

Nederlandse samenvatting

Programmering van energiebalans tijdens de ontwikkeling

In dit proefschrift wordt onderzoek beschreven naar ondervoeding tijdens de ontwikkeling en de korte- en lange termijneffecten daarvan op energiebalans. Dit is bestudeerd door ratten op te laten groeien in een nest met een verhoogd aantal pups: een diermodel voor vroeg-postnatale voedselrestrictie.

In het inleidende **Hoofdstuk 1** is de nodige achtergrondinformatie over de regulatie van energiebalans en over het concept '*developmental programming*' geïntroduceerd. Dit concept houdt in dat eigenschappen van de omgeving in de vroege ontwikkeling permanente veranderingen in de fysiologie kunnen veroorzaken. Deze plasticiteit tijdens de ontwikkeling biedt niet alleen een verklaring voor de spreiding van chronische ziekten in menselijke populaties, maar is in de eerste plaats een ontwikkelingsbiologisch proces waardoor organismen hun fenotype kunnen aanpassen aan hun omgeving. Als deze omgeving aanzienlijke veranderingen ondergaat tijdens het leven van het organisme, kan het zijn dat deze aanpassingen nadelig uitpakken en daardoor chronische ziekten veroorzaken.

Enkele van de eigenschappen waarvan gedacht wordt dat ze 'geprogrammeerd' kunnen worden door vroege omgevingsfactoren zijn de hoeveelheid lichaamsvet en de aanleg voor overgewicht en obesitas (en wel in een ongunstige richting in mensen met afwijkende perinatale voeding). Overgewicht en obesitas ontstaan door langere perioden van positieve energiebalans; wanneer de voedselinname het energiegebruik overstijgt en het teveel aan energie opgeslagen wordt als lichaamsvet. In de hersenen speelt de hypothalamus een belangrijke rol bij de regulatie van energie-inname en -gebruik. Leptine, een hormoon dat door vetweefsel geproduceerd en afgegeven wordt, speelt niet alleen een belangrijke rol bij de regulatie van deze energiebalans, maar ook bij de ontwikkeling van de neuronale verbindingen binnen de hypothalamus. Om deze redenen concentreert het onderzoek naar programmering van energiebalans zich op drie soorten metingen: lichaamssamenstelling-parameters (bv lichaamsgewicht, BMI), energie-inname en -gebruik, en indicatoren van het functioneren van de hypothalamus. Talrijke studies hebben langdurige veranderingen in deze parameters gerapporteerd, zowel bij mensen als bij proefdieren. Hoewel veel van deze effecten tot lang na de periode van plasticiteit aanhouden, varieert de duur en ook de richting van de effecten aanzienlijk tussen veel studies. Deze verschillen laten zien hoe belangrijk het is om een consistente methodologie te gebruiken en om meerdere parameters te meten binnen een en dezelfde groep.

In **Hoofdstuk 2** zijn de doelen en opzet van het onderzoek en de gebruikte methodes uiteengezet. Om te onderzoeken of de hoeveelheid voeding vroeg in het leven de energiebalans kan programmeren, hebben we vroeg-postnatale ondervoeding geïnduceerd

door ratten op te laten groeien in grote nesten van 20 jongen. Ratten die opgroeiden in nesten met 10 jongen (voor de rat een normale nestgrootte) werden gebruikt als controledieren. Vanaf het moment dat de jongen op dag 25 gespeend werden, hadden alle dieren onbeperkt voer en water tot hun beschikking. Om programmeringseffecten op energiebalans te onderzoeken, hebben we op meerdere leeftijden metingen verricht in de drie genoemde categorieën (lichaamsafmetingen, energiebalans en de hypothalamische regulatie) in voedselrestrictie- (FR, food-restricted) en controleratten. In het hoofdstuk worden de daarvoor gebruikte technieken kort beschreven en wijden we uit over onze redenen om de 'FR rat' te gebruiken als model voor programmering. In de volgende vier hoofdstukken komen de experimenten en hun resultaten aan de orde. Hier worden deze hoofdstukken besproken aan de hand van de soort metingen in de studies.

