



**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN**  
FACULTEIT GENEESKUNDE  
BIOMEDISCHE WETENSCHAPPEN

# Het effect van elektrische stimulatie in de septale nucleus op voedselinname, activiteit en waterinname in een diermodel voor anorexia nervosa

Masterproef voorgedragen  
tot het behalen van de  
graad van Master in de  
Biomedische Wetenschappen  
door **Annelies Engelen**

Promotor: Dr. Kris VAN KUYCK  
Faculteit Geneeskunde  
Departement Neurowetenschappen  
Laboratorium voor Experimentele functionele neurochirurgie

Tweede promotor: Prof. Dr. Bart NUTTIN  
Faculteit Geneeskunde  
Departement Neurowetenschappen  
Laboratorium voor Experimentele functionele neurochirurgie

Leuven, 2010

*Dit proefschrift is een examendocument dat na verdediging niet werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. In publicaties mag naar dit werk gerefereerd worden, mits schriftelijke toelating van de promotoren die met naam vermeld zijn op de titelpagina.*



**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN**  
FACULTEIT GENEESKUNDE  
BIOMEDISCHE WETENSCHAPPEN

# Het effect van elektrische stimulatie in de septale nucleus op voedselinname, activiteit en waterinname in een diermodel voor anorexia nervosa

Masterproef voorgedragen  
tot het behalen van de  
graad van Master in de  
Biomedische Wetenschappen  
door **Annelies Engelen**

Promotor: Dr. Kris VAN KUYCK  
Faculteit Geneeskunde  
Departement Neurowetenschappen  
Laboratorium voor Experimentele functionele neurochirurgie

Tweede promotor: Prof. Dr. Bart NUTTIN  
Faculteit Geneeskunde  
Departement Neurowetenschappen  
Laboratorium voor Experimentele functionele neurochirurgie

Leuven, 2010

# *Woord vooraf*

---

Het tot stand brengen van een eindwerk gebeurt niet overnacht. Het is een proces van vallen en opstaan, een proces waarbij steun en hulp onontbeerlijk zijn. Ik wil dan ook een aantal personen bedanken om mij dit schooljaar bij te staan bij de creatie van een document dat voor mij toch wel een grote waarde heeft.

Eerst en vooral bedank ik Karel Vander Elst die de hele uitwerking van mijn thesis aandachtig gevolgd heeft omdat hij zo geduldig en aandachtig luisterde naar al mijn labowerk- en schrijfverhalen en voor zijn hulp bij de uitwerking van dit eindwerk. Ook wil ik graag mijn ouders bedanken die mij reeds mijn hele leven steunen en die ook tijdens dit drukke jaar, aan het einde van een hoofdstuk, bij elke stap in het thesisproces aanwezig waren en met raad en daad meewerkten aan een goed eindproduct. Vervolgens bedank ik al mijn vrienden, familieleden en kennissen die in de loop van dit jaar geconfronteerd werden met mijn thesis, omdat ook hun luisterend oor voor mij een grote hulp was.

Mijn eindwerk heeft me ook veel plezier en vele mooie momenten gebracht en daarvoor bedank ik in de eerste plaats mijn collega's, Saïdja Gielen, Marleen Welkenhuysen, Laura Luyten en Dimiter Prodanov die me steeds bijstonden met goede raad, antwoorden op al mijn vragen en gezellige koffiepauzes.

Ook bedank ik graag de juryleden, Stephan Claes en Veerle Reumers, en de voorzitter van de eindwerkcommissie, Anton Roebroek, om mijn eindwerk door te nemen en te zetelen in de jury.

Verder wil ik Prof. Dr. Bart Nuttin bedanken voor het vertrouwen dat hij in mij stelde, voor me de kans te geven dit eindwerk tot een goed einde te brengen en voor de leerrijke vergaderingen en gesprekken. Hier, aan het einde van het 'Woord Vooraf' maar zeker niet laatst in mijn gedachten zou ik tenslotte ook graag Kris Van Kuyck, mijn eerste promotor, bedanken voor al de tijd die hij voor mij heeft vrijgemaakt, voor alles dat hij me geleerd heeft en, simpelweg, voor er altijd voor me te zijn tijdens de creatie van deze thesis.

Bedankt,

Annelies

# *Samenvatting*

---

Anorexia nervosa (AN) is een ernstige eetstoornis met een hoge mortaliteit en morbiditeit die zeer moeilijk te behandelen is. Er is dringend nood aan een effectieve behandeling voor ernstig zieke AN patiënten. Onderzoek naar nieuwe therapiemogelijkheden voor AN richt zich op het centrale zenuwstelsel. Een mogelijk therapeutisch doelwit in de hersenen is de septale nucleus (SN). In een blinde, gerandomiseerde en gecontroleerde ‘crossover’ studie werd nagegaan of bilaterale elektrische hersenstimulatie in de SN van jonge vrouwelijke ratten in het ‘activity based anorexia’ (ABA) model, een gevalideerd diermodel voor AN, leidt tot een toename van voedselinname, een verlaging van loopwielactiviteit of een verandering van waterinname. Bij 13 ratten werden elektrodes ingeplant in de SN, 7 van hen werden na introductie in het ABA model elektrisch gestimuleerd in deze hersenregio met 2 verschillende sets van stimulatieparameters: 1 met hoge (100 Hz) en 1 met lage (7 Hz) frequentie. Stimulatie bleek geen significant effect te hebben op voedselinname en loopwielactiviteit. Wel dronken ABA ratten die met laagfrequente stimulatie in de SN gestimuleerd werden significant meer dan ratten in het ABA model die niet septaal gestimuleerd werden. Aangezien limitaties zoals de beperking van het onderzoek tot 1 stimulatie-doelwit binnen de SN en tot 2 sets van stimulatieparameters de nood aan verdere studies benadrukken en het maken van een definitief besluit omtrent de geschiktheid van de SN als therapeutisch doelwit bij AN in de weg staan, wordt hiermee een mogelijke rol van deze hersenregio in de toekomst van AN-therapie echter niet uitgesloten.

## *Abstract*

---

Anorexia nervosa (AN) is a serious eating disorder with a high mortality and morbidity which is extremely difficult to treat. There is an urgent need for an effective treatment for severely ill AN patients. Research for new therapeutic strategies aims at the central nervous system. A possible therapeutic target in the brain is the septal nucleus (SN). A blind, randomized, controlled ‘crossover’ study was conducted to examine whether bilateral electrical brain stimulation in the SN of young female rats in the activity based anorexia (ABA) model, a validated animal model for AN, yields an increase in food intake, a decrease in running wheel activity or an alteration of water intake. 13 rats had electrodes implanted in the SN, 7 of them received, after introduction into the ABA model, electrical stimulation with 2 sets of stimulation parameters: 1 for high (100 Hz) and 1 for low (7 Hz) frequency stimulation. Stimulation did not significantly increase food intake or decrease running wheel activity. However, ABA rats receiving low frequency stimulation in the SN drank significantly more than rats that were not stimulated. Since limitations such as the use of only 1 target for stimulation in the SN and 2 sets of stimulation parameters emphasize the need for further examination and make it hard to put a definite conclusion concerning the importance of the SN as a therapeutic target in AN into words, these results do not rule out a possible role of the SN in the future of AN therapy.

