$ -triol- $20$ -one enzyme immunoassay [29, 30].

**Organ weights.** Mice were deeply anesthetized and euthanized i.p. with ketamine 195 mg/kg body weight (Bremer Pharma GmbH, Warburg) and xylazine 30 mg/kg body weight (Ecuphar GmbH, Greifswald). Thymus, spleen, adrenal glands, seminal vesicles, and testes were dissected and weighed.

**Statistical analysis.** All statistical analyses were performed using SPSS software, version 25 for Mac (IBM). Parametric and non-parametric tests were utilized depending on data distribution (Q-Q plots or Shapiro-Wilk test). For parametric data, two-way analysis of variance (ANOVA) were carried out with 'housing' and 'handling' as factors and the Tukey test as post hoc test. An intra-group comparison of the body weight and blood glucose was carried out by using a repeated measurement analysis, in which the factor 'housing' and 'handling' was added. Non-parametric data was analyzed by the chi-square statistics, Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test and the Friedman-Test. Additionally, we calculated the standard deviation of all values, serving as a measure of variation observed in the data. Statistical significance of variation was evaluated by a Levene test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. ♦ indicates  $p < 0.05$ , ♦♦ indicates  $p < 0.01$  and ♦♦♦ indicates  $p < 0.001$ .

## Results

Table 1 illustrates significant and non-significant findings regarding the factor 'housing' and 'handling'.

Table 1. Statistical results concerning the factors 'housing' and 'handling'.

|                     | Test                                   | Parameter                                         | Statistical test                 | Effects/ interactions                         |                                                                      |                                                                                                 | Post hoc test (Tukey) |               |                  | Effect size (Cohen's d) |                  |               |                  |
|---------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|------------------|-------------------------|------------------|---------------|------------------|
|                     |                                        |                                                   |                                  | Housing                                       | Handling                                                             | Housing x handling                                                                              | Hand vs. forceps      | Hand vs. tube | Forceps vs. tube | Housing                 | Hand vs. forceps | Hand vs. tube | Forceps vs. tube |
| Clinical parameters | Body weight                            | weight, week 8 (g)                                | ANOVA                            | ♦ p = 0.039, F = 4.43, df = 1                 | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             | -0.58                   | -0.07            | 0.02          | 0.09             |
|                     | Temperature difference                 | temperature difference, week 7 (°C)               | ANOVA                            | ♦ p = 0.046, F = 4.14, df = 1                 | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             | 0.60                    | -0.49            | -0.45         | 0.04             |
|                     |                                        | temperature difference, week 8 (°C)               |                                  | n.s.                                          | ♦♦ p = 0.009, F = 4.99, df = 2                                       | n.s.                                                                                            | ♦♦ p = 0.01           | n.s.          | p = 0.059        | 0.11                    | -0.82            | -0.21         | 0.67             |
|                     | Stress induced hyperthermia            | temperature difference, week 8 (°C)               | Chi-squared                      | n.s.                                          | ♦ p = 0.028                                                          |                                                                                                 | ♦ p = 0.019           | n.s.          | ♦ p = 0.019      |                         |                  |               |                  |
|                     | Blood glucose                          | Blood glucose, week 8 (mmol/L)                    | ANOVA                            | n.s.                                          | n.s.                                                                 | ♦♦ p = 0.005, F = 6.5, df = 2                                                                   | n.s.                  | n.s.          | n.s.             | -0.13                   | 0.33             | 0.36          | 0.09             |
|                     | Fecal corticosterone metabolites       | corticosterone, week 7 (pg/well)                  | ANOVA                            | ♦♦ p = 0.005, F = 8.98, df = 1                | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             | -1.00                   | 0.20             | -0.50         | -0.56            |
|                     |                                        | corticosterone, week 7 (ng/0.05 g feces)          |                                  | ♦♦ p = 0.005, F = 8.98, df = 1                | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             | -1.00                   | 0.20             | -0.50         | -0.56            |
| Behavioral analysis |                                        | corticosterone, week 7–3 (pg/well)                | ANOVA, repeated measurements     | ♦♦ p = 0.002, F = 10.79, df = 1               | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     |                                        | corticosterone, week 7–3 (ng/0.05 g feces)        |                                  | ♦♦ p = 0.002, F = 10.77, df = 1               | n.s.                                                                 | n.s.                                                                                            | n.s.                  | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     | BS of aggression-associated parameters | cages showing aggression, week 5–8, attack yes/no | Chi squared                      | /                                             | ♦♦ p = 0.002                                                         |                                                                                                 | ♦♦ p = 0.004          | n.s.          | ♦ p = 0.02       |                         |                  |               |                  |
|                     | Nest-test                              | quality, week 3, 5 h scores                       | Mann-Whitney-U or Kruskal-Wallis | ♦ p = 0.025                                   | n.s.                                                                 |                                                                                                 | n.s.                  | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     |                                        | quality, week 4, 5 h scores                       |                                  | ♦♦ p = 0.01                                   | n.s.                                                                 |                                                                                                 | n.s.                  | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     |                                        | quality, week 6, 24 h scores                      |                                  | ♦♦ p = 0.01                                   | n.s.                                                                 |                                                                                                 | n.s.                  | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     |                                        | quality, week 8, 24 h scores                      |                                  | ♦ p = 0.044                                   | p = 0.061                                                            |                                                                                                 | ♦ p = 0.033           | n.s.          | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                     |                                        | quality, week 3–8, 5 h scores                     |                                  | ♦♦♦ single: p < 0.001<br>♦♦♦ group: p < 0.001 | ♦♦♦ hand: p < 0.001<br>♦♦♦ forceps: p = 0.037<br>♦♦♦ tube: p = 0.001 | ♦ SH p = 0.011<br>SF: n.s.<br>♦ ST: p = 0.013<br>♦♦♦ GH: p = 0.001<br>GF: n.s.<br>GT: p = 0.068 |                       |               |                  |                         |                  |               |                  |

(Continued)

Table 1. (Continued)

| Test                     | Parameter                       | Statistical test                 | Effects/ interactions                      |                                                               |                                                                              | Post hoc test (Tukey) |                |                  | Effect size (Cohen's d) |                  |               |                  |
|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------|------------------|-------------------------|------------------|---------------|------------------|
|                          |                                 |                                  | Housing                                    | Handling                                                      | Housing x handling                                                           | Hand vs. forceps      | Hand vs. tube  | Forceps vs. tube | Housing                 | Hand vs. forceps | Hand vs. tube | Forceps vs. tube |
|                          | quality, week 3–8, 24 h scores  |                                  | ♦ single: $p = 0.027$ ; group: $p = 0.102$ | hand: $p = 0.32$ ; forceps: $p = 0.145$ ; ♦ tube: $p = 0.049$ | SH: n.s.<br>SF: n.s.<br>♦ ST: $p = 0.043$ ; GH: n.s.<br>GF: n.s.<br>GT: n.s. |                       |                |                  |                         |                  |               |                  |
| Openfield                | distance to walls 0–10 min (cm) | ANOVA                            | ♦♦ $p = 0.006$ , $F = 8.76$ , $df = 1$     | n.s.                                                          | n.s.                                                                         | n.s.                  | n.s.           | n.s.             | -0.89                   | -0.15            | 0.54          | 0.69             |
|                          | time in center 0–10 min (s)     |                                  | ♦♦ $p = 0.0011$ , $F = 7.2$ , $df = 1$     | n.s.                                                          | n.s.                                                                         | n.s.                  | n.s.           | n.s.             | 0.93                    | 0.12             | -0.38         | -0.56            |
| Social Novel-Object test | distance moved 0–5 min (cm)     | ANOVA                            | n.s.                                       | n.s.                                                          | ♦ $p = 0.035$ , $F = 3.75$ , $df = 2$                                        | n.s.                  | n.s.           | n.s.             | -0.02                   | 0.15             | 0.51          | 0.39             |
|                          | velocity 0–5 min (cm/sec)       |                                  | n.s.                                       | n.s.                                                          | ♦ $p = 0.036$                                                                | n.s.                  | n.s.           | n.s.             | -0.05                   | 0.15             | 0.50          | 0.37             |
|                          | time in center 0–10 min (s)     |                                  | ♦ $p = 0.043$ , $F = 4.4$ , $df = 1$       | n.s.                                                          | n.s.                                                                         | n.s.                  | n.s.           | n.s.             | -0.70                   | 0.15             | -0.03         | -0.15            |
| Light/dark box test      | exit latency (s)                | Mann-Whitney-U or Kruskal-Wallis | n.s.                                       | ♦ $p = 0.031$                                                 |                                                                              | n.s.                  | ♦♦ $p = 0.007$ | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                          | tail rattling (s)               | Mann-Whitney-U or Kruskal-Wallis | ♦ $p = 0.036$                              | n.s.                                                          |                                                                              | n.s.                  | n.s.           | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                          | aggressive bite (s)             |                                  | ♦ $p = 0.043$                              | n.s.                                                          |                                                                              | n.s.                  | n.s.           | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                          | attack (s)                      |                                  | ♦ $p = 0.024$                              | n.s.                                                          |                                                                              | n.s.                  | n.s.           | n.s.             |                         |                  |               |                  |
|                          | fighting (s)                    |                                  | ♦ $p = 0.016$                              | n.s.                                                          |                                                                              | n.s.                  | ♦ $p = 0.038$  | n.s.             |                         |                  |               |                  |

n.s. = no significance. Identification of overall effects of the factors 'handling' and 'housing' as well as interaction effects. Asterisks indicate the level of significance (♦  $p < 0.05$ ; ♦♦  $p < 0.01$ ; ♦♦♦  $p < 0.001$ ). Data is split in 'clinical parameters' and 'behavioral analysis' for better overview. Non-parametric tested parameters are highlighted in grey. The effect size (Cohen's d) was calculated for normal distributed data analyzed with ANOVA. Parameters not appearing in this table revealed non-significant results.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367.t001>

## Barbering and biting wounds

No bite wounds were visible on external exam during the experiment. In week 8, 2 mice of a GH-cage showed hair loss on their heads, which we attribute to barbering behavior of the third mouse in the cage.

## Nest building test

Immediate nest building improved over the course of the experiment (3<sup>th</sup> - 8<sup>th</sup> week) in both housing conditions (single housed:  $\chi^2(5) = 33.3$ ,  $p < 0.001$ ; group housed:  $\chi^2(5) = 29.4$ ,  $p < 0.001$ ) and in all animal cages. Significant results were detected for the groups SH ( $\chi^2(5) = 14.9$ ,  $p = 0.011$ ), ST ( $\chi^2(5) = 14.4$ ,  $p = 0.013$ ) and GH ( $\chi^2(5) = 21.5$ ,  $p = 0.001$ ) measured by the Friedman-test. When nest quality was assessed after 24 h, only singly-housed animals improved their nest building performance over the course of the experiment ( $\chi^2(5) = 12.6$ ,  $p = 0.027$ ). This only applies for singly-housed, tube-handled mice in a statistically significant way ( $\chi^2(5) = 11.4$ ,  $p = 0.043$ ).

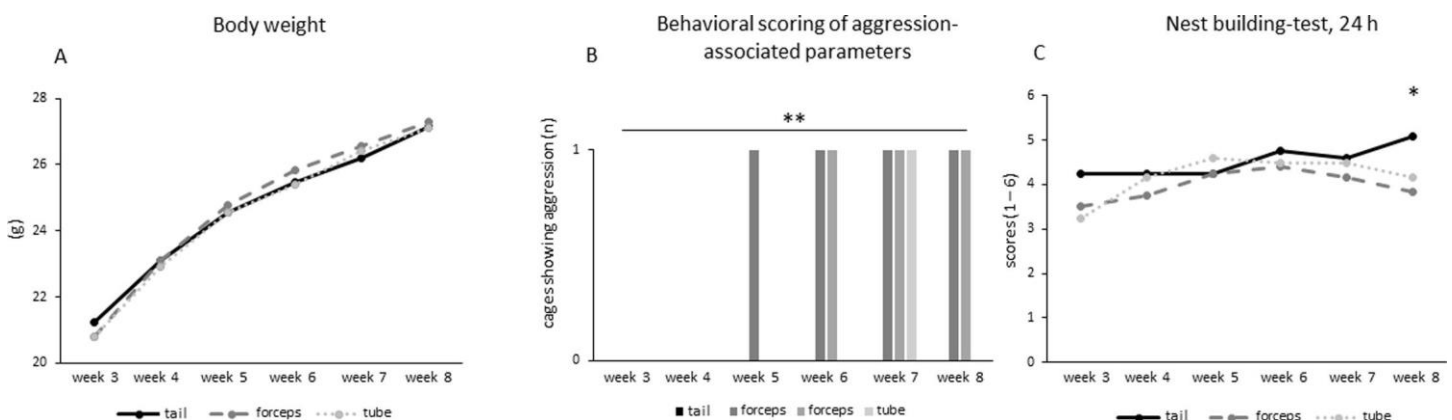
24 h scoring in the 8<sup>th</sup> week, measured with a non-parametric-test for independent samples, revealed an overall effect for the factor 'housing' ( $z = -2.01$ ,  $p = 0.044$ ). Post hoc testing showed a significant difference ( $U = 35$ ,  $p = 0.033$ ) between tail-handled animals and forceps-handled animals (**Fig 2A**). No significant effects after 5 h in week 8 were detected.

## Behavioral scoring of aggression-associated parameters

The first aggressive behavior after cage cleaning appeared in 8 weeks old group-housed mice handled with forceps (GF) in the 5<sup>th</sup> week. Using the chi squared test on proportions of cages displaying aggression there was a significant overall effect concerning the handling methods ( $\chi^2(2) = 12.09$ ,  $p = 0.002$ ), (**Fig 2B**). Tail-handled animals showed no aggression at all, 1 out of 6 tube-handled cages only once (7<sup>th</sup> week) and 2 out of 6 forceps-handled cages showed aggression from 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week until end of recording.

## Body weight

Animals gained weight over time regardless of housing condition. At the conclusion of the experiment, an effect for the factor 'housing' was seen. Singly-housed mice were significantly



**Fig 2. Development.** A) Nest building test, 24 h (n of cages = 36, 24 mice/handling method). A significant overall effect ( $p < 0.05$ ) revealed regarding the factor 'handling'. Furthermore, a significant difference in the nest building performance is seen by the last week of housing and handling, indicating the role of experience. B) Behavioral scoring of aggression-associated parameters, (n = 54, 18/handling method). There was a significant overall effect concerning the number of attacks: forceps-handled group-housed mice had an increase in the number of attacks compared to the other handling methods ( $p < 0.01$ ). C) Body weight, (n = 72, 24/handling method). No difference in the development was found regarding the factor 'housing' or 'handling'. Asterisks indicate the level of significance (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367.g002>

lighter than group-housed mice ( $F_{(1,70)} = 4.43$ ,  $p = 0.039$ ). No differences in weight could be attributed to 'handling', however. (**Fig 2C**). Additionally, variation differences were investigated for both factors but were not significant.

## Body temperature

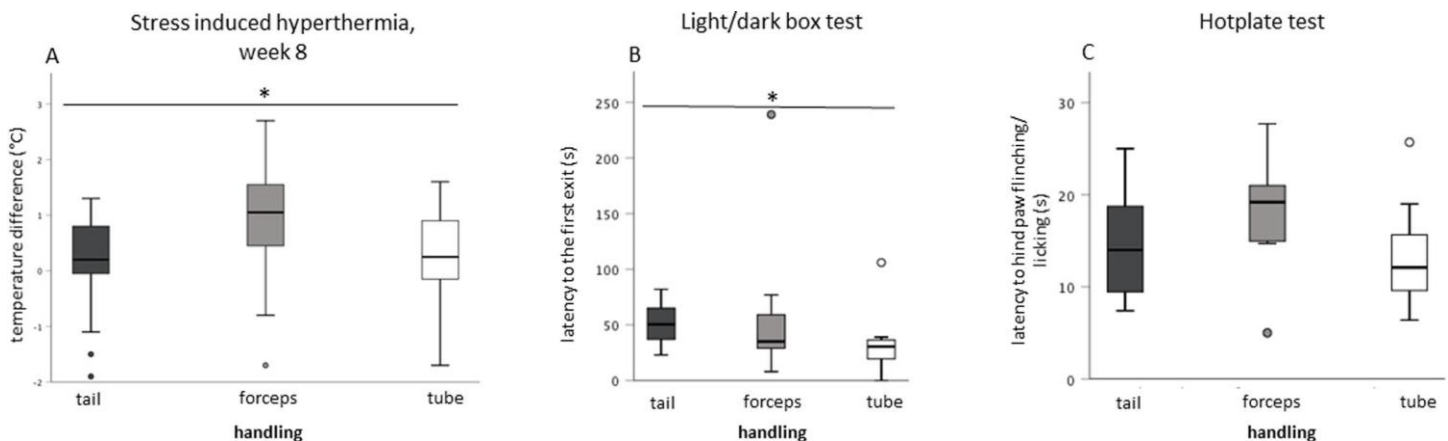
There was a significant overall effect only in the 7<sup>th</sup> week for the factor 'housing' ( $\text{Chi}^2 (1) = 5.04$ ,  $p = 0.025$ ) with singly-housed mice showing increased hyperthermia. In the 8<sup>th</sup> week, a significant difference in the factor 'handling' ( $\text{Chi}^2 (2) = 7.13$ ,  $p = 0.028$ ) was noted. Post hoc testing revealed a significant difference between forceps-handled and tube-handled mice ( $\text{Chi}^2 (1) = 5.49$ ,  $p = 0.019$ ) or tail ( $\text{Chi}^2 (1) = 5.49$ ,  $p = 0.019$ ) (**Fig 3A**). Furthermore, forceps-handled males had the greatest variation in temperature difference (tail,  $0.2 \pm 0.8$ ; forceps,  $0.9 \pm 1$ ; tube,  $0.3 \pm 0.8$ ; mean  $\pm$  SD) confirmed by Levene testing (tail vs. forceps:  $p = 0.026$ ; tube vs. forceps:  $p = 0.026$ ).

## Blood glucose

Neither housing nor handling influenced blood glucose levels overall. In the 8<sup>th</sup> week, the interaction between housing and handling was significant ( $F_{(2,36)} = 6.5$ ,  $p = 0.005$ ). Tail-handling in singly-housed mice led to the lowest, whereas in group-housed animals this handling condition evoked the highest blood glucose levels. For forceps-handled mice the blood glucose levels under group- and single housing conditions were most similar. Tube-handling in singly-housed mice revealed the highest and in group-housed animals the lowest blood glucose levels.

## Light/dark box test

Anxiety-like behaviors analyzed in the LDB were altered depending on handling conditions. This was especially evident in the 'latency to the first exit' ( $\text{Chi}^2 (2) = 6.92$ ,  $p = 0.031$ ). Tail-handled mice entered the lit compartment significantly later compared to tube-handled mice with post hoc testing ( $U (1) = 26.5$ ,  $p = 0.007$ ), (**Fig 3B**).



**Fig 3. Handling effects.** A) Stress induced hyperthermia, (cages  $n = 36$ , 24 mice/handling method). Effect of handling treatment on the SIH in 8<sup>th</sup> week. A higher temperature difference was found for forceps-handled animals compared to tube- and tail-handled mice ( $p < 0.05$ ). B) Light/dark box test, ( $n = 36$ , 12/handling method). Evaluation of anxiety behavior regarding the factor 'handling' in a LDB test. Tube-handled mice had diminished anxiety behavior represented by the latency to the first exit. C) Hotplate test, ( $n = 36$ , 12/handling method). Asterisks indicate the level of significance (♦  $p < 0.05$ ; ♦♦  $p < 0.01$ ; ♦♦♦  $p < 0.001$ ). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367.g003>

## Hotplate test

Mouse reaction time on the hotplate was not dependent on the handling condition ( $F_{(2,33)} = 3.08$ ,  $p = 0.059$ ), (Fig 3C).

## Open field and social novel-object test

Open field: Locomotion in the OF was significantly altered by the factor 'housing' concerning the parameters 'distance to walls 0–10 min' ( $F_{(1,34)} = 8.76$ ,  $p = 0.006$ ) and the 'time in center 0–10 min' ( $F_{(1,34)} = 7.2$ ,  $p = 0.011$ ). Group-housed mice compared to single-housed mice spent more time in the center, hence achieved greater distances to the walls (Fig 4A and 4B).

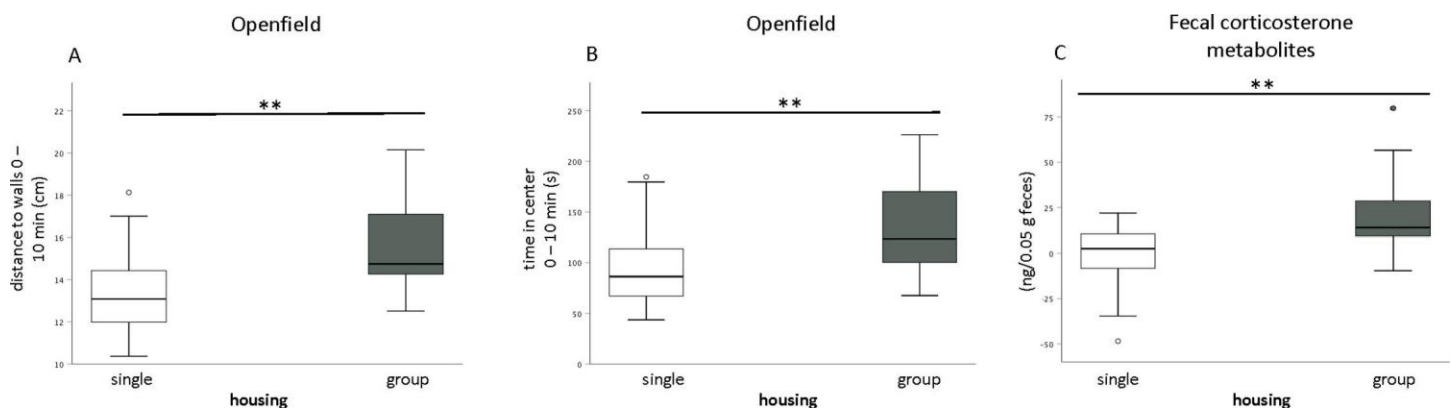
Social novel-object: Tukey post hoc testing revealed that tube-handled animals spent significantly more time ( $t = 2.47$ ,  $p = 0.049$ ) near the interaction partner compared to forceps-handled animals. Depending on the housing condition and the handling method mice differed in the first 5 min in their outcome in the parameters 'distance moved' ( $F_{(2,30)} = 3.75$ ,  $p = 0.035$ ), 'velocity' ( $F_{(2,30)} = 3.71$ ,  $p = 0.036$ ). Additionally, group-housed animals spent significantly more time in the center ( $F_{(1,34)} = 4.4$ ,  $p = 0.043$ ) compared to singly-housed ones.

