

Voorkomen van koudestress in metabole kooien door verwarmde kooiverrijking

Nicole Bakker¹, Henk Arnts¹, Carlijn Hooymans¹, Joanna In 't Hout² en Merel Ritskes-Hoitinga¹

¹Centraal Dierenlaboratorium, Radboud UMC, Nicole.Bakker@Osteo-pharma.com

²Afdeling Biostatistiek, Radboud UMC, Nijmegen

Samenvatting

Binnen het wetenschappelijk onderzoek wordt veel gebruik gemaakt van stofwisselingskooien, ook wel metabole kooien genoemd. Veel transgenen stammen die gebruikt worden in stofwisselingsonderzoek hebben een verlaagde lichaamstemperatuur. Wanneer deze stammen in een stofwisselingskooi worden geplaatst raken ze snel onderkoeld. Dit leidt tot een grote variatie in de groepen en tot extra ongerief.

In deze studie is daarom gekeken of het plaatsen van een verwarmd roestvrij stalen (RVS) huisje in een metabole kooi kan bijdragen aan een betere leefomgeving voor muizen. In het bijzonder werd gekeken naar het effect van verwarmde RVS huisjes op muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur. In een betere leefomgeving zal naar verwachting ook de variatie in de resultaten afnemen. Ook is gekeken of het plaatsen van een verwarmd RVS huisje kan bijdragen aan het verminderen van het ongerief en aan het behalen van meer betrouwbare resultaten. Als parameters voor het dierenwelzijn zijn water- en voedselopname, lichaamsgewicht en faeces- en urine- opbrengst gebruikt. Ook zijn stressniveaus bepaald en is er gekeken naar het gedrag van de dieren. Uit de resultaten blijkt dat een verwarmd RVS huisje zorgt voor een betere leefomgeving voor muizen, in het bijzonder voor muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur. Muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur kunnen hierdoor langer gehuisvest worden in een metabole kooi en hierdoor kan er nauwkeuriger faeces en urine verzameld worden, en wordt de voerruif minder bevuild. Ook zorgt een verwarmd RVS huisje ervoor dat muizen iets langere rustperiodes hebben.

Inleiding

Binnen het wetenschappelijk onderzoek wordt gebruik gemaakt van stofwisselingskooien, ook wel metabole kooien genoemd. Hiermee kunnen onder gestandaardiseerde omstandigheden per individueel dier urine en faeces verzameld worden en kan de voedsel- en wateropname nauwkeurig worden bepaald. Het individuele dier in een metabole kooi ondervindt ongerief. Het ongerief is te wijten aan het ontbreken van noodzakelijke kooiverrijking in de vorm van schuilmogelijkheden, bedding, nestmateriaal en soortgenoten. Onderzoek met muizen heeft »

aangetoond dat kooiverrijking een negatieve invloed heeft op de bloedwaarden (1, 2). Daarnaast heeft een metabole kooi een draadbodem, een beperkt vloeroppervlak en is het erg licht in de kooi. Hier houden muizen en ratten niet van (3) en zij zullen zich hier ook niet aan aanpassen (4). Onderzoek heeft laten zien dat bij muizen die worden overgezet naar metabole kooien het drie tot vier dagen duurt voordat hun voedsel en wateropname, urine en lichaamsgewicht weer stabiliseert (5).

