

Automatische
registratie

WEET HOE JE DIER EET!

van voedsel-
patronen bij
kleine dieren

Mieneke C.M. Lujendijk¹, Jan H. Brakkee¹, Ernest Boskovic², Rene van de Vosse²,
Cees M. Ligtvoet², Susanne E. la Fleur¹, Esther M. van der Zwaal¹, Roger A.H. Adan¹

¹ Rudolf Magnus Instituut voor Neurowetenschappen, Afdeling Neurowetenschappen en Farmacologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Universiteitsweg 100, 3584CG Utrecht
m.c.m.lujendijk@umcutrecht.nl

² Afdeling Medische Technologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht

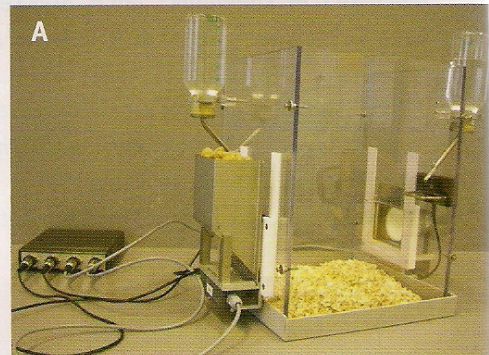
Samenvatting

Bij het onderzoek naar de regulatie van lichaamsgewicht en energiebalans is het niet alleen van belang te weten 'hoeveel' een dier eet, maar ook 'hoe' het zijn voedsel eet. Om veranderingen in de totale voedselinname en in het eetpatroon van proefdieren te kwantificeren, hebben wij een speciaal voedselweegsysteem ontwikkeld. Dit systeem registreert continu het gewicht van voerbakjes in de kooi en slaat elke 12 seconden dit gegeven op in de computer. Door te kijken naar veranderingen in het gewicht kan nauwkeurig bepaald worden hoe vaak, hoeveel en hoe lang een dier eet (respectievelijk maaltijdfrequentie, -grootte, en -duur). Doordat ook vastgelegd wordt op welke tijdstippen van de dag het dier eet, kan bovendien gekeken worden naar de circadiane ritmie van het eetpatroon. Om drinkgedrag van het dier te volgen wordt gebruik gemaakt van lickometers, die op hetzelfde systeem worden aangesloten. Het systeem kan op verschillende typen kooien gebruikt worden en het is mogelijk om inname uit verschillende voedselbronnen apart te meten, bijvoorbeeld als dieren worden blootgesteld aan een keuzedieet. Hierbij worden naast standaard voerbrokken en water, in de kooi ook vet en suiker aangeboden. Met behulp van dit systeem kan zeer gedetailleerd zicht worden verkregen op voedselpatronen van individuele dieren. Ons onderzoek naar eetgedrag is hierdoor verder verfijnd.

Bij de regulatie van voedselinname is in het lichaam voortdurende communicatie tussen mechanismen die eten stimuleren (honger) en remmen (verzadiging). Leptine, een hormoon dat vrijkomt uit vetweefsel, zorgt bijvoorbeeld voor een verlaging van de voedselinname, en ghreline, dat wordt gemaakt door de maag, zorgt juist voor een verhoging van de voedselinname. De samenwerking van de verschillende systemen zorgt op korte termijn voor de controle van eetgedrag en op de lange termijn voor de regulatie van het lichaamsgewicht en het vetpercentage (1). Naast interne mechanismen spelen ook externe factoren een rol bij de regulatie van lichaamsgewicht. Gemoedstoestand, aanbod van lekker eten en sociale factoren kunnen bijvoorbeeld aanleiding geven tot eten zonder dat sprake is van hongergevoel, wat uiteindelijk kan leiden tot overgewicht. Omgekeerd kunnen hyperactiviteit en het bewust vermijden van voedsel (om gezondheidsredenen of een schoonheidsideaal) zorgen voor een afname in lichaamsgewicht.