## Fecal corticosterone metabolites (FCM)

Handling had no significant effect on FCM concentrations (ng/0.05 g feces) when analyzed with a one-way ANOVA after we calculated the changes relative to the absolute baseline value at week 3 ( $F_{(2,33)} = 0.24$ ,  $p = 0.791$ ). The same applies for absolute values measured in week 3 ( $F_{(2,33)} = 2.17$ ,  $p = 0.13$ ) or 7 ( $F_{(2,33)} = 1.42$ ,  $p = 0.256$ ). A bifactorial ANOVA revealed significant differences between group and individual-housed animals ( $F_{(1,34)} = 10.77$ ,  $p = 0.002$ ) (Fig 4C). No difference regarding absolute FCM values in week 3 ( $F_{(1,34)} = 0.76$ ,  $p = 0.392$ ) could be observed, whereas in week 7 a significant difference existed ( $F_{(1,34)} = 8.98$ ,  $p = 0.005$ ).

## Resident-intruder test

Of the 36 mice (6 mice of each condition; as stated above only one defined mouse of the group-housed mice was participating in the behavioral tests) used in this study, 21 (58%) were aggressive towards an intruder male and included in the statistical analysis. Single mice showed in general more aggressive behavior when analyzed with a Mann-Whitney-U-Test for independent samples, reflected in detail by: significantly more events of tail rattling ( $U = 25$ ,



**Fig 4. Housing effects.** A–B) Open field, ( $n = 36$ , 18/group). Behavior of C57BL/6N mice in the OF. Group-housed mice stayed more distant to the walls (A), consequently they spent more time in the center (B). C) Fecal corticosterone metabolites (FCM), week 7–3, ( $n = 36$ , 18/group). Group-housed mice had higher FCM levels (\*\*\*  $p = 0.002$ ). Asterisks indicate the level of significance (♦  $p \leq 0.05$ ; ♦♦  $p \leq 0.01$ ; ♦♦♦  $p \leq 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215367.g004>

$p = 0.036$ ), number of aggressive bites' ( $U = 26.5$ ,  $p = 0.043$ ) as well as attacks' ( $U = 23$ ,  $p = 0.024$ ) and 'fighting' ( $U = 21.5$ ,  $p = 0.016$ ). Handling conditions did not influence these behaviors significantly. A high variation for forceps-handled animals' data was notable for the parameter 'fighting' (tail,  $24.7 \pm 15.7$ ; forceps,  $58 \pm 56.1$ ; tube,  $42.4 \pm 13.3$ ; mean  $\pm$  SD), confirmed by the Levene test (tail vs. forceps:  $p = 0.007$ ; forceps vs. tube:  $p = 0.004$ ).

## Organ weights

All organs were removed by the same animal technician. Neither the housing condition nor the handling procedure significantly affected mouse organ weights.

## Discussion

Our results indicate that forceps handling has a negative impact on aggression-associated parameters. Forceps-handled mice had visible deficits in the well-being parameter represented by the nest building test and an increase in the number of attacks after cage cleaning, higher (stress) reaction in the stress induced hyperthermia and less pain perception on the hotplate. Contrary to our expectations, tube handling only affected anxiety-like behavior and offered no advantages over tail-handling in all other investigated parameters.

In the literature tunnel- or tube-handling is praised as a non-aversive method that reduces anxiety-like behavior as well as optimizes the reliability of behavioral testing in laboratory mice [8, 31–33]. In our study, the tube-handled mice were the fastest to exit the dark compartment in the LDB test, which indicates they experienced less anxiety, consistent with the previous findings [31, 34]. In contrast, the performance of mice picked up by the tail with a gloved hand was the poorest reinforcing the conclusion by Hurst *et al.* that this traditional way of mouse handling causes stress and anxiety [8]. Contrary to the outcomes reported in Gouveia *et al.* [31], the handling method did not have a strong influence on the general exploratory behavior when tested in the OF. In the sNO test, tube-handled animals did spend more time with the newly introduced interaction partner than those lifted by the tail. Hence, one may assume their curiousness/social drive to be greater than their anxiety. No further changes in behavior associated with tube-handling were observed. Nest building performance of tube-handled mice over the time did not differ from tail-handled animals after 5 h, whereas they performed better than forceps-handled animals. After 2 months of housing the scores after 24 h were not as good as in tail-handled animals, but still better than in forceps-handled mice. In stress-related parameters such as the SIH, tube- and tail-handled animals had similar results.

There are several possible explanations for the restricted outcome of the actual predicted advantage of tube-handling: First, for experimental testing, *i.e.* to gain blood, mice in our study were restrained once a week on a wire cage lid by hand, while Hurst and colleagues [8, 31] examined tube/tunnel-handling only via observation, so no restraint was applied to animals in Hurst *et al.*'s studies. In scientific research, most experiments do need to obtain more information from mice than behavior, therefore restraint is needed. This restraint, even if it was just performed once a week, may have had a greater influence than predicted.

Another explanation could be the difference in frequency and duration of handling in the different studies. Hurst and West handled CD-1, BALB/c and C57BL/6N mice only for 9 days and reported a significantly improved performance of non-aversive handled mice in behavioral testing [8, 31]. Novac *et al.* reported an absence of handling effects in their study handling CD-1 mice daily for 15 weeks [35], while we handled mice 4 times per week for 8 weeks and did see, contrary to them a handling-effect but not as large as shown by Hurst *et al.* [8]. It is known that mice may adapt to experimenter handling [36] thus, the effect of tube-handling in

the present experiment should be in between the reported outcomes of the previous studies, which they are. Hence, we may see an effect of mice slightly habituated to handling.

The major consequences of handling were seen for forceps-handled animals. As predicted, group-housed, forceps-handled mice showed increased levels of aggression-related behavior. The number of attacks was significantly higher compared to tail- or tube-handled conspecifics. So far, no effects of forceps handling on aggressive behavior have been reported in the literature, consequently no previous data exist for us to compare our results. However, aggression is a welfare issue for mice and moreover creates additional variability [3, 37]. Interestingly the fecal corticosterone levels, which are thought to reflect stress experienced by the mice, did not show any difference between handling groups. These findings are in contrast with previous studies, which found changes in handling methods associated with changes in plasma corticosterone concentrations [38, 39].

We had expected forceps-handled mice to become more sensitive to pain, as this method is from an anthropocentric point of view the most painful one. Forceps-handling implied lifting the animals 4 times a week by forceps on the base of their tail and even if the distal part of the forceps is edged in plastic, it would seem to have an impact on pain perception. The results of this test, although not significant, were interesting as they contradicted our original hypothesis. Forceps-handled animals stayed the longest time on the plate, longer than mice handled with both other methods. An explanation might be a higher stress-induces analgesia (or hypoalgesia) in the forceps-handled mice, which is a well-known phenomenon [40]. As effective pain assessment is critical in terms of animal welfare and the reduction of variation within experimental group, an influence of other painful procedures on those which are conducted with the ongoing research experiment, should be determined [32]. Routine husbandry procedures therefore should not influence those outcomes.

We used rectal temperature to investigate the distress caused by different handling methods. The body temperature can be measured by a rectal thermometer [41, 42] but this method may increase mouse distress due to handling [43, 44]. Therefore, all animals were handled similarly for rectal temperature measurements. We hypothesized that a difference in the temperature measurement was dependent on the previous, 4 times a week conducted handling method, not on the brief restraint required for the measure. Our experiment demonstrated SIH was altered by handling conditions in forceps-handled mice in the last week of measurement: Their SIH was greater than in the other handling conditions, thus their stress-recovery within the 30 min after being handled was delayed. Though a consistent insertion of the probe is important (Bouwknicht et al recommend 2–2.5 cm [27]) we only inserted approximately 1 cm of the rectal probe as the mice were only 3 weeks old on arrival and we wanted to avoid potential injuries to the animal. As this may have led to unreliable measurements, further investigations of the SIH would be needed to verify our outcome.

The investigation of housing effects on mice is far more established than those of handling. In general, group housing is recommended over single housing [1] to maximize well-being of these social animals [45, 46]. However, separation of co-housed animals is a practical solution if aggression arises, even though it is known that male mice prefer each other's company over individual-housing [47, 48]. Current research opinions differ concerning the consequences of housing configuration on stress-related parameters. Results of several studies indicate individual housing causes stress to mice resulting in stereotypy, nervousness, or handling difficulties [48]. Furthermore, single housing may affect the animals' physiological stress response and hypersensitivity against toxins [47, 49]. Contrary to those results, Kamakura et al published in 2016 that single housing caused less stress to mice when compared with group housing [50], underlining their results by urinary corticosterone analysis. Urinary corticosterone levels were hereby decreased in individually-housed mice. Those results are supported by previous studies

which led to the same findings [51, 52]. Kappel *et al.* recently published a review paper discussing whether it is in the best interest of male mice to be housed together in groups or alone [53], concluding that housing is highly context dependent.

The present study demonstrated several differences in animals based on housing condition. The body weights measured after 2 months clearly differed between group- and single-housed mice with single ones being lighter. Stress can influence the food intake and therefore the body weight, whereby some stressors lead to a decrease, but others have the opposite effect [54–57]. In our results, the weight differential seen could be due to nourishment competition in group-housed mice resulting in an increase in food intake compared to singly-housed mice, or singly-housed mice were stressed by isolation.

However, looking at the results of the fecal corticosterone metabolite analysis, no adverse effect of single housing is obvious. Instead increased FCM levels in group-housed mice were found. Corticosterone, a glucocorticoid which is released from the adrenal cortex in response to a stress stimulus, is a well-established stress marker in research [29, 52]. Even though it is most commonly detected in blood plasma, blood sampling itself as an invasive technique is known to be stressful, especially for small animals [29, 51]. Based on these facts we chose to collect fecal samples for measuring corticosterone metabolites instead, which is a non-invasive technique able to measure prior substantial stress [58]. The measured FCM levels in our singly-housed mice were decreased compared to group-housed animals perhaps indicating less stress compared to their group-housed conspecifics.

This conclusion can be underlined regarding the findings in the nest building test. Mice in both housing conditions improved their initial nest building performance during the course of the experiment. However, scoring after 24 h revealed a nest-building improvement only in singly-housed mice. As nest building behavior is an indicator of well-being in mice and reduced by stress [13, 59], group-housed mice seem to be more stressed in our study. To determine the position of an individual inside the dominance hierarchy of group-housed animals, aggressive interactions are an inevitable consequence, causing stress in animals involved in the agonistic encounter and bystanders. This could be an explanation for the previous results. However, the complexity of nests is of less impact in group-housed mice since they may compensate for lower nest qualities by physical contact [60]. Therefore the cold stress described by Gaskill *et al.* [60] could have led to respective differences in behavior since the impact of nest building in singly-housed mice is higher.

Looking at the data of the SIH, the single-housed mice experienced a single event of stress induced hyperthermia in the 10th week, which is not acutely evident anymore in the following week. SIH has been described in group- and single-housed conditions in several studies [27, 61, 62]. Due to our rectal temperature probe insertion of only 1 cm rather than the recommended 2–3 cm we could have caused some unreliable measurements.

In the RIT singly-housed mice showed more thrust- and aggressive behavior towards the intruder, whereas the distribution of attacking the intruder-males was equal for singly- and group-housed animals. Our results are therefore not consistent with previous findings which state that group-housed male mice are less likely to attack the intruder mouse [63]. We had to modify the standard protocol due to our experimental design; we could not house our residents individually in company with females before testing, as we wanted to examine the effect of handling conditions on behavior in different housing conditions. Additionally, our intruders were all housed singly to prevent a development of a social hierarchy, which might confound results by researchers selecting a mouse at different places in that cage's dominance hierarchy, possibly influencing the resident's reaction. In previous studies we consulted, intruder mice were always group-housed. The predicted outcome of singly-housed mice being

more aggressive was only partially confirmed, as mice in both housing conditions did not differ in their attack latency, but singly-housed mice did show more aggressive behavior in total.

Another housing effect was detected in the OF, where group-housed mice exhibited fewer anxiety-related spatial movement patterns, supporting previous research on the effect of housing conditions on activity and anxiety behavior in mice [64]. In the sNO assay, the introduction of the caged male mouse, which allowed olfactory, acoustic and limited physical contact (but no biting), revealed no differences in behavior based on housing.

We used mice ordered from commercial breeders by age to study intermale aggression, therefore we probably mixed non-littermates, even if it is known that grouping littermates decreases aggression [21]. This approach was chosen to investigate aggressive behavior under most realistic conditions, because housing only littermates together in cages is mostly not achievable due to the high number of mice required in experiments.

Even though our aim was to study aggression in male mice, agonistic interactions among all males were generally low in our study. An explanation might be that we kept the mice in stable groups from weaning throughout the experiment. Another approach to explain the low aggression could be the way we investigated for biting wounds. Even though bite wounds are difficult to see through fur [65] we chose to use only visual examination as further handling of the mice would be an additional source of stress. It is likely we missed smaller injuries on the animals. Another explanatory approach might be found in the environment of our experimental setting. Only male mice were investigated and therefore they were kept in the experimental room without any female mice. Might the absence of females and consequently their pheromones might have led to the decreased levels of intra-cage aggression? The question of whether the presence of female mice influences male agonistic interactions has so far not been tested. A further investigation of this aspect, *i.e.* redoing the experiment with female mice in the husbandry room could be a valuable addition to the mouse aggression literature.

## Conclusion

Our findings assessing the method of handling on aggression-associated parameters in C57BL/6NCrl mice do have important implications for common handling practices. Lifting mice up by their tails with forceps appears to stimulate aggressive behavior within groups of familiar adult mice more than lifting them up with fingers or in a tube. Consequently, this method influences behavioral assessments of aggression. Confirming the recommendations of Hurst *et al.* (18), tube-handling should be applied when minimization of anxiety in experimental mice is desired. Moreover, since group vs. single-housing significantly influenced some of our test results, these maintenance conditions should be considered carefully when planning or analyzing an experiment. The findings of the present study should be kept in mind when forceps-handling is the standard handling procedure (*i.e.* IVC cage changing), especially if the parameters being investigated in the course of an experiment are pain-, stress- or behavior-related.

## Supporting information

**S1 Fig. Scoring sheet.** For clinical assessment mice were observed once a week after weighing for clinical signs which might include one or more of the following: weight loss, wounds, barbering sings. Once the mice have been scored grade 2 they were observed more frequently (once a day). (PDF)

## Acknowledgments

We thank Charles River (Sulzfeld, Germany) and Janvier (Laval, France) for donating the mice used in this study. We thank members of our facility especially L. Walisch for helping us with tissue processing as well as the Institute of Medical Biometry and Informatics (IMBI), Heidelberg University, for their support.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Sinja Mertens, Miriam A. Vogt, Bernhard Hiebl, Sabine Chourbaji.

**Data curation:** Sinja Mertens.

**Formal analysis:** Sinja Mertens.

**Investigation:** Sinja Mertens, Rupert Palme, Sabine Chourbaji.

**Methodology:** Sinja Mertens, Rupert Palme.

**Resources:** Peter Gass.

**Supervision:** Miriam A. Vogt, Bernhard Hiebl, Sabine Chourbaji.

**Validation:** Sinja Mertens, Peter Gass.

**Visualization:** Sinja Mertens.

**Writing – original draft:** Sinja Mertens, Sabine Chourbaji.

**Writing – review & editing:** Sinja Mertens, Peter Gass, Rupert Palme, Bernhard Hiebl, Sabine Chourbaji.

## References

1. DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, (2010).
2. Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans V. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim*. 2003; 37(4):300–13. <https://doi.org/10.1258/002367703322389870> PMID: [14599305](#)
3. Weber EM, Dallaire JA, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Garner JP. Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem? *Lab Anim (NY)*. 2017; 46(4):157–61. <https://doi.org/10.1038/labani.1219> PMID: [28328884](#)
4. Howerton CL, Garner JP, Mench JA. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchical linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008; 115(1–2):90–103.
5. Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav*. 2003; 43(2):281–92. Epub 2003/04/16. PMID: [12694638](#)
6. Benedetti F, Fresi F, Maccioni P, Smeraldi E. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behavioural brain research*. 2008; 187(2):221–7. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.09.012> PMID: [17950929](#)
7. Lewejohann L, Zipser B, Sachser N. "Personality" in laboratory mice used for biomedical research: a way of understanding variability? *Dev Psychobiol*. 2011; 53(6):624–30. Epub 2011/08/26. <https://doi.org/10.1002/dev.20553> PMID: [21866543](#)
8. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods*. 2010; 7(10):825–6. Epub 2010/09/14. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1500> PMID: [20835246](#)
9. Palanza P, Parmigiani S. How does sex matter? Behavior, stress and animal models of neurobehavioral disorders. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017; 76(Pt A):134–43. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.037> PMID: [28434584](#)
10. 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; 164(1):100–6. Epub 2005/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.06.003> PMID: [16046006](#)
11. Bartolomucci A, Palanza P, Sacerdote P, Ceresini G, Chirieleison A, Panerai AE, et al. Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28(4):540–58. PMID: [12689611](#)
  12. Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc.* 2006; 1(3):1117–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.170> PMID: [17406392](#)
  13. Deacon R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp.* 2012;(59):e2607. Epub 2012/01/20. <https://doi.org/10.3791/2607> PubMed Central PMCID: PMCPMC3369766. PMID: [22258546](#)
  14. Bryant CD, Zhang NN, Sokoloff G, Fanselow MS, Ennes HS, Palmer AA, et al. Behavioral differences among C57BL/6 substrains: implications for transgenic and knockout studies. *J Neurogenet.* 2008; 22(4):315–31. Epub 2008/12/17. <https://doi.org/10.1080/01677060802357388> PubMed Central PMCID: PMCPMC3697827. PMID: [19085272](#)
  15. rodents Fwgorogfmo, rabbits, Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2014; 48(3):178–92. Epub 2014/02/06. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312> PMID: [24496575](#)
  16. Van Loo PL, Mol JA, Koolhaas JM, Van Zutphen BF, Baumans V. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav.* 2001; 72(5):675–83. PMID: [11336999](#)
  17. Joseph Garner BG, Cathleen Rodda, Cathleen Rodda, Aria Prater, Jon Klein, Hanno Wu'rbel, Georgia Mason, Anna Olsson, Elin Weber, Jerome Geronimo. Mouse Ethogram Available from: [mousebeha-vior.org/ethogram](http://mousebeha-vior.org/ethogram)
  18. Carola V, D'Olimpio F, Brunamonti E, Mangia F, Renzi P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res.* 2002; 134(1–2):49–57. Epub 2002/08/23. PMID: [12191791](#)
  19. Domanskyi A, Geissler C, Vinnikov IA, Alter H, Schober A, Vogt MA, et al. Pten ablation in adult dopaminergic neurons is neuroprotective in Parkinson's disease models. *FASEB J.* 2011; 25(9):2898–910. Epub 2011/05/20. <https://doi.org/10.1096/fj.11-181958> PMID: [21593433](#)
  20. Burgdorf J, Panksepp J, Brudzynski SM, Beinfeld MC, Cromwell HC, Kroes RA, et al. The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. *Dev Psychobiol.* 2009; 51(1):34–46. Epub 2008/09/27. <https://doi.org/10.1002/dev.20343> PMID: [18819097](#)
  21. Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, et al. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiol Dis.* 2006; 23(3):587–94. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.05.001> PMID: [16843000](#)
  22. Bourin M, Hascoët MJEjop. The mouse light/dark box test. 2003; 463(1–3):55–65.
  23. Chourbaji S, Brandwein C, Vogt MA, Dormann C, Hellweg R, Gass P. Nature vs. nurture: can enrichment rescue the behavioural phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behav Brain Res.* 2008; 192(2):254–8. Epub 2008/06/10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.04.015> PMID: [18538870](#)
  24. Malkesman O, Maayan R, Weizman A, Weller A. Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behav Brain Res.* 2006; 175(2):408–14. Epub 2006/10/31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.017> PMID: [17069898](#)
  25. Floody OR, Pfaff DW. Aggressive behavior in female hamsters: the hormonal basis for fluctuations in female aggressiveness correlated with estrous state. *J Comp Physiol Psychol.* 1977; 91(3):443–64. Epub 1977/06/01. PMID: [559693](#)
  26. Harrington JE. Recognition of territorial boundaries by olfactory cues in mice (*Mus musculus* L.). *Zeitschrift für Tierpsychologie.* 1976; 41(3):295–306. PMID: [983426](#)
  27. Adriaan Bouwknecht J, Olivier B, Paylor RE. The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31(1):41–59. Epub 2006/04/19. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.02.002> PMID: [16618509](#)
  28. Palme R, Touma C, Arias N, Dominchin MF, Lepsch M. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 2013; 100(9–10):238–46.
  29. Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003; 130(3):267–78. Epub 2003/02/28. PMID: [12606269](#)