# *Lijst van afkortingen*

---

$\mu\text{A}$	microampère
$\mu\text{C}$	microcoulomb
$\mu\text{m}$	micrometer
ABA	‘activity based anorexia’
AcbSh	‘shell’ van de <i>nucleus accumbens</i>
ACTH	adrenocorticotroop hormoon
Alc	alcohol
AN	anorexia nervosa
AP	anterieur-posterieur
BMI	body mass index
cc	<i>corpus callosum</i>
cm	centimeter
cm <sup>2</sup>	vierkante centimeter
CRH	corticotropine vrijzettende factor
csf	cerebrospinale vloeistof
CZS	centraal zenuwstelsel
d.	effectgrootte
d.m.v.	door middel van
DM	dorsale middenhersenen
DSM-IV	‘Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV’
EHS	elektrische hersenstimulatie
f	frequentie
FDG	fluorodeoxyglucose
FDR	‘False Discovery Rate’
g	gram
gem	gemiddelde
HC	hippocampus
HF	(experimentele dag met) hoogfrequente stimulatie (bij stimulatiedieren)
HPA-as	hypothalamus-hypofyse-bijnier as
HT	hypothalamus
Hz	hertz
I	stroomsterkte
ICD-10	‘International Classification of Diseases-version 10’

L	lateraal
LD	ladingsdensiteit
Ld	lambdoïdale septale zone
LF	(experimentele dag met) laagfrequente stimulatie (bij stimulatiedieren)
LH	laterale hypothalamus
LSD	dorsale deel van de laterale SN
LSI	intermediair deel van de laterale SN
LSV	ventrale deel van de laterale SN
mA	milliampère
m.b.v.	met behulp van
mfb	‘medial forebrain bundle’
ml	milliliter
mm	millimeter
mm HG	millimeter kwik
(f)MRI	(functionele) magnetische resonantie beeldvorming
MS	mediale SN
ms	milliseconde
NaCl	natriumchloride
NPY	neuropeptide-Y
NS	experimentele dag zonder stimulatie bij stimulatiedieren
o.	kort onderdompelen
o.b.v.	op basis van
OCD	obsessieve-compulsieve stoornis
opp	oppervlakte
Pb	pulsbreedte
PET	positron emissie tomografie
PLd	paralambdoïdale SN
SD	standaarddeviatie
Sd	subduraal
Sfi	septofimbriale nucleus
Shi	septohippocampale nucleus
Shy	septohypothalamische nucleus
SN	septale nucleus
SSRI	selective serotonine heropname inhibitor
SZS	septale zelfstimulatie
t.o.v.	ten opzichte van

# *Inhoudstafel*

---

Woord vooraf .....	i
Samenvatting .....	ii
Abstract .....	ii
Lijst van afkortingen .....	iii
Inhoudstafel .....	v
1 Inleiding .....	1
2 Literatuuroverzicht .....	2
2.1 Inleiding.....	2
2.2 Anorexia nervosa.....	2
2.2.1 Inleiding.....	2
2.2.2 Diagnose .....	2
2.2.3 Epidemiologie en prognose .....	3
2.2.4 Etiologie .....	3
2.2.4.1 Persoonsgebonden factoren .....	3
2.2.4.2 Omgevingsfactoren .....	4
2.2.5 Klinische presentatie .....	5
2.2.5.1 Uithongering en gewichtsverlies .....	5
2.2.5.2 Hyperactiviteit .....	5
2.2.5.3 Neuropsychologische symptomen .....	6
2.2.5.4 Fysieke symptomen.....	7
2.2.6 Comorbiditeit.....	8
2.2.7 Neuroendocrinologie .....	8
2.2.8 Behandeling.....	9
2.2.8.1 Niet farmacologische behandeling.....	9
2.2.8.2 Farmacotherapie .....	9
2.3 Het ‘Activity Based Anorexia’ model.....	10
2.3.1 Principe.....	10
2.3.2 Mechanisme.....	11
2.3.2.1 De adaptatiehypothese .....	11
2.3.2.2 De onderdrukkingstheorie .....	11
2.3.2.3 De thermostatische theorie van voedselconsumptie .....	11
2.3.2.4 De evolutionaire theorie van activiteitsanorexia .....	12



2.3.2.5 Fysiologische verklaringen.....	12
2.3.3 Overeenkomsten tussen ABA en AN .....	12
2.3.4 Verschillen tussen ABA en AN.....	13
2.3.5 Validiteit .....	13
2.3.5.1 Indruksvaliditeit bij AN .....	14
2.3.5.2 Predictieve validiteit bij AN .....	14
2.3.5.3 Constructvaliditeit bij AN .....	14
2.3.5.4 Specificiteit van ABA voor AN.....	14
2.4 Elektrische hersenstimulatie .....	14
2.4.1 Methode.....	14
2.4.2 Weefselschade.....	15
2.4.3 Mechanisme.....	16
2.4.4 Selectie van doelwitten voor EHS en chirurgische precisie .....	16
2.5 De septale nucleus .....	17
2.5.1 Situering, morfologie en connecties .....	17
2.5.2 Functie .....	17
2.5.2.1 Invloed op andere hersenregio's.....	18
2.5.2.2 Dorst en waterinname.....	18
2.5.2.3 Voedselconsumptie .....	19
2.5.2.4 Angst.....	19
2.5.3 Elektrische hersenstimulatie in de septale nucleus bij de rat.....	19
2.5.3.1 Septale zelfstimulatie (SZS) .....	19
2.5.3.2 Septale stimulatie en de hypothalamus.....	20
2.5.3.3 Hartritme, bloeddruk en ademhaling.....	21
2.5.3.4 Effecten van septale stimulatie in verband met eten en drinken .....	21
2.5.3.5 Stress, angst en septale stimulatie .....	22
2.5.3.6 Pijn en septale stimulatie .....	22
2.5.3.7 Hippocampale effecten van septale stimulatie.....	22
2.5.3.8 Onderdrukking van gedrag.....	23
2.5.3.9 Invloed op andere hersenregio's.....	23
2.6 Probleemstelling .....	23
3 Materialen en Methoden.....	24
3.1 Experimentele opzet .....	24
3.2 Experimentele procedure.....	24
3.3 Randomisatie en blinding.....	27

3.4 Variabelen, beginvoorwaarde en ‘drop-out’ condities .....	27
3.5 Dieren .....	27
3.6 Elektrodes .....	28
3.7 Implantatie van elektrodes .....	28
3.8 Stimulatie .....	30
3.9 Opoffering en perfusie .....	32
3.10 Histologie .....	32
3.11 Statistische data analyse .....	34
3.11.1 Analyses van groepsverschillen .....	34
3.11.2 Analyses van verschillen binnen de stimulatiegroep .....	34
3.11.3 Correlatieanalyses .....	34
3.11.4 ‘Power’ analyse .....	34
4 Resultaten .....	35
4.1 Evoluties doorheen de tijd in het ABA model .....	35
4.1.1 Lichaamsgewicht na ABA introductie .....	35
4.1.2 Voedselinname en loopwielactiviteit in het ABA model .....	36
4.1.2.1 Voedselinname in het ABA model .....	36
4.1.2.2 Loopwielactiviteit in het ABA model .....	36
4.2 Histologische analyse .....	37
4.3 Analyses van groepsverschillen tijdens de experimentele periode .....	39
4.3.1 Voedselinname .....	40
4.3.2 Loopwielactiviteit .....	40
4.3.3 Waterinname .....	41
5 Discussie .....	43
5.1 Een acuut stimulatie-experiment in het ABA model .....	43
5.2 Elektrische hersenstimulatie in de SN bij ABA ratten .....	43
5.2.1 De locatie van de elektrodetip en het effect van stimulatie .....	43
5.2.2 Septale stimulatie en voedselinname .....	44
5.2.3 Septale stimulatie en loopwielactiviteit .....	44
5.2.4 Septale stimulatie en waterinname .....	44
5.2.5 Het ‘septal rage’ syndroom .....	45
5.3 Limitaties van het onderzoek .....	46
5.3.1 Elektrische hersenstimulatie en histologische analyse .....	46
5.3.2 Omgevingsfactoren en procedurele limitaties .....	46
5.3.3 Statistische data-analyse .....	47
5.4 Toekomstig onderzoek .....	48