Binnen onze onderzoeksgroep zijn wij specifiek geïnteresseerd in de rol van de hersenen in de regulatie van eetgedrag en lichaamsgewicht. Het effect van stoffen zoals leptine en ghreline komt namelijk grotendeels tot stand via de hersenen en van bepaalde neuropeptiden is bekend dat zij hierbij een belangrijke rol spelen (2). Neuropeptide Y (NPY) stimuleert bijvoorbeeld de voedselinname terwijl alpha-melanocyte stimulerend hormoon (α-MSH) voedselinname juist remt. Beide neuropeptiden worden afgegeven in de hypothalamus. Van dit hersengebied is bekend dat het vooral betrokken is bij het initiëren van een maaltijd (maaltijdfrequentie). Daarentegen is de hersenstam vooral betrokken bij het beëindigen van maaltijden (maaltijdgrootte) (3). Om onderzoek te doen naar de regulatie van eetgedrag in diersoorten is het vaststellen van individuele eetpatronen van belang. Overconsumptie kan namelijk tot stand komen, doordat een dier vaker eet, doordat hij grotere hoeveelheden per maaltijd eet of een combinatie hiervan.

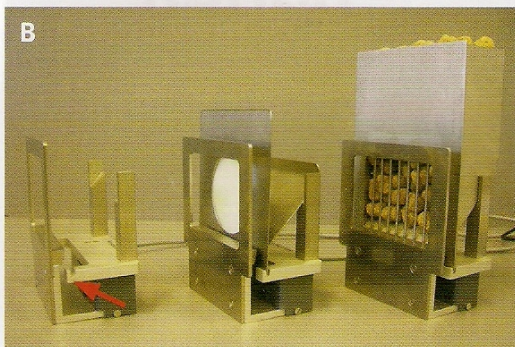
De oudste methode die werd gebruikt om voedselpatronen vast te leggen, is het bepalen van voedselinname door frequent het voer te wegen. Dit is echter erg tijdrovend, en kan het gedrag van de dieren beïnvloeden doordat ze door het wegen verstoord worden. Bovendien kan zo alleen vastgesteld worden hoeveel een dier in een bepaalde tijdsperiode eet, maar het geeft geen informatie over individuele maaltijden. Daarom zijn in het verleden verschillende systemen



Afbeelding 1. **A.** Opstelling van het weegstelsel op een demontabele kooi. Links op de foto is de interface (zwart kastje) te zien, deze is verbonden met een computer. **B.** Weegstelsel met verschillende voedselbronnen. Gleuf voor voerbak aangegeven met rode pijl. **C.** Lickometersysteem, zwart kastje met metalen stangetjes.

The Marshall Standard is Recognizable

ontwikkeld om voedselpatronen van proefdieren automatisch te registreren. In 1973 introduceerde Mettler Toledo de eerste elektronische balans (PT1200) waardoor het mogelijk werd om voer en water van proefdieren automatisch te wegen (4). Deze balans werd in een aparte ruimte naast een speciale meetkooi geplaatst. Via een tunnel had het dier toegang tot een schaalje poedervormig voedsel op de weegschaal. Op vaste tijdstippen werd het gewicht geregistreerd en als het dier in de afgelopen periode iets had gegeten, werd dit zichtbaar aan een afname in het gewicht op de balans. Dit systeem heeft echter enkele nadelen. Ten eerste kunnen dieren niet gehuisvest worden zoals in de thuishooi, en kan dus slechts korte tijd gemeten worden. Bovendien kan de meting verstoord worden omdat de ruimte met de balans voor het dier vrij toegankelijk is. Zo kan het bijvoorbeeld voedsel van de balans halen zonder het te eten en kunnen dieren zelfs slapen of hun behoefte doen in het voedsel. Om deze beperkingen te ver-