30. Tourma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav.* 2004; 45(1):10–22. Epub 2004/01/22. PMID: [14733887](#)
31. Gouveia K, Hurst JL. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Sci Rep.* 2017; 7:44999. Epub 2017/03/23. <https://doi.org/10.1038/srep44999> PubMed Central PMCID: PMCPCMC5359560. PMID: [28322308](#)
32. Miller A, Kitson G, Skalkoyannis B, Leach M. The effect of isoflurane anaesthesia and buprenorphine on the mouse grimace scale and behaviour in CBA and DBA/2 mice. *Appl Anim Behav Sci.* 2015; 172:58–62. Epub 2016/03/05. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.038> PubMed Central PMCID: PMCPCMC4768077. PMID: [26937061](#)
33. Nakamura Y, Suzuki K. Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation. *J Vet Med Sci.* 2018; 80(6):886–92. Epub 2018/04/17. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0044> PMID: [29657231](#)
34. Gouveia K, Hurst JL. Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLoS One.* 2013; 8(6):e66401. Epub 2013/07/11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066401> PubMed Central PMCID: PMCPCMC3688777. PMID: [23840458](#)
35. Novak J, Bailoo JD, Melotti L, Rommen J, Wurbel H. An Exploration Based Cognitive Bias Test for Mice: Effects of Handling Method and Stereotypic Behaviour. *PLoS One.* 2015; 10(7):e0130718. Epub 2015/07/15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130718> PubMed Central PMCID: PMCPCMC4496074. PMID: [26154309](#)
36. Taylor K, Gordon N, Langley G, Higgins W. Estimates for worldwide laboratory animal use in 2005. *Altern Lab Anim.* 2008; 36(3):327–42. Epub 2008/07/30. PMID: [18662096](#)
37. Sherwin CJAW. The influences of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. 2004; 13(1):9–15.
38. Ghosal S, Nunley A, Mahbod P, Lewis AG, Smith EP, Tong J, et al. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav.* 2015; 150:31–7. Epub 2015/06/17. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.06.021> PubMed Central PMCID: PMCPCMC4546855. PMID: [26079207](#)
39. Ono M, Sasaki H, Nagasaki K, Torigoe D, Ichii O, Sasaki N, et al. Does the routine handling affect the phenotype of disease model mice? *Jpn J Vet Res.* 2016; 64(4):265–71. Epub 2016/11/01. PMID: [29786176](#)
40. Mogil JS, Sternberg WF, Balian H, Liebeskind JC, Sadowski BJP, behavior. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. 1996; 59(1):123–32.
41. Wong JP, Saravolac EG, Clement JG, Nagata LP. Development of a murine hypothermia model for study of respiratory tract influenza virus infection. *Lab Anim Sci.* 1997; 47(2):143–7. Epub 1997/04/01. PMID: [9150492](#)
42. Soothill JS, Morton DB, Ahmad A. The HD50 (hypothermia-inducing dose 50): an alternative to the LD50 for measurement of bacterial virulence. *Int J Exp Pathol.* 1992; 73(1):95–8. Epub 1992/02/01. PubMed Central PMCID: PMCPCMC2002468. PMID: [1576081](#)
43. Toth LA. Defining the moribund condition as an experimental endpoint for animal research. *ILAR J.* 2000; 41(2):72–9. Epub 2001/06/15. PMID: [11406700](#)
44. Warn PA, Brampton MW, Sharp A, Morrissey G, Steel N, Denning DW, et al. Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Lab Anim.* 2003; 37(2):126–31. Epub 2003/04/12. <https://doi.org/10.1258/00236770360563769> PMID: [12689423](#)
45. Kallikowski O, Teilmann AC, Jacobsen KR, Abelson KS, Hau J. The lonely mouse—single housing affects serotonergic signaling integrity measured by 8-OH-DPAT-induced hypothermia in male mice. *PLoS One.* 2014; 9(12):e111065. Epub 2014/12/02. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111065> PubMed Central PMCID: PMCPCMC4249803. PMID: [25436462](#)
46. Arakawa H. Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. *Behav Brain Res.* 2018; 341:98–108. Epub 2017/12/31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.12.022> PMID: [29287909](#)
47. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim.* 2004; 38(2):178–88. Epub 2004/04/09. <https://doi.org/10.1258/002367704322968867> PMID: [15070458](#)
48. Van Loo PL, de Groot AC, Van Zutphen BF, Baumans V. Do male mice prefer or avoid each other's company? Influence of hierarchy, kinship, and familiarity. *Journal of Applied Animal Welfare Science.* 2001; 4(2):91–103.
49. Ruis MA, te Brake JH, Engel B, Buist WG, Blokhuis HJ, Koolhaas JM. Adaptation to social isolation. Acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiol Behav.* 2001; 73(4):541–51. Epub 2001/08/10. PMID: [11495658](#)

50. Kamakura R, Kovalainen M, Leppaluoto J, Herzig KH, Makela KA. The effects of group and single housing and automated animal monitoring on urinary corticosterone levels in male C57BL/6 mice. *Physiol Rep.* 2016; 4(3). <https://doi.org/10.14814/phy2.12703> PubMed Central PMCID: PMC4758932. PMID: [26869685](#)
51. Hunt C, Hambly C. Faecal corticosterone concentrations indicate that separately housed male mice are not more stressed than group housed males. *Physiol Behav.* 2006; 87(3):519–26. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.11.013> PMID: [16442135](#)
52. Arndt SS, Laarakker MC, van Lith HA, van der Staay FJ, Gieling E, Salomons AR, et al. Individual housing of mice—impact on behaviour and stress responses. *Physiol Behav.* 2009; 97(3–4):385–93. Epub 2009/03/24. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.008> PMID: [19303031](#)
53. Kappel S, Hawkins P, Mendl MT. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals (Basel).* 2017; 7(12). Epub 2017/12/01. <https://doi.org/10.3390/ani7120088> PubMed Central PMCID: PMC5742782. PMID: [29186765](#)
54. Adam TC, Epel ES. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav.* 2007; 91(4):449–58. Epub 2007/06/05. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.011> PMID: [17543357](#)
55. Tamashiro KL, Hegeman MA, Nguyen MM, Melhorn SJ, Ma LY, Woods SC, et al. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav.* 2007; 91(4):440–8. Epub 2007/05/22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.004> PubMed Central PMCID: PMC1986729. PMID: [17512562](#)
56. Tamashiro KL, Nguyen MM, Ostrander MM, Gardner SR, Ma LY, Woods SC, et al. Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(5):R1864–74. Epub 2007/09/15. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00371.2007> PMID: [17855491](#)
57. Ulrich-Lai YM, Herman JP. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6):397–409. Epub 2009/05/27. <https://doi.org/10.1038/nrn2647> PubMed Central PMCID: PMC4240627. PMID: [19469025](#)
58. Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1040:162–71. Epub 2005/05/14. <https://doi.org/10.1196/annals.1327.021> PMID: [15891021](#)
59. Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim.* 2013; 47(3):153–61. Epub 2013/04/09. <https://doi.org/10.1177/0023677213475603> PMID: [23563122](#)
60. Gaskill BN, Rohr SA, Pajor EA, Lucas JR, Garner JPJAABS. Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing. 2009; 116(2–4):279–85.
61. Veening JG, Bouwknecht JA, Joosten HJ, Dederen PJ, Zethof TJ, Groenink L, et al. Stress-induced hyperthermia in the mouse: c-fos expression, corticosterone and temperature changes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004; 28(4):699–707. Epub 2004/07/28. <https://doi.org/10.1016/j.pnpb.2004.05.007> PMID: [15276696](#)
62. Van der Heyden JA, Zethof TJ, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav.* 1997; 62(3):463–70. Epub 1997/09/01. PMID: [9272651](#)
63. Yang T, Yang CF, Chizari MD, Maheswaranathan N, Burke KJ, Borius M, et al. Social control of hypothalamus-mediated male aggression. *Neuron.* 2017; 95(4):955–70. e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.046> PMID: [28757304](#)
64. Voikar V, Polus A, Vasar E, Rauvala H. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav.* 2005; 4(4):240–52. Epub 2005/06/01. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00106.x> PMID: [15924556](#)
65. Gaskill BN, Stottler A, Pritchett-Corning KR, Wong LK, Geronimo J, Garner JPJAABS. He's getting under my skin! Comparing the sensitivity and specificity of dermal vs subcuticular lesions as a measure of aggression in mice. 2016; 183:77–85

## 4.2 Manuskript 2 (submitted to “Applied Animal Behaviour Science“)

### Effect of a partial cage dividing enrichment on aggression-associated parameters in group-housed male C57BL/6NCrl mice

Sinja Mertens<sup>1,2</sup>, Peter Gass<sup>3</sup>, Rupert Palme<sup>4</sup>, Bernhard Hiebl<sup>1</sup>, Sabine Chourbaji<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Farm Animal Behavior and Virtual Center for Replacement - Complementary Methods to Animal Testing, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hanover, Germany

<sup>2</sup> University of Heidelberg, Interfaculty Biomedical Research Facility (IBF), Heidelberg, Germany<sup>[1]</sup>

<sup>3</sup> University of Heidelberg, Central Institute of Mental Health (CIMH), Mannheim Faculty, Heidelberg, Germany

<sup>4</sup> University of Veterinary Medicine Vienna, Unit of Physiology, Pathophysiology and Experimental Endocrinology, Vienna, Austria

#### Korrespondenzadresse

Universität Heidelberg, Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF)

Sinja Susanna Mertens

Im Neuenheimer Feld 347

69120 Heidelberg

Email: dr221@stud.uni-heidelberg.de

#### 1. Abstract:

Group-housing is highly important for social animals. Group-housing of male mice in captivity though often leads to aggression with partially disastrous consequences for the animals as well as for the quality of experimental data. In this study we investigated the effect of a novel “cross-enrichment”, i.e. a colored partial cage divider, which is provided in transparent or black and which is partly separating the cage in four small areas. Group-housed male mice (3 per cage) were maintained under either standard conditions (nestlet group) or enriched conditions (nestlet + cage divider in black [EB-group] or in transparent [ET-group]) for 8 weeks. Several physiological parameters (body weight, blood glucose, stress induced hyperthermia, fecal corticosterone metabolites and organ weights) and behavioral tests (Nest test, Openfield/social Novel-Object, Dark-Light-Box, Hotplate and Resident-Intruder test) were measured/performed to determine enrichment-induced effects. In comparison to nestlet- and ET-group animals, EB-mice showed significant increased stress-associated parameters, i.e. in the blood glucose concentration. Furthermore, EB animals seemed to have enhanced emotional stress with a poorer

outcome in the nest test and a higher amount of fecal boli at the end of the social Novel-Object test. Additionally, EB-mice behaved more aggressive towards conspecifics after cleaning cages. We conclude that the color of the tested partial cage dividers has a huge impact on aggressive behavior and therefore may lead to significant changes in behavioral and physical measures potentially altering research outcomes.

2. **Keywords:** aggression, corticosterone, enrichment, husbandry condition, stress, welfare

### 3. Introduction:

Aggression in group-housed laboratory male mice is a problem concerning not just animal welfare but also quality of experimental data. If conventional strategies for aggression limitation fail, the only possibility to prevent critical traumatization between the animals can be animal separation and individual housing, raising housing costs and human resources. However, for a highly social species, such as mice, this housing form is not sustainable because also male mice prefer the proximity of another conspecific to individual housing (Van Loo et al., 2001a). As mice are the most commonly used species for biomedical research, researchers and facility managers are looking desperately for a solution to solve the problem of aggression and its resulting consequences, so far in vain (Weber et al., 2017).

In the wild, aggressive behavior of the species *Mus musculus* is part of their social organization, which varies depending on local resource availability (Latham and Mason, 2004, Gray et al., 2002). Male mice social organization has been studied in semi-natural bawns and differs between i) individual males defending established territories, to ii) groups of males living in the same area and exhibit dominant-subordinate relationships and to iii) males defending territories while other males -not owning a territory- co-exist peacefully between defended territories (Wolff, 1985).

Under laboratory conditions federal guidelines regulate the cage size and density. Up to 4 mice < 30 g body weight and 3 mice > 30 g body weight are allowed in a standard type II cage of 370 cm<sup>2</sup> and 12 cm height. This standard cage, even if it satisfies the legal norms does not offer sufficient opportunities to show innate natural behavior such as exploration, burrowing or hiding and might especially be disadvantageous for male mice, where social dominance is inherent and escape behavior cannot be performed (Tallent et al., 2018). Furthermore, the suppression of the innate behavior may increase aggression from the dominant mouse. This does not only affect physiological, but also psychological welfare of all cage mates, especially pertaining to the subordinate mouse, which might experience pain and distress caused by

injuries (Council, 1992). An aggressive interaction is typically started by a thrust behavior (i.e. tail rattling, thrust) of the dominant companion and is followed by an aggressive behavior (i.e. attack, bite) if the subordinate mouse does not react appropriately (i.e. submissive upright, fleeing) (Joseph Garner, 2018). Such an adequate reaction though is not always possible under laboratory housing conditions as a non-enriched cage does provide only limited means of escape, leaving the subordinate male almost unprotected. Consequently, the dominant male gets separated to prevent further damage and the victim suffers from either isolation stress or its injuries and might even end up dead.

One approach to solve the problem of aggression is by providing environmental enrichment, which has been defined as “an improvement in the biological function of captive animals resulting from modifications to their environment” (Newberry, 1995). As a result of increased public and regulatory pressure, the improvement of animal welfare is no longer only on the basis of standardizing housing to minimize variability of experimental outcomes. Previous research verified enrichment to enable mice to interact with and partially control their surrounding by manipulating the device, which has a positive impact on their stress level (Wiepkema and Koolhaas, 1993). Subsequently structural enrichment is provided by most facilities (Hutchinson et al., 2005) and several different forms of them exist on the market (Howerton et al., 2008). However, most refinement efforts for laboratory rodent husbandry are evaluated from an anthropomorphic point of view non-regarding physiological parameters and the biological relevance for the animals. Environmental enrichment may not only influence animal’s behavior, but also might affect physiological parameters (i.e. body temperature, glucose, immune system) as outlined before (Meijer et al., 2006, Haemisch et al., 1994, Kingston and Hoffman-Goetz, 1996). Additionally, strain- and sex-specific effects associated to the added cage enrichment can occur (Nevison et al., 1999, Van de Weerd et al., 1994, Martínez-Cué et al., 2002, Tsai et al., 2003, Bayne, 2005, Tsai et al., 2006). Therefore an evaluation of each form of enrichment is necessary to prove their beneficial effect on mice (Benefiel et al., 2005). Weber et al. published a review paper summarizing all methods to cope with aggression in group-housed male mice to date (Weber et al., 2017). Aggression is a complex field and affected by many factors. For example an enrichment which is valued by and advantageous for individually-housed mice could have the opposite effect in group-housed animals as it may become a defensible resource, increasing aggressive behavior (Howerton et al., 2008). A review of the literature reveals few behavioral investigations of the effects of environmental enrichment on aggression in mice and the results have generally been inconsistent. Some demonstrating an increase (Barnard et al., 1996, Haemisch and Gartner,

1994, Haemisch and Gartner, 1997, Henderson, 1976, Marashi et al., 2003, Tsai et al., 2002, Van de Weerd et al., 2004, Bergmann et al., 1995) others a reduction (Ambrose and Morton, 2000, Van Loo et al., 2002, Vestal and Schnell, 1986, Belz et al., 2003) and still others no effect regarding aggressive behavior (Haemisch and Gartner, 1997, Marashi et al., 2003, Van Loo et al., 2004, Van Loo et al., 2003, Van der Meer et al., 2004, Van Loo et al., 2002).

So far the only well-established enrichment known to decrease aggression is nesting material: Mice spend over 60% of their wake phase (Van de Weerd et al., 1997a) with the provided material, building nests which allows them to thermoregulate in a surrounding where ambient temperatures are set below the mice's thermoneutral zone (Van de Weerd et al., 1997b, Van Loo et al., 2003). Also transferring old nesting material at cage changing is recommended to minimize aggression. With the Appendix A of the European Convention of the Council of Europe (ETS 123) coming into force, nesting material therefore became nearly indispensable. Structural enrichments, such as shelters, had a mixed outcome regarding aggression with studies reporting both increases and decreases (Olsson and Dahlborn, 2002). However, studies explicitly focusing on cage dividers are rare and only one so far evaluated such a type of enrichment with respect to aggressive behavior: Talent et al. (Tallent et al., 2018) tested 18 male Balb/c mice, which were assigned at an age of 8 weeks in groups of 3 and put either to a standard or a divided cage. The cage divider created a three-burrow partition and mice behavior was recorded on day 1, 2 and 7. Findings indicated a significant decrease in events of aggressive behaviors, both in the light and dark cycles.

The present study was conducted to evaluate the suitability of a novel partial cage dividing enrichment to reduce stress- and aggressive-related parameters. Studies in group-housed males, in which an enrichment allowed one mouse to gain control over it led to an increase in the variance of the collected experimental data (Gärtner, 1999). Therefore, the invented cage divider enables no exclusive control of the device. Up to 4 mice < 30 g can be held in a Macrolon type II cage and the created cross-enrichment, which consisted of equal chambers with an area of 33 cm<sup>2</sup> each, allowed all animals to use it contemporaneously. Besides that, it is known that mice do prefer specific cage colors over others (Sherwin and Glen, 2003). With no study investigating the effect of different colored cage dividers on aggression-associated parameters, we custom-designed the enrichment in 2 different colors, one translucently for mice (Enrichment transparent, ET), the other one opaque for mice (Enrichment black, EB).

We tested the hypothesis if both enrichment items, independent of their colors, would significantly decrease aggressive behavior in group housed male mice compared to mice housed in a standard, non-divided cage.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Ethics statement:

The study was conducted according to the guidelines of the German Animal Welfare Act and was approved by the Karlsruhe State Authority (project licence number: G-154/17).

#### 3.2 Animals:

54 male mice of the inbred strain C57BL/6NCrl (B6, age of 3 weeks) were obtained from Charles River Laboratories. The animals were maintained under standard laboratory conditions (reversed 12 h light/ 12 h dark cycle,  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $55 \pm 10\%$  humidity, aspen wood bedding (ABEDD LTE-001, Lab & Vet Service, Vienna, Austria)), provided with pelleted food (Rod 16-A LasVendi, Soest, Germany)) and access to water *ad libitum* throughout the whole experimental. A specific pathogen-free (SPF) hygienical status according to Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) recommendations was given (rodents et al., 2014). Mice of the inbred strain C3H/HeJ were obtained from Janvier Laboratories (Laval, France), to serve as interaction partners for 2 behavioral tests. The strain was used due to its even tempers (personal communication with commercial breeders) and for its brown color, which makes them easier to distinguish from the B6 mice. They were housed in a separate room to prevent an impact on the experiment by the influence of odor particles.

#### 3.3 Study design:

The Experimental setup was performed as illustrated in Figure 1. All experiments and measurements were performed during the dark phase and the animals were handled by hand. Upon arrival the 54 animals were randomly allocated into 3 different housing conditions of groups of  $n = 3$  per cage. A total of 18 mice were maintained in standard housing conditions serving as controls (C), only provided with a cotton nesting pad and 36 mice in enriched housing conditions (18 mice housed with a transparent enrichment (ET) and 18 mice housed with a black enrichment (EB)). Mice were marked by ear punches (1 – 3) and additionally for easy differentiation on their tails (mark on the tail refreshed weekly). Only one initially randomly assigned mouse per cage (number 3) was used for the behavioral testing battery in weeks 9 – 10 and the feces collection. The aspen wood bedding and additional enrichment of all cages (Makrolon type II cages,  $370\text{ cm}^2$ , Tecniplast, Milan, Italy) were changed on a 7-day cycle with a small portion ( $\pm 0.5\text{ g}$ ) of old nesting material transferred with the mice and a fresh nestlet added to the new cage.

Mice were housed in respective conditions for 10 weeks and cage cleaning, behavioral scoring after cage cleaning plus the nest test (NT) were performed once a week between week 1 – 8. On the following day the clinical parameters blood glucose, body weight and the rectal temperature were measured. For feces collection the mouse was placed on an empty Macrolon Typ II cage in the third and 7<sup>th</sup> week, fecal boli for fecal corticosterone metabolite (FCM) measurements were collected and the animal relocated in its home cage. Furthermore, all experiments were performed by a female researcher.

### 3.4 Cross-Enrichment:

The enrichment was hand-fabricated from either Polycarbonate (transparent) or, due to availability, recycled Polycarbonate (black) and designed to fit in a Macrolon Typ II cage. Composed of 2 parts, each piece had the dimension of 12 x 5 x 0.5 cm with a centered pit (0.5 x 2.5 cm) and could be easily combined in the middle, creating 4 equal compartments (Fig. 2). Total floor space was unaffected by the addition of the partial cage divider and daily observation and health checks easily feasible.

### 3.5 Clinical parameters:

Barbering and biting wounds were recorded throughout the study by means of a standardized score sheet (Fig. 3).

#### 3.5.1 Body weight:

Mice were weighed each week throughout the study.

#### 3.5.2 Blood glucose:

Blood was sampled from the tail vein by puncture once a week and the blood glucose measured using an automatic glucose meter (Medisana ® MediTouch 2, Promed GmbH, Germany): FAD-binding glucose-dehydrogenase converts the glucose in the blood to glucoconolactone, which is measured by the device and which is in proportion to the blood glucose volume. Levels of glucose were compared within the groups to estimate an effect of stress.

#### 3.5.3 Rectal temperature:

The test started by inserting a thermistor probe 1 cm into the rectum of the mice (Testo 108, Testo SE & Co. KGaA, Lenzkirch, Germany + MLT1404 Rectal Probe, ADInstruments Ltd, Oxford, United Kingdom), after dipping it into a lubricant. The first rectal temperature

measurement ( $T_1$ ) was followed by a second temperature measurement ( $T_2$ ) 30 min later. The difference  $\Delta T (=T_2-T_1)$  is the stress-induced hyperthermia (Van der Heyden et al., 1997).

#### 3.5.4 Corticosterone metabolites:

In order to analyze fecal corticosterone metabolites (FCM) fecal samples of mouse no. 3 were collected in the third and 7th week of housing. Samples were taken by placing the mouse in a separate empty cage for approximately 45 min (14.00 – 14.45h), fecal boli were collected and the mouse replaced in its home cage. FCM were extracted according to the method described by Palme et al. (Palme et al., 2013). In brief, each sample was homogenized and an aliquot of 0.05 g was shaken for 5 min by hand with 1 ml of 80% methanol (if less feces was available proportionally less methanol was used). After centrifugation the supernatant was frozen at -20 °C until analysis. The samples were analyzed using a  $5\alpha$ -pregnane-3 $\beta$ ,11 $\beta$ ,21-triol-20-one enzyme immunoassay as described and validated for mice by Touma et al. (Touma et al., 2004, Touma et al., 2003).

#### 3.5.5 Organ weights:

As an index of the degree of stress, which may arise from sub-optimal housing conditions, we weighed the thymus, spleen, both adrenal glands, both vesicular seminales and both testes of the mice. Under deep anesthesia induced with ketamine (195 mg/kg i.p., Bremer Pharma GmbH, Warburg) and xylazine (30 mg/kg i.p., Eucuphar GmbH, Greifswald) the organs were dissected, weighted and the weight set in relation to the body weight.

### 3.6 Behavioral testing

The acclimatization time before the behavioral testing was at least 25 min. Between 2 tests a pause of 24 h was abided. Additionally, animals were tested in the experiments ranked as less stressful, following earlier recommendations for repetitive behavioral testing (Maier, 2001, Chourbaji et al., 2008b, McIlwain et al., 2001).