6 Besluit.....	50
7 Referenties.....	a
8 Bijlagen .....	I
8.1 Literatuuroverzicht: stimulatieparameters bij septale stimulatie.....	I
8.2 Elektrodetipfiguren.....	II

# 1 Inleiding

---

Anorexia nervosa is een ernstige eetstoornis met een hoge morbiditeit en mortaliteit en een complexe etiologie die nog niet volledige ontrafeld is. Deze zeldzame aandoening treft voornamelijk jonge vrouwen. Ondanks intensieve therapieprogramma's blijft de prognose van AN vaak negatief en is de kans op chroniciteit en herval groot. De nood aan effectieve therapeutische strategieën voor AN is dan ook hoog.

In het onderzoek naar deze strategieën zijn diermodellen van essentieel belang. Een gevalideerd en veel gebruikt diermodel voor AN is het 'Activity Based Anorexia'(ABA) model bij de rat. Hierbij wordt replicatie van een aantal belangrijke kenmerken van AN mogelijk gemaakt door de combinatie van voedselrestrictie en loopwielactiviteit.

Aangezien een belangrijke rol van het centraal zenuwstelsel (CZS) in AN aangetoond is, kunnen interventies die daarop gericht zijn een uitgebreid scala aan therapeutische mogelijkheden bieden voor deze moeilijk behandelbare aandoening. Een interessante hersenregio in dit opzicht is de septale nucleus (SN). Onderzoek heeft immers uitgewezen dat de septale regio een rol speelt in onder andere voedselinname, waterinname en activiteit.

Eén mogelijke therapeutische interventie gericht op het CZS is elektrische hersenstimulatie (EHS). Dit is een neurochirurgische techniek die zijn therapeutisch nut reeds heeft bewezen bij verschillende neurologische, motorische en psychiatrische aandoeningen zoals de ziekte van Parkinson en obsessieve-compulsieve stoornis (OCD). Bij EHS worden in de hersenen elektroden ingeplant die pulsen genereren en zo het omliggend hersenweefsel beïnvloeden. EHS in de SN kan mogelijk een nieuwe therapeutische strategie zijn voor ernstig zieke AN patiënten.

Deze mogelijkheid wordt ondersteund door preliminaire studies die uitwezen dat elektrolytische letsels in de SN van ABA ratten een positief effect hebben op een aantal belangrijke parameters van de aandoening en wordt verder uitgediept in dit onderzoek. Meer specifiek wordt voor 2 sets van stimulatieparameters nagegaan of EHS in de SN bij ratten in het ABA model hun loopwielactiviteit verlaagt, hun voedselinname verhoogt of hun waterinname verandert. Het onderzoek dat op de volgende pagina's beschreven wordt vormt op die manier een essentiële stap in de evaluatie van de mogelijkheden die septale stimulatie biedt in de therapie van AN.

De beschrijving vangt aan met een overzicht van de literatuur omtrent een aantal onderwerpen die relevant zijn voor het onderzoek naar EHS in de SN bij ABA en AN. Vervolgens wordt een overzicht gegeven van de gebruikte materialen en methoden en van de bekomen resultaten. Deze resultaten worden in een volgend hoofdstuk kritisch geëvalueerd. Ook ideeën voor toekomstig onderzoek worden weergegeven. Een kort en bondig besluit vervolledigt het geheel.

# 2 Literatuuroverzicht

---

## 2.1 Inleiding

---

Tijdens de studie die wordt beschreven in dit eindwerk werd onderzoek verricht naar een mogelijke nieuwe therapeutische strategie voor patiënten die ernstig lijden onder AN. In het literatuuroverzicht wordt eerst een introductie tot deze aandoening en tot een diermodel ervan gegeven. Vervolgens worden het principe van EHS, de morfologie en functie van de SN en de resultaten van vroegere stimulatiestudies in de SN besproken. Tenslotte wordt de doelstelling van het onderzoek nader toegelicht.

## 2.2 Anorexia nervosa

---

### 2.2.1 Inleiding

Eetstoornissen zijn verstoringen van eetgedrag die gepaard gaan met handelingen die in het teken staan van gewichtscntrole en die de fysieke en psychologische gezondheid van de patiënt in gevaar brengen. De bekendste eetstoornissen zijn anorexia nervosa (AN) en boulimia nervosa. AN patiënten weigeren een minimaal normaal lichaamsgewicht te behouden en uitendit onder andere door hun calorie-inname te beperken. Boulimia nervosa kenmerkt zich door vreetbuien gevolgd door compensatiegedrag zoals zelf-geïnduceerd braken.(1) AN kan zich uitend als beperkende AN, vreetbuien/purgerend type AN of een mengvorm van deze 2 uitersten. Bij beperkende AN ligt de nadruk op vasten, bij vreetbuien/purgerend type AN eerder op vreetbuien, zelf-geïnduceerd braken en eventueel misbruik van laxativa, diuretica of dieetpillen. In AN speelt verder fysieke activiteit vaak een hoofdrol.(2-4)

### 2.2.2 Diagnose

Bij diagnose van AN worden twee sets van criteria bij gebruikt: De DSM-IV ('Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV') en de ICD-10 ('International Classification of Diseases-version 10'). Beide sets zijn, zeker sinds de laatste herzieningen, zeer vergelijkbaar. Ze omschrijven AN als een syndroom dat gekarakteriseerd wordt door 4 essentiële diagnostische criteria:(5, 6)

- Gewichtsverlies tot 85 % van het verwachte gewicht voor leeftijd en lengte, wat overeenkomt met een Body Mass Index (BMI) van ongeveer 17,5 kg/m<sup>2</sup>.
- Pathologische, intense angst voor gewichtstoename en obesitas, ondanks ondergewicht. De waarde van dit criterium in de diagnose van AN wordt echter betwist, aangezien deze angst niet voorkomt bij alle AN patiënten.(7)
- De aanwezigheid van een verstoring van het eigen lichaamsbeeld, van een grote invloed van lichaamsperceptie op zelfevaluatie en van ontkenning van de ernst van het ondergewicht.
- Amenorroe, ofwel afwezigheid van menstruele cycli, gedurende minstens drie maanden bij postmenarchale vrouwen. Ook aan het belang van dit criterium in de diagnose van AN wordt getwijfeld, onder andere omdat niet elke patiënt dit symptoom ontwikkelt en er geen verschillen zijn tussen AN patiënten met of zonder amenorroe.(8) In de klinische praktijk wordt herstel van amenorroe vaak gebruikt als een indicator van genezing. Herstel van

menstruele cycli treedt echter niet altijd op tijdens genezing aangezien langdurige AN kan leiden tot atrofie van de ovaria met persisterende amenorroe tot gevolg.(9-12)