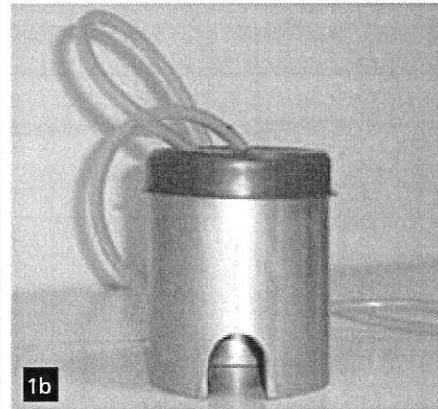
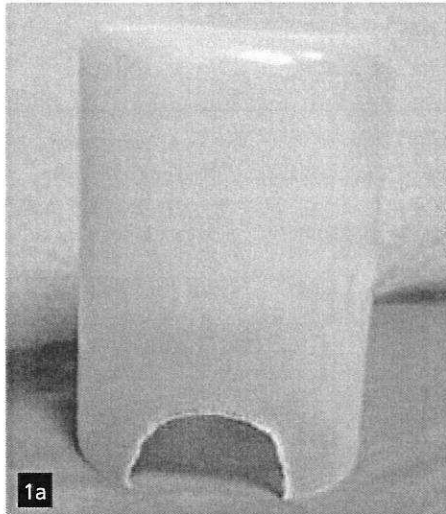
Veel transgene muizenstammen die gebruikt worden voor het stofwisselingsonderzoek hebben een verlaagde lichaamstemperatuur. Wanneer deze muizen geplaatst worden in een metabole kooi zonder soortgenoten en schuilmogelijkheden zullen deze muizen moeite hebben om hun lichaamstemperatuur optimaal te houden. Het gevolg is dat de muizen onderkoeld raken. Door deze onderkoeling wordt hun metabolisme langzamer en dit kan resulteren in een grote variatie in de intrinsieke metabolische parameters (6). Deze variatie wordt versterkt door de verminderde water- en voedselopname en een stijging van de stressniveaus omdat de muizen solitair gehuisvest zijn. In de meeste gevallen kunnen deze transgene muizen niet langer dan 24 uur in een metabole kooi gehuisvest worden als ze langer in een metabole kooi worden gehuisvest raken ze onderkoeld. Hierdoor ontbreekt de acclimatisatiefase (7). Dit alles veroorzaakt extra variatie waardoor er meer dieren nodig zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen. Het verminderen van deze variatie is daarom een belangrijk element bij het opzetten en uitvoeren van experimenten met metabole kooien, zeker als er gebruik wordt gemaakt van stammen met een verminderde lichaamstemperatuur.

In deze studie is daarom gekeken of het plaatsen van een verwarmd huisje in een metabole kooi kan bijdragen aan een betere leefomgeving voor muizen. In het bijzonder werd gekeken naar het effect van verwarmde huisjes op muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur. Een betere leefomgeving zal naar verwachting ook de variatie in de resultaten doen afnemen. Ook is gekeken of het plaatsen van een verwarmd RVS huisje kan bijdragen aan het verminderen van het ongerief en meer betrouwbare resultaten. In een aantal laboratoria worden plastic flessen gebruikt als kooiverrijking in metabole kooien. Daarom is deze kooiverrijking in dit experiment ook meegenomen. Voor dit experiment zijn Klotho wild type (WT) en Klotho knock out (KO) muizen gebruikt. De Klotho KO muis mist het Klotho gen. Deze muizen hebben een verlaagde lichaamstemperatuur en worden veel gebruikt bij stofwisselingsonderzoek. De plastic fles als kooiverrijking is alleen getest bij de WT muizen. Als parameters voor het dierenwelzijn zijn water- en voedselopname, lichaamsgewicht en faeces en urine opbrengst gebruikt. Ook zijn stressniveaus bepaald en is er gekeken naar het gedrag van de dieren. De muizen zijn 72 uur in een metabole kooi geplaatst. Er is gekozen voor 72 uur omdat onderzoek heeft laten zien dat bij muizen ongeveer drie dagen duurt voordat ze gewend zijn aan hun omgeving (5).

Dieren, materiaal en methoden

Dieren Klotho WT (WT C57Bl/6J/C3H/J) en Klotho KO (K1-/K1-) muizen zijn verkregen van Prof. J. Hoenderop (Afdeling Fysiologie, Radboud UMC Nijmegen). Dit experiment is goedgekeurd door de DEC van het Radboud UMC in Nijmegen. De muizen werden gehuisvest in groepen van vier tot aan de start van het experiment (12h licht/donker cyclus, licht aan van 6:30-18:30 uur, lichtintensiteit (60-100 lux), temperatuur ($21 \pm 20^\circ\text{C}$) en luchtvochtigheid ($55 \pm 10\%$)). De muizen hadden vrije toegang tot aangezuurd water (pH 3.9) en kregen ad libitum voedsel (Rat en muis special Diet V1244-703, Ssniff GMBH).