#### 3.6.1 Nest test:

Each week a nest test was performed. Nest building behavior is an indicator of well-being, as the behavior is reduced by pain and stress (Jirkof, 2014). After the mice bedding was changed they received a bit of the old nest as well as a new cotton nest pad (Plexx B.V, AB Elst, The Netherlands). The nests were then scored after 5 h and 24 h by using a modified protocol developed by Deacon on a 6-point scale (1 = nestlet untouched, 2 = more than 90 % of the

nestlet intact; 3 = < 50 % intact; 4 = identifiable, but flat nest, 5 = nearly perfect nest, more than 90 % shredded, less than 50 % of its circumference is higher than mouse body height when curled up; 6 = perfect nest, more than 50 % of its circumference is higher than mouse body height when curled up).

### 3.6.2 Behavioral scoring of aggression-associated parameters:

Cage cleaning disrupts odor cues, which are emanated from the body, deposited on the bedding largely by mice's urine, and mediate aggression between mice (Gray and Hurst, 1995). Therefore, the mice were recorded for 20 min under light illuminated conditions (35 lux) after cage cleaning and the behavioral interactions i) latency to the first attack, ii) duration of the first attack and iii) total amount of attacks were analyzed.

### 3.6.3 Openfield test, social Novel-Object test:

Mice were subjected to an Openfield (OF) test between 10.30 and 11.50 a.m. on 2 consecutive days to monitor their exploration, activity and anxiety (Chourbaji et al., 2008a). They were placed in the center of the OF on an infrared light surface. Light intensity during testing was 25 lux floor level (Domanskyi et al., 2011). The test was combined with a sNO test to investigate exploratory-, neophobic- and social behavior towards an unfamiliar male mouse (C3H/HeJ strain). The mouse, sitting in a metal cage (7 cm x 7 cm x 8 cm), was placed in the middle of the OF wherefore the test is named social Novel-Object (sNO) test.

Each test was recorded with a camera-videosystem (Ikegami Digital) for 10 min and mice's movement tracked using a tracking software (Ethovision, Noldus Information Technologies, Wageningen, The Netherlands). In both parts of the OF test several parameters were measured, i.e. distance moved, time in center or the velocity. Additionally, while testing for social interaction with the new object parameters like 'latency to the sNO', 'frequency of visiting the sNO' and 'time spend at the sNO' were evaluated. In the end of the testing period, the number of fecal boli was counted as an indicator of emotionality. In between animal changes the apparatuses were cleaned with 70% ethanol.

### 3.6.4 Dark-Light-Box test:

A Dark-Light-Box (DLB) test was conducted to measure anxiety-like behavior (Chourbaji et al., 2008a), as aggression provokes the development of anxiety in male mice (Kudryavtseva et al., 2002). The DLB consisted of an arena partitioned into 2 compartments, a dark (approximately 1 lux) and a lit compartment (600 lux), connected by a small entry. Animals

were placed in in the dark compartment and recorded for 5 min by a video camera (Ikegami Digital) positioned overhead. The latency until entering, the number of entries into- and the time spent in the lit compartment was scored. Furthermore, the number of fecal boli was counted at the end of each trial and the arena cleaned with 70% ethanol.

### 3.6.5 Hotplate test:

Enrichment may alter pain sensitivity (Pham et al., 2010), wherefore a Hotplate (HP) test was performed using an electronically controlled hot plate (Ugo Basile Hot/Cold Plate 35100, Ugo Basile, Gemonio, Italy) heated to 53°C ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ). Latency until hind paw flinching or licking movements occurred was measured and the animal immediately removed from the hot plate if the behavior was presented. Cut off time was set at 45 sec to avoid tissue damage (Chourbaji et al., 2005).

### 3.6.6 Resident-Intruder test:

The Resident-Intruder test (RIT) is based on the territorial behavior against unfamiliar intruding conspecifics. Prior to testing, the mice bedding was left unchanged for 12 days. Two mice were set out of the cage and the remaining resident was confronted in its home cage by an unfamiliar, lighter and smaller intruder male of the C3H/HeJ strain for 10 min. Behavioral interactions during each confrontation were recorded by a camera from above (Ikegami Digital) and subsequently scored. Thrust (tail rattling, thrust, mounting) and aggressive behavior (boxing, attack latency, aggressive bite, attack, fighting, chase) were analyzed following a previously published mouse ethogram (Joseph Garner, 2018).

### 3.7 Statistical analysis:

All statistical analyses were performed using SPSS 26.0 for Mac (IBM) with statistical significance assigned when  $p < 0.05$ . If our data was normally distributed, we used a one- way ANOVA followed by Tukey post hoc testing. If not, we used nonparametric statistical tests, i.e. the Kruskal-Wallis test or the Mann-Whitney-U-test. Body weight and blood glucose were analyzed by using a repeated measurement ANOVA. Additionally, we calculated the standard deviation of all values, serving as a measure of variation observed in the data.

## 4. Results:

Table 1 illustrates all conducted tests with significant and non-significant results.

#### 4.1 Clinical parameters:

##### 4.1.1 Barbering, biting wounds:

No barbering or biting wounds were noted during the experiment.

##### 4.1.2 Body weight:

Presence of the enrichment did not alter body weight of male mice compared to mice housed in standard cages when analyzed with a repeated measures ANOVA ( $F_{(1,52)} = 0.004$ ,  $p = 0.953$ ). Furthermore the enrichment color had no effect on the course of body weight ( $F_{(1,34)} = 1.467$ ,  $p = 0.234$ ). Additionally, no differences in data variation were detected comparing enriched and non-enriched cages (no enrichment,  $26.03 \pm 1.92$ ; enrichment,  $25.87 \pm 1.46$ ; mean  $\pm$  SD).

##### 4.1.3 Stress induced hyperthermia:

Defined as a temperature difference  $\Delta T > 0.5^\circ\text{C}$ , the stress induced hyperthermia was evaluated for each animal from week 3 - 8. No significant difference measured by one way ANOVA occurred between enriched and non-enriched groups ( $F_{(1,52)} = 0.611$ ,  $p = 0.438$ ) or color-differing enrichments ( $F_{(1,34)} = 0.339$ ,  $p = 0.564$ ). Additionally, chi-square statistic in the last week of housing did not reveal any difference (enrichment,  $\text{Chi}^2(1) = 0.38$ ,  $p = 0.845$ ; color,  $\text{Chi}^2(1) = 1.029$ ,  $p = 0.310$ ), whereas a difference in variation appeared (no enrichment,  $0.54 \pm 0.32$ ; enrichment,  $0.53 \pm 0.53$ ; mean  $\pm$  SD). At closer examination EB mice had a higher variation than C or ET mice (C,  $0.54 \pm 0.32$ ; ET,  $0.34 \pm 0.45$ ; EB,  $0.72 \pm 0.56$ ; mean  $\pm$  SD).

##### 4.1.4 Color effects:

4.1.4.1 Blood glucose: The blood glucose level was analyzed by performing a repeated measures ANOVA between week 3 and 8. The additional enrichment had no effect on the course of blood glucose level compared to the standard cage, whereas the color of the enrichment did altered the blood glucose level with higher glucose level in EB compared to ET mice ( $F_{(1,10)} = 5.881$ ,  $p = 0.036$ , Fig 4.). Furthermore, in the third and regarding a tendency in the 6<sup>th</sup> week, analyzed with a one-way ANOVA, the devices color influenced the blood glucose level ( $F_{(1,10)} = 7.3$ ,  $p = 0.022$ ;  $F_{(1,10)} = 4.54$ ,  $p = 0.059$ ), which also shows in the 6<sup>th</sup> week in a tendency comparing enriched and non-enriched cages. After 2 month of housing an increased variation in data of enriched cages compared to non-enriched once is obvious, with the biggest standard deviation for ET mice (C,  $102.67 \pm 6.71$ ; ET,  $96.17 \pm 9.75$ ; EB,  $102 \pm 6.54$ ; mean  $\pm$  SD).

#### 4.1.4.2 Fecal corticosterone metabolites:

The FCM did not significantly differ neither between enriched and non-enriched ( $F_{(1,16)}=0.359$ ,  $p = 0.558$ ) nor between ET nor EB-enriched mice ( $F_{(1,10)} = 0.106$ ,  $p = 0.752$ ) when analyzed with a one-way ANOVA in respect to the baseline value (Fig 4). A repeated measurement ANOVA revealed a tendency for the factor ‘color’ ( $F_{(1,10)} = 4.35$ ,  $p = 0.064$ ) with higher values for EB mice. Regarding the data variation enriched mice compared to non-enriched, especially EB mice, had higher outcomes (C,  $-14.77 \pm 19.12$ ; ET,  $-1.18 \pm 28.47$ ; EB,  $-8.57 \pm 47.78$ ; mean  $\pm$  SD).

#### 4.1.4.3 Organ weight:

All organs were removed by the same animal technician to reduce an unwanted effect and the organ weights analyzed corrected for final body weight. Again, just a trend regarding the factor color was detected (spleen,  $F_{(1,10)} = 4.665$ ;  $p = 0.056$ ; testis right,  $F_{(1,10)} = 3.748$ ,  $p = 0.082$ ), with higher data outcomes for EB mice (Fig 4). No noticeable differences in data variation was found.

### 4.2 Behavioral analysis:

#### 4.2.1 Behavioral effects:

4.2.1.1 Nest test: All mice improve their nest building performance between week 3 and 8 after 5 h and 24 h, analyzed by the Friedman-test. However, only non-enriched and ET mice do so significantly after 5 h. Furthermore after 24 h only C-housed mice show a tendency in performing better over the time ( $\text{Chi}^2 (2) = 10.6$ ,  $p = 0.06$ ). Kruskal-Wallis-Analysis did reveal a significant overall effect in the 24 h nest scores in week 5 when comparing all 3 housing conditions ( $\text{Chi}^2 (2) = 6.533$ ,  $p = 0.038$ ). Specified with the Mann-Whitney-U-test an effect in the 24 h scores in week 5 ( $U = 4$ ,  $p = 0.026$ ) and in week 6 ( $U = 4$ ,  $p = 0.026$ ) for the parameter color occurred (Fig 5). No differences regarding the data variation were detected.

#### 4.2.1.2 Behavioral scoring of aggression-associated parameters:

Analyzing the behavior after cage cleaning from week 4 on (starting point was set here as the first aggressive interaction was observed in week 4) a significant overall effect for the occurrence of attacks in the different housing conditions was seen ( $\text{Chi}^2 (2) = 18.202$ ,  $p < 0.001$ , Fig 5). From the 90 total cases, (18 animals observed over 5 weeks), 9 times aggressive behavior was seen- all in EB mice. In detail, the factor ‘enrichment’ ( $\text{Chi}^2 (1) = 4.551$ ,  $p = 0.033$ ) as well

as the factor ‘color’ ( $\text{Chi}^2 (1) = 9.153$ ,  $p = 0.002$ ) had a significant impact on the behavioral outcome.

#### 4.2.1.3 Openfield:

The OF measures anxiety-like behavior as mice naturally prefer to be near a protective wall rather than being exposed to danger out in the open (Christakis et al., 2012). All mice did not show any difference in the measured parameter.

After the sNO test the counted ‘fecal boli’ differed depending on the color of enrichment ( $F_{(1,10)} = 4.187$ ,  $p = 0.068$ , Fig 5). Regarding the variation in data, the ‘latency to the sNO’ as well as the ‘fecal boli’ differed depending on enriched or non-enriched, depending predominately on EB mice data outcome (‘latency to sNO’: C,  $3.83 \pm 5$ ; ET  $3.67 \pm 5.32$ ; EB,  $5.83 \pm 8.8$ ; ‘fecal boli’: C,  $3.33 \pm 1.86$ ; ET  $2.5 \pm 1.96$ ; EB,  $6.17 \pm 3.92$ ; mean  $\pm$  SD).

#### 4.2.2 Dark-Light-Box test:

DLB testing did not uncover any anxiety-related differences. Regarding variation differences an effect of enrichment was found (no enrichment,  $0.5 \pm 1.23$ ; enrichment,  $1.75 \pm 2.56$ ; C,  $0.5 \pm 1.23$ ; ET,  $2.17 \pm 3.06$ ; EB,  $1.33 \pm 2.16$ ; mean  $\pm$  SD).

#### 4.2.3 Hotplate test:

The housing condition did not affect the response in this test (enrichment:  $F_{(1,17)} = 0.135$ ,  $p = 0.718$ ; color  $F_{(1,10)} = 0.012$   $p = 0.916$ ). For enriched mice a higher variation in values occurred (no enrichment,  $16.31 \pm 3$ ; enrichment,  $16.97 \pm 4.08$ ; C,  $16.31 \pm 3$ ; ET,  $17.1 \pm 4.07$ ; EB,  $16.83 \pm 4.48$ ; mean  $\pm$  SD).

#### 4.2.4 Resident-Intruder test:

Among all 18 mice enrolled in this test, only 2 mice acted aggressive towards the intruder within 10 min testing time. Both were housed under EB conditions. Chi-square statistical analysis revealed no significant difference within the groups ( $\text{Chi}^2 (2) = 4.500$ ,  $p = 0.105$ ).

## 5. Discussion:

The results show that the male C57BL/6NCrl mice were more aggressive when housed under EB conditions, compared to when housed under C or ET conditions. Partial cage division per se did therefore not decrease aggressive behavior within male mice, contrary to the findings by Tallent et al. (Tallent et al., 2018) and to our expectations. We previously hypothesized that the

animals housed under enriched conditions would be less aggressive. The enrichment structures the cage and offers an escaping possibility; hence we assumed the mice to cope more easily with stressful situations. This effect was estimated to be enhanced by black enrichment, because the shelter effect was postulated to be increased by lack of visual contact.

Especially transferring the EB mice into new cages increased fighting and dominance behaviors. This may have been due to the non-transparency as it did not occur in the ET mice. In the wild, male mice defend their established territories and attack male intruders until the rival flees (Crowcroft, 1966). In our study, breaking line of sight is just achievable in EB mice, therefore the statement could also apply for the fighting over the dominance status in laboratory conditions - as soon as the subordinate mouse flees behind the wall of the black enrichment, the dominant one is not able to see it anymore, consequently being the winner of conflict. The minute the subordinate returns in the field of vision of the mouse which has previously defended its territory successfully, it may trigger once again aggressive behavior of the dominant resident. Contrary, the transparent enrichment allows the mice to see through the partitioned areas, so the aggression is not provoked again as soon as the mouse emerges from the divided zone. This result raises the presumption of an enhanced territorial behavior of the EB animals. Additionally, our findings of the first aversive interaction being observed in the 5th week of housing, hence the mice being 8 weeks old, correspond to previous findings of territorial aggression, demonstrating that territorial aggression behavior is not displayed prior to sexual maturity, which is approximately around the age of 6 – 8 weeks (Benus et al., 1992).

However, the pain threshold measured by the HP test was not altered by housing conditions. So far it is unclear whether a break out of aggression is a result of pain, frustration, a failure of dominance relationships to mediate aggression or if it is more closely related to territorial aggression (Gaskill et al., 2017, Weber et al., 2017). As no diversity in pain perception was obvious for the different housing conditions, aggressive behavior in our study does not seem to be a result of pain. Furthermore, we tested the mice for territorial aggression towards an unfamiliar intruder in the RIT. Out of all tested male mice, only 2 attacked the intruder, both originating from EB. This underlines the assumption of black enrichment strengthen aversion behavior due to a greater development of territorial aggression and a breakout of aggression, as seen in the behavioral testing after cage cleaning, being more closely related to territorial aggression. Therefore, this result is consistent with previous findings, showing that an environmental enrichment can lead to an increase of aggressive behavior in male mice (Haemisch and Gartner, 1994, Haemisch et al., 1994, Marashi et al., 2003, Bergmann et al., 1995, McGregor and Ayling, 1990). Interestingly the transparency of the enrichment seemed

to have a profound impact, since no significant differences existed between C- and ET-housed mice. This outcome was unexpected as cage dividers so far were not investigated regarding their opacity.

Furthermore, the EB had a clear effect on the stress-induced hyperglycaemia. Thus, individuals housed under EB conditions, differed from C or ET animals. The release of the glucocorticoid corticosterone in mice is a key component of a response to stress and regulates many metabolic processes and glucose homeostasis (Ghalami et al., 2013). Corticosterone stimulates the gluconeogenesis leading to an increase in blood glucose, hence stressed animals show higher blood glucose levels. As the blood glucose level also depends on mice food uptake, we assumed all animals to be replete as food was provided *ad libitum*. Therefore, changes in blood glucose would be explainable with different stress states. However, these findings were not consistent with the measured FMC levels. The FCM values did not reflect the outcomes of the blood glucose measurements, since no significant difference for EB mice was obvious. Thus, EB mice do not seem to be more stressed. Nevertheless a greater variation for enriched animals was observed, consistent with previous research (Gärtner, 1999).

Besides those findings a tendency in the number of fecal boli counted after the sNO test indicate EB mice to exhibit higher emotionality (Lister, 1990, Lerch et al., 2015). This may result from previous stress-related behavior, justifying the assumption of EB mice being more stressed and therefore more anxious. However, the ‘distances to walls’ in the OF as well as the ‘exit latency’ in the DLB, 2 parameters testing for anxiety-like behavior, were unaffected by the different housing condition. Thus, anxiety may only manifest in a very slight expression in feces and just towards an unknown conspecific, assuming the alien mouse to stress EB- mice more than ET or standard-housed mice.

Also stress can lead to an increase in aggressive behavior in rodents (Marquez et al., 2013) and a decrease in the nest building performance (Jirkof, 2014). In our cages, the nest-scorings of EB animals were particularly after 24h lower than in the 2 other husbandry conditions. The NT is an indicator for wellbeing (Jirkof, 2014) and therefore when scorings are decreased, mice seem to be more stressed. Several explanations are conceivable for the considerable differences in the outcome of aggressive behavior compared to the study by Tallent et al. (10), in which the cage dividing enrichment had led to a significant decrease in aggression. First, both studies used different mouse strains and ages. Furthermore, different devices and lengths of enrichment exposure were examined. We used C57BL/6NCrl mice, which were tested over a period of 10 weeks, whereas they observed BALB/c mice for one week. It is known that a variable effect of enrichment exists on different strains (Chapillon et al., 1999, Tsai et al., 2002) and that the

duration of enrichment exposure can affect behavioral outcome (Leger et al., 2014). A study conducted by Leger et al. (Leger et al., 2014) aimed at assessing the time in which beneficial effects of an enriched environment appear, by using behavioral tests and neurobiological parameters. After testing the mice following exposition to different durations of enriched environments (24 h, 1, 3, or 5 weeks) they did see alterations for the different time-points, subsequently recommending, based on the results, 3 weeks of enrichment-exposure. So far, no investigation regarding enrichment duration and its effects on aggression was performed. Nevertheless, different outcomes are very likely to exist for different times of enrichment-exposure, too. Therefore, the statement of partial cage dividing decreasing aggression in male mice should be clarified independently for each device, exposure-period and strain. Additionally, the current study was performed involving animal manipulations to gather data relevant to the day-to-day use of mice in experimental research, whereas in Tallent et al. no handling of the animals was performed and therefore could have affected data outcomes. Handling is known to be stressful for animals and can result in impaired test performances (Deacon, 2006b). All mice in our experiment experienced the same handling technique and therefore stress, but accumulation of 2 stressors, one being the black enrichment, the other one being the handling, could have led to the bad results for EB mice.

To prove our suggestion of not only the opacity but also the color being important regarding dividing enrichment, it would have been interesting to clarify our results by using a colored Cross-Enrichment, e.g. green, as a 4<sup>th</sup> group. A study investigating cage color preferences and the effect of home cage color on anxiety in 72 female CBA mice revealed after a 5-week period of housing differences in behavioral outcomes and mice's color preferences (Sherwin and Glen, 2003). Held in groups of 3, one mouse was selected arbitrarily at the age of 8 weeks from each home cage and used in the cage color preference test (n = 24). The preference apparatus consisted of a central transparent cage connected by yellow plastic tubing (15 cm length) to four preference cages, each painted one of the colors of the home cage. The test was filmed by a camera from above and started by placing the mouse in the central cage, in which it could habituate for 24 h to the entire apparatus. Then each 24 h the position of the preference cages was changed until each cage color (red, black, green or white) was tested in each position. Overall the white cages were most and the red least preferred. In addition, anxiety behavior in a raised plus maze was investigated in which mice from red home cages spent most time in the closed arms, hence indicating greater anxiety. Even if we could not detect any anxiety-related differences in our study (OF, DLB), the higher amount of fecal boli after the sNO test points to a higher emotionality in EB mice. Hence, in accordance to Sherwin et al., we assume the

reduced occupancy of the black cross-enrichment to induce a negative mental state (Sherwin and Glen, 2003). Likewise, findings in rats demonstrated the importance of taking opacity into account. An experiment performed by Wren-Dail et al. aimed to examine the impact of different colored tunnels (amber, red, clear, or opaque) on the metabolism of pair-housed male Crl:SD rats (Wren-Dail et al., 2016). The colored devices, which were placed for 25 days into the animals' cages, altered the circadian rhythms of plasma measures of metabolism and physiology. Thus, all mentioned color-investigating studies, including ours, assumed colors to affect experimental outcomes (Wren-Dail et al., 2016). Nevertheless, future studies are necessary in mice to investigate opacity related differences to validate the presumption.

## 6. Conclusion:

The opacity of cage dividing enrichment, and likely other types of enrichment, appears to have a great impact on the behavioral outcome. The potentiation of aggression by a non-transparent enrichment should consequently be closely observed. We thus recommend that mice get a transparent enrichment when aggression within caged groups of males is a concern, but further research on this topic is necessary.

## 7. Acknowledgments

This project was supported in part by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR 2591, GZ: GA427/12-1) to P.G. We thank Charles River (Sulzfeld, Germany) and Janvier (Laval, France) for providing us with the mice used in this study. We thank members of our lab especially J. Weiss for helping us with tissue processing.

## References

1. Van Loo PL, de Groot AC, Van Zutphen BF, Baumans V. Do male mice prefer or avoid each other's company? Influence of hierarchy, kinship, and familiarity. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2001;4(2):91-103.
2. Weber EM, Dallaire JA, Gaskill BN, Pritchett-Corning KR, Garner JP. Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem? *Lab Anim (NY)*. 2017;46(4):157-61. doi: 10.1038/labanim.1219. PubMed PMID: 28328884.