### **2.2.3 Epidemiologie en prognose**

Methodologische beperkingen, bijvoorbeeld op vlak van selectiecriteria, zorgen ervoor dat de resultaten van epidemiologische studies over AN niet eenduidig zijn. Het syndroom heeft een prevalentie van ongeveer 0,3-2,2%, treft 10 tot 20 keer meer vrouwen dan mannen en ontwikkelt meestal tijdens de adolescentie.(1, 13-15) De populatie die het meest getroffen wordt door AN bestaat uit meisjes van 15 tot 19 jaar oud. Deze groep staat in voor 40 % van alle AN patiënten.(16-18) Verder is het zo dat, hoewel AN een zeldzame ziekte is en blijft, er een incidentiestijging werd genoteerd.(19-27) Meta-analyse heeft deze stijging echter niet bevestigd en ook werd reeds gerapporteerd dat de incidentie van AN stabiel is.(16, 17, 25, 28-31) AN ontwikkelt tot een chronische ziekte bij 20% van de patiënten. Iets minder dan de helft van alle AN patiënten, 50-75% van behandelde adolescenten en 25-50% van gehospitaliseerde volwassenen herstelt volledig. De kans op herstel is echter groot. Ongeveer een derde van de patiënten kent een gedeeltelijk herstel. Verder ontwikkelt ongeveer 30% van de patiënten met beperkende AN na verloop van tijd ook vreetbui. Het herstelproces kan heel wat tijd in beslag nemen, zo wordt bijvoorbeeld een periode van 4,75-6,5 jaar vermeld. De kans op herstel is omgekeerd evenredig met de ernst van het gewichtsverlies en de aanwezigheid van comorbide psychiatrische aandoeningen. Zo is de mortaliteit bij AN significant verhoogd als de BMI van de patiënt voor aanvang van behandeling kleiner is dan 13. Uithongering vormt de primaire doodsoorzaak bij AN, maar ook een groot aantal secundaire doodsoorzaken, zoals bijkomstige ziekte of dehydratie, is reeds genoteerd. Hiernaast staat zelfmoord in voor 20 tot 30 % van de sterftegevallen bij AN. Cijfers over sterfte bij AN variëren sterk: studies rapporteren mortaliteitspercentages tussen de 3 en de 25 % over periodes met verschillende duur en gestandaardiseerde mortaliteitsratio's tussen 0 en 17,8.(3, 4, 31-41) AN patiënten blijven vaak zelfs na herstel niet alleen perfectionistisch en bang om te verdikken maar ook zeer mager en kunnen dus ook dan nog het slachtoffer worden van typische gevolgen van ondervoeding zoals problemen in verband met voortplanting. (zie 2.2.5.4 fysieke symptomen).(42-45)

### **2.2.4 Etiologie**

AN is een complexe, multifactoriële en etiologisch heterogene aandoening waarbij zowel genetische en psychologische persoonsgebonden factoren als omgevingsfactoren zoals sociaal-culturele determinanten een belangrijke etiologische rol spelen. Deze risicofactoren zijn echter zelden specifiek voor AN en geen enkele factor is voldoende of noodzakelijk voor de ontwikkeling van deze aandoening. Bovendien zijn risicofactoren voor AN vaak moeilijk te onderscheiden van vroege symptomen ervan. Dit is bijvoorbeeld zo voor voedselrestrictie en excessieve fysieke activiteit, beide symptomen van AN die ook in de chroniciteit en etiologie van de ziekte een belangrijke rol spelen.(37, 46)

#### **2.2.4.1 Persoonsgebonden factoren**

##### ***Genetische factoren***

Tweeling- en familiestudies tonen aan dat familieleden van AN patiënten een verhoogd risico hebben op AN. Dit verhoogde risico is waarschijnlijk deels het gevolg van een gemeenschappelijk genetisch gevoeligheidsprofiel voor AN, deels van gedeelde omgevingsfactoren.(47-53) Geschat wordt dat de bijdrage van genetische factoren aan het risico op AN zo'n 58 tot 88 % bedraagt.(54) Deze bijdrage wordt bepaald door een combinatie van verschillende allelcombinaties en de bijhorende fenotypische kenmerken, zoals karaktereigenschappen.(48, 55) Kandidaat-genen in de etiologie van AN zijn onder andere bepaalde genen die coderen voor de serotonine receptor, het oestrogeen receptor- $\beta$  gen, het

'agouti related peptide' gen, het noradrenaline-transporter gen en een mogelijke menselijke homologo van het 'foraging' gen.(56-62)

### ***Psychologische factoren: karakter en persoonlijkheid***

Angst, perfectionisme, teruggetrokkenheid, obsessiviteit, compulsiviteit, 'borderline' gedrag, gebrekkig zelfvertrouwen, een negatief zelfbeeld, een minderwaardigheidscomplex, onderdanig gedrag en narcisme zijn de voornaamste elementen van het kwetsbare persoonlijkheidsprofiel dat etiologisch zeer belangrijk is in AN. De prognose van deze aandoening wordt bovendien beïnvloed door de mate waarin deze karaktereigenschappen aanwezig zijn bij een bepaalde patiënt en de aandacht die ze krijgen tijdens therapie. Psychologische verstoringen kunnen naast risicofactoren voor uithongering ook mogelijke gevolgen zijn ervan. Dit is bijvoorbeeld zo voor depressiviteit, laag zelfvertrouwen, reductie van libido en bepaalde cognitieve beperkingen.(1, 3, 37, 46, 63-65)

### **2.2.4.2 Omgevingsfactoren**

#### ***Perinatale factoren, prenatale factoren en prematuriteit***

Kinderen van moeders met een voorgeschiedenis van verloskundige problemen, prematuur geboren meisjes en kindjes waarvan de geboorte niet zonder problemen verliep hebben een verhoogd risico op AN. Prematuriteit is geassocieerd met suboptimale neuronale en cognitieve ontwikkeling en kan daardoor leiden tot gedrags- en eetproblemen. Kindjes die heel prematuur geboren worden hebben ook meer kans op intracraniale bloedingen en, daardoor, meer kans op het ontwikkelen van bepaalde psychiatrische aandoeningen in hun kindertijd. Het verband tussen preterme geboorte en AN kan ook deels verklaard worden door het vervroegd wegvallen van placentale steroïden en de daaropvolgende hypothalamische dysfunctie met eventuele gevolgen voor eetlust en eetgedrag. (37, 66, 67) Ouders van prematuurtjes of ouders die complicaties tijdens zwangerschap en bevalling hebben meegemaakt zijn vaak uiterst bezorgd over hun kinderen. Ook dit kan het risico op AN verhogen.(46, 67) Anderzijds is het ook reeds gerapporteerd dat meisjes die later AN zullen ontwikkelen een hoger geboortegewicht hebben dan hun zusjes.(68)

#### ***Familie, opgroeien en ontwikkeling***

De ontwikkeling van kinderen is afhankelijk van de aanwezigheid en het gedrag van hun ouders, onder andere door invloed hiervan op de activiteit van de hypothalamus-hypofyse-bijnier as (de HPA-as) van het kind. Veranderingen van deze activiteit kunnen nefast zijn voor het regelen van eetlust en eetgedrag op lange termijn. Moeders met AN kunnen hun kinderen bovendien niet alleen voorzien van een genetische achtergrond, maar ook van een omgeving die hen eventueel gevoeliger maakt voor het ontwikkelen van eetstoornissen. Zo kunnen de problemen met het geven van borstvoeding, met eetgedrag of met aandacht voor uiterlijk, die voorkomen bij moeders met AN ervoor zorgen dat er ook bij hun kinderen voedingsproblemen ontstaan.(37, 46) Ook een familiegeschiedenis van depressie en obesitas is geassocieerd met een verhoogd risico op AN.(3) Hiernaast kunnen trauma's bij jonge kinderen neurofysiologische veranderingen induceren die leiden tot een verhoogde gevoeligheid voor een aantal psychiatrische aandoeningen, waaronder ook eetstoornissen.(69) AN ontwikkelt meestal tijdens de adolescentie, een periode die gekenmerkt wordt door grote lichamelijke, hormonale en emotionele veranderingen, door stress, door veranderingen op vlak van relaties en toekomstperspectieven en door grote veranderingen in de plasticiteit van neuronale netwerken. Al deze factoren verhogen het risico op ontregeling van systemen betrokken bij eetlust en gewicht en maken dat ook de pubertijd op zich een risicofactor is voor AN. Tenslotte wordt de ontwikkeling van AN vaak voorafgegaan door een ernstige, belangrijke gebeurtenis of door een situatie die problematisch is voor de patiënt. Vooral seksuele problemen, zoals seksueel misbruik of plagerijen in verband met borstomvang, blijken belangrijk te zijn in de etiologie van AN. Ook onderworpen worden aan hoge

verwachtingen en een afwezigheid van echte vrienden zijn factoren die vaak voorkomen in het leven van AN patiënten.(1, 46)

