

# perfect quality in animal nutrition

For over 40 years Hope Farms has been the reliable choice of many laboratories in Europe. From now on the Hope Farms product range is marketed under the new brand name ab diets. The ab diets products range from conventionally clean and sterilizable diets to irradiated diets in small packs for isolators. Fixed formula are produced according to GMP+ and GLP standards with analysis on every batch.

Purified diets are one of our specialties. We develop any diet you need for your scientific research. ab diets is the best choice for small batches of 15 kg and fast delivery.

For more information please call:  
+31 (0)348 574766 or e-mail [info@abdiets.com](mailto:info@abdiets.com)

AB DIETS IS DISTRIBUTED BY ARIE BLOK BV  
P.O. BOX 30, 3440 AA WOERDEN · THE NETHERLANDS

*If reliability is important, there is only one option...*

**abdiets**  
animal nutrition



*Oost  
west  
thuis  
best*

## Geautomatiseerde observaties in de thuishooi als nieuwe methode voor gedragsonderzoek bij muizen

### Inleiding

**Oost west, thuis best. Zoals het klokje thuis tikt, tikt het nergens. Eigen haard is goud waard. Deze bekende en veelgebruikte spreekwoorden geven aan hoe belangrijk de thuisomgeving is voor mensen. Ons 'thuis' is wat we koesteren, waar we veiligheid en geborgenheid vinden. Maar de vanzelfsprekendheid waarmee mensen het belang van de thuisomgeving erkennen staat in schril contrast met de manier waarop laboratoriummuizen worden getest voor wetenschappelijk onderzoek.**

Muizen zijn veelgebruikte proefdieren voor het onderzoek naar de werking van de hersenen en de invloed van genen en de omgeving op gedrag. Dit komt mede door de mogelijkheid gebruik te maken van inteeltlijnen van dieren met dezelfde genetische achtergrond en van muizen waarbij een specifiek gen is veranderd. Voor het bestuderen van het gedrag van muizen is het gebruikelijk de dieren uit hun thuishooi te halen en voor een korte tijd in een testopstelling te plaatsen en te observeren. Uit de manier waarop de muis zich door de test beweegt, hoe snel hij de nieuwe omgeving ontdekt of hoe gemakkelijk hij een taak oplost, kunnen conclusies worden getrokken over de emotionele toestand en het leervermogen van de dieren. Gecombineerd met de kennis over de genetische achtergrond levert dit belangrijke nieuwe inzichten op over de rol van genen in het sturen van gedrag.

Home sweet home - Home cage testing for behaviour/phenotyping of mice.  
14 januari 2008, Utrecht.  
Samenvatting van het proefschrift van **Leonie Visser**



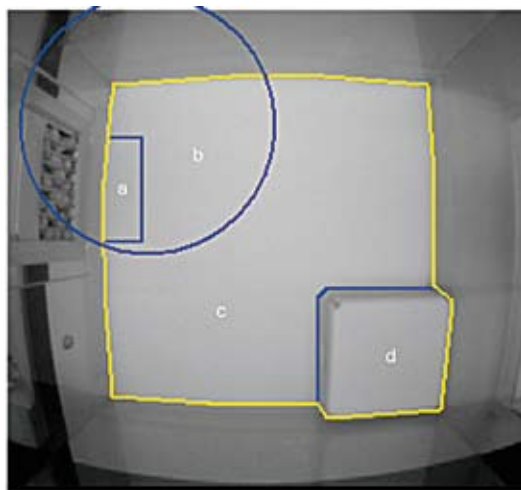
Testopstelling met de thuiskooien, duidelijk zichtbaar de lichtbundel gericht op de voerruif.