3. Latham N, Mason G. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*. 2004;86(3-4):261-89.
4. Gray SJ, Jensen SP, Hurst JL. Effects of resource distribution on activity and territory defence in house mice, *Mus domesticus*. *Animal Behaviour*. 2002;63(3):531-9.
5. Wolff RJ. Mating behaviour and female choice: their relation to social structure in wild caught House mice (*Mus musculus*) housed in a semi-natural environment. *Journal of Zoology*. 1985;207(1):43-51.
6. Tallent BR, Law LM, Rowe RK, Lifshitz J. Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Lab Anim*. 2018;23677217753464. Epub 2018/02/08. doi: 10.1177/0023677217753464. PubMed PMID: 29409371.
7. Council NR. Recognition and alleviation of pain and distress in laboratory animals: National Academies Press; 1992.
8. Joseph Garner BG, Cathleen Rodda, Cathleen Rodda, Aria Prater, Jon Klein, Hanno Würbel, Georgia Mason, Anna Olsson, Elin Weber, Jerome Geronimo. Mouse Ethogram Available from: [mousebehavior.org/ethogram](http://mousebehavior.org/ethogram).
9. Newberry RC. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*. 1995;44(2-4):229-43.
10. Wiepkema P, Koolhaas J. Stress and animal welfare. *Animal welfare*. 1993;2(3):195-218.
11. Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J*. 2005;46(2):148-61. Epub 2005/03/19. PubMed PMID: 15775024.
12. Howerton CL, Garner JP, Mench JA. Effects of a running wheel-igloo enrichment on aggression, hierarchy linearity, and stereotypy in group-housed male CD-1 (ICR) mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 2008;115(1-2):90-103.
13. Meijer MK, Spruijt BM, van Zutphen LF, Baumans V. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Lab Anim*. 2006;40(4):382-91. Epub 2006/10/05. doi: 10.1258/002367706778476370. PubMed PMID: 17018209.
14. Haemisch A, Voss T, Gartner K. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiol Behav*. 1994;56(5):1041-8. Epub 1994/11/01. PubMed PMID: 7824569.
15. Kingston SG, Hoffman-Goetz L. Effect of environmental enrichment and housing density on immune system reactivity to acute exercise stress. *Physiol Behav*. 1996;60(1):145-50. Epub 1996/07/01. PubMed PMID: 8804655.

16. Nevison C, Hurst J, Barnard C. Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Animal Welfare*. 1999;8(4):361-79.
17. Van de Weerd H, Baumans V, Koolhaas J, Van Zutphen L. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *Journal of experimental animal science*. 1994;36:117-.
18. Martínez-Cué C, Baamonde C, Lumbreras M, Paz J, Davisson MT, Schmidt C, et al. Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behavioural brain research*. 2002;134(1-2):185-200.
19. Tsai PP, Stelzer HD, Hedrich HJ, Hackbarth H. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? *Lab Anim*. 2003;37(4):314-27. doi: 10.1258/002367703322389889. PubMed PMID: 14599306.
20. Bayne K. Potential for Unintended Consequences of Environmental Enrichment for Laboratory Animals and Research Results. *ILAR journal*. 2005;46(2):129-39.
21. Tsai P-P, Stelzer HD, Schraepfer A, Hackbarth H. Importance and effects of enrichment on physiology, behaviour and breeding performance in mice. *Altex*. 2006;23:96-8.
22. Benefiel AC, Dong WK, Greenough WT. Mandatory "enriched" housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation. *ILAR J*. 2005;46(2):95-105. Epub 2005/03/19. PubMed PMID: 15775019.
23. Barnard CJ, Behnke JM, Sewell J. Environmental enrichment, immunocompetence, and resistance to *Babesia microti* in male mice. *Physiol Behav*. 1996;60(5):1223-31. Epub 1996/11/01. PubMed PMID: 8916175.
24. Haemisch A, Gartner K. The cage design affects intermale aggression in small groups of male laboratory mice: strain specific consequences on social organization, and endocrine activations in two inbred strains (DBA/2J and CBA/J). *J Exp Anim Sci*. 1994;36(4-5):101-16. Epub 1994/08/01. PubMed PMID: 7948062.
25. Haemisch A, Gartner K. Effects of cage enrichment on territorial aggression and stress physiology in male laboratory mice. *Acta Physiol Scand Suppl*. 1997;640:73-6. Epub 1997/01/01. PubMed PMID: 9401611.
26. Henderson ND. Short exposures to enriched environments can increase genetic variability of behavior in mice. *Dev Psychobiol*. 1976;9(6):549-53. Epub 1976/11/01. doi: 10.1002/dev.420090608. PubMed PMID: 1001840.

27. Marashi V, Barnekow A, Ossendorf E, Sachser N. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav.* 2003;43(2):281-92. Epub 2003/04/16. PubMed PMID: 12694638.
28. Tsai PP, Pachowsky U, Stelzer HD, Hackbarth H. Impact of environmental enrichment in mice. 1: effect of housing conditions on body weight, organ weights and haematology in different strains. *Lab Anim.* 2002;36(4):411-9. Epub 2002/10/25. doi: 10.1258/002367702320389071. PubMed PMID: 12396284.
29. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Baumans V. Environmental enrichment: room for reduction? *Altern Lab Anim.* 2004;32 Suppl 2:69-71. PubMed PMID: 15601230.
30. Bergmann P, Militzer K, Büttner D. Environmental enrichment and aggressive behaviour: influence on body weight and body fat in male inbred HLG mice. *Journal of Experimental Animal Science (Germany).* 1995.
31. Ambrose N, Morton DB. The use of cage enrichment to reduce male mouse aggression. *Journal of Applied Animal Welfare Science.* 2000;3(2):117-25.
32. Van Loo P, Kruitwagen C, Koolhaas J, Van de Weerd H, Van Zutphen L, Baumans V. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science.* 2002;76(1):65-81.
33. Vestal BM, Schnell GD. Influence of environmental complexity and space on social interactions of mice (*Mus musculus* and *Peromyscus leucopus*). *Journal of Comparative Psychology.* 1986;100(2):143.
34. Belz EE, Kennell JS, Czambel RK, Rubin RT, Rhodes ME. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2003;76(3-4):481-6.
35. Van Loo PL, Van de Weerd HA, Van Zutphen LF, Baumans V. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim.* 2004;38(2):178-88. Epub 2004/04/09. doi: 10.1258/002367704322968867. PubMed PMID: 15070458.
36. Van Loo PL, Van Zutphen LF, Baumans V. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim.* 2003;37(4):300-13. doi: 10.1258/002367703322389870. PubMed PMID: 14599305.
37. Van der Meer E, Van Loo PL, Baumans V. Short-term effects of a disturbed light-dark cycle and environmental enrichment on aggression and stress-related parameters in male mice. *Lab Anim.* 2004;38(4):376-83. Epub 2004/10/14. doi: 10.1258/0023677041958972. PubMed PMID: 15479552.

38. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav.* 1997;62(5):1019-28. PubMed PMID: 9333195.
39. Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, Koolhaas JM, Baumans V. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim.* 1997;31(2):133-43. Epub 1997/04/01. doi: 10.1258/002367797780600152. PubMed PMID: 9175010.
40. Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim.* 2002;36(3):243-70. doi: 10.1258/002367702320162379. PubMed PMID: 12144738.
41. Gärtner K. Cage enrichment occasionally increases deviation of quantitative traits. *Animals research and welfare: Partnership.* 1999:207.
42. Sherwin C, Glen E. Cage colour preferences and effects of home cage colour on anxiety in laboratory mice. *Animal behaviour.* 2003;66(6):1085-92.
43. rodents Fwgorogfhmo, rabbits, Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, Gallagher A, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim.* 2014;48(3):178-92. Epub 2014/02/06. doi: 10.1177/0023677213516312. PubMed PMID: 24496575.
44. Van der Heyden JA, Zethof TJ, Olivier B. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav.* 1997;62(3):463-70. Epub 1997/09/01. PubMed PMID: 9272651.
45. Palme R, Touma C, Arias N, Dominchin MF, Lepschy M. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. *Wien Tierarztl Monatsschr.* 2013;100(9-10):238-46.
46. Touma C, Palme R, Sachser N. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav.* 2004;45(1):10-22. Epub 2004/01/22. PubMed PMID: 14733887.
47. Touma C, Sachser N, Mostl E, Palme R. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2003;130(3):267-78. Epub 2003/02/28. PubMed PMID: 12606269.
48. Maier SF. Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biological psychiatry.* 2001;49(9):763-73.
49. Chourbaji S, Chourbaji S, Brandwein C, Chourbaji S, Brandwein C, Vogt MA, et al. Evaluation of effects of previous exposure to an acute stressor before testing for depression-like behaviours in mice. *Stress.* 2008;11(2):170-5.

50. McIlwain KL, Merriweather MY, Yuva-Paylor LA, Paylor R. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & behavior*. 2001;73(5):705-17.
51. Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*. 2014;234:139-46.
52. Gray S, Hurst JL. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal behaviour*. 1995;49(3):821-6.
53. Chourbaji S, Brandwein C, Vogt MA, Dormann C, Hellweg R, Gass P. Nature vs. nurture: can enrichment rescue the behavioural phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behav Brain Res*. 2008;192(2):254-8. Epub 2008/06/10. doi: 10.1016/j.bbr.2008.04.015. PubMed PMID: 18538870.
54. Domanskyi A, Geissler C, Vinnikov IA, Alter H, Schober A, Vogt MA, et al. Pten ablation in adult dopaminergic neurons is neuroprotective in Parkinson's disease models. *FASEB J*. 2011;25(9):2898-910. Epub 2011/05/20. doi: 10.1096/fj.11-181958. PubMed PMID: 21593433.
55. Kudryavtseva NN, Bondar NP, Avgustinovich DF. Association between experience of aggression and anxiety in male mice. *Behavioural brain research*. 2002;133(1):83-93.
56. Pham TM, Hagman B, Codita A, Van Loo PL, Strommer L, Baumans V. Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiol Behav*. 2010;99(5):663-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.01.038. PubMed PMID: 20149809.
57. 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;164(1):100-6. Epub 2005/07/28. doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.003. PubMed PMID: 16046006.
58. Christakis DA, Ramirez JS, Ramirez JM. Overstimulation of newborn mice leads to behavioral differences and deficits in cognitive performance. *Sci Rep*. 2012;2:546. Epub 2012/08/03. doi: 10.1038/srep00546. PubMed PMID: 22855702; PubMed Central PMCID: PMC3409385.
59. Crowcroft P. Mice all over. 1966.
60. Benus RF, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA. Individual strategies of aggressive and non-aggressive male mice in encounters with trained aggressive residents. *Animal Behaviour*. 1992;43(4):531-40.
61. Gaskill BN, Stottler AM, Garner JP, Winnicker CW, Mulder GB, Pritchett-Corning KR. The effect of early life experience, environment, and genetic factors on spontaneous home-cage

- aggression-related wounding in male C57BL/6 mice. *Lab Anim (NY)*. 2017;46(4):176-84. doi: 10.1038/labani.1225. PubMed PMID: 28328870.
62. McGregor PK, Ayling SJ. Varied cages result in more aggression in male CFLP mice. *Applied Animal Behaviour Science*. 1990;26(3):277-81.
  63. Ghalami J, Zardooz H, Rostamkhani F, Farrokhi B, Hedayati M. Glucose-stimulated insulin secretion: Effects of high-fat diet and acute stress. *Journal of endocrinological investigation*. 2013;36(10):835-42.
  64. Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*. 1990;46(3):321-40.
  65. Lerch S, Brandwein C, Dormann C, Gass P, Chourbaji S. Bred to breed?! Implications of continuous mating on the emotional status of mouse offspring. *Behav Brain Res*. 2015;279:155-65. Epub 2014/12/03. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.007. PubMed PMID: 25446740.
  66. Marquez C, Poirier GL, Cordero MI, Larsen MH, Groner A, Marquis J, et al. Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl Psychiatry*. 2013;3:e216. Epub 2013/01/17. doi: 10.1038/tp.2012.144. PubMed PMID: 23321813; PubMed Central PMCID: PMC3566724.
  67. Chapillon P, Manneche C, Belzung C, Caston J. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet*. 1999;29(1):41-6. Epub 1999/06/18. PubMed PMID: 10371757.
  68. Leger M, Paizanis E, Dzahini K, Quiedeville A, Bouet V, Cassel J-C, et al. Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cerebral cortex*. 2014;25(11):4048-61.
  69. Deacon RM. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nature protocols*. 2006;1(2):936.
  70. Wren-Dail MA, Dauchy RT, Ooms TG, Baker KC, Blask DE, Hill SM, et al. Effects of Colored Enrichment Devices on Circadian Metabolism and Physiology in Male Sprague–Dawley Rats. *Comparative medicine*. 2016;66(5):384-91.

## Figure Legend:

Fig 1. *Study design.*

Mice were housed on arrival (week 0) in groups (n = 3) in a standard cage (A), with a transparent enrichment (B) or with a black enrichment (C). Measurements of clinical parameters were conducted from week 0 – 8, followed by behavioral testing (week 9 – 10) and sections for organ weight assessment. NT = Nest test, OF = Openfield, sNO = social Novel-Object test, DLB = Dark-Light-Box test, HP = Hotplate test, RIT = Resident-Intruder test

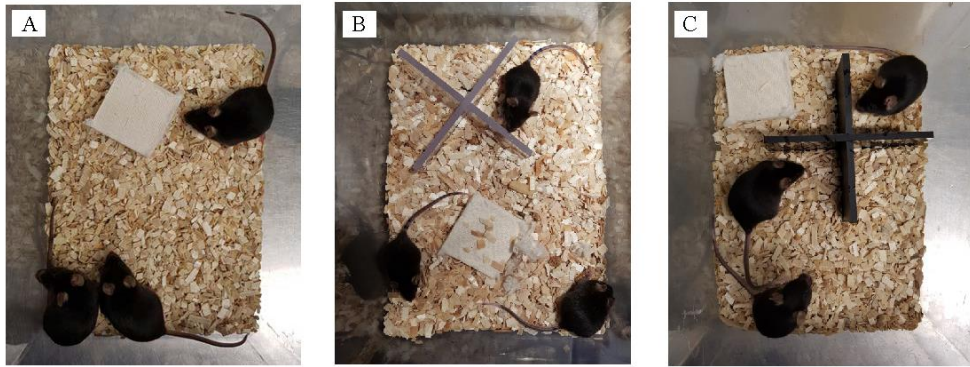
|            |                                                                                                                            |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Week: 0    |                                         |
| Week 0-8:  | Bodyweight, blood glucose, rectal temperature, behavioral scoring after cage cleaning, NT, Scoring of barbering and wounds |
| Week 3+7:  | Mouse No. 3: feces collection for corticosterone metabolite analysis                                                       |
| Week 9-10: | Mouse No. 3: OF + sNO, DLB, HP, RIT → section: organ weights                                                               |

Fig 2. *Enrichment.*

Sections of a black enrichment (a) and cages with a transparent enrichment, illustrated from the side (b) and rear (c). Devices dimensions are 12 x 5 x 0.5 cm.

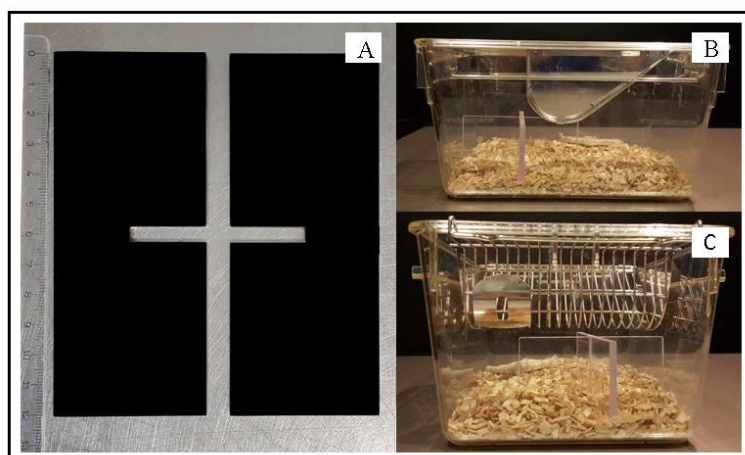


Fig. 3. *Scoring Sheet.*

|                                                                                                                     |                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Project license number: G-154/17<br>experimenter: _____<br>date: _____                                              |                                                                                                                   |
| week: _____<br>starting time: _____<br>ending time: _____                                                           |                                                                                                                   |
| <b>Cage Number/Animal Number</b>                                                                                    | _____ / _____                                                                                                     |
| Body weight (g):                                                                                                    | last week<br>current weight                                                                                       |
|                                                                                                                     | Score: 0: no weight loss<br>1: 0 – 5 % weight loss<br>2: 5 – 15 % weight loss<br>3: 15 – 20 % weight loss         |
| Wounds (n):                                                                                                         |                                                                                                                   |
|                                                                                                                     | Score: 0: none<br>1: superficial or < 1 cm<br>2: deep or 1 – 1.5 cm<br>3: ulceration or > 3 wounds or > 1.5 cm    |
| Barbering:                                                                                                          |                                                                                                                   |
|                                                                                                                     | Score: 0: no hair loss<br>0,5: < 30% hair loss<br>1: < 50% hair loss<br>1,5: < 75% hair loss<br>2: 100% hair loss |
| Total Score:                                                                                                        |                                                                                                                   |
| Euthanasia guidelines: 1. score of 3 in 1 category<br>2. score of 2 in 2 categories<br>3. total score of $\geq 4.5$ |                                                                                                                   |

Fig. 4. *Color effects.*

A) Blood glucose: Evaluation of stress-induced hyperglycemia revealed significant color differences between EB- and ET mice. B) Fecal corticosterone metabolites: No color effect comparing data values in respect to the baseline value were detected. C-D) Organ weights: Right testis and spleen of EB-mice were heavier than in ET-housed animals. Asterisks indicate the level of significance (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

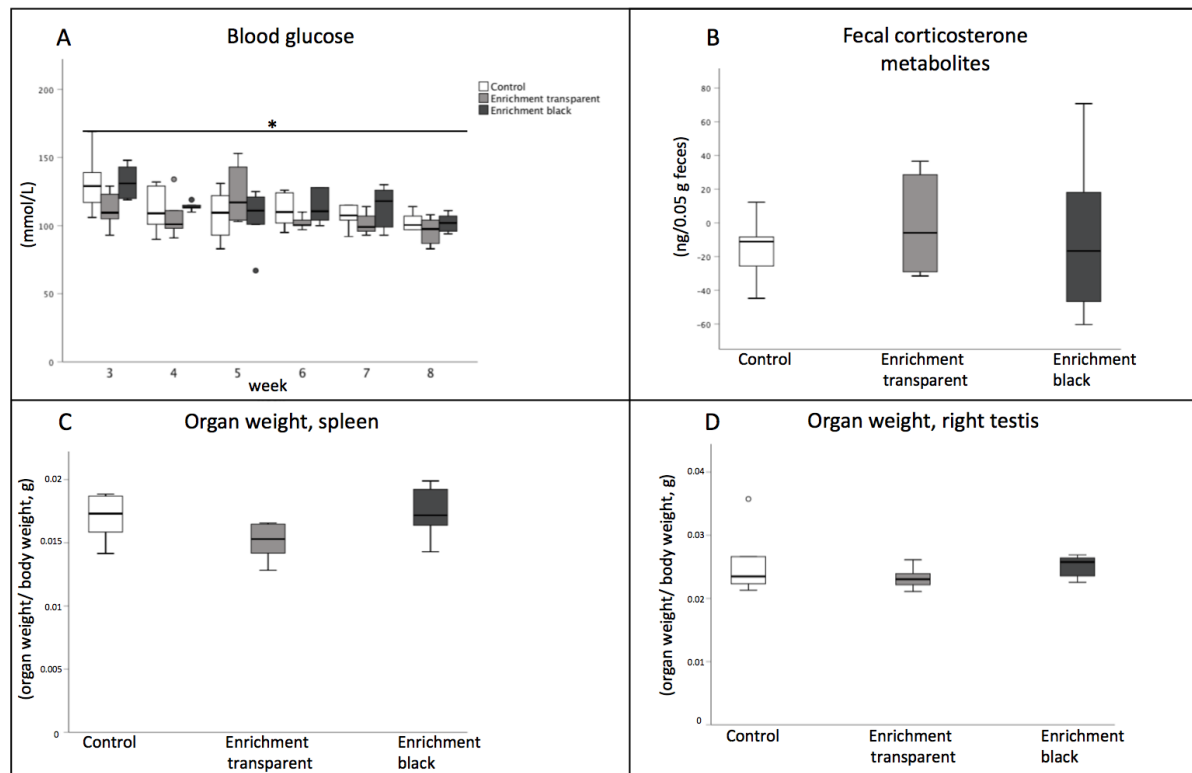


Fig. 5. *Behavioral analysis.*

A-B) Nest test 5 h and 24 h: The median of both enrichment colors after 5 h is equally whereas 24 h scores revealed a significant difference in the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week for the factor ‘color’ with lower scores for EB mice. B) Behavioral scoring of aggression-associated parameters: EB-housed mice compared to C- or ET-housed mice attacked conspecifics highly significant more often. C) Openfield + social Novel-Object: Tendencially, the number of the counted fecal boli was higher in EB-housed compared to ET-housed mice. Asterisks indicate the level of significance (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

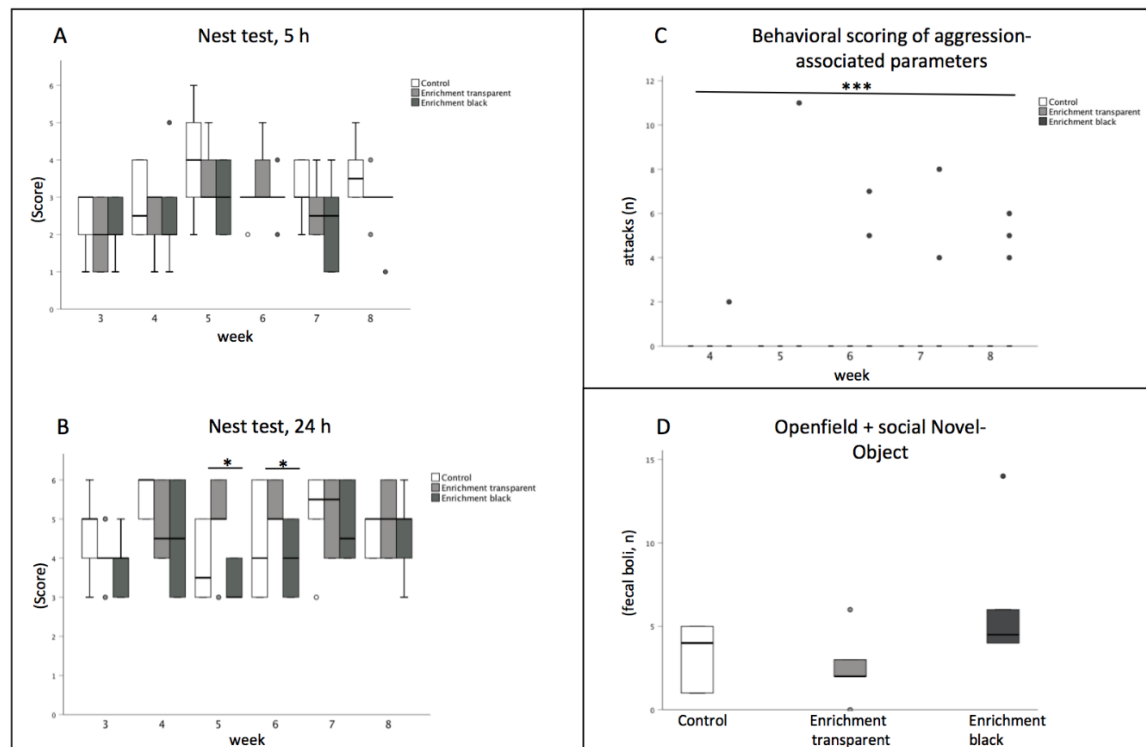


Table 1. *Statistical results concerning the factors 'enrichment' and 'color'.*

n.s.= no significance. Identification of the effects of the factors 'enrichment' and 'color'. Asterisks indicate the level of significance (\*  $p \leq 0.05$ ; \*\*  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). Data is split in 'clinical parameters' and 'behavioral-analysis' for better overview. Non-parametric testing is highlighted in grey. The order of the data presented in the categories reflects the order of the tests as they were conducted. Parameter not appearing in this table revealed non-significant results.