### ***Sociologische en culturele factoren***

Het culturele narcisme dat nu in onze samenleving heerst, leidt tot een sterk verlangen naar lichamelijke perfectie. De invulling van deze perfectie is vaak, en zeker bij AN patiënten, afhankelijk van hoe dik of dun we zijn. Het resultaat hiervan is een extreem mager ideaalbeeld. Als we dit ideaal nastreven, kan dat desastreuze gevolgen hebben, zoals we zien bij AN. Hoe gevoelig iemand is voor het ontwikkelen van een eetstoornis hangt af van hoe gevoelig iemand is voor zelfkritiek en voor de drang naar perfectie die in onze maatschappij ingebakken is. Vergelijkingen met beelden van superfitte en extreem magere modellen die we in de media zien, komen ons ideaalbeeld niet ten goede en leiden, zeker bij personen die een gestegen gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van AN, tot nog meer zelfkritiek, tot een nog negatiever zelfbeeld en tot nog meer drang naar vermagering. De overstap van drang naar praktijk wordt op zijn beurt vereenvoudigd door reclamecampagnes voor allerlei diëten of sportactiviteiten die ons aangereikt worden door diezelfde media. Culturele factoren leiden, met andere woorden, tot een “drang naar dun”. Deze drang kan ons eetpatroon veranderen en aanleiding geven tot een drang naar fysieke oefening. Intense motorische activiteit leidt verder tot een vermindering van eetlust, voedselinname en lichaamsgewicht. Bovendien doet een daling van lichaamsgewicht de motivationele waarde van fysieke activiteit toenemen. Het uiteindelijke resultaat is een cyclus van stijgende fysieke activiteit, dalende voedselinname en gewichtsverlies die zeer moeilijk te doorbreken is. Vrouwen die intens met sport bezig zijn hebben dan ook een verhoogd risico op AN. Zo bleek bijvoorbeeld dat bij gehospitaliseerde patiënten met eetstoornissen 60% van hen ooit competitief sport had beoefend op hoog niveau.(1, 69-71)

## **2.2.5 Klinische presentatie**

### **2.2.5.1 Uithongering en gewichtsverlies**

*“Niets smaakt zo goed als mager zijn”, Kate Moss*

Om te vermageren zullen AN patiënten hun calorie-inname zoveel mogelijk beperken. Dit heeft niet alleen een direct effect op lichaamsgewicht, maar versterkt ook ander gedrag, zoals fysieke activiteit, dat gewichtsafname bevordert.(37) De uithongering bij AN verloopt gradueel: de patiënten eten steeds minder en vervangen steeds meer onveilige, dikmakende etenswaren door energie-arme varianten. Vaak zal de patiënt het gewichtsverlies proberen te verbergen voor familie en vrienden en sociale contacten uit de weg gaan om zo mogelijke interferentie met gewichtsafname te vermijden. Uiteindelijk zal het leven van de patiënten zich beperken tot rituelen die te maken hebben met eten, fysieke activiteit en werk. Aangezien uithongering leidt tot gewichtsverlies is hieraan voor AN patiënten een belangrijke beloning verbonden. Hiernaast is deze restrictie van voedselinname ook een reactie op stress of angst en een manier om controle te krijgen over een aspect van het leven. AN gaat bovendien gepaard met veranderingen in de centrale controle van eetgedrag die ertoe leiden dat de patiënten minder honger hebben en sneller verzadigd zijn. (1, 64)

### **2.2.5.2 Hyperactiviteit**

*“if a little bit is good, then a lot is better”, gezegde*

Hyperactiviteit speelt een belangrijke rol in AN. Het verlangen om dun te zijn uit zich immers niet alleen in calorische restrictie maar ook in extreme fysieke activiteit om calorische verbranding te maximaliseren.(69) Motorische activiteit kan bij deze aandoening een groot aantal verschillende



vormen aannemen, zoals excessief sporten, isotone contracties, zoveel mogelijk rechtstaan, overvolle werkschema's of gewoon zoveel mogelijk, al is het doelloos, bewegen.(1, 72) Hyperactiviteit speelt een causale rol in de pathologie van AN. Zo gaat fysieke oefening vaak vooraf aan voedselrestrictie in de ontwikkeling van de aandoening en blijven veel AN patiënten ook na herstel fysiek zeer actief. Bovendien versterken calorische restrictie en fysieke activiteit elkaar. Verder is bij populaties waar fysieke oefening wordt aangemoedigd het risico op AN verhoogd, verloopt de aandoening ernstiger bij patiënten die intens fysiek actief zijn en kan hyperactiviteit bijdragen tot symptomen zoals ontkenning van gewichtsverlies en verzet tegen gewichtstoename.(62, 70, 73-76) Het is dan ook niet verwonderlijk dat de prevalentie van hyperactiviteit bij AN patiënten bijzonder hoog is. De volgende percentages worden vermeld voor het voorkomen van een vorm van extreme of overdreven fysieke activiteit tijdens het leven van AN patiënten: 51-75% bij volwassenen, 82% bij adolescenten, 78 % bij gehospitaliseerde patiënten en 31% bij minder zieke niet-gehospitaliseerde patiënten.(69, 70, 77, 78) De hyperactiviteit bij AN heeft een groot aantal biologische implicaties en oorzaken. Motorische activiteit heft bijvoorbeeld de hypothermie die het gevolg is van gewichtsverlies op.(72) AN patiënten eten bovendien minder als ze meer fysiek actief zijn, onder andere omdat hyperactiviteit aanleiding geeft tot hypothalamisch hypermetabolisme van serotonine en daardoor tot een daling van lichaamsgewicht en voedselinname.(69) Hiernaast bevordert hoge fysieke activiteit, net zoals calorische restrictie, het katabolisme en draagt het daardoor bij tot metabole keto-acidose.(79) AN patiënten die overdreven actief zijn hebben ook meer eetproblemen en boulimische symptomen, zijn vaker en meer ontevreden over hun lichaam en zijn vaker depressief, angstig of geïrriteerd dan hun niet hyperactieve lotgenoten. In hoeverre de hyperactiviteit bij AN louter de vrije keuze van de patiënt om gewicht te verliezen reflecteert, is nog onduidelijk. Hyperactiviteit bij AN heeft naast psychologische immers ook fysiologische oorzaken zoals bijvoorbeeld hypoleptinemie. (70)