Metabole kooi studies Bij de start van het experiment waren de muizen 7 tot 8 weken oud. De muizen werden individueel gehuisvest in metabole kooien (cat No 3600M021, Tecniplast Kettering, UK). Deze kooien hadden een vloeroppervlakte van 200 cm² (32x25x36,5 cm (l x b x h)). De dieren kregen ad libitum water en voedsel in poedervorm (Rat and Mice special Diet V1244-703, Ssniff GMBH) gedurende 72 uur. Plastic flessen, verwarmde en niet verwarmde



Afbeelding 1.
(a) Plastic fles.
(b) Roestvrij stalen huisje.

roestvrij stalen (RVS) huisjes waren aanwezig in de kooien als verrijking (zie afb. 1). Ook waren er kooien zonder verrijking (leeg). De verwarmde RVS huisjes bestonden uit een dubbelwandige roestvrij stalen wand, waarin een silicone slang zat. Deze slang was verbonden met een waterpomp met een temperatuur regelaar. Hiermee werd de temperatuur zo ingesteld dat het in de huisjes 30°Celsius was. In de niet verwarmde huisjes was de pomp uitgeschakeld. Elke dag werd het lichaamsgewicht, water en voedselopname en de urine en faeces opbrengst bepaald. De lichaamstemperatuur werd 2x per dag bepaald met een oor thermometer (Braun, LF 40). Alle bepalingen van voedsel- en wateropname en urine- en faeces opbrengst werden uitgedrukt per 100 gram lichaamsgewicht. Het gedrag van de muizen werd opgenomen met een camera (EthoVision XT @ [8.5]).

Analyse faeces monsters. Corticosterone Metabolieten (CORT) van bevroren faecesmonsters werden geëxtraheerd en gekwantificeerd zoals eerder beschreven (7).

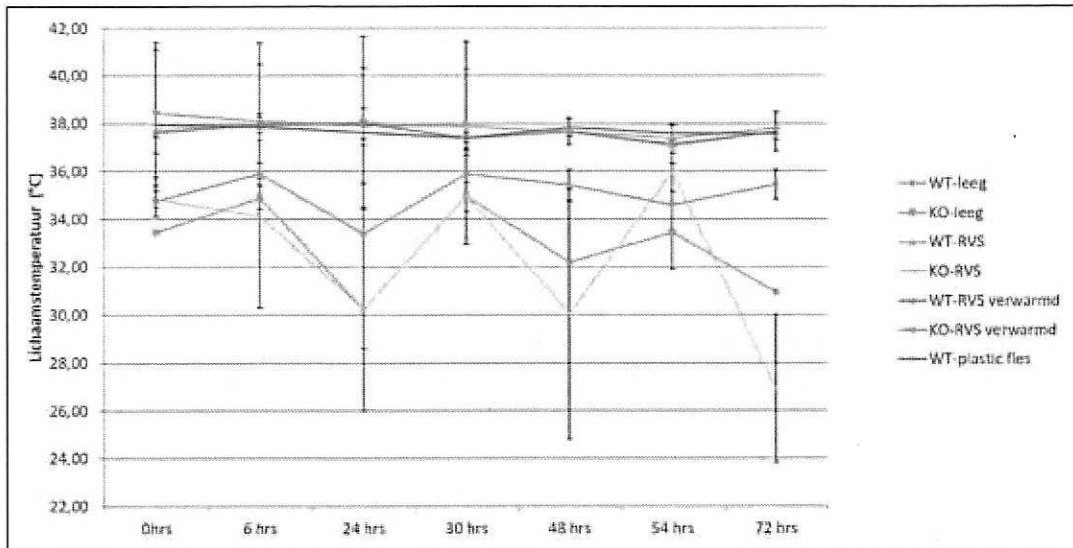
Analyseren van het gedrag. Met de Envision software werd het gedrag van de muis opgenomen. Van deze opnames werd elke twee uur zes minuten geobserveerd waar de muis zich bevond en of, en zo ja, hoelang de muis gedurende deze zes minuten actief was.

Statistische analyse. Lineaire mixed models zijn gebruikt om de herhaalde metingen over de tijd te modelleren, met als covariaten het type huisje, het genotype van de muis (WT of Klotho KO), sexe, tijd en de interacties hiertussen. De covariantie tussen de metingen werd bepaald met behulp van een vrije structuur cq. met een compound symmetrie structuur. Stap voor stap is bekeken of de modellen konden worden vereenvoudigd door sexe en genotype en hun interacties te verwijderen. Voor de gedragsdata is ook bekeken of de interacties tussen behandeling en tijd konden worden verwijderd. Per parameter is uiteindelijk het model met de laagste AICC waarde gebruikt. Alle analyses zijn uitgevoerd met SAS versie 9.2 voor Windows.