|                     |                                                        |                                             | effects/ interactions |                                                       |                          |
|---------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|
|                     | Test                                                   | Parameter                                   | Control vs. ET vs. EB | no enrichment vs. enriched cages                      | color: ET vs. EB         |
| clinical parameters | Body weight                                            | weight, week 8 (g)                          | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
|                     | Stress induced hyperthermia                            | all parameters                              | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
|                     | Blood glucose                                          | glucose, week 3 (mmol/L)                    | n.s.                  | n.s.                                                  | *p = 0.022               |
|                     |                                                        | glucose, week 6 (mmol/L)                    | p = 0.066             | n.s.                                                  | p = 0.059                |
|                     |                                                        | glucose, week 3 - 8 (mmol/L)                | n.s.                  | n.s.                                                  | *p = 0.036               |
|                     | organweight/ body weight                               | weight testis right (g)                     | n.s.                  | n.s.                                                  | p = 0.082                |
|                     |                                                        | weight spleen (g)                           | n.s.                  | n.s.                                                  | p = 0.056                |
|                     | Fecal corticosterone metabolites                       | corticosterone, week 3 + 7 (pg/well)        | n.s.                  | n.s.                                                  | p = 0.064                |
|                     |                                                        | corticosterone, week 7 - 3 (ng/0.05g feces) | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
| behavioral analysis | Behavioral scoring of aggression-associated parameters | attacks, week 4 - 8                         | *** p < 0.001         | *p = 0.033                                            | **p = 0.002              |
|                     | Nest test                                              | quality, week 5, 24 h scores                | *p = 0.038            | n.s.                                                  | *p = 0.026               |
|                     |                                                        | quality, week 6, 24 h scores                | n.s.                  | n.s.                                                  | *p = 0.026               |
|                     |                                                        | quality, week 3 - 8, 5 h scores             | ***p < 0.001          | *no enrichment: p = 0.049 **enriched cages: p = 0.001 | **ET: p = 0.006 EB: n.s. |
|                     |                                                        | quality, week 3 - 8, 24 h scores            | **p = 0.014           | no enrichment: p = 0.06 enriched cages: p = 0.072     | ET: n.s EB: n.s.         |
|                     | Openfield                                              | all parameters                              | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
|                     | social Novel-Object                                    | fecal boli                                  | n.s.                  | n.s.                                                  | p = 0.068                |
|                     | Dark-Light-Box                                         | all parameters                              | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
|                     | Hotplate                                               | all parameters                              | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |
|                     | Resident-Intruder test                                 | all parameters                              | n.s.                  | n.s.                                                  | n.s.                     |

## 5. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

Die Gruppenhaltung männlicher Mäuse stellt Versuchstierhaltungen vor große Herausforderungen, denn das intraspezifische Aggressionsverhalten ist nicht nur ein Tierschutzproblem, sondern kann auch die Validität und Reproduzierbarkeit der Experimentaldaten beeinflussen.

Verschiedene Lösungsansätze werden derzeit untersucht und diskutiert, jedoch mit mäßigem Erfolg (Weber et al., 2017). Das Einbringen von Nestmaterial ist zum jetzigen Zeitpunkt der einzige bekannte Weg, neben der Haltung von Wurfgeschwistern und einer maximalen Anzahl von drei männlichen Tieren pro Käfig, dieses Verhalten zu reduzieren (Weber et al., 2017). Aus Gründen der Praktikabilität oder aber auch aus Gründen der Versuchsdurchführung können die letzten beiden Maßnahmen jedoch nicht immer realisiert werden. Zudem führen diese Maßnahmen nicht zu der erwünschten Elimination des Verhaltens, sodass nach weiteren Möglichkeiten gesucht wird, diese Aufgabe zu bewältigen.

Die erste Studie, welche das Handling als potentiellen Einflussfaktor auf das Verhalten von Mäusen untersuchte, wurde 2010 von Hurst and West durchgeführt (Hurst and West, 2010). Die Wissenschaftler stellten die Hypothese auf, dass die Stress- und Angstreaktion von Mäusen auf das gebräuchliche Hochheben der Tiere am Schwanz als „normal“ empfunden werden könne. Sie verglichen, um ihre Theorie zu überprüfen, das Standard-Handling von Mäusen, das Greifen der Tiere am Schwanz mit Daumen und Zeigefinger, mit zwei nicht-aversiven Handlingmethoden, dem Cup- und dem Tunnel-Handling. Über neun Tage wurden sowohl männliche als auch weibliche 8 – 10 Wochen alte Tiere der Inzuchtstämme BALB/c und C57BL/6, sowie des Auszuchtstammes ICR (CD-1) täglich für 60 Sekunden mit der jeweils zugeordneten Handlingmethode hochgehoben. Die Mäuse, welche die Tage zuvor mit den nicht-aversiven Methoden gehandelt wurden, zeigten weniger Angstverhalten, sowohl dem Experimentator gegenüber, als auch in dem „Elevated plus maze“-Test. Die Ergebnisse stimmen mit unseren Resultaten der ersten Teilstudie überein. Obwohl nur eine nicht-aversive Handlingmethode untersucht wurde, das Hochheben der Tiere mittels eines Tunnels, schnitten die Tiere, welche mit dieser Methode über acht Wochen hinweg gehandelt wurden, in dem Hell/Dunkel-Box Test, einem Test, um das Ängstlichkeitsverhalten der Tiere zu untersuchen, signifikant besser ab als solche, welche zuvor am Schwanz hochgehoben wurden. Betrachtet man zudem die Ergebnisse des sozialen Neu-Objekt Tests, scheint ferner das Neugier- bzw. Sozialverhalten der mit dem Tunnel gehandelten Tiere ausgeprägter zu sein als deren Angstverhalten. Die mit dem Tunnel gehandelten Mäuseböcke verbrachten signifikant mehr

Zeit mit dem zentral platzierten C3H-Mäusebock als die restlichen Tiere. Auf andere Parameter als das Angstverhalten hatte das Tunnel-Handling jedoch keine weiteren signifikant positiven Effekte. Mehrere Studien folgten der Studie von Hurst und West (Gouveia and Hurst, 2013, Ghosal et al., 2015, Miller and Leach, 2016, Gouveia and Hurst, 2017, Nakamura and Suzuki, 2018) und konnten die Ergebnisse von Hurst und West bestätigen.

Miller und Leach untersuchten außerdem die Auswirkungen von Finger- und Tunnel-Handling auf die Schmerzreaktion von Mäusen, stellten in ihrer Studie jedoch keinen entsprechenden Effekt fest (Miller and Leach, 2016). Die vorliegende Arbeit untersuchte die Schmerzreaktion der unterschiedlich gehandhabten Tiere mittels des Heizplattentests. Ebenfalls unterschied sich das Schmerzverhalten der mit der Standard- und mit der nicht-aversiven Technik hochgenommenen Tiere nicht. Jedoch blieben diejenigen Mäuse, welche mit der Pinzette gehandelt wurden, länger auf der Heizplatte sitzen, als die anderen Mäuseböcke. Diese Beobachtung ist mit dem Phänomen der Stress-induzierten Hypoalgesie erklärbar (Mogil et al., 1996). Diese Erklärung impliziert, dass es zu einer verstärkten Konfrontation der Pinzetten-gehandelten Tiere mit Stress kam.

Obwohl die vorliegenden Ergebnisse der ersten Teilstudie hinsichtlich des Angstverhaltens der Tiere mit dem aktuellen Wissenschaftstand übereinstimmen, hat sich das nicht-aversive Handling im Vergleich zum aversiven Greifen der Tiere mit den Fingern in keinem weiteren von uns untersuchten Parameter als vorteilhaft erwiesen: Weder waren die Tiere weniger aggressiv, noch stress-resistenter.

Leider wurde in bisherigen Studien das Handling bzw. Greifen der Tiere mit einer Pinzette, ein Verfahren, welches aus hygienischen Gründen in IVC-Haltungen oder bei immunsupprimierten Tieren angewendet wird, nicht systematisch untersucht. Die Ergebnisse in der ersten Studie sind unter Betrachtung von aggressionsassoziierten Parametern eindeutig: Das Handling von Mäusen mit einer Pinzette sollte vermieden werden. Die männlichen B6 Mäuse, welche über acht Wochen hinweg mit der Pinzette hochgehoben wurden, zeigten niedrigere Scores im Nestbautest (zur Detektion positiv-emotionaler Parameter), verbissen sich signifikant häufiger nach dem wöchentlichen Käfigwechsel und hatten zudem signifikant höhere Temperaturwerte in der stressinduzierten Hyperthermie nach zweimonatiger Handlerfahrung (Mertens et al., 2019).

Ähnliche Ergebnisse wurden in der zweiten Studie für jene Tiere festgestellt, welche mit der schwarz-opaken kreuzförmigen Anreicherungsstruktur (Kreuz-Enrichment) im Käfig gehalten wurden. Ihre Nestqualität war schlechter, auch sie verbissen sich signifikant häufiger nach dem Käfigwechsel und hatten signifikant höhere stressassoziierte Blutglukosewerte

(stressinduzierte Hyperglykämie) im Vergleich zu den Tieren, welche mit einer transparenten (oder gar keiner) Anreicherungsstruktur im Käfig gehaltenen wurden. Das legt die Vermutung nahe, dass die Transparenz der Anreicherungsstruktur einen Einfluss auf das Verhalten und Stresssensibilität hatte. Nur eine weitere Studie hat den Effekt von käfigunterteilendem Enrichment auf die Aggression männlicher Mäuse bisher untersucht (Tallent et al., 2018) mit einem gegensätzlichen Ergebnis: Die strukturelle Umweltanreicherung führte zu einer signifikanten Verminderung des Aggressionsverhaltens der Tiere. Betrachtet man die unterschiedliche Durchführung der Studien, ergeben sich mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Resultate. Während Tallent et al. BALB/c Mäuse für einen Zeitraum von einer Woche untersuchten, wurden in der vorliegenden Arbeit B6 Mäuseböcke über einen Zeitraum von 10 Wochen studiert. Forschungsergebnisse haben bereits gezeigt, dass Enrichment einen variablen Effekt auf verschiedene Mäusestämme haben (Chapillon et al., 1999, Tsai et al., 2002) und ebenfalls die Dauer der Einbringung in den Käfig das Verhalten der Tiere beeinflussen kann (Leger et al., 2014).

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit, warum das schwarz-opake Enrichment zu einer erhöhten Aggression nach dem Umsetzen der Tiere in einen frisch eingestreuten Käfig führte, liefert das Territorialverhalten der Tiere in der Wildnis. Männliche Mäuse verteidigen ihr Revier gegen andere männliche Mäuse solange, bis ihr Rivale flieht oder es zum Tod einer der beiden Konkurrenten kommt (Crowcroft, 1966). Während beim durchsichtigen Enrichment, in welchem keine Zunahme des aversiven Verhaltens zu beobachten war, der Sichtkontakt stets gegeben ist, ist dies bei der schwarz-opaken Anreicherungsstruktur nicht der Fall. Somit könnte das Fliehen des Subordinaten in ein Kompartiment dazu führen, dass aufgrund des Abreißens des Sichtkontakts der Kampf für das dominante Männchen gewonnen scheint. Sobald der vermeidlich geschlagene Konkurrent jedoch wieder aus dem Kompartiment in das Gesichtsfeld der dominanten Maus tritt, könnte dies zu einer erneuten Attacke durch das dominante Tier führen. Die Vermutung legt also nahe, dass das Territorialverhalten der Tiere durch die uneinsichtige Kompartimentierung des Käfigs erhöht wurde. Unterstützt werden kann diese Vermutung durch die Tatsache, dass es erstmalig nach dem Umsetzen der Tiere in den Käfig mit dem schwarz-opaken Enrichment-Element im Alter von 8 Wochen zum aversiven Verhalten kam. Mäuse zeigen erst mit Beginn der Geschlechtsreife, also im Alter von 6-8 Wochen, territoriales Aggressionsverhalten (Benus et al., 1992). Das dieses sofort in der Haltung mit der schwarz-opaken Anreicherungsstruktur gezeigt wurde, legt nahe, dass hierdurch besonders das Territorialverhalten gefördert wird.

Im Gegensatz zur Studie 1 mit dem unterschiedlichen Handling hat sich in der Studie 2 mit dem Enrichment-Element gezeigt, dass das Aggressionsverhalten kein Resultat von Schmerz ist. Keine signifikanten Unterschiede im Schmerzempfinden der Tiere, welches im Heizplattentest getestet wurde, konnten detektiert werden.

Urinieren und Defäkation sind Messwerte für die Emotionalität, welche mit Stress- oder Angst assoziiert werden (Hurst and West, 2010). Tiere mit schwarz-opakem käfigunterteilendem Enrichment hatten nach dem sozialen Neu-Objekt Test eine höhere Anzahl an Fäzes. Die vermehrte Anzahl an Kotpellets spricht dafür, dass die mit schwarz-opakem Enrichment gehaltenen Tiere auf die Konfrontation mit einem gleichgeschlechtlichen Artgenossen gestresster reagierten als die Tiere, welche in der Kontrollgruppe oder mit der durchsichtigen Anreicherungsstruktur gehalten wurden.

Im RIT attackierten lediglich zwei der insgesamt 18 eingesetzten Tiere den potentiellen Rivalen. Beide wurden in Käfigen mit einem schwarz-opaken Enrichment-Element gehalten. Dies lässt vermuten, dass die schwarz-opake Umweltanreicherung zu einer Förderung der territorialen Aggression beiträgt.

Alle Tiere in der Studie zum kreuzförmigen Enrichment-Element wurden mit der Handlingmethode, die sich in der Handling-Studie (Studie 1) als am wenigsten aggressionsfördernd herausgestellt hat, dem Handling mit Daumen und Zeigefinger, gehandelt. Trotzdem bedeutet diese Manipulation für die Tiere Disstress. Die Akkumulation von zwei negativen Stressoren (aversives Handling und Exposition gegenüber dem schwarz-opaken Enrichment-Element) könnte das schlechte Abschneiden des schwarz-opaken Kreuz-Enrichments erklären.

Um die Vermutung zu bestätigen, dass die schwarz-opake Färbung eine wesentliche Rolle hinsichtlich des Aggressionsverhaltens von männlichen Mäusen spielt, wäre es interessant gewesen, ein opak-farbiges Enrichment (e.g. blau, grün) zu verwenden. Dass unterschiedliche Farben von Enrichment (Tunnel in gelb, rot, durchsichtig, schwarz-opak) einen Einfluss auf physiologische Parameter haben können, wurde u.a. bereits bei männlichen Ratten nachgewiesen (Wren-Dail et al., 2016).

Haltungseffekte sind in der Literatur wesentlich besser untersucht als die von Handling oder käfigunterteilendem Enrichment, liefern jedoch bezogen auf stress-assoziierte Parameter keine einheitlichen Untersuchungsergebnisse (Kappel et al., 2017). Während mehrere Studien darauf verweisen, dass die Individualhaltung von Mäusen Stress verursacht (Van Loo et al., 2001a, Bartolomucci et al., 2003, Capdevila and Kelly, 2016), kommen andere Studien zu gegenteiligen Resultaten – in Gruppen gehaltene Mäuseböcke erfahren mehr Stress (Kamakura

et al., 2016, Weber et al., 2017, Van Loo et al., 2003, Crowcroft, 1966). Ob es von Vorteil ist männliche Mäuse gemeinsam in Gruppen oder alleine zu halten, ist letztlich stark kontextabhängig (Kappel et al., 2017).

In der Studie zu den verschiedenen Handlingvarianten zeigten sich mehrere Unterschiede zwischen einzeln und in Gruppen gehaltenen Tieren. Beispielsweise waren einzeln gehaltene Tiere Handling-unabhängig nach achtwöchiger Haltung signifikant leichter. Stress kann die Nahrungsaufnahme beeinflussen, wobei sowohl eine Gewichtszunahme als auch eine Gewichtsabnahme in der Literatur beschrieben sind (Adam and Epel, 2007, Tamashiro et al., 2007a, Tamashiro et al., 2007b, Ulrich-Lai and Herman, 2009). Eine mögliche Erklärung für den beobachteten Gewichtsunterschied ist, dass Mäuse in der Einzelhaltung eine reduzierte Nahrungsaufnahme haben als in Gruppen gehaltene Tiere (Yamada et al., 2000). Zudem ist denkbar, dass chronischer Stress von einzeln gehaltenen Tieren zum Gewichtsverlust beigetragen hat. Dieser Erklärungsansatz, kann jedoch durch die untersuchten FCM-Werte nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es fanden sich erhöhte FCM-Werte bei den gruppengehaltenen Mäuseböcken. Die Ergebnisse des Nestbautests lassen, in Einklang mit den FCM-Werten, ebenfalls darauf schließen, dass die in Gruppen gehaltenen Tiere mehr gestresst waren als die einzeln gehaltenen. Während beide Haltungen anfänglich ihre Nestbauleistung verbesserten, konnte dies nach 24 h nur noch für einzeln gehaltene Tiere nachgewiesen werden. Wichtig ist jedoch zu erwähnen, dass die Nestkomplexität in gruppengehaltenen Tieren weniger relevant ist als in der Einzelhaltung, da diese Tiere sich über Körperkontakt gegenseitig wärmen können (Gaskill et al., 2009). Der von Gaskill et al. beschriebene Kältestress (Gaskill et al., 2009) könnte also bei den einzeln gehaltenen Tieren für bessere Resultate in der Nestqualität verantwortlich gewesen sein.

Unterschiede in den beiden Haltungen konnten auch im Bewohner-Eindringling Test (RIT) detektiert werden. Einzeln gehaltene Tiere zeigten mehr Angriff- und Aggressionsverhalten gegenüber dem Eindringling. Dies widerspricht früheren Erkenntnissen, welche besagen, dass männliche, in Gruppen gehaltene Tiere den Eindringling weniger wahrscheinlich angreifen (Yang et al., 2017). Eine denkbare Erklärung lässt sich im Aufbau unserer Versuchsdurchführung finden, welche vom Standardprotokoll des RIT abweicht, in welcher der „Resident“ einzeln und der „Intruder“ in Gruppen gehalten wird.

Das Aggressionslevel zwischen den Mäuseböcken war in beiden Studien insgesamt sehr niedrig. Weder Bisswunden noch Anzeichen von Barbering konnten während der wöchentlichen Begutachtung des Fellstatus identifiziert werden. In beiden Versuchen wurden die männlichen Mäuse ab einem Alter von drei Wochen in stabilen Gruppen gehalten. Dies ist

eine bereits bekannte Methode, um aggressives Verhalten zu reduzieren. Zudem wurden die empfohlene Gruppengröße von  $n = 3$  eingehalten und der Transfer von altem Nestmaterial als aggressionsmindernde Maßnahme berücksichtigt (Weber et al., 2017).

Einige Faktoren limitieren die Aussagen der vorliegenden Studien: Die Untersuchung von Handlingmethoden in verschiedenen Haltungen ließen die vorgesehene individuelle Unterbringung der Mäuseböcke vor der Durchführung des RIT, in der Studie 1 nicht zu. Das Standardprotokoll sieht eine Einzelhaltung der Mäuseböcke gemeinsam mit einem sterilisierten Weibchen für mindestens eine Woche vor Beginn des RIT vor, um Territorialverhalten zu etablieren (Koolhaas et al., 2013). Da dies in der ersten Studie nicht möglich war, wurde, um eine bessere Vergleichbarkeit der beiden Studien zu gewährleisten, in der zweiten Studie entsprechend verfahren. Lediglich das Umsetzen der Tiere eine Woche vor Testbeginn in einen frisch eingestreuten Käfig wurde unterlassen, um Territorialverhalten, welches auf Geruchsmarken basiert, zu fördern.

Eine weitere Limitierung der Studie betrifft die Haltung der Interaktionspartner. Diese wurden isoliert, um die Entwicklung einer sozialen Hierarchie zu verhindern und somit eine weitere mögliche Fehlervariable zu eliminieren. Obwohl in der Literatur nicht explizit vorgeschrieben ist, wie der Interaktionspartner vor Testbeginn zu halten ist, könnte die Einzelhaltung der Tiere (im Vergleich zu einer Gruppenhaltung) einen Einfluss auf deren Territorialverhalten gehabt haben.