Scales — version: 6.0								
File	COMpart	Options	Select	About	Open Experiment map			
Weight	Licko	Calibration			Channel Map		Service	
11:11:10	1	2	3	4	5	6	7	8
weight(g)	198.4	182.8	163.9	176.9	199.0	214.7	180.8	190
5 sec	B26-1	B26-2	B27-1	B27-2	B28-1	B28-2	B29-1	B29
11:05:00	198.42	182.75	163.77	176.93	199.93	214.67	180.81	191
11:05:12	198.41	182.78	163.74	176.93	198.91	214.69	180.79	191
11:05:24	198.43	182.77	163.76	176.93	198.90	214.68	180.82	191
11:05:36	198.40	182.76	163.78	176.94	198.88	214.68	180.80	191
11:05:48	198.41	182.77	163.74	176.93	198.91	214.69	180.79	191

Afbeelding 2. (Bron: Scales) De rij "weight (g)" laat de actuele gewichten zien en de kolommen de iedere 12 seconden opgeslagen gewichten (de kolommen 1-6 vertegenwoordigen weegbakje 1-6).

helpen werd het systeem verder ontwikkeld. Bij het vernieuwde systeem werd aan de binnenkant van de kooi een voerbakje met ruif gehangen dat verbonden was met een weegschaal boven op de kooi. Voordeel hiervan is dat het

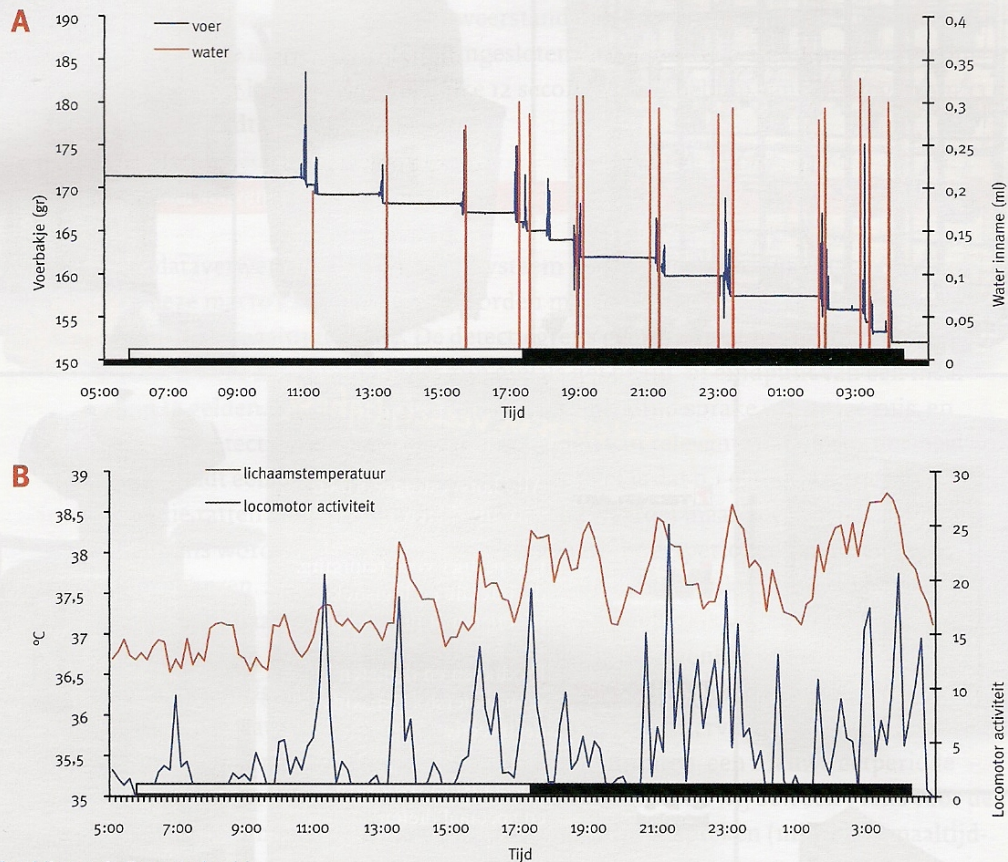
dier niet meer direct toegang tot de balans heeft en er hele voerbrokken gegeven kunnen worden. Een nadeel is echter dat er stukjes voer in de kooi kunnen vallen zonder dat deze worden opgegeten, waardoor gewichtsverandering door verspilling niet kan worden gescheiden van een maaltijd. Dit is vooral een probleem bij onderzoek met muizen, die maar 2-5 gram per dag eten. Daarnaast registreren beide systemen alleen periodiek het gewicht van het voerbakje, waardoor geen individuele maaltijden kunnen worden vastgesteld.