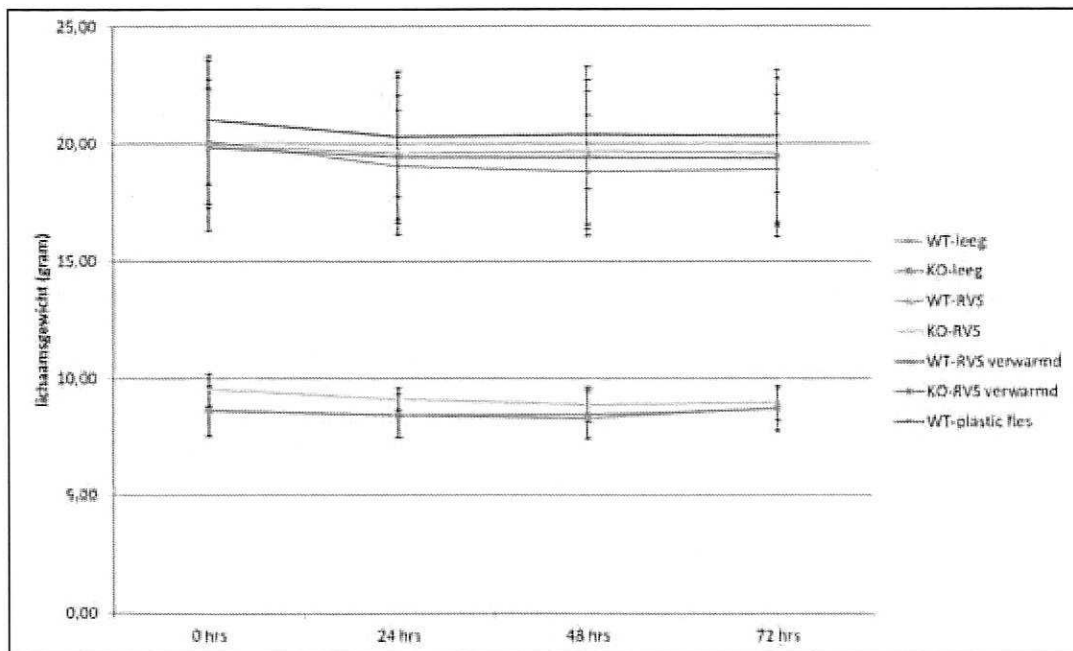
Resultaten

In dit experiment zijn per huisvestingsconditie drie mannen en drie vrouwen gebruikt. Omdat er geen significant verschil tussen de geslachten was, zijn de resultaten van de mannen en de vrouwen samengevoegd, dit leidt tot een n=6 per type kooiverrijking.

Op t=0, 6, 24, 30, 48, 54 en 72 uur is de temperatuur van de muizen gemeten met behulp van een oor thermometer (afb. 2). De resultaten laten zien dat met een verwarmd RVS huisje de lichaamstemperatuur van de Klotho KO muizen constanter blijft, dan zonder verwarmd huisje. Ook is de gemiddelde lichaamstemperatuur van de KO muizen significant hoger ($p < 0.001$) in een kooi met verwarmd huisje in vergelijking met geen of een onverwarmd huisje. De eerste 24 uur is er gemiddeld 1°C verschil. Deze gemiddelde lichaamstemperatuur in verwarmde huisjes »



Afbeelding 2. Resultaten gemiddelde lichaamstemperatuur \pm SD



Afbeelding 3. Resultaten gemiddelde lichaamsgewicht \pm SD

komt overeen met de temperatuur van Klotho KO muizen tijdens de standaard huisvesting in macrolon bakken. De verschillende huisjes hebben geen invloed op de lichaamstemperatuur van de WT muizen. Deze blijft constant rond de 37°C.

Op $t=0$, 24, 48 en 72 uur is het lichaamsgewicht gemeten (afb. 3). Er zit een groot verschil in lichaamsgewicht tussen een volwassen WT muis (25 gram) en een KO muis (10 gram).