Schlussfolgern lässt sich, dass sowohl das Handling der Tiere, als auch das eingebrachte Kreuz-Enrichment, das Aggressionsverhalten von männlichen C57BL/6NCrl Mäusen beeinflussen kann. Das Handling der Tiere durch Greifen des Schwanzes mittels einer Pinzette fördert das aggressive Verhalten von Mäuseböcken mehr als das Greifen des Schwanzes mit Daumen und Zeigefinger und das nicht-aversive Handling durch einen Tunnel. Da die Haltungsform (Einzel- oder Gruppenhaltung) einige unserer Testresultate beeinflusst hat, sollte auch dies in der Versuchsplanung berücksichtigt werden, insbesondere wenn schmerz-, stress-, oder verhaltensbedingte Parameter im Rahmen des Experiments untersucht werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Sinja Susanna Mertens (2019):

Einfluss unterschiedlicher Handlingmethoden und eines strukturellen Enrichments auf aggressionsassoziierte Parameter in männlichen C57BL/6NCrl Mäusen

Die Untersuchung von stress- und aggressions-induzierenden Faktoren auf Mäuse ist vornehmlich vor dem Hintergrund ihrer bedeutenden Rolle in der biomedizinischen Forschung von großer Wichtigkeit. Die Labormaus ist mit Abstand das häufigste verwendete Versuchstier, sodass mögliche Stressoren zum einen im Sinne des Tierwohls reduziert werden sollten, zum anderen jedoch auch, um die Variabilität der Daten einzuschränken. Ziel dieser Arbeit war es daher, festzustellen, ob verschiedene Formen des Handlings sowie eine partiell käfigunterteilende Umweltanreicherung (Enrichment) einen Einfluss auf das Aggressionsverhalten männlicher C57BL/6NCrl Mäuse haben. Dazu wurden in einer ersten Studie drei verschiedene Handlingmethoden vergleichend hinsichtlich ihres Effekts auf das Aggressionsverhalten männlicher Mäuse in Einzel- und Gruppenhaltung untersucht. Für diese Fragestellung wurden 72 männliche C57BL/6NCrl Mäuse auf zwei verschiedene Haltungen (Individualhaltung, n = 18; Gruppenhaltung, n = 54) aufgeteilt und viermal wöchentlich über einen Zeitraum von acht Wochen mit drei verschiedenen Handlingmethoden (Daumen-Zeigefinger-Griff, Pinzetten-Griff, Tunnel) hochgehoben. Die Auswirkungen der Handhabung der Tiere wurde innerhalb der ersten acht Wochen wöchentlich anhand unterschiedlicher stressphysiologischer Parameter untersucht: Körpergewichts, Fellstatus, stressinduzierten Hyperthermie, stressinduzierte Hyperglykämie, Verhaltens nach dem Umsetzen in einen neuen Käfig, Nestbautests. Zusätzlich wurden in der dritten sowie siebten Woche die Fäzes der Tiere in einem festgelegten Zeitintervall von maximal 50 min gesammelt und hinsichtlich ihrer Kortikosteronmetabolite analysiert. Anschließend wurden in der 9. – 10. Woche verschiedene Verhaltenstests durchgeführt, wobei die Reihenfolge durch deren Invasivität bestimmt wurde (von wenig zu viel): Offenfeldtest (OFT), sozialer Neu-Objekt-Test (sNOT), Hell/Dunkel-Box Test (HDBT), Heizplattentest (HPT), Bewohner-Eindringling Test (BET). Es zeigte sich, dass das Handling der Mäuseböcke mit der Pinzette im Vergleich zu den beiden anderen Methoden bei den Tieren erhöhtes Aggressionsverhalten auslöst. Diese Tiere verbissen sich nach dem wöchentlichen Käfigwechsel signifikant häufiger, zeigten eine erhöhte Stressreaktion in der stressinduzierten Hyperthermie und eine höhere Latenzzeit im HPT. Des Weiteren waren klare Defizite in der Nestqualität im Nestbautest ersichtlich, welche Rückschlüsse auf ein

vermindertes Wohlbefinden gibt. Übereinstimmend mit aktuellen Studien, erwies sich das Tunnel-Handling als vorteilhaft in Bezug auf das gezeigte Angstverhalten im HDBT. Im sNOT verbrachten die Tiere zudem mehr Zeit bei dem dargebotenen Interaktionspartner, so dass deren Neugier- bzw. Sozialverhalten höher als ihr Angstverhalten scheint. Wider Erwarten bewährte sich der Tunnel jedoch nicht, um das Aggressionsverhalten der Tiere im Vergleich zum Handling durch Greifen des Schwanzes mit Daumen und Zeigefinger zu minimieren. Die über den Experimentalverlauf mit dieser letztgenannten Standardtechnik hochgenommenen Tiere zeigten in allen übrigen stress- und aggressionsassoziierten Parametern vergleichbare Ergebnisse wie diejenigen Mäuseböcke, welche mit den Tunneln hochgenommen wurden. Der positive Effekt der nicht invasiven Methode spiegelte sich somit leider nicht in den Resultaten der aggressionsassoziierten Parameter wider.

Basierend auf den Ergebnissen der Handling Studie wurde in der zweiten Studie das Handling mit Daumen und Zeigefinger angewendet. In dieser Studie wurde das Einbringen einer strukturellen Umweltanreicherung (transparent oder schwarz-opak) mit einem Käfig ohne Enrichment (Kontrolle) in der Gruppenhaltung von Mäuseböcken hinsichtlich deren Aggressionsverhalten untersucht. Dafür wurden 54 Mäuseböcke in Gruppen ( $n = 3$ ) unterteilt und in drei verschiedenen Haltungsbedingungen (1. schwarz-opakes Enrichment; 2. transparentes Enrichment; 3. Kontrollgruppe) über einen Zeitraum von 10 Wochen gehalten. Es wurden die gleichen stressphysiologischen Parameter sowie Verhaltenstests wie im ersten Versuchsteil erhoben. Die Resultate zeigen, dass die schwarz-opake kreuzförmige Umweltanreicherung das Aggressionsverhalten der Tiere fördert: Mäuse, welche mit diesem Enrichment gehalten wurden, hatten höhere stressinduzierte Blutglukosewerte und verbissen sich häufiger nach dem Umsetzen. Zudem legen die Ergebnisse des Nestbautests sowie des sozialen Neu-Objekt-Tests nahe, dass diese Tiere vermehrt emotional gestresst sind. Diejenigen Tiere, die mit einer transparenten kreuzförmigen Umweltanreicherung gehalten wurden, zeigten kein zusätzliches Aversionsverhalten verglichen mit der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich anhand der Ergebnisse der ersten Studie sagen, dass das Handling einen Einfluss auf das Aversionsverhalten von adulten Mäuseböcken haben kann. Pinzetten-Handling förderte das Aggressionsverhalten, wohingegen das Handling durch Greifen des Schwanzes mit Daumen und Zeigefinger oder durch Tunnel-Handling keinen Effekt zu haben schienen. Die Resultate der zweiten Studie legen nahe, dass die Transparenz von käfigunterteilendem Enrichment einen großen Einfluss auf das Aggressionsverhalten der Tiere hat. Schwarz-opakes Enrichment förderte das Aggressionsverhalten, im Vergleich zu der transparenten Anreicherungsstruktur.

## 7. SUMMARY

Sinja Susanna Mertens (2019):

Effect of different forms of handling and structural enrichment on aggression-associated parameters in male C57BL/6NCrl mice

The investigation of stress and aggression inducing factors in mice is of great importance in view of their important role in biomedical research. The laboratory mouse is by far the most frequently used experimental animal, so that potential stressors should be reduced in the interest of animal welfare on the one hand, but also to limit the variability of the data on the other.

The aim of this study was to determine whether different forms of handling, as well as partial cage-dividing environmental enrichment, have an influence on the aggression behavior of male C57BL/6NCrl mice. For this purpose, two consecutive experiments were performed. The handling evaluated in the first part and least aversive for the animals was used as standard handling in the second part of this study.

In the first part of the present study, three different handling methods were compared regarding their effect on the aggression behavior of male mice in two different housing conditions. In addition, it was examined whether housing the animals in groups or individual modulates this behavior. To answer this question, 72 male C57BL/6NCrl mice were divided into two different housing conditions (individual and group housing) upon arrival and lifted four times a week over a period of eight weeks using three different handling methods (hand, forceps, tunnel). The effects of the handling on the animals were investigated during the first eight weeks weekly by using different stress-physiological parameters: Body weight, fur status, stress-induced hyperthermia, stress-induced hyperglycaemia, behavior after transfer to a new cage, and nest building test. In addition, in the third and seventh week, the faeces of the animals were collected in a fixed time interval (maximum 50 min) and analyzed for corticosterone metabolites. Subsequently, various behavioral tests were performed in the 9 - 10th week, the order of which was determined by their invasiveness (little too much): open field test (OFT), social novel object test (sNOT), dark/light box test (DLBT), heating plate test (HPT), resident intruder test (RIT).

It was found that the handling of the male mice with forceps caused increased aggressive behavior in the animals compared to the two other methods. These animals bit significantly more frequently after the weekly cage change, showed an increased stress response in the stress-

induced hyperthermia and a higher latency time in the HPT. Additionally, clear deficits in nest quality were evident in the nest building test, which indicates reduced well-being.

In accordance with current studies, tunnel handling proved to be advantageous regarding anxiety-like behavior tested in the DLBT. Furthermore, the animals spent more time with the presented interaction partner in the sNOT, so that their curiosity or social behavior seems to be greater than their anxiety behavior. Contrary to expectations, the tunnel did not prove to be successful in minimizing the aggression behavior of the animals compared to hand handling. The animals lifted by hand during the course of the experiment showed comparable results in all other stress- and aggression-associated parameters as the mice lifted with the tunnels. Unfortunately, the positive effect of the non-invasive method was only seen for anxiety-like behavior and not reflected in the results of the aggression-associated parameters.

Based on the results of the handling study, hand handling was applied in the second part of the experiment, in which the introduction of a structural environmental enrichment (transparent or opaque) was compared with a cage without enrichment (control) in group-housed male mouse with regard to their aggression behavior. For this purpose, 54 male mice were divided into groups ( $n = 3$ ) and kept in three different housing conditions (1. opaque enrichment; 2. transparent enrichment; 3. control group) over a period of 10 weeks. The same stress-physiological parameters and behavioral tests as in the first part of the experiment were used. The results showed that the opaque cross-shaped environmental enrichment promotes the aggression behavior of the animals: Mice kept with this enrichment had higher stress-induced blood glucose levels and were more likely to bite after being transferred into clean cages. In addition, the results of the nest building test and the sNOT suggest that these animals are more emotionally stressed.

However, those animals that were kept with a transparent environmental enrichment showed no additional aversion behavior compared to the control group.

In summary, the results of the first part suggest that handling may have an influence on the aversion behavior of adult male mice. Forceps-handling promoted aggression whereas tunnel- and hand-handling seemed to have no effect. The results of the second part of the experiment suggest that the transparency of cage-dividing enrichment has a large influence on the aggression behavior of the animals. Opaque enrichment promoted aggression behavior compared to the transparent enrichment.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAM, T. C. & EPEL, E. S. 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiol Behav*, 91, 449-58.
- AMBROSE, N. & MORTON, D. B. 2000. The use of cage enrichment to reduce male mouse aggression. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 3, 117-125.
- AUGUSTSSON, H., VAN DE WEERD, H. A., KRUITWAGEN, C. L. & BAUMANS, V. J. L. A. 2003. Effect of enrichment on variation and results in the light/dark test. 37, 328-340.
- BALCOMBE, J. P., BARNARD, N. D. & SANDUSKY, C. 2004. Laboratory routines cause animal stress. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43, 42-51.
- BARNARD, C. J., BEHNKE, J. M. & SEWELL, J. 1996. Environmental enrichment, immunocompetence, and resistance to *Babesia microti* in male mice. *Physiol Behav*, 60, 1223-31.
- BARTOLOMUCCI, A., PALANZA, P., SACERDOTE, P., CERESINI, G., CHIRIELEISON, A., PANERAI, A. E. & PARMIGIANI, S. 2003. Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 28, 540-58.
- BATTEY, J., JORDAN, E., COX, D. & DOVE, W. J. N. G. 1999. An action plan for mouse genomics. 21, 73.
- BAUMANS, V. 2000. Environmental enrichment: a right of rodents! Progress in the reduction, refinement and replacement of animal experimentation. Amsterdam: Elsevier.
- BAUMANS, V., VAN LOO, P. & PHAM, T. J. S. J. O. L. A. S. 2010. Standardisation of environmental enrichment for laboratory mice and rats: Utilisation, practicality and variation in experimental results. 37, 101-114.
- BAYNE, K. 2005. Potential for Unintended Consequences of Environmental Enrichment for Laboratory Animals and Research Results. *ILAR journal*, 46, 129-139.
- BAYNE, K. J. A. M. & MEDICINE, E. 2018. Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives. 1, 82-90.
- BECKER, J. B., ARNOLD, A. P., BERKLEY, K. J., BLAUSTEIN, J. D., ECKEL, L. A., HAMPSON, E., HERMAN, J. P., MARTS, S., SADEE, W. & STEINER, M. 2005. Strategies and methods for research on sex differences in brain and behavior. *Endocrinology*, 146, 1650-1673.
- BEERY, A. K. & ZUCKER, I. 2011a. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, 565-572.
- BEERY, A. K. & ZUCKER, I. 2011b. Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev*, 35, 565-72.
- BEERY, A. K., ZUCKER, I. J. N. & REVIEWS, B. 2011. Sex bias in neuroscience and biomedical research. 35, 565-572.
- BELZ, E. E., KENNEL, J. S., CZAMBEL, R. K., RUBIN, R. T. & RHODES, M. E. 2003. Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76, 481-486.
- BENEDETTI, F., FRESI, F., MACCIONI, P. & SMERALDI, E. 2008. Behavioural sensitization to repeated sleep deprivation in a mice model of mania. *Behavioural brain research*, 187, 221-227.
- BENEFIEL, A. C., DONG, W. K. & GREENOUGH, W. T. 2005. Mandatory "enriched" housing of laboratory animals: the need for evidence-based evaluation. *ILAR J*, 46, 95-105.
- BENUS, R. F., KOOLHAAS, J. M. & VAN OORTMERSSEN, G. A. 1992. Individual strategies of aggressive and non-aggressive male mice in encounters with trained aggressive residents. *Animal Behaviour*, 43, 531-540.

- BERGMANN, P., MILITZER, K. & BÜTTNER, D. 1995. Environmental enrichment and aggressive behaviour: influence on body weight and body fat in male inbred HLG mice. *Journal of Experimental Animal Science (Germany)*.
- BERKLEY, K. J. 1992. Vive la difference. *Trends Neurosci*, 15, 331-332.
- BMEL 2017. Verwendung von Versuchstieren im Jahr 2017. [https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/texte/TierschutzTierforschung.html;jsessionid=1227F577CEE36607B7693997088ED84E.2\\_cid385?docId=11850874](https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/texte/TierschutzTierforschung.html;jsessionid=1227F577CEE36607B7693997088ED84E.2_cid385?docId=11850874).
- BROWN, R. Z. J. E. M. 1953. Social behavior, reproduction, and population changes in the house mouse (*Mus musculus* L.). 23, 217-240.
- BUTLER, R. K. & FINN, D. P. J. P. I. N. 2009. Stress-induced analgesia. 88, 184-202.
- CAPDEVILA, S. & KELLY, H. J. A. M. A., NH, USA 2016. No one likes to live alone: Social housing of lab animals.
- CAROLA, V., D'OLIMPIO, F., BRUNAMONTI, E., MANGIA, F. & RENZI, P. 2002. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behav Brain Res*, 134, 49-57.
- CHAPILLON, P., MANNECHE, C., BELZUNG, C. & CASTON, J. 1999. Rearing environmental enrichment in two inbred strains of mice: 1. Effects on emotional reactivity. *Behav Genet*, 29, 41-6.
- CHOURBAJI, S., BRANDWEIN, C., VOGT, M. A., DORMANN, C., HELLWEG, R. & GASS, P. 2008a. Nature vs. nurture: can enrichment rescue the behavioural phenotype of BDNF heterozygous mice? *Behav Brain Res*, 192, 254-8.
- CHOURBAJI, S., CHOURBAJI, S., BRANDWEIN, C., CHOURBAJI, S., BRANDWEIN, C., VOGT, M. A., DORMANN, C. & GASS, P. 2008b. Evaluation of effects of previous exposure to an acute stressor before testing for depression-like behaviours in mice. *Stress*, 11, 170-175.
- CHOURBAJI, S., ZACHER, C., SANCHIS-SEGURA, C., SPANAGEL, R. & 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*, 164, 100-6.
- CHRISTAKIS, D. A., RAMIREZ, J. S. & RAMIREZ, J. M. 2012. Overstimulation of newborn mice leads to behavioral differences and deficits in cognitive performance. *Sci Rep*, 2, 546.
- CLOSE, R. J. A. M. 2005. Introduced Mammals of the World: Their History, Distribution and Influence. John Long. A Review by Robert L Close. 27, 109-110.
- COUNCIL, N. R. 1992. *Recognition and alleviation of pain and distress in laboratory animals*, National Academies Press.
- CROWCROFT, P. 1966. Mice all over.
- CROWCROFT, P. & ROWE, F. Social organization and territorial behaviour in the. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 1963. Wiley Online Library, 517-531.
- DE KLOET, E. R., JOËLS, M. & HOLSBOER, F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews neuroscience*, 6, 463.
- DEACON, R. M. 2006a. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*, 1, 1117-9.
- DEACON, R. M. 2006b. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nature protocols*, 1, 936.
- DOMANSKYI, A., GEISLER, C., VINNIKOV, I. A., ALTER, H., SCHÖBER, A., VOGT, M. A., GASS, P., PARLATO, R. & SCHUTZ, G. 2011. Pten ablation in adult dopaminergic neurons is neuroprotective in Parkinson's disease models. *FASEB J*, 25, 2898-910.
- FLURKEY, K. & CURRER, J. M. 2009. *The Jackson Laboratory handbook on genetically standardized mice*, Jackson Laboratory.

- FRITZ, A. K., AMREIN, I. & WOLFER, D. P. Similar reliability and equivalent performance of female and male mice in the open field and water-maze place navigation task. *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics*, 2017. Wiley Online Library, 380-391.
- FROBERG-FEJKO, K. M. 2010. Benefits of providing nesting material as a form of environmental enrichment for mice. *Lab Anim (NY)*, 39, 326-7.
- GÄRTNER, K. 1999. Cage enrichment occasionally increases deviation of quantitative traits. *Animals research and welfare: Partnership*, 207.
- GASKILL, B. N., GORDON, C. J., PAJOR, E. A., LUCAS, J. R., DAVIS, J. K. & GARNER, J. P. J. P. O. 2012. Heat or insulation: behavioral titration of mouse preference for warmth or access to a nest. 7, e32799.
- GASKILL, B. N., KARAS, A. Z., GARNER, J. P. & PRITCHETT-CORNING, K. R. J. J. 2013. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. e51012.
- GASKILL, B. N., ROHR, S. A., PAJOR, E. A., LUCAS, J. R. & GARNER, J. P. J. A. A. B. S. 2009. Some like it hot: mouse temperature preferences in laboratory housing. 116, 279-285.
- GASKILL, B. N., STOTTLER, A., PRITCHETT-CORNING, K. R., WONG, L. K., GERONIMO, J. & GARNER, J. P. J. A. A. B. S. 2016. He□s getting under my skin! Comparing the sensitivity and specificity of dermal vs subcuticular lesions as a measure of aggression in mice. 183, 77-85.
- GASKILL, B. N., STOTTLER, A. M., GARNER, J. P., WINNICKER, C. W., MULDER, G. B. & PRITCHETT-CORNING, K. R. 2017. The effect of early life experience, environment, and genetic factors on spontaneous home-cage aggression-related wounding in male C57BL/6 mice. *Lab Anim (NY)*, 46, 176-184.
- GEERSE, G.-J., VAN GURP, L. C., WIEGANT, V. M. & STAM, R. J. B. B. R. 2006. Individual reactivity to the open-field predicts the expression of cardiovascular and behavioural sensitisation to novel stress. 175, 9-17.
- GHALAMI, J., ZARDOOZ, H., ROSTAMKHANI, F., FARROKHI, B. & HEDAYATI, M. 2013. Glucose-stimulated insulin secretion: Effects of high-fat diet and acute stress. *Journal of endocrinological investigation*, 36, 835-842.
- GHOSAL, S., NUNLEY, A., MAHBOD, P., LEWIS, A. G., SMITH, E. P., TONG, J., D'ALESSIO, D. A. & HERMAN, J. P. 2015. Mouse handling limits the impact of stress on metabolic endpoints. *Physiol Behav*, 150, 31-7.
- GOSLING, L. M., ROBERTS, S. C., THORNTON, E., ANDREW, M. J. B. E. & SOCIOBIOLOGY 2000. Life history costs of olfactory status signalling in mice. 48, 328-332.
- GOUVEIA, K. & HURST, J. L. 2013. Reducing mouse anxiety during handling: effect of experience with handling tunnels. *PLoS One*, 8, e66401.
- GOUVEIA, K. & HURST, J. L. 2017. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Sci Rep*, 7, 44999.
- GRAY, S. & HURST, J. L. 1995. The effects of cage cleaning on aggression within groups of male laboratory mice. *Animal behaviour*, 49, 821-826.
- GRAY, S. J., JENSEN, S. P. & HURST, J. L. 2002. Effects of resource distribution on activity and territory defence in house mice, *Mus domesticus*. *Animal Behaviour*, 63, 531-539.
- GREEN, E. L. 1966. Biology of the laboratory mouse.
- GREENBLATT, D. J., HARMATZ, J. S., VON MOLTKE, L. L., WRIGHT, C. E., DUROL, A. L. B., HARREL-JOSEPH, L. M. & SHADER, R. I. 2000. Comparative kinetics and response to the benzodiazepine agonists triazolam and zolpidem: evaluation of sex-dependent differences. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293, 435-443.