Er kleeft echter een aantal nadelen aan deze manier van onderzoek. De muizen leven het grootste gedeelte van de tijd in hun thuis-kooi, maar daar wordt hun gedrag meestal niet in detail bekeken. Aan-gezien muizen in het laboratorium model staan voor mensen, zou het logisch zijn om juist ook de thuisomgeving te betrekken bij de gedragsstudies. Dit is immers ook gangbaar in de psychologie, waar de manier waarop mensen zich gedragen als ze thuis zijn belangrijk is voor het stellen van diagnoses. Daarnaast brengt het uit de thuis-kooi halen

en verplaatsen van de dieren naar de testopstelling een bepaalde mate van stress met zich mee. De hoeveelheid stress die de dieren ervaren door deze procedure is lastig te meten, maar het is wel bekend dat dit het gedrag in de test beïnvloedt en daarmee de betrouwbaarheid van de testresultaten ondermijnt. Een ander nadeel is de korte tijdsduur van de meeste gangbare gedragstesten. Hierdoor worden belangrijke circadiane processen en langetermijn effecten niet meegenomen in de karakterisering van het gedrag.

**Dus daarom rijst de vraag: Waarom niet de test naar de muis brengen, in plaats van de muis naar de test? Het testen van muizen in de thuis-kooi heeft belangrijke voordelen ten opzichte van het testen van muizen in een aparte testopstelling, zoals nu gebruikelijk is.**

**Het gedrag van de muizen kan gedurende lange tijdsperioden worden geobserveerd en dit maakt het mogelijk het dag/nacht ritme in slapen, activiteit en eetgedrag te meten. Daarnaast kunnen niet alleen de kortetermijn effecten, maar ook de langetermijn effecten van experimentele handelingen worden onderzocht. Door het introduceren van 'stimuli', nieuwe elementen en gebeurtenissen, in de thuis-kooi kunnen verschillende gedragingen worden uitgelokt en bestudeerd. Een voorbeeld hiervan is het plotseling aanzetten van een felle lichtbundel wat de muis afschrikt. Hiermee kan de mate van angstigheid en aanpassingsvermogen van het dier aan nieuwe situaties worden bepaald.**



Door middel van een camera in de thuis-kooi en de daaraan verbonden computer kan de positie van de muis voortdurend berekend worden.

Om de invloed van onderzoekers op het gedrag van de muizen zo klein mogelijk te maken, is een thuis-kooi ontwikkeld waarin de muizen automatisch kunnen worden geobserveerd. Via een camera in het dak van de kooi kan met een computer de locatie van de muis in de kooi worden berekenend en in de tijd worden gevolgd. Uit de looppatronen van de muis kan vervolgens informatie worden gehaald over de tijd die de muis besteedt in verschillende delen van de kooi, bijvoorbeeld in zijn nest (shelter) of bij de voedselruif. Ook kunnen de 'stimuli', zoals de felle lichtbundel, automatisch worden aan- en uitgezet. Op deze manier kunnen de observaties 24 uur per dag, zeven dagen per week doorgaan zonder onderbrekingen. Dit is vooral een voordeel omdat muizen nachtdieren zijn en vooral actief zijn in de donkere periode van de dag.

Het doel van de experimenten die worden beschreven in dit proefschrift was het onderzoeken van zowel de mogelijkheden als de beperkingen van het testen van muizen in de thuis-kooi voor het bestuderen van gedrag. Hierbij is gebruik gemaakt van standaard-inteeltlijnen van muizen die veel gebruikt worden in gedragsonderzoek. Door muizen met verschillende genetische achtergronden te testen kon worden onderzocht wat het onderscheidend vermogen was van de thuis-kooimethode. Naast het meten van basaal gedrag in de thuis-kooi en dag/nacht ritmes is een specifieke test ontworpen voor het meten van angst. Tenslotte is ook bekeken hoe robuust de resultaten zijn die worden verkregen met de thuis-kooimethode. Hiervoor is hetzelfde experiment in twee verschillende laboratoria uitgevoerd en zijn de resultaten vergeleken en beoordeeld op overeenkomstigheid.