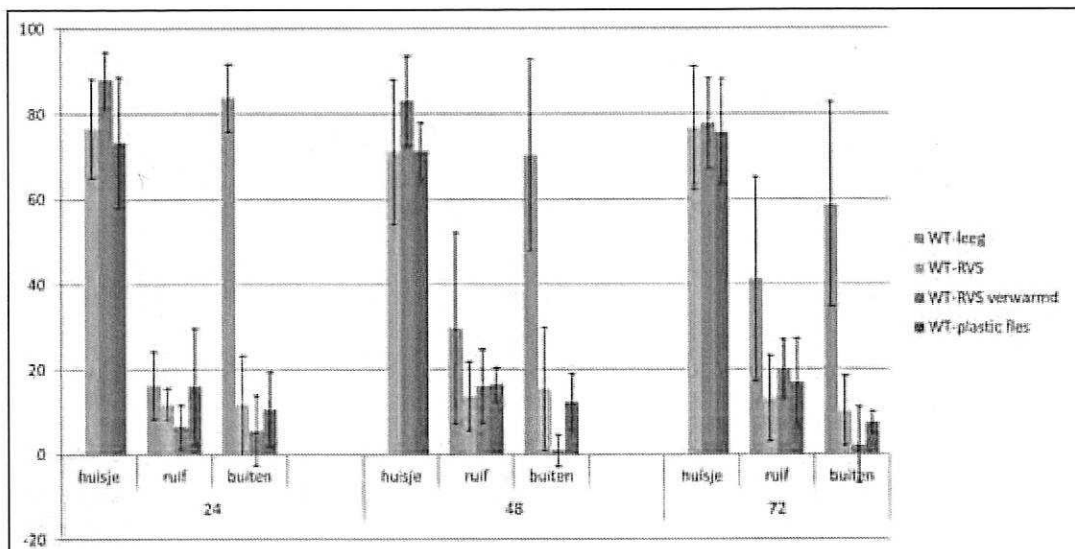
Op $t=24$, 48 en 72 uur zijn de urine en faeces opbrengsten gemeten. Ook is op die tijdstippen de voedsel- en wateropname bepaald. Voor zowel de urine- als de faecesopbrengst zijn er geen significante verschillen tussen de groepen zonder huisje, met een huisje en met een verwarmd huisje. Wel is er een significante toename te zien tussen de groepen met een plastic fles en de

andere groepen. De muizen in een kooi met een plastic fles produceren significant meer urine en faeces op t = 24, 48 en 72 uur. Er is echter geen verschil in wateropname tussen de muizen met een plastic fles en de andere condities.

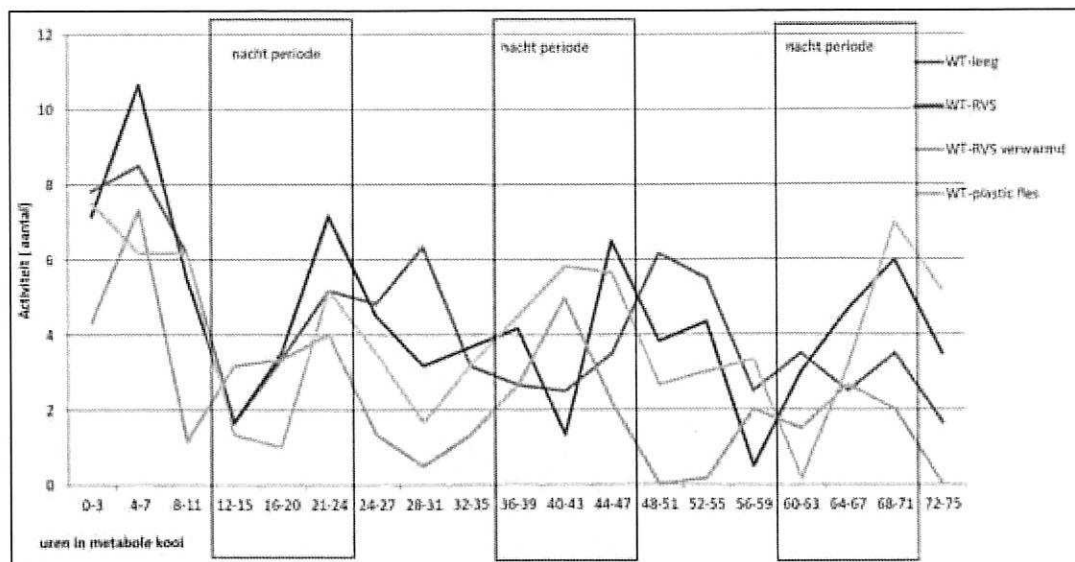
Op t = 24, 48 en 72 uur zijn de corticosteronniveaus bepaald in de faeces en zijn geen significante verschillen gemeten tussen de verschillende type kooiverrijkingen.

