



# Meten van ruimtelijk leren en geheugen van varkens in de halebordtaak

Elise T. Gieling<sup>1</sup>, Rebecca E. Nordquist<sup>1</sup>, Janneke Arts<sup>2</sup>, F. Josef van der Staay<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Emotie & Cognitie Groep, Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren, <sup>2</sup>Departement Dier in Wetenschap & Maatschappij, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht







## Varkens en neurowetenschappelijk onderzoek

GEDurende de laatste 100 jaar hebben onderzoekers aangetoond dat een aantal diersoorten, waaronder het varken, opmerkelijke cognitieve vaardigheden bezit (3). In de preklinische neurowetenschappen wordt onderzoek van oudsher vooral met knaagdieren uitgevoerd en in veel mindere mate met fylogenetisch 'hogere' diersoorten – d.w.z. soorten die nauwer verwant zijn aan de mens – zoals primaten, die van bijzonder belang worden geacht voor neurobiologisch onderzoek ten behoeve van de mens (7). Net als de mens hebben hogere diersoorten zoals bijv. het varken, de hond en de kat complexe hersenen, met een hersenschors die wordt gekenmerkt door gyri (windingen of verhogingen) en sulci (groeven) (Afb. 1) terwijl de hersenen van bv. knaagdieren een glad oppervlak vertonen.

Wanneer we m.b.v. dierexperimenteel onderzoek verkregen resultaten naar de mens willen vertalen, is het noodzakelijk voor iedere wetenschappelijke vraagstelling het meest relevante diermodel te selecteren (6). Voordat een potentieel nieuw geneesmiddel klinisch op proefpersonen en patiënten kan worden getest moet in tenminste twee verschillende diersoorten zijn aangetoond dat het teratologisch (met betrekking tot misvormingen in de ontwikkeling van de baby) en toxicologisch (met betrekking tot de giftigheid) geen bedreiging voor de gezondheid oplevert (2). Bovendien kan bevestiging van de werkzaamheid in een tweede diersoort het proces van toelating als nieuw geneesmiddel bespoedigen (2). De eerst gebruikte diersoort is meestal een knaagdier, vaak de muis. Als tweede diersoort zou het varken kunnen worden gekozen, vanwege zijn grotere genetische, fysiologische en anatomische gelijkenis met de mens. »



Afbeelding 1.

| Species |   | Gewicht hersenen   | Gyri en sulci |
|---------|---|--|---------------|
| Mens    |  | ≈ 1300–1400 g  | Gyrencefaal   |
| Varken  |  | ≈ 80–180 g (grote variatie tussen lijnen)                | Gyrencefaal   |
| Hond    |  | ≈ 70–130 g (grote variatie tussen rassen; Beagle ≈ 72 g) | Gyrencefaal   |
| Kat     |  | ≈ 30 g   | Gyrencefaal   |
| Rat     |  | ≈ 2 g  | Lissancefaal  |
| Muis    |  | ≈ 0.5 g  | Lissancefaal  |

Afbeelding 1. Gewicht van de hersenen van volwassen mensen, varkens, honden, katten, ratten en muizen. Bij varkens en honden is de variatie erg groot als gevolg van het fokken op uiterlijke kenmerken zoals lichaamsgrootte. De hersenen zijn op schaal weergegeven (originele afbeeldingen in Major National Resources for Studying Brain Anatomy van de University of Wisconsin, Michigan State University, en het National Museum of Health and Medicine; zie: <http://www.brainmuseum.org/index.html>). Gyrencefale dieren hebben ronde verhogingen of krommingen (de gyri) en groeven (de sulci) op het oppervlak van de grote hersenen. Het oppervlak van de hersenen van lissancefale dieren, bijv. ratten en muizen daarentegen is glad.

## Waarom het varken?

Varkens worden over het algemeen als intelligente diersoort gezien, zowel door wetenschappers als door de maatschappij. Misschien komt dit omdat ze net zoals honden goed trainbaar zijn. We weten dat varkens m.b.v. klassieke (denk aan de hond van Pavlov) en operante ('trial en error') conditioneringstechnieken kunnen worden getraind. Echter, er zijn op dit moment weinig goed gevalideerde testprocedures die volgens een standaardprotocol kunnen worden ingezet voor het onderzoek naar de cognitieve vaardigheden van varkens (5), terwijl werken met varkens binnen neurobiologisch onderzoek in opkomst is. In de praktijk blijkt het trainen van varkens soms tijdrovend te zijn. Omdat veel leer- en geheugen experimenten nooit eerder zijn uitgevoerd met varkens is het vooraf moeilijk om in te schatten hoe de dieren zullen reageren en of ze gemotiveerd zijn om mee te werken. Daarnaast moeten varkens leren individueel te presteren in een testopstelling. De habituatieperiode is beduidend langer dan bij knaagdieren, omdat varkens na het scheiden van de groep een sterke stressreactie vertonen en niet getraind kunnen worden voordat ze aan de testsituatie gewend zijn. Wanneer de varkens voldoende gehabitueerd zijn en ze tijdens de test d.m.v. positieve bekrachtiging worden beloond werken ze graag mee. Wanneer de dieren flink in gewicht toenemen wordt het hanteren echter weer wat lastiger en de apparatuur dient 'varkens-proof' te zijn.