Eind jaren 70 werd in Groningen gebruik gemaakt van een voedselweegsysteem waarbij het gewicht van een voedselruif elke seconde gemeten werd. Ook het gruis dat ontstaat door het knagen aan de voedselbrokken werd opgevangen. Als

het gewicht verschilde van het gewicht dat een seconde eerder was gemeten, dan werd dit gewicht opgeslagen op een digitale magnetische cassette. Elke verandering in het gewicht van de voedselruif werd zo vastgelegd, en hieruit konden de grootte en de duur van maaltijden bepaald worden. Door middel van een videocamera werd het eetgedrag van de dieren ook visueel gevolgd. Hierdoor was er een extra controle ingebouwd voor de data van het voedselweegstelsel (5). In 1997 werd er een ander soort weegstelsel op de markt gebracht door Research Diets Inc. dat voedselinname registreert door middel van een 'periode meter' (4). De 'aan' en 'uit' schakels van deze 'periode meter' zijn gebaseerd op een verandering in het gewicht van een voerbakje. Zolang het dier niet eet, verandert het gewicht niet. Als het dier gaat eten, dan verstoort dit het stabiele gewicht. Deze verstoring wordt gezien als de start van een eetperiode en het gewicht wordt dan geregistreerd (periode meter 'aan'). Als het dier stopt met eten, ontstaat weer een stabiel gewicht en dit wordt geregistreerd als het einde van de eetperiode (periode meter 'uit'). Uit de geregistreeerde gegevens kan berekend worden hoeveel en hoe lang het dier gegeten heeft. De tijd tot het volgende moment van eten wordt het tussen-maaltijd-interval genoemd. Dit interval kan seconden, minuten, maar ook uren zijn. Het grootste voordeel van dit stelsel (ten opzichte van de eerdere) is dat het aan de kooi hangt en er dus 24 uur per dag gemeten kan worden. Bovendien wordt het bakje met voer of water erin op een weegschaaltje aan de buitenkant van de ratten- of muizenkooi geplaatst. Hierbij worden voedselkrumels die uit de ruif vallen opgevangen, zodat dit niet geregistreerd wordt als gewichtsverlies. Een nadeel van dit stelsel is echter dat alleen periodes worden vastgelegd waarbij het gewicht niet stabiel is. Zo worden alleen korte eetmomenten geregistreerd, maar niet elk eetmoment is een maaltijd. Een ander nadeel is dat er per kooi maximaal twee voedselbronnen kunnen worden gemeten. Wij zijn onder andere geïnteresseerd in maaltijdpatronen tijdens een keuzedieet, waarbij de ratten naast voer en water ook verzadigd vet (ossewit) en 30% suikerwater aangeboden krijgen. Daarom hebben wij binnen het UMC Utrecht een stelsel ontwikkeld waarmee voedselpatronen nog nauwkeuriger te bepalen zijn en dat geschikt is voor alle experimenten die in ons lab worden uitgevoerd.

Hoe ziet ons nieuwe weegstelsel eruit?

Het weegstelsel bestaat uit een weegschaaltje dat door middel van een interface met een computer verbonden is (Afb. 1a). Op elke interface kunnen twee weegschaaltjes worden aangesloten. Deze kunnen op een of twee afzonderlijke kooien geplaatst worden waarin verschillende voedselbronnen worden aangeboden, zoals bij een keuzedieet. De voedselruif wordt op het weegschaaltje geplaatst in daarvoor bestemde gleuven (Afb. 1b). De interface is nodig om de gegevens om te zetten in een voor het computerprogramma Scales begrijpelijke code.