## Resultaten

### Het loopwiel als maat voor activiteit?

Voor het beschrijven van de mate van activiteit in de thuis-kooi kan worden gekozen voor verschillende meetmethoden. Het loopwiel wordt veel gebruikt in studies naar dag/nacht ritmes bij muizen. In deze studies wordt specifiek gekeken naar de afgelegde afstand in het loopwiel als maat voor activiteit. In dit proefschrift is een experiment beschreven (hoofdstuk 1) waarbij de activiteit in een loopwiel direct wordt vergeleken met 'normale' activiteit, gemeten als de tijd die de muis besteedt aan lopen door de kooi en de afgelegde afstand. De thuis-kooimethode heeft als voordeel dat beide vormen van activiteit simultaan gemeten kunnen worden door het integreren van een loopwiel in de kooi voor aanvang van de observaties. Muizen die over een loopwiel beschikten, waren meer actief dan muizen zonder loopwiel. Ook bleek uit het experiment dat de ritmiek van activiteit in het loopwiel afwijkt van de ritmiek van 'normale' activiteit en dat het loopwiel zelfs een verstoringseffect heeft op het gedrag van de muis in de thuis-kooi. Dit kan verklaard worden door resultaten uit

Een muis in een loopwiel.







Een C57BL/6-muis bij de voerruif.

andere onderzoeken waaruit de belonende waarde bleek van het rennen in een loopwiel. De belonende waarde zou het rennen zodanig aantrekkelijk maken dat het een zichzelf versterkend gedrag is. Uit het experiment kon worden geconcludeerd dat het loopwiel niet geschikt is voor het meten van basale activiteit in de thuishooi, maar dat daarvoor beter de 'normale' activiteit gebruikt kan worden.

De versturende eigenschappen van het loopwiel maken het bovendien minder geschikt als kooiverrijking. In een vervolgonderzoek (hoofdstuk 3) werd onderzocht of het loopwiel juist gebruikt kan worden als methode om de beloningsgevoeligheid van muizen te testen.

Het bleek dat muizen van twee verschillende inteeltlijnen, C57BL/6 en DBA/2, sterk verschilden in de hoeveelheid tijd die ze doorbrachten in het loopwiel. De DBA/2-muizen bleken gevoeliger voor het loopwiel; ze brachten er meer tijd in door dan C57BL/6-muizen, maar raakten ook meer verstoord in de ritmiek van hun gedrag door de aanwezigheid van het loopwiel.

Bovendien waren bij de DBA/2-muizen blijvende veranderingen te zien in gedrag na het weghalen van het loopwiel. Op basis van dit experiment kon worden gesteld dat het loopwiel in de thuishooi als een test gebruikt kan worden voor het meten van de gevoeligheid voor beloning en verstoring van gedrag.

### Onderscheidend vermogen van meten in de thuishooi

Bij het onderzoeken van de mogelijkheden van de thuishooimethode was het van belang om het onderscheidend vermogen te bepalen. Hiertoe werden vier veelgebruikte inteeltlijnen, C57BL/6, DBA/2, C3H en 129S2/Sv-muizen, gedurende zes dagen in de thuishooi geobserveerd om de verschillen in gedrag tussen de lijnen te analyseren (hoofdstuk 2). Hierbij werden de muizen op de eerste dag naïef geïntroduceerd in de thuishooi, zodat zowel naar gedrag in een nieuwe omgeving als naar basaal gedrag in een bekende omgeving gekeken kon worden. Het bleek dat er duidelijke verschillen waren in de mate van activiteit en het dag/nacht ritme. Bovendien verschilden de muizen in de snelheid van habituatie aan de nieuwe thuishooi-omgeving. Binnen vijf dagen waren alle muizen aangepast en kon worden gesproken van basaal gedrag.

De dissociatie tussen gedrag geïnduceerd door de nieuwe omgeving en basaal gedrag in de bekende omgeving werd verder aangetoond door vergelijking van gedrag in de thuishooi met gedrag in twee bestaande testen; het open veld en de 'elevated plus maze'. Er werden positieve correlaties gevonden tussen de mate van activiteit in het open veld en in de thuishooi, maar alleen voor het eerste uur na introductie in de thuishooi. Ook werden correlaties gevonden tussen mate van angstigheid in de 'elevated plus maze' en de snelheid van lopen en tijd doorgebracht op de shelter in de thuishooi. Ook hier beperkten de correlaties zich tot het eerste uur na introductie in de thuishooi. Uit de resultaten bleek dat in de thuishooi een duidelijk onderscheid gemaakt kon worden tussen het gedrag voor en na habituatie aan de omgeving.