## Het cognitieve varkensholeboard

Ons doel is de wetenschap te voorzien van een voor varkens geschikte test naar cognitieve vaardigheden (o.a. leervermogen en geheugen). We hebben ervoor gekozen om de holeboard- taak verder uit te werken (voor een recent overzicht zie: 8) en deze aan te passen aan de soortspecifieke gedragingen van het varken (1, 5) Het holeboardapparaat bestaat meestal uit een vierkante arena (een 'open veld'), waarin op een aantal locaties voer kan worden gevonden (Afb. 2 en 3 C,D). Voor knaagdieren zijn dat vaak gaten in de vloer van de arena. Niet alle locaties zijn voorzien van voer; alleen in een onderverzameling van alle mogelijke vindplaatsen kan voer worden gevonden. In de holeboardtaak worden altijd dezelfde locaties voorzien van voer. Het varken moet dus twee dingen leren en onthouden:

Waar ligt de beloning? Het varken moet onderscheid maken tussen de wel en niet beloonde locaties. De informatie over de locatie van de beloonde en niet beloonde gaten is voor alle testen van belang en wordt in het referentiegeheugen, een soort lange termijn geheugen, opgeslagen. Voor het bepalen van het referentiegeheugen wordt vaak de formule toegepast (8): aantal bezoeken aan de beloonde set van 'holes', gedeeld door het totale aantal bezochte 'holes'.

Welke beloningen zijn al gevonden? Binnen een test moet het varken onthouden waar het de beloning al heeft opgehaald. Immers, terugkeren naar eerder bezochte gaten heeft geen zin. Deze informatie is alleen van belang binnen een lopende test en wordt in het werkgeheugen, een soort korte termijn geheugen, opgeslagen. Voor het bepalen van het werkgeheugen wordt vaak de formule toegepast (8): aantal beloonde bezoeken, gedeeld door het totale aantal bezoeken aan 'holes' met beloning.

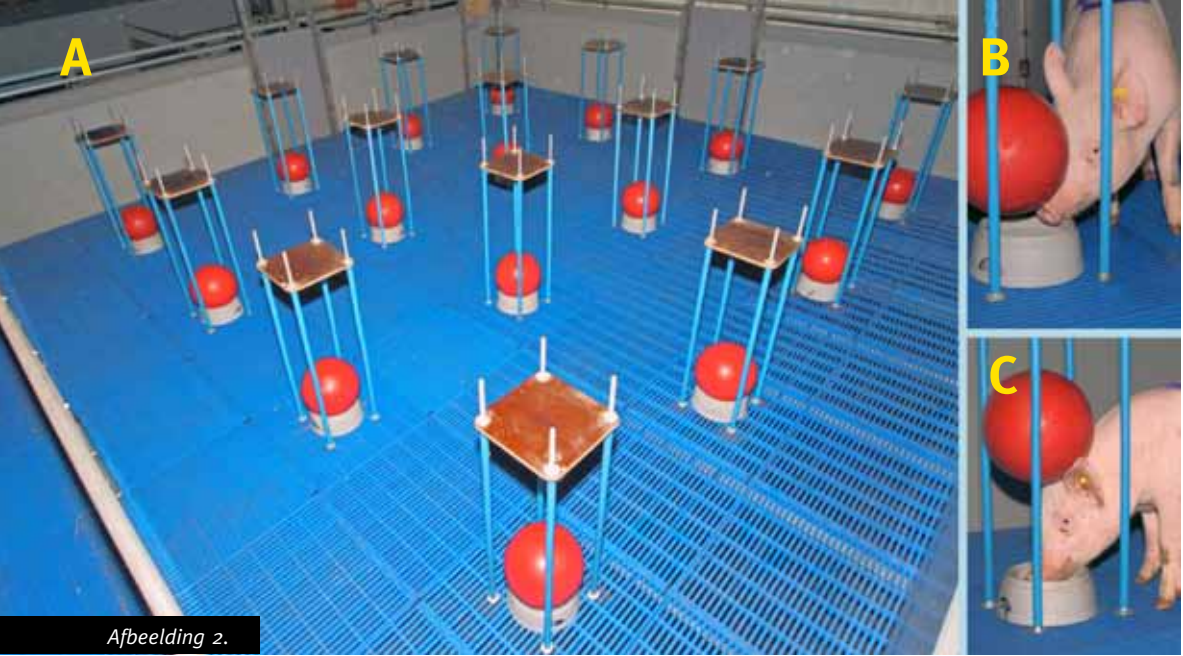
Zowel de maat voor het referentiegeheugen als ook voor het werkgeheugen bereikt de waarde 1 bij maximale prestatie, d.w.z. wanneer het varken foutloos alle beloningen ophaalt.