Afbeelding 3. A. Een voorbeeld van 24 uur voedselinname (blauw) en waterinname (rood) van één rat. B. Lichaamstemperatuur (rood) en activiteit (blauw). Dag-nacht ritme 5.00-17.00 licht.

Dit programma registreert continu het gewicht op maximaal 24 weegschaaltjes. Elke 12 seconden wordt het gemiddelde gewicht bepaald en opgeslagen en verschijnt elk gewicht op het computerscherm (Afb. 2). Als een rat niet eet blijft het gewicht van het voerbakje stabiel. Pas als de rat gaat eten verandert deze waarde (Afb. 3a). De uitschieters van het gemeten gewicht worden veroorzaakt doordat de rat aan het voerbakje zit terwijl hij aan het eten is. Stopt de rat met eten, dan wordt het gewicht opnieuw stabiel.

Het drinkgedrag van de rat kan gevolgd worden door middel van een lickometersysteem (Afb. 1c). De lickometer bestaat uit een metaal-draadje dat verbonden is met de drinknippel en een stangetje aan de binnenkant van de kooi. Over deze twee onderdelen staat een kleine elektrische spanning, die voor een elektrisch circuitje zorgt op het moment dat de rat aan de nippel likt. Als de rat wil drinken, moet hij namelijk eerst met zijn voorpoten op het stangetje gaan staan om bij de fles te komen. Als hij dan bij het drinken de nippel aanraakt met zijn tong, loopt bij elke lik heel kort een stroompje door het circuit. Dit

stroompje wekt bij de rat geen weerstand op. Er kunnen maximaal twee lickometers op elke interface worden aangesloten. Deze stuurt de signalen naar de computer, waar het aantal likken, elke 12 seconden met behulp van het programma Scales wordt opgeslagen.

Hoe worden de data verwerkt?

De dataverwerking van het weegsysteem wordt uitgevoerd met macro's in Excel. In deze macro's kan gevarieerd worden met de detectiegrens, intervalgrens en minimale maaltijdgrootte. De detectiegrens geeft aan wat het minimale verschil tussen twee datapunten moet zijn om als het begin- of eindpunt van een maaltijd te gelden. Bij elk meetsysteem is namelijk altijd sprake van enige ruis, en met de detectiegrens wordt deze gescheiden van relevante data. Voor normaal voer geldt een detectiegrens van 0,3 g; voor vet is dat 0,1 g omdat de hoeveelheid vet die ratten eten (door de hoge calorische waarde) maar heel klein is. De intervalgrens wordt gebruikt om vast te stellen welke eetperioden tot dezelfde maaltijd behoren. Het is namelijk mogelijk dat de rat een stukje van een voerbokje uit de ruif haalt en in enkele minuten buiten het bereik van het weegsysteem opeet. Als hij daarna direct verder gaat eten is hij eigenlijk nog met dezelfde maaltijd bezig. Daarnaast kan een kort interval tussen eetperioden ook ontstaan doordat de rat even gaat drinken. Onze standaard intervalgrens is 5 minuten, dat betekent dat na een interval van meer dan 5 minuten, een nieuwe eetperiode gezien wordt als nieuwe maaltijd. Tenslotte gebruiken wij ook een grens voor de minimale inname van voer om van een maaltijd te spreken (minimale maaltijdgrootte). Bij voerbrokken is die 0,5 g en bij vet 0,1 g.