### **2.2.5.3 Neuropsychologische symptomen**

AN patiënten vertonen vaak een groot aantal psychologische en cognitieve verstoringen zoals problemen op het vlak van geheugen en concentratie of symptomen van depressie die bijdragen tot de irrationele preoccupatie met lichaamsgewicht. Deze verstoringen worden in verband gebracht met structurele hersenafwijkingen, zoals vergrote cerebrale ventrikels of een reductie in het volume van de hippocampus (HC) en de amygdala, met menstruele disfunctie en met verhoogde cortisolconcentraties. Tijdens uithongering treedt er bij AN patiënten bovendien verlies op van zowel witte als grijze stof. Persisterend verlies van grijze stof kan bijdragen tot lange-termijn effecten op vlak van cognitief functioneren. (1, 73, 80-84) Hiernaast hebben AN patiënten een verstoord lichaamsbeeld: ze vinden zichzelf te dik of te zwaar ook al zijn ze in feite extreem mager. Deze overschatting van lichaamsomvang is waarschijnlijk te wijten aan emotionele verstoringen en neuronale problemen met lichaamsrepresentatie, waarin de pariëtale cortex een belangrijke rol speelt. De hypothese dat deze hersenstructuur betrokken is bij de pathologie van AN wordt versterkt door rapporteringen van pariëtale disfunctie bij AN patiënten en van problemen met het inschatten van lichaamsomvang bij personen met pariëtale schade. Het is mogelijk dat ondervoeding leidt tot een foute lichaamsrepresentatie door effecten te veroorzaken op zenuwgeleiding betrokken in visueel-spatiële cognitie waardoor binnenkomende sensorische informatie die noodzakelijk is bij het opbouwen van een juist lichaamsbeeld niet goed geïntegreerd wordt. De resulterende verstoring van het lichaamsbeeld draagt op zijn beurt bij tot ondervoeding.(85) Verder ontkennen AN patiënten vaak de ernst van hun symptomen en negeren ze de risico's die deze met zich meebrengen. Ze zijn tevreden met hun situatie, optimistisch en zelfs euforisch. Deze ontkenning heeft te maken met de problemen die AN patiënten hebben met het inschatten van hun lichaamsomvang en is zeer moeilijk te verhelpen.(64)

#### 2.2.5.4 Fysieke symptomen

Medische complicaties van uithongering, purgatie en excessieve fysieke activiteit treffen bijna alle orgaansystemen. Effecten van AN op hart en bloedsomloop kunnen zich uiten als bradycardie, congestief hartfalen, hypotensie, aritmie en verstoringen van het electrocardiogram zoals verlenging van het QT-interval. Ook de samenstelling van bloed verandert onder invloed van deze aandoening. Zo zien we onder andere anemie, leukopenie, thrombocytopenie en hypercholesterolemie. AN patiënten drinken vaak te weinig of net teveel. In het eerste geval kan er dehydratatie optreden, wat leidt tot een stijging van stikstof- en creatinineconcentraties. Overdreven vochtinname, aan de andere kant, geeft aanleiding tot hyponatriëmie. Metabole gevolgen van calorische deficiëntie en excessieve fysieke activiteit omvatten onder andere een verlaging van de cerebrale glycolytische activiteit en metabole ketoacidose. Hierdoor ontstaan er onder andere veranderingen in het metabolisme van oestrogeen, testosteron, cortisol, en hemoglobine. Andere metabole afwijkingen geassocieerd met AN zijn verlaagde plasmaconcentraties van glucose en insuline.

Op vlak van seksualiteit en voortplanting vertonen AN patiënten vaak symptomen zoals amenorroe, gedaalde testosteronconcentraties en verminderde seksuele lust en functie. Bij amenorroe zijn veel verschillende processen betrokken. Een belangrijke oorzakelijke factor hierbij is bijvoorbeeld de daling van concentraties van het luteïniserend hormoon die het resultaat is van een gebrek aan lichaamsvet en de daaropvolgende hypo-estrogenemie. Andere factoren in de pathogenese van amenorree bij AN zijn hypothalamische dysfunctie, stijging van neuropeptide-Y (NPY) concentraties, daling van concentraties van het follikel stimulerend hormoon en het gonadotropine vrijzettend hormoon en hypoleptinemie.

Als de patiënt zich overgeeft aan zelf-geïnduceerd braken en misbruik van diuretica treden er ook symptomen op zoals beschadiging van slokdarm, tanden en tandvlees, hypokaliëmie, alkalose en gewijzigde concentraties van elektrolyten. Ook schade ter hoogte van nieren en lever is niet ongewoon bij AN. Wat betreft ademhaling en longen treden er bij AN symptomen op zoals bradypnoe en longontsteking. Op het niveau van maag en darm kan vermindering van gastroïntestinale motiliteit leiden tot vertraagde maaglediging en obstipatie. Het voorkomen van corticale atrofie illustreert dat ook de hersenen niet ontsnappen aan schade. Effecten van AN op het niveau van huid, haar en botweefsel leiden onder andere tot lanugo, alopecie en vermindering van botdensiteit. Verder leidt AN onder andere tot schildklieratrofie, koude-intolerantie, hypothermie, slaapstoornissen, immunodeficiëntie, convulsies, spierzwakte en vitaminedeficiëntie.(1, 3, 4, 62, 70, 72, 79, 84, 86-90)

AN is bovendien ook geassocieerd met voortplantingsproblemen. Zo gaat een lage BMI en suboptimale voeding onder andere gepaard met stijging van concentraties van het corticotropine vrijzettend hormoon (CRH) en vitaminetekort. Deze en andere factoren leiden bij zwangerschap tot vertraagde intra-uteriene groei en een grote kans op preterme geboorte. Vrouwen met AN ervaren dan ook relatief vaak geboorte- en zwangerschapscomplicaties, zoals prematuriteit, stuitligging en een laag geboortegewicht, wat naast genetische factoren kan bijdragen tot het verhoogde risico dat kinderen van vrouwelijke AN patiënten hebben op het ontwikkelen van eetstoornissen. Ook miskramen komen vaak voor bij vrouwen met AN. Het risico op geboorte- en zwangerschapscomplicaties is niet verhoogd als de zwangere vrouw met AN voldoende bijkomt tijdens de zwangerschap. (37, 42, 91-95)

Het merendeel van de fysieke symptomen bij AN is reversibel. Herstel treedt op tijdens gewichtsnormalisatie. De vermindering van botdensiteit die het gevolg is van uithongering en de gevolgen hiervan, osteopenie en osteoporose, zijn echter niet reversibel en vormen dan ook een belangrijk probleem tijdens en na herstel van AN. Deze aandoeningen kunnen resulteren in onder andere onvolledige groei tijdens adolescentie en stress-breuken op latere leeftijd.(4, 43, 96)

### **2.2.6 Comorbiditeit**

De comorbiditeit van AN met andere psychiatrische aandoeningen is groot en speelt een belangrijke rol in de chroniciteit van AN.(64) Psychiatrische aandoeningen die vaak samen met AN voorkomen zijn: depressie, obsessieve-compulsieve stoornis (OCD), "body dysmorphic disorder", angststoornissen, autisme, sociale fobieën en misbruik van alcohol, geneesmiddelen en drugs.(31, 64, 69, 70, 77, 97-100) Wanneer AN samen voorkomt met bepaalde psychiatrische en niet-psychiatrische aandoeningen kan dit leiden tot verhoogde mortaliteit. Dit is bijvoorbeeld het geval bij type-1 diabetes, onder andere door misbruik van insuline, en bij alcoholmisbruik.(31, 101)