Twee studies waarin het holeboard leren van vleesvarkens werd bestudeerd zijn tot nu toe gepubliceerd. In Afbeelding 3 zijn de leercurves over de eerste 25 testen voor het werk- en referentiegeheugen, berekend met behulp van bovenstaande formules, uit deze twee studies naast elkaar gezet. De twee studies gebruikten verschillende holeboardapparaten. Ook het ontwerp van de 'holes' was verschillend.

In het onderzoek van Arts *et al.* (1) dienden emmers als 'holes'. Deze emmers waren voorzien van een dubbele geperforeerde bodem met in elke emmer een onbereikbare beloning (chocoladerozijn). De varkens werden getraind door ze eerst in tweetallen in het holeboard te laten zoeken (om de associatie met sociale isolatie tegen te gaan). Begonnen werd met een beloning in elke emmer. Vervolgens werden de dieren individueel verder getraind, en werd het aantal beloningen gereduceerd tot vier (bereikbare) beloningen in zestien emmers.

In het onderzoek van Gieling *et al.* (5) werd een nieuw ontwerp (Afb. 2 B,C) toegepast, dat de automatische registratie van bezoeken aan 'holes' mogelijk maakt. Ook hier werd de geur van de beloningen gemaskeerd, volgens hetzelfde principe als in het onderzoek van Arts. Het nieuwe ontwerp wordt verder getest, en de holeboardtaak wordt momenteel voor mini-varkens (Göttinger minipigs) en vleesvarkens in vervolgonderzoek verder gevalideerd en gestandaardiseerd. »

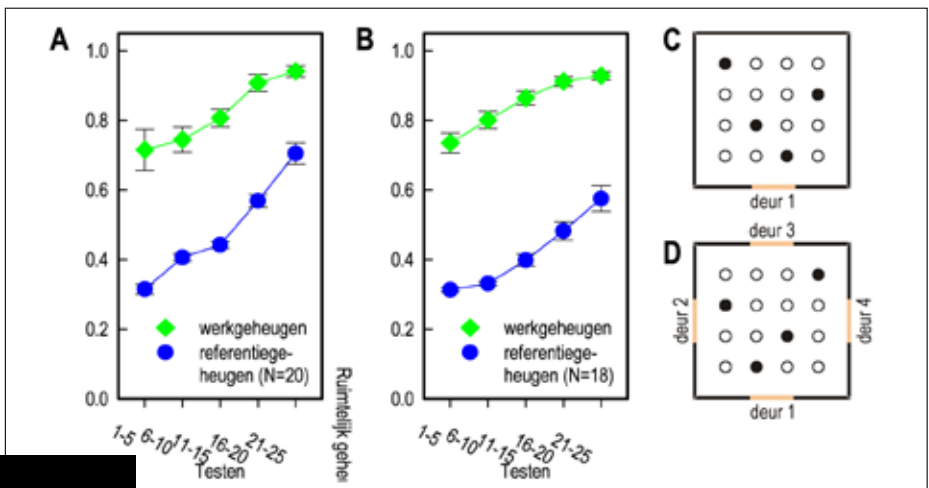




Afbeelding 2.

Afbeelding 2. A: holeboard-apparaat voor het meten van het ruimtelijke geheugen van varkens. B en C: een varken tilt de bal op die de voerbak (hole) afdekt om een verborgen beloning te vinden, bv. een M&M of een stukje appel (foto's: Annemarie Baars).