De muizen zijn gedurende 72 uur gefilmd en vervolgens is er iedere twee uur gekeken waar in de kooi de muizen zich bevonden. De muizen konden zich bevinden in het huisje, in het voerbakje of op de roosterbodems/buiten het huisje. Als er een huisje in de metabole kooi aanwezig is, gaan de muizen daarin zitten. Het maakt niet uit of het een plastic fles of RVS huisje is. De muizen zonder huisje, zitten de eerste 24 uur gemiddeld het meeste op de roosterbodem, na 24 uur gaan ze meer in het voerbakje zitten (afb. 4).

Als er een huisje of fles is, wordt het voerbakje niet meer gebruikt als schuilplaats. Je ziet dan



Afbeelding 4. Resultaten gemiddelde score gedrag \pm SD



Afbeelding 5. Resultaten gemiddelde activiteit score wildtype muizen \pm SD

geen urine meer in het voerbakje en langs de rand van de metabole kooi. Dit betekent dat de muizen hun behoefte doen als ze in het huisje zitten. Ook is er iedere twee uur 6 minuten lang gekeken hoelang de muizen gedurende die 5 minuten actief waren. Afbeelding 3 toont dat de muizen in de stofwisselingskooien geen dag-nacht ritme laten zien. De muizen hebben dus bijna geen rustperiodes en zijn constant actief. De muizen met een verwarmd RVS huisje in hun kooi hebben de langste periode van rust.

Discussie en conclusie

Een verwarmd RVS huisje zorgt ervoor dat de Klotho KO muizen hun lichaamstemperatuur beter op peil kunnen houden en hierdoor hoeven minder muizen uit experiment gehaald te worden. Dit leidt tot betrouwbaardere resultaten en minder proefdieren. Doordat de muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur snel afkoelen, kunnen ze maar 24 uur in een stofwisselingskooi geplaatst worden, terwijl muizen met een normale lichaamstemperatuur 48 uur in een stofwisselingskooi worden geplaatst, en hiervan is de eerste 24 uur acclimatisatietijd. Muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur hebben dus geen acclimatisatietijd. Hierdoor kunnen de verkregen resultaten zonder verwarmd huisje mogelijk geen goed beeld geven van de werkelijkheid. Door het plaatsen van een verwarmd RVS huisje kunnen ook de muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur 48 uur in een stofwisselingskooi worden geplaatst en hierdoor worden de verkregen resultaten betrouwbaarder en zal de variatie minder worden waardoor er minder dieren per groep nodig zijn.

In dit experiment is twee keer per dag de temperatuur gemeten. Het lijkt erop dat de lichaamstemperatuur van de Klotho KO muizen na iedere meting even toeneemt. Dit komt waarschijnlijk doordat de muizen voor deze temperatuurmeting vastgepakt moeten worden. De verwachting is dat als dit niet gedaan was, de lichaamstemperatuur van de Klotho KO muizen zonder verwarmd huisje nog verder was gedaald en er nog meer dieren uit experiment zouden moeten worden gehaald vanwege ontoelaatbare daling.

Het plaatsen van een (verwarmd) huisje heeft geen invloed op het lichaamsgewicht van de WT muizen. Ook verandert door het plaatsen van een (verwarmd) RVS huisje de urine- en faecesopbrengst niet en heeft het plaatsen van een (verwarmd) RVS of plastic fles geen invloed op de water- en voedselopname.