### **2.2.7 Neuroendocrinologie**

AN gaat gepaard met een groot aantal endocriene veranderingen. Deze zijn, tenminste deels, het gevolg van uithongering maar spelen ook een causale rol in de etiologie en progressie van AN. De hypothalamus (HT), een belangrijke structuur op vlak van gedrag, emoties, honger en verzadiging, en de HPA-as spelen een belangrijke rol in AN. Dit blijkt onder andere uit het verband tussen amenorroe en deficiënte vrijzetting van gonadotropine-vrijzettend hormoon uit de HT. (90, 102) Bij AN patiënten worden verder vaak abnormale concentraties gerapporteerd van een aantal honger-regulerende peptiden. Zo blijken de concentraties van NPY en CRH, die samen belangrijk zijn bij de regulatie van voedselinname, verhoogd bij AN en de concentratie van leptine, een uitermate belangrijke verzadiginginducerende factor en voortplantingsfactor die gesecreteerd wordt vanuit vetcellen, verlaagd.(4, 90) De rol van CRH in AN wordt geïllustreerd door de observatie dat centrale micro-injecties van CRH bij dieren leiden tot een reeks van fysiologische veranderingen en gedragssymptomen die typisch geassocieerd worden met anorexia zoals stijging van motorische activiteit en vermindering van eetgedrag. Het belang van leptine in AN blijkt uit de observatie dat toediening van leptine bij knaagdieren leidt tot een reductie van fysieke activiteit. Bovendien zijn lage leptine niveaus bij AN geassocieerd met hyperactiviteit. Hiernaast wordt bij AN patiënten ook hypercortisolemie waargenomen. (4, 46, 70, 90, 103-105) In de pathologie van AN zou stress aanleiding kunnen geven tot CRH hypersecretie. Dit leidt tot een daling van de concentratie van NPY, waardoor eetlust vermindert en insulineconcentraties hoog blijven ondanks calorische restrictie. Een verminderde aanwezigheid van NPY resulteert ook in hypercortisolemie waardoor het katabolisme versterkt wordt en dopaminevrijzetting verhoogt. Dit leidt tot euforie en stimulatie van hyperactiviteit. De combinatie van al deze factoren mondt uit in een neerwaartse spiraal van hyperactiviteit en verlies van eetlust en gewicht.(46, 70)

Verder worden ook abnormale plasma- en/of serumconcentraties van (nor)adrenaline, serotonine, groeihormoon, "insulin-like growth factor 1", groeihormoon bindend proteïne,  $\beta$ -endorfine, dynorfine-A, vasopressine, somatostatine-C, oxytocine, en de schildklierhormonen (T3 en T4) beschreven bij AN.(4, 90, 104, 106) Serotonine is een zeer interessant molecuul in onderzoek over AN aangezien deze neurotransmitter honger, verzadiging, activiteit, angst, opwindend en pijngevoeligheid reguleert. Serotonerge hyperactiviteit leidt tot AN symptomen zoals angst, obsessies en versnelde verzadiging. Een stijging van het metabolisme van serotonine kan veroorzaakt worden door hyperactiviteit of uithongering en resulteert in een daling van

voedselinname en lichaamsgewicht. Serotonine neurotransmissie is verstoord in AN en dit blijft zo na herstel.(46, 69, 70, 90, 107) Een daling van  $\beta$ -endorfine activiteit kan bijdragen tot weigering van voedsel door AN patiënten. Deze hypothese wordt ondersteund door de observatie dat intraventriculaire en hypothalamische injecties van  $\beta$ -endorfine eetgedrag stimuleren.(104, 106)

Concentraties van een deel van de vermelde neuropeptides, zoals leptine, NPY, CRH en  $\beta$ -endorfine, normaliseren tijdens gewichtsherstel. Verstoringen van deze concentraties zijn dan ook, minstens deels, secundair aan ondervoeding en gewichtsverlies.(103, 104) De endocrinologie van AN is in elk geval een samenspel van complexe, interactieve pathways in een vicieuze anorectische cirkel waarbij oorzaak en gevolg soms heel moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn.(90)

## **2.2.8 Behandeling**

AN is allerminst een eenvoudige aandoening om te behandelen en een groot aantal patiënten reageert niet of slecht op therapie. Vaak kan een gewichtsstijging wel bekomen worden, maar is deze niet blijvend. Herval na behandeling gebeurt zeer frequent. Al bij al blijft het resultaat van de, nochtans intensieve, therapieprogramma's op lange termijn vaak negatief. Er is dan ook nood aan onderzoek naar effectieve therapeutische strategieën voor AN. Naast onze gebrekkige kennis van de etiologische en pathologische mechanismen betrokken bij de aandoening vormt de beperkte compliantie van AN patiënten een belangrijk obstakel bij therapie.(4, 18, 108, 109)

### **2.2.8.1 Niet farmacologische behandeling**

Gewichtsherstel is het hoofddoel bij acute behandeling van AN. Hierbij is in sommige gevallen hospitalisatie, om voedselinname en fysieke activiteit te controleren, noodzakelijk. Hulpmiddelen bij het verminderen van hyperactiviteit zijn calorierijke maaltijden en toediening van warmte. Plotse toediening van grote hoeveelheden voedsel moet echter vermeden worden aangezien dit aanleiding kan geven tot ernstige metabole en klinische complicaties die beschreven worden als het "refeeding" syndroom. Ook psychotherapie kan gewichtsnormalisatie bevorderen. Familiale betrokkenheid bij de therapie kan, zeker bij kinderen en adolescenten, de resultaten ervan verbeteren. Vroege interventie, tenslotte, is cruciaal om het risico op aritmie en het verlies van grijze stof in de hersenen te beperken. (1, 3, 70, 110) Aangezien functionele beeldvorming en neuroendocrinologische studies de betrokkenheid van het centraal zenuwstelsel (CZS) in het mediëren en het behouden van symptomen van AN heeft aangetoond, worden nu ook de therapeutische mogelijkheden van interventies die gericht zijn op het CZS, zoals elektrische hersenstimulatie, bij AN patiënten onderzocht. De daling van mortaliteit bij AN die we de laatste jaren zien kan tenminste deels worden toegeschreven aan verbeteringen op vlak van therapie, bijvoorbeeld wat betreft aandacht voor medische complicaties en comorbiditeiten.(18, 31, 90)

### **2.2.8.2 Farmacotherapie**

Farmacologische therapie bij AN leidt vaak tot teleurstellende resultaten. Dit is bijvoorbeeld het geval voor toediening van oestrogenen, antidopaminerge en antiadrenerge agentia, bepaalde neuroleptica, tricyclische antidepressiva, tetrahydrocannabinol, cisapride, zinc en lithiumcarbonaat.(1, 90, 103) Toediening van gonadotrofine-vrijzettend hormoon stimuleert ovulatie en lost dus het probleem van amenorroe op, maar heeft geen effect op eetgedrag en lichaamsgewicht.(111) Toediening van selectieve inhibitoren van serotonine heropname (SSRI's), zoals fluoxetine, voorkomt herval na AN maar heeft geen bewezen effect tijdens de initiële fase van gewichtsnormalisatie.(1, 3, 90, 103) Behandeling met lage dosissen van atypische antipsychotica zou gewichtsherstel kunnen bespoedigen en symptomen van depressie en obsessiviteit kunnen verminderen.(3) Tenslotte kan toediening van neuroleptica en geneesmiddelen die interfereren met dopaminerge, noradrenerge of serotoninerge neurotransmissie hyperactiviteit verminderen.(70)

## 2.3 Het ‘Activity Based Anorexia’ model

---

*“You would be crazy to use animal models, but you would also be crazy not to use them”, Harry Harlow*