- GV-SOLAS. 2013. *Stellungnahme zur Einzelhaltung von Mäusen zu Versuchszwecken* [Online]. <http://www.gv-solas.de/index.php?id=35>. [Accessed].
- GV-SOLAS. 2014. *Tiergerechte Haltung von Labormäusen* [Online]. <http://www.gv-solas.de/index.php?id=35>. [Accessed].
- HAEMISCH, A. & GARTNER, K. 1994. The cage design affects intermale aggression in small groups of male laboratory mice: strain specific consequences on social organization, and endocrine activations in two inbred strains (DBA/2J and CBA/J). *J Exp Anim Sci*, 36, 101-16.
- HAEMISCH, A. & GARTNER, K. 1997. Effects of cage enrichment on territorial aggression and stress physiology in male laboratory mice. *Acta Physiol Scand Suppl*, 640, 73-6.
- HAEMISCH, A., VOSS, T. & GARTNER, K. 1994. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiol Behav*, 56, 1041-8.
- HALL, C. & BALLACHEY, E. L. J. U. O. C. P. I. P. 1932. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology.
- HENDERSON, N. D. 1976. Short exposures to enriched environments can increase genetic variability of behavior in mice. *Dev Psychobiol*, 9, 549-53.
- HESS, S. E., ROHR, S., DUFOUR, B. D., GASKILL, B. N., PAJOR, E. A. & GARNER, J. P. J. J. O. T. A. A. F. L. A. S. 2008. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. 47, 25-31.
- HOWERTON, C. L., GARNER, J. P. & 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. *Applied Animal Behaviour Science*, 115, 90-103.
- HUGHES, R. N. 2007. Sex does matter: comments on the prevalence of male-only investigations of drug effects on rodent behaviour. *Behavioural pharmacology*, 18, 583-589.
- HUMPHRIES, R., ROBERTSON, D., BEYNON, R. & HURST, J. J. A. B. 1999. Unravelling the chemical basis of competitive scent marking in house mice. 58, 1177-1190.
- HURST, J. L., FANG, J. & BARNARD, C. J. A. B. 1993. The role of substrate odours in maintaining social tolerance between male house mice, *Mus musculus domesticus*. 45, 997-1006.
- HURST, J. L. & WEST, R. S. 2010. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods*, 7, 825-6.
- HUTCHINSON, E., AVERY, A. & VANDEWOUDE, S. 2005. Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J*, 46, 148-61.
- HYLANDER, B. L. & REPASKY, E. A. J. T. I. C. 2016. Thermoneutrality, mice, and cancer: a heated opinion. 2, 166-175.
- JIRKOF, P. 2014. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *Journal of neuroscience methods*, 234, 139-146.
- JOSEPH GARNER, B. G., CATHLEEN RODDA, CATHLEEN RODDA, ARIA PRATER, JON KLEIN, HANNO WÜRBEL, GEORGIA MASON, ANNA OLSSON, ELIN WEBER, JEROME GERONIMO. 2018. *Mouse Ethogram* [Online]. Available: [mousebehavior.org/ethogram](http://mousebehavior.org/ethogram) [Accessed].
- KALISTE, E. K., MERING, S. M. & HUUSKONEN, H. K. J. C. M. 2006. Environmental modification and agonistic behavior in NIH/S male mice: nesting material enhances fighting but shelters prevent it. 56, 202-208.
- KALUEFF, A., MINASYAN, A., KEISALA, T., SHAH, Z. & TUOHIMAA, P. J. B. P. 2006. Hair barbering in mice: implications for neurobehavioural research. 71, 8-15.

- KAMAKURA, R., KOVALAINEN, M., LEPPALUOTO, J., HERZIG, K. H. & MAKELA, K. A. 2016. The effects of group and single housing and automated animal monitoring on urinary corticosterone levels in male C57BL/6 mice. *Physiol Rep*, 4.
- KAPPEL, S., HAWKINS, P. & MENDEL, M. T. 2017. To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice. *Animals (Basel)*, 7.
- KARP, N. A., MASON, J., BEAUDET, A. L., BENJAMINI, Y., BOWER, L., BRAUN, R. E., BROWN, S. D., CHESLER, E. J., DICKINSON, M. E. & FLENNIKEN, A. M. 2017. Prevalence of sexual dimorphism in mammalian phenotypic traits. *Nature communications*, 8, 15475.
- KIKUSUI, T., TAKEUCHI, Y., MORI, Y. J. P. & BEHAVIOR 2004. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. 81, 37-42.
- KINGSTON, S. G. & HOFFMAN-GOETZ, L. 1996. Effect of environmental enrichment and housing density on immune system reactivity to acute exercise stress. *Physiol Behav*, 60, 145-50.
- KLIDE, A. M. J. T. V. C. O. N. A. S. A. P. 1992. Anesthetic depth: the undefinable. 22, 435-437.
- KOOLHAAS, J. M., COPPENS, C. M., DE BOER, S. F., BUWALDA, B., MEERLO, P. & TIMMERMANS, P. J. J. J. 2013. The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. e4367.
- KOVALENKO, I. L., GALYAMINA, A. G., SMAGIN, D. A., MICHURINA, T. V., KUDRYAVTSEVA, N. N. & ENIKOLOPOV, G. 2014. Extended effect of chronic social defeat stress in childhood on behaviors in adulthood. *PloS one*, 9, e91762.
- KUDRYAVTSEVA, N. N., BONDAR, N. P. & AVGUSTINOVICH, D. F. 2002. Association between experience of aggression and anxiety in male mice. *Behavioural brain research*, 133, 83-93.
- LATHAM, N. & MASON, G. 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science*, 86, 261-289.
- LEGER, M., PAIZANIS, E., DZAHINI, K., QUIEDEVILLE, A., BOUET, V., CASSEL, J.-C., FRERET, T., SCHUMANN-BARD, P. & BOULOULARD, M. 2014. Environmental enrichment duration differentially affects behavior and neuroplasticity in adult mice. *Cerebral cortex*, 25, 4048-4061.
- LERCH, S., BRANDWEIN, C., DORMANN, C., GASS, P. & CHOURBAJI, S. 2015. Bred to breed?! Implications of continuous mating on the emotional status of mouse offspring. *Behav Brain Res*, 279, 155-65.
- LEWEJOHANN, L., ZIPSER, B. & SACHSER, N. 2011. "Personality" in laboratory mice used for biomedical research: a way of understanding variability? *Dev Psychobiol*, 53, 624-30.
- LIPKIND, D., SAKOV, A., KAFKAFI, N., ELMER, G. I., BENJAMINI, Y. & GOLANI, I. J. J. O. A. P. 2004. New replicable anxiety-related measures of wall vs. center behavior of mice in the open field. 97, 347-359.
- LISTER, R. G. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacology & therapeutics*, 46, 321-340.
- LISTER, R. G. J. P. & THERAPEUTICS 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. 46, 321-340.
- MACDONALD, D. 2004. *Die große Enzyklopädie der Säugetiere*, Königswinter.
- MACKINTOSH, J. J. A. B. 1970. Territory formation by laboratory mice. 18, 177-183.
- MACKINTOSH, J. J. A. B. 1973. Factors affecting the recognition of territory boundaries by mice (*Mus musculus*). 21, 464-470.
- MAEHLER, M., BERARD, M., FEINSTEIN, R., GALLAGHER, A., ILLGEN-WILCKE, B., PRITCHETT-CORNING, K. & RASPA, M. J. L. A. 2015. FELASA recommendations for the health

- monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units (vol 48, pg 178, 2014). 49, 88-88.
- MAIER, S. F. 2001. Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biological psychiatry*, 49, 763-773.
- MANEY, D. L. 2016. Perils and pitfalls of reporting sex differences. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371, 20150119.
- MARASHI, V., BARNEKOW, A., OSSENDORF, E. & SACHSER, N. 2003. Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav*, 43, 281-92.
- MARQUEZ, C., POIRIER, G. L., CORDERO, M. I., LARSEN, M. H., GRONER, A., MARQUIS, J., MAGISTRETTI, P. J., TRONO, D. & SANDI, C. 2013. Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl Psychiatry*, 3, e216.
- MARTÍNEZ-CUÉ, C., BAAMONDE, C., LUMBRERAS, M., PAZ, J., DAVISSON, M. T., SCHMIDT, C., DIERSSEN, M. & FLÓREZ, J. 2002. Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behavioural brain research*, 134, 185-200.
- MATSUMOTO, K., PINNA, G., PUJA, G., GUIDOTTI, A. & COSTA, E. 2005. Social isolation stress-induced aggression in mice: a model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*, 8, 85-93.
- MCGREGOR, P. K. & AYLING, S. J. 1990. Varied cages result in more aggression in male CFLP mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 26, 277-281.
- MCILWAIN, K. L., MERRIWEATHER, M. Y., YUVA-PAYLOR, L. A. & PAYLOR, R. 2001. The use of behavioral test batteries: effects of training history. *Physiology & behavior*, 73, 705-717.
- MEIJER, M. K., SOMMER, R., SPRUIJT, B. M., VAN ZUTPHEN, L. F. & BAUMANS, V. 2007. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim*, 41, 161-73.
- MEIJER, M. K., SPRUIJT, B. M., VAN ZUTPHEN, L. F. & BAUMANS, V. 2006. Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Lab Anim*, 40, 382-91.
- MERTENS, S., VOGT, M. A., GASS, P., PALME, R., HIEBL, B. & CHOURBAJI, S. J. P. O. 2019. Effect of three different forms of handling on the variation of aggression-associated parameters in individually and group-housed male C57BL/6NCrl mice. 14, e0215367.
- MILLER, A. L. & LEACH, M. C. 2016. The effect of handling method on the mouse grimace scale in two strains of laboratory mice. *Lab Anim*, 50, 305-7.
- MOGIL, J. S. & CHANDA, M. L. 2005. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain*, 117, 1-5.
- MOGIL, J. S., STERNBERG, W. F., BALIAN, H., LIEBESKIND, J. C., SADOWSKI, B. J. P. & BEHAVIOR 1996. Opioid and nonopioid swim stress-induced analgesia: a parametric analysis in mice. 59, 123-132.
- NAKAMURA, Y. & SUZUKI, K. 2018. Tunnel use facilitates handling of ICR mice and decreases experimental variation. *J Vet Med Sci*, 80, 886-892.
- NEVISON, C., HURST, J. & BARNARD, C. 1999. Strain-specific effects of cage enrichment in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Animal Welfare*, 8, 361-379.
- NEWBERRY, R. C. 1995. Environmental enrichment: increasing the biological relevance of captive environments. *Applied Animal Behaviour Science*, 44, 229-243.

- OLSSON, I. A. & DAHLBORN, K. 2002. Improving housing conditions for laboratory mice: a review of "environmental enrichment". *Lab Anim*, 36, 243-70.
- PALME, R., RETTENBACHER, S., TOUMA, C., EL-BAHR, S. M. & MOSTL, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci*, 1040, 162-71.
- PALME, R., TOUMA, C., ARIAS, N., DOMINCHIN, M. F. & LEPSCHY, M. 2013. Steroid extraction: get the best out of faecal samples. *Wien Tierarztl Monatsschr*, 100, 238-46.
- PHAM, T. M., HAGMAN, B., CODITA, A., VAN LOO, P. L., STROMMER, L. & BAUMANS, V. 2010. Housing environment influences the need for pain relief during post-operative recovery in mice. *Physiol Behav*, 99, 663-8.
- POOLE, T. J. U. H. O. T. C., POOLE, M. O. L. A. E. B. T. B. & EDITORIAL ASSISTANT, R. R. 1987. Raising and defining laboratory animals.
- PRENDERGAST, B. J., ONISHI, K. G. & ZUCKER, I. 2014. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 40, 1-5.
- PRUT, L. & BELZUNG, C. J. E. J. O. P. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. 463, 3-33.
- RASMUSSEN, S., MILLER, M. M., FILIPSKI, S. B. & TOLWANI, R. J. J. O. T. A. A. F. L. A. S. 2011. Cage change influences serum corticosterone and anxiety-like behaviors in the mouse. 50, 479-483.
- RODENTS, F. W. G. O. R. O. G. F. H. M. O., RABBITS, MAHLER CONVENOR, M., BERARD, M., FEINSTEIN, R., GALLAGHER, A., ILLGEN-WILCKE, B., PRITCHETT-CORNING, K. & RASPA, M. 2014. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim*, 48, 178-192.
- ROWE, F. & REDFERN, R. J. A. O. A. B. 1969. Aggressive behaviour in related and unrelated wild house mice (*Mus musculus* L.). 64, 425-431.
- RÜLICHE, T. 2001. *Transgene, Transgenese, transgene Tiere: Methoden der nichthomologen DNA-Rekombination*, Karger Medical and Scientific Publishers.
- RUSSELL, W. M. S., BURCH, R. L. & HUME, C. W. 1959. *The principles of humane experimental technique*, Methuen London.
- SHERWIN, C. & GLEN, E. 2003. Cage colour preferences and effects of home cage colour on anxiety in laboratory mice. *Animal behaviour*, 66, 1085-1092.
- SHERWIN, C. J. A. W. 2004. The influences of standard laboratory cages on rodents and the validity of research data. 13, 9-15.
- SINGEWALD, G., NGUYEN, N., NEUMANN, I., SINGEWALD, N. & REBER, S. J. S. 2009. Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. 12, 58-69.
- SORGE, R. E., MAPPLEBECK, J. C., ROSEN, S., BEGGS, S., TAVES, S., ALEXANDER, J. K., MARTIN, L. J., AUSTIN, J.-S., SOTOCINAL, S. G. & CHEN, D. 2015. Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nature neuroscience*, 18, 1081.
- SORGE, R. E., MARTIN, L. J., ISBESTER, K. A., SOTOCINAL, S. G., ROSEN, S., TUTTLE, A. H., WIESKOPF, J. S., ACLAND, E. L., DOKOVA, A., KADOURA, B., LEGER, P., MAPPLEBECK, J. C., MCPHAIL, M., DELANEY, A., WIGERBLAD, G., SCHUMANN, A. P., QUINN, T., FRASNELLI, J., SVENSSON, C. I., STERNBERG, W. F. & MOGIL, J. S. 2014. Olfactory exposure to males, including men, causes stress and related analgesia in rodents. *Nat Methods*, 11, 629-32.

- STURM, M. 2014. *Der Einfluss chronischer Corticosteron-Applikation auf Depressions-assoziiertes Verhalten und die Expression Depressions-relevanter hippocampaler Gene bei C57BL/6 J und N Mäusen*. Universitäts-und Landesbibliothek Bonn.
- TALLENT, B. R., LAW, L. M., ROWE, R. K. & LIFSHITZ, J. 2018. Partial cage division significantly reduces aggressive behavior in male laboratory mice. *Lab Anim*, 23677217753464.
- TAMASHIRO, K. L., HEGEMAN, M. A., NGUYEN, M. M., MELHORN, S. J., MA, L. Y., WOODS, S. C. & SAKAI, R. R. 2007a. Dynamic body weight and body composition changes in response to subordination stress. *Physiol Behav*, 91, 440-8.
- TAMASHIRO, K. L., NGUYEN, M. M., OSTRANDER, M. M., GARDNER, S. R., MA, L. Y., WOODS, S. C. & SAKAI, R. R. 2007b. Social stress and recovery: implications for body weight and body composition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293, R1864-74.
- TOUMA, C., PALME, R. & SACHSER, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav*, 45, 10-22.
- TOUMA, C. & PALME, R. J. A. O. T. N. Y. A. O. S. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. 1046, 54-74.
- TOUMA, C., SACHSER, N., MOSTL, E. & PALME, R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol*, 130, 267-78.
- TSAI, P.-P., STELZER, H. D., SCHRAEPLER, A. & HACKBARTH, H. 2006. Importance and effects of enrichment on physiology, behaviour and breeding performance in mice. *Altex*, 23, 96-98.
- TSAI, P. P., PACHOWSKY, U., STELZER, H. D. & 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, 411-9.
- TSAI, P. P., STELZER, H. D., HEDRICH, H. J. & HACKBARTH, H. 2003. Are the effects of different enrichment designs on the physiology and behaviour of DBA/2 mice consistent? *Lab Anim*, 37, 314-27.
- ULRICH-LAI, Y. M. & HERMAN, J. P. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10, 397-409.
- VAN DE WEERD, H., BAUMANS, V., KOOLHAAS, J. & VAN ZUTPHEN, L. 1994. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse. *Journal of experimental animal science*, 36, 117-117.
- VAN DE WEERD, H. A., AARSEN, E. L., MULDER, A., KRUITWAGEN, C. L., HENDRIKSEN, C. F. & BAUMANS, V. J. J. O. A. A. W. S. 2002. Effects of environmental enrichment for mice: variation in experimental results. 5, 87-109.
- VAN DE WEERD, H. A., VAN LOO, P. L. & BAUMANS, V. 2004. Environmental enrichment: room for reduction? *Altern Lab Anim*, 32 Suppl 2, 69-71.
- VAN DE WEERD, H. A., VAN LOO, P. L., VAN ZUTPHEN, L. F., KOOLHAAS, J. M. & BAUMANS, V. 1997a. Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiol Behav*, 62, 1019-28.
- VAN DE WEERD, H. A., VAN LOO, P. L., VAN ZUTPHEN, L. F., KOOLHAAS, J. M. & BAUMANS, V. 1997b. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice. *Lab Anim*, 31, 133-43.
- VAN DER HEYDEN, J. A., ZETHOF, T. J. & OLIVIER, B. 1997. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav*, 62, 463-70.
- VAN DER KOOIJ, M. A., JENE, T., TRECCANI, G., MIEDERER, I., HASCH, A., VOELXEN, N., WALENTA, S. & MÜLLER, M. B. J. P. O. T. N. A. O. S. 2018. Chronic social stress-induced

- hyperglycemia in mice couples individual stress susceptibility to impaired spatial memory. 115, E10187-E10196.
- VAN DER MEER, E., VAN LOO, P. L. & BAUMANS, V. 2004. Short-term effects of a disturbed light-dark cycle and environmental enrichment on aggression and stress-related parameters in male mice. *Lab Anim*, 38, 376-83.
- VAN LOO, P., KRUITWAGEN, C., KOOLHAAS, J., VAN DE WEERD, H., VAN ZUTPHEN, L. & BAUMANS, V. 2002. Influence of cage enrichment on aggressive behaviour and physiological parameters in male mice. *Applied Animal Behaviour Science*, 76, 65-81.
- VAN LOO, P., KRUITWAGEN, C., VAN ZUTPHEN, L., KOOLHAAS, J. & BAUMANS, V. 2000. Modulation of aggression in male mice: influence of cage cleaning regime and scent marks. *Animal Welfare*, 9, 281-295.
- VAN LOO, P. L., DE GROOT, A. C., VAN ZUTPHEN, B. F. & BAUMANS, V. 2001a. Do male mice prefer or avoid each other's company? Influence of hierarchy, kinship, and familiarity. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 4, 91-103.
- VAN LOO, P. L., KUIN, N., SOMMER, R., AVSAROGLU, H., PHAM, T. & BAUMANS, V. J. L. A. 2007. Impact of 'living apart together' on postoperative recovery of mice compared with social and individual housing. 41, 441-455.
- VAN LOO, P. L., MOL, J. A., KOOLHAAS, J. M., VAN ZUTPHEN, B. F. & BAUMANS, V. 2001b. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiol Behav*, 72, 675-83.
- VAN LOO, P. L., VAN DE WEERD, H. A., VAN ZUTPHEN, L. F. & BAUMANS, V. 2004. Preference for social contact versus environmental enrichment in male laboratory mice. *Lab Anim*, 38, 178-88.
- VAN LOO, P. L., VAN ZUTPHEN, L. F. & BAUMANS, V. 2003. Male management: Coping with aggression problems in male laboratory mice. *Lab Anim*, 37, 300-13.
- VAN ZEGEREN, K. 1980. Variation in aggressiveness and the regulation of numbers in house mouse populations.
- VANDENBERGH, J. G. J. I. J. 2000. Use of house mice in biomedical research. 41, 133-135.
- VEENEMA, A. H. 2009. Early life stress, the development of aggression and neuroendocrine and neurobiological correlates: what can we learn from animal models? *Frontiers in neuroendocrinology*, 30, 497-518.
- VESTAL, B. M. & SCHNELL, G. D. 1986. Influence of environmental complexity and space on social interactions of mice (*Mus musculus* and *Peromyscus leucopus*). *Journal of Comparative Psychology*, 100, 143.
- WALD, C. & WU, C. 2010. Of mice and women: the bias in animal models. American Association for the Advancement of Science.
- WEBER, E. M., DALLAIRE, J. A., GASKILL, B. N., PRITCHETT-CORNING, K. R. & GARNER, J. P. 2017. Aggression in group-housed laboratory mice: why can't we solve the problem? *Lab Anim (NY)*, 46, 157-161.
- WIEPKEMA, P. & KOOLHAAS, J. 1993. Stress and animal welfare. *Animal welfare*, 2, 195-218.
- WOLFER, D., LITVIN, O., MORF, S., NITSCH, R., LIPP, H. & WURBEL, H. 2004. Cage enrichment and mouse behaviour-Test responses by laboratory mice are unperturbed by more entertaining housing. NATURE PUBLISHING GROUP MACMILLAN BUILDING, 4 CRINAN ST, LONDON N1 9XW, ENGLAND.
- WOLFF, R. J. 1985. Mating behaviour and female choice: their relation to social structure in wild caught House mice (*Mus musculus*) housed in a semi-natural environment. *Journal of Zoology*, 207, 43-51.

- WREN-DAIL, M. A., DAUCHY, R. T., OOMS, T. G., BAKER, K. C., BLASK, D. E., HILL, S. M., DUPEPE, L. M. & BOHM JR, R. P. 2016. Effects of Colored Enrichment Devices on Circadian Metabolism and Physiology in Male Sprague–Dawley Rats. *Comparative medicine*, 66, 384-391.
- YAMADA, K., OHKI-HAMAZAKI, H., WADA, K. J. P. & BEHAVIOR 2000. Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice. 68, 555-561.
- YANG, T., YANG, C. F., CHIZARI, M. D., MAHESWARANATHAN, N., BURKE, K. J., BORJUS, M., INOUE, S., CHIANG, M. C., BENDER, K. J. & GANGULI, S. 2017. Social control of hypothalamus-mediated male aggression. *Neuron*, 95, 955-970. e4.
- ZAKINIAEIZ, Y., COSGROVE, K. P., POTENZA, M. N. & MAZURE, C. M. 2016. Balance of the Sexes: Addressing Sex Differences in Preclinical Research. *Yale J Biol Med*, 89, 255-9.
- ZUCKER, I. & BEERY, A. K. 2010. Males still dominate animal studies. *Nature*, 465, 690.

## 9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hiebl und Frau PD. Dr. Sabine Chourbaji, welche die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit übernommen haben und mir während der Anfertigung der Dissertation fortwährend mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Philip Daiber bedanken, für sein geduldiges Wesen in Bezug zu eigentlich allem. Spezieller Dank geht hier auch an Frau Dr. Miriam Vogt, welche mir beim Verfassen des Tierversuchsantrags tatkräftig zur Seite stand. Für die Unterstützung bei der Organentnahme möchte ich mich zudem bei Laura Walisch, sowie Julia Weiss bedanken, die geschickte Finger unter Beweis gestellt haben.

Für die Möglichkeit auf seine statistischen Kenntnisse zurückzugreifen, möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. Johannes Krisam bedanken.

Mein größter und herzlichster Dank geht an meine Familie, außerdem an die ganze Familie Mihi, sowie an Dich, Tom. Für eure Unterstützung, für eure Zusprüche und dafür, dass ihr bedingungslos an mich geglaubt habt.

Ein weiteres großes herzliches Extradanke geht außerdem an die Korrekturleser (Tom, Nele und Tine)!

Danke, danke und nochmals danke!