Het corticosteron niveau lijkt bij de WT muizen iets te dalen als de muizen worden gehuisvest in een metabole kooi met (verwarmd) RVS huisje, dit is echter niet significant. WT muizen gehuisvest in een kooi met een plastic fles laten een significante toename in van urine en faeces productie zien ten opzichte van de muizen met een RVS huisje. Dit zou kunnen duiden op een hoger stress niveau. De temperatuur in de plastic fles komt overeen met de temperatuur in de onverwarmde RVS huisjes. Het plastic fles laat wel meer licht door dan het RVS huisje. Dit zou een mogelijke verklaring voor het gemiddeld hogere corticosteron niveau kunnen zijn.

De muizen gaan indien een huisje aanwezig het meeste in het huisje zitten. Ze lijken dus echt op zoek naar een schuilmogelijkheid. Er zit geen verschil tussen de verschillende type huisjes. Als er geen huisje is, zitten de dieren de eerste 24 uur op de roosterbodem/buiten het huisje, maar daarna gaan ze meer in de voerbakje zitten. De resultaten laten ook zien dat door het plaatsen van muizen in een metabole kooi het dag- en nachtritme van de muizen verstoord wordt. De muizen hebben zich na 72 uur nog steeds niet aangepast aan hun omgeving. De muizen die gehuisvest zijn in een metabole kooi met RVS huisje, plastic fles of geen huisje hebben bijna geen rustperiode en zijn constant actief. De muizen gehuisvest in een metabole kooi met verwarmd RVS huisje hebben een iets langere rustperiode, maar nog altijd veel korter dan muizen gehuisvest in standaard huisvesting. Bij deze standaard huisvesting hebben de muizen hun noodzakelijke kooiverrijking in de vorm van schuilmogelijkheden, bedding, nestmateriaal en sootgenoten. Dit missen de muizen bij huisvesting in metabole kooien, hierdoor hebben de muizen meer stress en kunnen ze moeilijker hun rust vinden. »

Gebaseerd op bovenstaande bevindingen kan gesteld worden dat het plaatsen van een verwarmd huisje in metabole kooien zorgt voor een betere leefomgeving voor muizen, in het bijzonder voor muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur. Muizen met een verlaagde lichaamstemperatuur kunnen hierdoor langer gehuisvest worden in een metabole kooi en hierdoor kan er nauwkeuriger faeces en urine verzameld worden, en wordt de voerruif minder bevuild. Ook zorgt het plaatsen van een verwarmd huisje in een metabole kooi ervoor dat muizen iets langere rustperiodes hebben.

Dank. De schrijvers bedanken Prof. J. Hoenderop voor het beschikbaar stellen van de muizen. Ook bedanken zij Bianca Lemmers, Iris Lamers en Kitty Lemmens voor hun hulp tijdens het uitvoeren van dit experiment. Ook dr. Kalkokoski wordt bedankt voor het meten van de corticosteron niveau's.

Literatuurlijst

1. Champy MF, Selloum M, Zeitler V *et al.* (2008) *Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse.* Mammalian genome 19(5): 318-331.
2. Van Loo PLP, van der Meer E, Kruitwagen CLJJ *et al.* (2004) *Long term effects of husbandry procedures on stress-related parameters in male mice of two strains.* Laboratory Animals 38: 169-177.
3. Manser CE, Morris TH, Broom DM *et al.* (1995) *An investigation into the effects of solid or grid cage flooring on the welfare of laboratory rat.* Laboratory Animals 29: 353-363.
4. Kalkokoski O, Jacobsen KR, Darysman HS (2013) *Mice do not habituate to metabolism cage housing--a three week study of male BALB/c mice.* PLoS One 8(3).
5. Stechman MJ, Ahmed BN, Loh NY *et al.* (2010) *Establishing normal plasma and 24-hour urinary biochemistry ranges in C3H, BALB/c and C57BL/6J mice following acclimatization in metabolic cages.* Laboratory Animals 44(3): 218-225.
6. Hwa JJ, Ghihaudi L, Compton D *et al.* (1996) *Intracerebroventricular injection of leptin increases thermogenesis and mobilizes fat metabolism in ob/ob mice.* Hormone and Metabolic Research Res 28(12): 659-663.
7. Sundboom R, Jacobsen K, Kalkokoski O *et al.* (2011) *Post-operative corticosterone levels in plasma and feces of mice subjected to permanent catheterization and automated blood sampling.* In Vivo 25(3): 335-342.



«