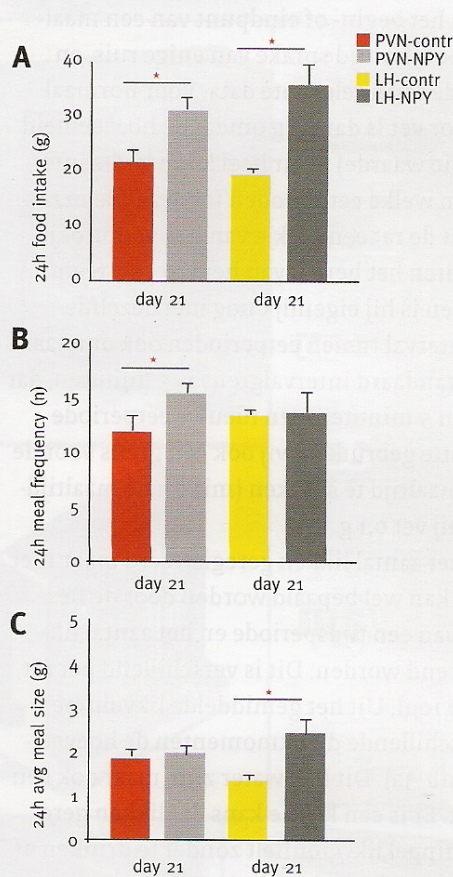
Bij het lickometersysteem wordt alleen het aantal likken geregistreerd maar niet het volume dat de rat drinkt. Dit volume kan wel bepaald worden door de fles te wegen. Uit het absolute drinkvolume van een tijdsperiode en het aantal likken kan het gemiddelde likvolume berekend worden. Dit is verschillend per rat, maar bevindt zich meestal tussen de 5 en 10 μ l. Uit het gemiddelde likvolume kan en het aantal likken kan voor de verschillende drinkmomenten de hoeveelheid die is gedronken worden bepaald (Afb. 3a). Dit kan water zijn, maar ook een suikeroplossing, zoals bij een keuzedieet. Er is een kleine kans dat likken geregistreerd worden als de rat aan de drinknippel likt/snuffelt zonder te drinken of er langs loopt en contact maakt. Als dit vaak gebeurt kan dit interfereren met de dataverwerking. Door een minimale innamehoeveelheid aan te houden van 50 likken kunnen deze 'valse' likken eruit gehaald worden.

Er kan per dier een overzicht gemaakt worden van het aantal genuttigde maaltijden, de maaltijdgrootte, de duur van maaltijden en het interval ertussen. Ook kan onderscheid gemaakt worden tussen maaltijden in de licht- en de donkerfase, zodat gekeken kan worden naar de circadiane ritmiek van het eetpatroon. Ten slotte kunnen data van het weeg- en lickometersysteem gecombineerd wor-

den om bijvoorbeeld de relatie tussen eet- en drinkgedrag zichtbaar te maken (figuur 3a). Als dieren bij een keuzedieet hun maaltijden zelf samenstellen uit de voedselbronnen, kan bovendien een goed beeld verkregen worden van de voorkeur voor de verschillende voedselbronnen binnen een maaltijd. Tot slot kan de inname uit verschillende voedselbronnen gecombineerd worden tot één voedselpatroon.

Wat zijn de voor- en nadelen van dit systeem?

Met ons automatisch voedselweegsysteem en lickometersysteem kan gedetailleerd zicht worden verkregen op de voedselpatronen van individuele dieren.



Afbeelding 4.

A. Veranderingen in voedselpatronen na injectie van AAV-NPY bij Wistar ratten. De kolommen laten een gemiddelde \pm SEM van 6 dieren zien.

B. In de PVN-groep komt de verhoging van voedselinname door het toegenomen aantal maaltijden.

C. In de laterale LH wordt die verhoging verklaard door een toename in maaltijdgrootte. [naar (6)].

leerd zicht worden verkregen op de voedselpatronen van individuele dieren. De nauwkeurigheid van het voedselweegsysteem is heel hoog (0,01 g). En de dataverwerking is relatief eenvoudig uit te voeren in Excel. In de macro's kunnen parameters als detectiegrens, intervalgrens en minimale maaltijdgrootte naar wens aangepast worden. Een ander groot voordeel is dat het bruikbaar is voor verschillende soorten voer, zoals bij een keuzedieet. Verder kan het systeem op meerdere typen kooien worden geplaatst en is dus erg flexibel te gebruiken in verschillende gedragsopstellingen. Het systeem kan onder andere gebruikt worden op kooien met een renwiel en kooien die voorzien zijn van een filtertop.