In **Hoofdstuk 3** zijn de groeipatronen en lichaamsdimensies van FR- en controledieren beschreven. Deze parameters geven informatie over de effecten van vroeg-postnatale voedselrestrictie op de lichaamssamenstelling. Hierdoor komen we indirect meer te weten over de effecten op de energiebalans. Bovendien geven ze een beeld van het algemene fenotype van ratten die aan dit model blootgesteld worden.

Direct nadat de dieren in controle- en grote nesten ingedeeld waren, daalde de groeisnelheid van de FR jongen sterk. Hierdoor waren hun lichaamsgewicht, lichaams-, staart-, totale lengte en body mass index (BMI, een maat voor 'gewicht voor lengte') significant lager dan die van controledieren. Met een dieptepunt van maar 65% van controlewaarden op dag 21 was lichaamsgewicht de sterkst aangedane parameter. Nadat de dieren gespeend waren (en allemaal onbeperkt konden eten), lieten de FR ratten gedeeltelijke inhaal groei zien, die aanhield tot rond dag 70. Op dat moment wogen de FR dieren bijna 90% van het gewicht van controles. Na dag 70 bleef deze waarde stabiel tot het einde van het experiment, op de leeftijd van een jaar. Hoewel de andere lichaamsafmetingen stabiliseerden tussen de 95% en 97% van die van controledieren, bleven ze tot het einde van het experiment allemaal significant lager dan in controledieren.

Op alle vier de leeftijden dat de leptineconcentratie in serum gemeten werd, was die significant lager bij FR ratten dan bij controledieren. Op dag 10 (na ongeveer een week voedselrestrictie) was de leptineconcentratie van FR serum maar 20% van die van controledieren. Bij het spenen op dag 25 was dit toegenomen tot meer dan 60%. Jongvolwassen FR dieren lieten verder herstel zien tot ongeveer 80%, waarna ze stabiliseerden op dit niveau. Het leptinegehalte is een indirecte maat voor de vetmassa van de dieren. Ook de BMI (gewicht onafhankelijk van lengte) wordt vaak gebruikt om de lichaamssamenstelling te schatten. De blijvende effecten op beide parameters in deze studie suggereren dus dat vroeg-postnatale voedselrestrictie bij ratten een slank en mager fenotype programmeert.

Om de effecten van vroeg-postnatale voedselrestrictie op energiebalans op een directere manier te bestuderen, werden energie-inname en -gebruik gemeten. De energie-inname werd berekend uit de dagelijkse (24 uren-) voedselinname, terwijl het energiegebruik in rust (overdag, want ratten zijn vooral in het donker actief) gemeten werd met indirecte calorimetrie.

In **Hoofdstuk 3** werd de voerinnname per kooi door het leven heen op regelmatige basis bepaald: van het moment van spenen tot het einde van het experiment op de leeftijd van een jaar. De totale energie-inname over deze periode was significant lager in FR dieren, bij zowel mannetjes als vrouwtjes. De energie-inname werd ook geanalyseerd na correctie voor lichaamsgrootte, omdat de energiebehoefte hiermee samenhangt. Na correctie voor lichaamsgewicht was de inname in pasgespeende mannelijke FR ratten juist hoger dan in controledieren. Dit verschil werd niet gevonden in oudere mannetjes en in vrouwtjes. Hoewel de absolute hoeveelheid voedsel die FR dieren consumeren dus verlaagd is, suggereren deze resultaten dat deze hoeveelheid meestal passend is voor hun lichaamsgrootte. De verhoogde relatieve inname in jonge FR mannetjes kan mogelijk hebben bijgedragen aan de inhaalgroei die ze in deze periode lieten zien. Omdat inhaalgroei ook in de vrouwtjes optrad, en bovendien veel langer aanhield dan deze verhoging in relatieve voedselinname, moet er nog een andere manier zijn waarop de FR ratten hun groei weten te versnellen. Dit is ook te zien aan het feit dat de efficiëntie waarmee de dieren hun voedsel in groei omzetten in de FR ratten verhoogd was tussen spenen en 10 weken, de periode waarin de inhaalgroei plaatsvond. Als er nu een groter gedeelte van de beschikbare energie in groei geïnvesteerd wordt, lijkt het aannemelijk dat er minder energie beschikbaar zal zijn voor andere processen, zoals reproductie en activiteit, wat een nadelig effect op deze processen zou kunnen hebben.