We hebben statistische analyses (variantie-analyses) uitgevoerd waarmee we de leercurves voor het werkgeheugen en het referentiegeheugen van de twee experimenten met elkaar hebben vergeleken (Afb.3). Hoe steiler een leercurve is, hoe sneller de varkens de taak leren. Ondanks de verschillen in proefopzet en design van het test apparaat lijken de verkregen leercurves in de twee studies op elkaar. In de twee experimenten verbeterden de varkens hun werkgeheugenprestatie nagenoeg even snel. Echter, de varkens in het onderzoek van Arts et al. (1) verbeterden hun referentiegeheugen prestaties sneller dan de varkens in het onderzoek van Gieling *et al.* (4). De betere prestatie op het referentiegeheugen in het onderzoek van Arts is misschien toe te schrijven aan een verschil in moeilijkheidsgraad. De opzet van Arts was makkelijker aan te leren dan die van Gieling omdat de dieren in het experiment van Arts het holeboard altijd door dezelfde deur betraden. Dit vergemakkelijkt de ruimtelijke oriëntatie. In het experiment van Gieling werd voor iedere test per toeval bepaald door welke van de vier deuren een varken het holeboard betrad.



Afbeelding 3.

*Afbeelding 3. Het werkgeheugen en het referentiegeheugen (gemiddelde van groepen van vijf testen en de standaardfout van het gemiddelde [SEM]) van varkens in een holeboard-taak (A) onderzoek van Arts et al. (1) (B) onderzoek van Gieling et al. (4). In A betraden alle dieren door dezelfde deur het holeboard. In B werd in iedere serie van vier opeenvolgende testen per toeval bepaald via welk van de vier deuren een varken toegang kreeg tot het testapparaat. Het patroon van voerbeloonde locaties ('holes') in de twee studies was verschillend: in C is het patroon, gebruikt tijdens het trainen van de varkens in het onderzoek van Arts weergegeven, in D is een van de vier verschillende patronen, gebruikt tijdens het trainen in het onderzoek van Gieling weergegeven. De zwart gevulde 'holes' bevatten een beloning (chocoladerozijnen, M&Ms of stukjes appel).*

## Tenslotte

Het (mini)varken wint aan betekenis voor neurowetenschappelijk onderzoek. Enerzijds kan het (mini)varken worden ingezet ter vervanging van en als aanvulling op het onderzoek met primaten, honden en katten. Anderzijds wordt verwacht dat onderzoeksresultaten vanwege de complexe neuroanatomie van het varken beter naar de mens kunnen worden vertaald. Echter, er bestaan nog weinig goed gevalideerde leer- en geheugentaken voor deze proefdiersoort (Gieling *et al.* 2011). We hopen met ons onderzoek naar de holeboardtaak voor varkens een bijdrage te leveren aan het uitbreiden van het methodespectrum voor onderzoek naar leren en geheugen bij varkens. Het uiteindelijke doel is deze taak geschikt te maken voor het onderzoek naar effecten van 1. potentiële therapeutica en 2. potentieel toxicologische of teratologische substanties waaraan dier en mensen bloot kunnen worden gesteld. Uiteraard kan deze taak ook gebruikt worden voor het verkrijgen van ontbrekende informatie over de cognitieve vaardigheden van het varken in het belang van deze soort. Wij zijn er vooral in geïnteresseerd te onderzoeken, welke factoren tijdens de pre-, peri- en postnatale periode invloed hebben op de leer- en geheugenprestaties op latere leeftijd.

## Literatuur

1. Arts, J, van der Staay, F J, & Ekkel, E D. 2009. Working and reference memory of pigs in the spatial holeboard discrimination task. *Behavioural Brain Research*, 205, 303-306
2. Bode, G, Clausing, P, Gervais, F, et al. 2010. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 62, 196-220
3. Broom, D M & Zanella, A. J. 2004. Brain measures which tell us about animal welfare. *Animal Welfare*, 13, 41-45
4. Gieling, E T, Nordquist, R E & van der Staay, F 2011. Assessing learning and memory in pigs. *Animal Cognition*, 14, 151-173
5. Gieling, E T, Park, S Y, Nordquist, R E et al. 2012. Performance of low- and normal birth weight piglets in a spatial holeboard discrimination task. *Pediatric Research*, 71, 71-76
6. Markou, A, Chiamulera, C, Geyer, M A et al. 2009. Removing obstacles in neuroscience drug discovery: the future path for animal models. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, 34, 74-89
7. van der Staay, F J 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Research Reviews*, 52, 131-159
8. van der Staay, F J, Gieling, E T, Espitia Pinzón, N, et al. 2012. The appetitively motivated "cognitive" holeboard: a family of complex spatial discrimination tasks for assessing learning and memory. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36, 379-403.