Ook bleek dat bepaalde parameters gemeten in de thuishooi vóór habituatie wellicht representatief zijn voor een bepaalde mate van angstigheid. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

### Effect van stress op gedrag in de thuishooi

Stress kan een belangrijke oorzaak zijn van het ontstaan van gedragsstoornissen bij de mens. Een van de symptomen van stress is een ontregeld dag/nacht ritme en toe- of afname in activiteit. In studies bij muizen wordt veel gekeken naar de effecten van stress op gedrag, maar niet in de thuishooi. In dit proefschrift is een experiment uitgevoerd waarbij de effecten werden gemeten van herhaalde blootstelling aan een stressvolle situatie op dag/nacht ritme en activiteit in de thuishooi. Hiertoe werden muizen herhaaldelijk uit



De PhenoTyper, de thuishooi van deze muis.

hun thuis-kooi gehaald en naar een andere kamer gebracht waarbij ze werden blootgesteld aan een rat, zonder fysiek contact. Vervolgens werden zij weer terug gezet in de thuis-kooi. Het bleek dat de muizen die herhaald werden blootgesteld aan deze stressvolle situatie, een verminderde activiteit vertoonden ten opzichte van controledieren. Ook was de ritmiek van activiteit gedurende de donkerperiode anders dan bij controledieren. Een verklaring voor deze resultaten kan zijn, dat de onbeschermde omgeving van de thuis-kooi als minder veilig werd ervaren en de dieren zich daarom zoveel mogelijk terugtrokken in de shelter. Het meten van de effecten van stress op het gedrag in de thuis-kooi levert een belangrijke bijdrage aan de resultaten verkregen met bestaande gedragstesten.

### Testen van angst in de thuis-kooi

Om de mogelijkheden van de thuis-kooimethode uit te breiden werd een specifieke test ontwikkeld om in de thuis-kooi naar angstgerelateerd gedrag te kijken (hoofdstuk 5). Angst is een belangrijke emotie die zorgt voor een waarschuwingssignaal in potentieel gevaarlijke situaties. Maar overmatige angst kan bij mensen leiden tot gedragsstoornissen. Op dit moment is veel gedragsonderzoek bij muizen gericht op het achterhalen hoe angst wordt gereguleerd door de genen en welke therapieën succesvol kunnen zijn. In de thuis-kooimethode wordt op een andere manier naar angst bij muizen gekeken dan gebruikelijk.

In plaats van het dier in een testopstelling te plaatsen waar wordt gekeken hoe hij de nieuwe omgeving exploreert, is een test ontwikkeld waarbij na een aantal dagen een felle lichtbundel automatisch aangaat. Deze lichtbundel staat gericht op de voedselruif, een plek waar de dieren veel tijd doorbrengen als het donker is. Muizen vermijden van nature fel licht en er ontstaat op deze manier een conflict tussen vermijden van de voedselruif door de aversieve lichtstimulus en het willen naderen van de voedselruif door honger.

Twee inteeltlijnen, C57BL/6 en DBA/2, werden getest op hun gedragsrespons op de lichtstimulus door het licht gedurende de eerste drie uur van de donkerperiode aan te zetten. Het bleek dat C57BL/6-muizen minder tijd doorbrachten bij de voedselruif gedurende het eerste uur dat de lichtstimulus aan was, dan DBA/2-muizen. Het belangrijke van deze test in combinatie met de thuis-kooimethode is dat er zowel naar de acute reactie kon worden gekeken op het moment dat de lichtstimulus aangaat, maar ook naar langetermijn effecten. Zo kon een duidelijke habituatie aan het licht worden gezien, gemeten als een afname in de vermindering van de voedselruif gedurende de tijd dat de lichtstimulus aan was. Het bleek dat bij C57BL/6-muizen 24 uur later nog steeds een vermindering werd gevonden in de tijd die werd doorgebracht bij de voedselruif, een effect dat toegeschreven kan worden aan de lichtstimulus.