In **Hoofdstuk 4** werd op twee tijdstippen de individuele voedselinname van volwassen mannetjesratten bepaald. Net als bij de metingen per kooi was hier de inname van FR dieren lager. Na correctie voor de lichaamssamenstelling (BMI of een schatting van de vetvrije massa) bleef dit verschil bestaan. De vetvrije massa wordt over het algemeen beschouwd als een betere parameter om de energiebehoefte te corrigeren dan het lichaamsgewicht (dat in Hoofdstuk 3 gebruikt werd als correctiefactor). Daarom suggereren deze resultaten dat de voedselinname van volwassen FR ratten op een lager niveau geprogrammeerd is dan men op basis van hun lichaamsgrootte zou verwachten.

Hoofdstuk 4 beschrijft ook het individuele energiegebruik in rust van dezelfde volwassen mannetjes. Dit was op beide leeftijden lager in de FR ratten dan in de controledieren, maar dit verschil verdween na correctie voor de lichaamssamenstelling (BMI of een schatting van de vetvrije massa). Deze uitkomsten suggereren dat de volwassen grootte als bepalende factor voor het energiegebruik belangrijker is dan de neonatale voeding. Daarom lijkt het energiegebruik in rust, in tegenstelling tot de voedselinname, niet geprogrammeerd te zijn in deze ratten. Het verschil tussen de inname en het gebruik in rust, oftewel de energie die

overblijft voor activiteit, was onafhankelijk van de lichaamssamenstelling en was significant lager in de FR mannen.

De tot nu toe besproken data hebben laten zien dat door het opgroeien in een groot nest zowel de lichaamsdimensies als de energiebalans van ratten langdurig kunnen veranderen. Daarom werd gehypothetiseerd dat ook de regulatie van de energiebalans door de hypothalamus veranderd zou zijn in de FR ratten.

Bij deze regulatie zijn twee belangrijke soorten neuropeptiden betrokken: orexigene en anorexigene peptiden. Het eerste type stimuleert eten en bevordert de opslag van energie; het tweede type zorgt voor remming van eetgedrag en een negatievere energiebalans. De nucleus arcuatus (ARC), een kern in de hypothalamus, produceert zowel de orexigene eiwitten neuropeptide Y (NPY) en agouti-gerelateerd peptide (AgRP) als de anorexigene eiwitten α -melanocyt-stimulerend hormoon (α -MSH) en cocaïne- en amfetamine-gereguleerd transcript (CART). Twee andere kernen, de paraventriculaire nucleus (PVN) en de laterale hypothalamus (LHA), produceren respectievelijk de anorexigene eiwitten corticotropine-vrijmakend hormoon (CRH) en thyrotropine-vrijmakend hormoon (TRH) en de orexigene eiwitten melanine-concentrerend hormoon (MCH) en orexine (ORX). In **Hoofdstuk 5** is met kwantitatieve reverse transcriptie polymerase-kettingreactie (qRT-PCR) de genexpressie gemeten van NPY, AgRP, pro-opiomelanocortine (POMC, het voorlopereiwit voor α -MSH) en CART in de ARC, CRH en TRH in de PVN; en MCH en ORX in de LHA van mannelijke en vrouwelijke FR- en controleratten op neonatale leeftijd, bij het spenen en op middelbare leeftijd. In **Hoofdstuk 6** is de genexpressie van NPY en POMC in de ARC van jongvolwassen mannelijke FR- en controleratten onderzocht met *in situ* hybridisatie.

Op alledrie de leeftijden dat deze met qRT-PCR gemeten is (neonataal op dag 10, speenleeftijd op dag 25 en middelbare leeftijd rond dag 380) was de CART expressie in de ARC significant verlaagd in de FR ratten. Op middelbare leeftijd was ook de expressie van POMC, het andere anorexigene eiwit in de ARC, verlaagd. Expressie van de orexigene ARC eiwitten NPY en AgRP verschilde op geen van de drie leeftijden tussen beide groepen. In de jongvolwassen mannen (van rond dag 77) was de NPY expressie significant hoger in de FR groep, terwijl er in de expressie van POMC geen verschil was. Van de vier peptiden die op dag 10, 25 en 380 in de PVN en LHA gemeten werden, was alleen de expressie van MCH significant verhoogd in neonatale FR ratten.