Omdat het systeem de data per tijdstip opslaat, kunnen gegevens over maaltijden gekoppeld worden aan een ander soort meetsysteem, zoals bijvoorbeeld telemetrie. Hiervoor krijgt een rat een transmitter in de buikholte die een signaal zendt naar een ontvanger die de lichaamstemperatuur en activiteit registreert. In Afbeelding 3b zijn telemetrie data te zien van het dier uit Afbeelding 3a. Door deze twee grafieken met elkaar te vergelijken worden zowel aspecten van energie-inname als -verbruik tegelijk bepaald. Hierin is o.a. te zien dat de lichaamstemperatuur na afloop van een maaltijd iets omhoog gaat. Daarnaast is met name in de lichtfase duidelijk een verhoogde activiteit te zien rondom de eetmomenten.

Een beperking van het systeem is dat we niet kunnen voorkomen dat er gruis uit de ruif valt tijdens

het eten. Dit gruis valt echter niet in de kooi en is handmatig te wegen waardoor hiervoor gecorrigeerd kan worden. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat bij gebruik van het vet-suikerrijk dieet stukjes bedding in het vet blijven plakken, waardoor het geregistreerde gewicht niet meer representatief is. Dit is echter slechts bij een enkel dier het geval. Tot slot registreert het lickometersysteem niet automatisch het exacte drinkvolume, maar moet het gemiddelde likvolume worden berekend.

Voorbeeld van behaalde resultaten met dit systeem

Zoals eerder vermeld is onze onderzoeksgroep specifiek geïnteresseerd in de rol van de hersenen in de regulatie van eetgedrag en energiebalans. Van het neuropeptide NPY, dat in de hypothalamus wordt afgegeven, was bekend dat het voedselinname stimuleert. Om te onderzoeken wat het effect is van NPY in specifieke delen van de hypothalamus hebben wij dit neuropeptide tot overexpressie gebracht met behulp van adeno-geassocieerde virussen (AAV) (6). Hierbij zagen wij dat zowel overexpressie in de paraventriculaire nucleus (PVN) als in de laterale hypothalamus (LH) leidde tot verhoogde voedselinname (Afb. 4a). Door gebruik te maken van ons automatische voedselweegsysteem hebben we echter kunnen laten zien dat de verhoging van voedselinname in de PVN veroorzaakt wordt door een toename in het aantal maaltijden (Afb. 4b), terwijl het in de LH verklaard wordt door een toename in de grootte van de maaltijden (Afb. 4c). Hetzelfde neuropeptide kan dus in verschillende hersengebieden leiden tot overconsumptie, maar via verschillende 'pathways' effect hebben op het eetpatroon.

Conclusie

Dankzij dit nieuwe weegsysteem is het onderzoek naar eetgedrag verfijnd. Het systeem kan gebruikt worden met zowel verschillende soorten kooien als voedselbronnen en de verkregen informatie over het eetpatroon kan gecombineerd worden met gegevens over activiteit en lichaamstemperatuur.

Literatuur

- 1 Stellar E (1954). *The physiology of motivation*. Psychol. Rev 61: 5-22
- 2 Adan RA, Vanderschuren LJ, la Fleur SE (2008). Anti-obesity drugs and neural circuits of feeding. *Trends in Pharmacol Sci* 29: 208-17
- 3 Grill HJ (2006). *Distributed neural control of energy balance: Contributions from hindbrain and hypothalamus*. Obesity 14(suppl 5): 216S-221S
- 4 Ulman E.A., Compton D., Kochanek J (2008). *Measuring Food and Water intake in Rats and Mice*. ALN magazine 10: 15-20
- 5 Prins AA, Stubbe JH (1986). *Daily Rhythms of feeding in genetically obese and lean Zucker rats*. Physiol Behav 38: 423-26
- 6 Tiesjema B, Adan RAH, Luijendijk MCM (2007). *Differential effects of recombinant adeno-associated virus-mediated neuropeptide Y overexpressie in the hypothalamic paraventricular nucleus and lateral hypothalamus on feeding behavior*. J. Neurosci 27: 14139-146