Toediening van klinisch effectieve anxiolytische stof (diazepam) en een anxiogene stof (FG7142) toonden ten dele aan dat de reactie op de lichtbundel inderdaad kan worden geïnterpreteerd als angst. Dit ondersteunt het gebruik van de lichtstimulus in de thuis-kooi als angsttest. Wel moeten de farmacologische validatie worden uitgebreid om met zekerheid vast te stellen dat angst wordt gemeten en om te specificiteit van de respons te bepalen. Dit is een aanbeveling voor vervolgonderzoek.

### Reproduceerbaarheid van de resultaten

Het laatste experiment in dit proefschrift betreft een vergelijking van de resultaten verkregen met de thuis-kooimethode in twee verschillende laboratoria; Utrecht en Aberdeen (hoofdstuk 6).

Gedrag is gevoelig voor veel factoren die soms moeilijk controleer- of meetbaar zijn. Bijvoorbeeld de laboratoriumomgeving, licht, temperatuur, aanwezigheid van mensen, maar ook gebeurtenissen tijdens de ontwikkeling van de dieren, zoals het transport van de fokker naar het laboratorium, kunnen effect hebben op het gedrag dat uiteindelijk in een test wordt gemeten. Dit is mede de oorzaak van vele tegenstrijdige resultaten die in de literatuur worden gerapporteerd. Met de thuis-kooimethode kunnen een klein aantal van deze factoren worden vermeden, zo is er geen aanwezigheid van mensen nodig tijdens het testen en is de testopstelling gestandaardiseerd.

In het laboratorium in Utrecht en in Aberdeen werd hetzelfde experiment uitgevoerd om de reproduceerbaarheid van de resultaten te beoordelen. Muizen van de C57BL/6- en DBA/2-inteeltlijn werden gedurende zes dagen in de thuis-kooi geobserveerd waarbij op dag vijf de angsttest met lichtstimulus werd uitgevoerd. Het bleek dat met name de basale activiteitspatronen in de thuis-kooi goed overeenkwamen tussen beide labs.

Echter, de reactie op de angsttest was erg verschillend. In Utrecht waren de C57BL/6-muizen angstiger dan de DBA/2-muizen, terwijl dit in Aberdeen omgekeerd was. Hieruit kon worden geconcludeerd dat de thuis-kooimethode, net als andere testen, gevoelig is voor externe factoren en gebeurtenissen tijdens de ontwikkeling die het gedrag van muizen beïnvloeden. Wel bleek uit dit experiment een goede reproduceerbaarheid binnen het laboratorium in Utrecht van de resultaten verkregen uit de angsttest in de thuis-kooi.

### Conclusies

**Het automatisch observeren van muizen in de thuis-kooi levert een belangrijke bijdrage aan onderzoek naar de regulatie van gedrag. Met de thuis-kooimethode is het goed mogelijk om dag/nacht ritmes in activiteit gedetailleerd te meten en langetermijn effecten van experimentele manipulaties te analyseren. Bovendien heeft deze methode de potentie om ontregeling van gedrag en gedragsstoornissen te onderzoeken. Wel moet worden gerealiseerd dat het analyseren van de grote hoeveelheden data veel tijd in beslag neemt en dat het tot nu toe niet mogelijk is om meerdere dieren in een kooi te huisvesten.**

**Toekomstig onderzoek zal zich dan ook moeten richten op het verder valideren van methode, en dan met name de specifieke gedragstesten zoals angsttest, met farmacologische stoffen. Ook is het aan te bevelen de mogelijkheden van de thuis-kooimethode uit te breiden door het ontwikkelen en valideren van cognitieve testen.**