We hebben de verhouding tussen orexigene en anorexigene expressie in de ARC berekend als het gemiddelde van de expressie van NPY {en AgRP*} gedeeld door die van POMC {en CART*}. Deze verhouding was tijdelijk veranderd in de FR ratten met significant hogere waarden op dag 10 en 25 en rond dag 77. In de FR ratten van middelbare leeftijd was de balans tussen de orexigene en anorexigene expressie weer genormaliseerd.

* AgRP en CART: expressie van deze peptiden was geïncubeerd op dag 10, 25 en 380 (qRT-PCR in Hoofdstuk 5), maar waren niet beschikbaar op dag 77 (*in situ* hybridisatie in Hoofdstuk 6).

In het laatste hoofdstuk, **Hoofdstuk 7**, zijn de resultaten van de voorgaande hoofdstukken bijeengebracht en bediscussieerd. De resultaten van de drie verschillende soorten metingen (lichaamsdimensies, energiebalans en hypothalamische neuropeptiden) kunnen goed met elkaar vergeleken worden, omdat alle dieren in hetzelfde experiment zaten en daardoor onder vergelijkbare omstandigheden geleefd hebben. Vroeg-postnatale ondervoeding had vrijwel dezelfde effecten op mannelijke en vrouwelijke dieren. FR ratten:

- 1) waren blijvend lichter, korter en slanker dan controleratten;
- 2a) hadden door het hele leven heen een lagere voedselinname,
- 2b) met op volwassen leeftijd een energiegebruik in rust dat passend was voor hun kleinere lichaam,
- 2c) zodat er minder energie overbleef voor activiteit;
- 3a) hadden op jonge leeftijd een verhoogde ratio van orexigene/anorexigene genexpressie,
- 3b) die in het volwassen leven normaliseerde (tussen dag 77 en dag 380).

Parameters uit alledrie de categorieën ondergingen dus veranderingen die bleven bestaan tot lang nadat de originele stimulus (voedselrestrictie tot de speenleeftijd) weggenomen was. Om vast te stellen of '*developmental programming*' is opgetreden, is het essentieel dat tijdens een periode van plasticiteit een voorbijgaande stimulus blijvende of langdurige veranderingen veroorzaakt. Daarom kunnen we uit deze resultaten concluderen dat het laten opgroeien van ratten in vergrote nesten daadwerkelijk programmering van de energiebalans heeft geïnduceerd.

In de rest van het hoofdstuk is gespeculeerd over de implicaties en bredere betekenis van de uitkomsten van het onderzoek; over de mogelijke mechanismen die aan programmering ten grondslag liggen, de relevantie van onze resultaten voor de situatie bij de mens en over eventuele vervolggexperimenten die het fenotype van de FR rat verder zouden kunnen karakteriseren en verklaren. Om het slanke fenotype van de volwassen FR rat te rijmen met de genormaliseerde ratio van orexigene/anorexigene genexpressie in de ARC zullen we op zoek moeten naar meer permanente veranderingen in de hypothalamus (naast die in POMC en CART genexpressie in de ARC), maar ook in andere onderdelen van het complexe systeem dat de energiebalans reguleert. De leptinegevoeligheid van FR dieren is hierbij een belangrijke kandidaat voor verder onderzoek.

Met dit onderzoek hebben we laten zien dat vroege manipulaties in de voeding permanente effecten kunnen hebben op de energiebalans van de rat en de homeostatische regulatie daarvan. Als we deze uitkomsten naar de mens extrapoleren, lijkt het aannemelijk dat een (tijdelijke) toename van orexigene signalen op z'n minst een gedeeltelijke verklaring kan geven voor het verhoogde risico op obesitas in mensen die perinataal ondervoed zijn geweest. Voor de toekomst biedt dit diemodel nog ruimschoots mogelijkheden om de onderliggende mechanismen van programmering van energiebalans verder te bestuderen.