Anorexia nervosa is een humane aandoening met cognitieve, emotionele, psychische en biologische componenten. Hoewel het uitermate moeilijk is al deze componenten te repliceren in een diermodel is het ontwikkelen van modellen wel belangrijk. Diermodellen van eetstoornissen laten ons immers toe eetproblemen te simuleren onder gecontroleerde condities bij een groot aantal subjecten, de effecten van allerlei manipulaties op de aandoening te onderzoeken en de etiologie ervan te bestuderen. Het ‘Activity Based Anorexia’ (ABA) model is een eenvoudig introduceerbaar diermodel voor AN bij de rat dat intensief gebruikt wordt en geschikt is voor het bestuderen van een aantal belangrijke facetten van deze aandoening.(73)

### 2.3.1 Principe

Ratten die, in standaard omstandigheden, *ad libitum* beschikking hebben over voedsel eten gemiddeld 10 tot 15 maaltijden van 1-3 gram per dag, samen goed voor een totale duur van 1-2 uur. In tegenstelling tot deze normale situatie wordt voor ratten in het ABA model de toegang tot voedsel gelimiteerd tot 1 periode van 1-2 uur per dag. De dieren kunnen in dit model wel onbeperkt gebruik maken van een loopwiel. De combinatie van ongelimiteerde loopwielactiviteit en voedselrestrictie leidt tot een felle stijging van fysieke activiteit en tot een sterke daling van voedselconsumptie en lichaamsgewicht. Zo kunnen de ratten in dit model tot meer dan 23000 meter per dag afleggen en tot minder dan 1 gram per dag eten. De loopwielactiviteit en de waterinname in het ABA model zijn het hoogst wanneer de ratten voedsel anticiperen, meteen voor de voedingsperiode en er is ook een kleinere piek van deze variabelen meteen nadat het voedsel wordt weggenomen. Hiernaast ontwikkelen ABA ratten een verstoring van circadianritme op vlak van loopwielactiviteit: waar normale ratten voornamelijk s’ nachts actief zijn, komt loopwielactiviteit in het ABA model gespreid over de hele dag voor. Na de initiële reductie van voedselconsumptie volgt er in de regel een lichte stijging hiervan. Deze toename is echter niet voldoende om de nefaste lichaamsgewichts daling te stoppen. Het effect is zo drastisch dat de ratten sterven door zelf-uithongering na gemiddeld 3-12 dagen. Dieren die onderworpen worden aan hetzelfde voedingsschema maar geen beschikking hebben over een loopwiel overleven de voedselrestrictie wel. Bovendien is de aanwezigheid van een loopwiel, en niet enkel de mogelijkheid tot fysieke activiteit, essentieel aangezien toegang tot een stationaire, cirkelvormige loopgang niet volstaat voor de ontwikkeling van ABA. Synoniemen voor ABA zijn: ‘Activity Anorexia’, ‘(semi-) starvation-induced hyperactivity’, ‘self-starvation’ en ‘the activity-stress’ of ‘the activity-ulcer paradigm’.

De ernst van het syndroom is afhankelijk van een groot aantal factoren. Zo zullen de symptomen milder zijn als de ratten eten krijgen als het donker of net licht is, als de voedingsperiode elke dag op het zelfde moment valt, als de toegang tot het loopwiel beperkt wordt, als de ratten voor aanvang van het experiment zwaarder wegen of ouder zijn, als ze niet alleen in een kooi zitten en dus mogelijkheid hebben tot sociaal contact, als er frequenter maaltijden worden aangeboden, als de dieren nat in plaats van droog voedsel aangeboden krijgen en als ze reeds kunnen wennen aan de voedselrestrictie voor ze in het ABA model geïntroduceerd worden. Andere factoren die de ernst van het syndroom beïnvloeden zijn het geslacht van de dieren, hun basale activiteit, omgevingsverrijking, de leeftijd waarop de ratten van hun moeder weggehaald worden en pre-experimentele ervaring, onder andere met individuele huisvesting. Verder gaat een vetrijk dieet de ontwikkeling en progressie van ABA

tegen. Dit wordt in verband gebracht met activatie van bepaalde opioïde systemen. Activiteitsanorexia kan tenslotte ook geïnduceerd worden bij andere dieren. (70-72, 88, 106, 112-122)

### **2.3.2 Mechanisme**

Het gedrag van ratten in het ABA model lijkt tegenstrijdig met elke instinctieve zin voor zelfbehoud. Waarom deze dieren zich zo gedragen is dan ook een vraag waarover reeds veel is nagedacht. Hieronder worden een aantal hypothesen aangehaald. (118)

#### **2.3.2.1 De adaptatiehypothese**

De observatie dat ratten in het ABA model hyperactief zijn ondanks voedselrestrictie roept de hypothese op dat dit model maladaptief gedrag uitlokt. ABA zou tot stand komen wanneer de subjecten er niet in slagen zich aan te passen aan voedselrestrictie en daardoor gewicht verliezen. Het gewichtsverlies is volgens deze stelling primair te wijten aan de reductie van voedselinname. Fysieke activiteit versnelt verzadiging, waardoor dieren die extreem fysiek actief zijn erg kleine maaltijden eten, en verergert zo de maladaptatie. Deze hypothese gaat dus uit van een indirecte associatie tussen activiteit en gewichtsverlies. De stelling wordt ondersteund door de observatie dat dieren die zich reeds hebben kunnen aanpassen aan voedselrestrictie voordat ze in het ABA model geplaatst worden meer eten, minder gewicht verliezen, en langer overleven na introductie in het model dan dieren waarvoor dit niet zo is. Ook de observatie dat herhaalde blootstelling aan de volledige ABA procedure resulteert in grotere voedselconsumptie en trager gewichtsverlies dan eenmalige blootstelling hieraan past in dit plaatje. De adaptatiehypothese verklaart ABA niet volledig aangezien ratten die zich voor introductie in het model aan voedselrestrictie kunnen aanpassen het syndroom nog steeds ontwikkelen. Bovendien zijn ook zonder voorafgaande gewenning aan voedselrestrictie ongeveer 30% van de ratten ABA-resistent. (112, 115, 118, 120, 123-125) Het betreft hier overigens enkel adaptatie aan voedselrestrictie. Voor vrouwelijke ratten die zich kunnen aanpassen aan de aanwezigheid van een loopwiel voordat ze in het ABA model geïntroduceerd worden, is immers reeds gerapporteerd dat ze sneller activiteitsanorexia ontwikkelen dan ratten die pas in het ABA model voor de eerste keer met een loopwiel geconfronteerd worden. Dit zou te maken kunnen hebben met de impact van een nieuwe omgeving met loopwiel die bij deze laatste groep gedrag kan uitlokken dat rennen in het loopwiel tegengaat. (112, 126)

#### **2.3.2.2 De onderdrukkingstheorie**

Deze hypothese stelt dat intense fysieke activiteit eetlust en voedselinname onderdrukt, bijvoorbeeld door vrijzetting van opiaten te bevorderen. Hierbij kan fysieke activiteit leiden tot een neurochemische reactie die fungeert als een signaal van verzadiging na terminatie van de activiteit. Hiernaast zou een hoge loopwielactiviteit ook misselijkheid kunnen induceren en zo interfereren met voedselinname. Deze hypothese legt dus een primaire rol in gewichtsverlies weg voor hyperactiviteit. De resulterende daling van voedselinname geeft op zijn beurt aanleiding tot hyperactiviteit. Het gevolg is een vicieuze cirkel waarbij voedselrestrictie en hyperactiviteit elkaar versterken en gewichtsverlies bevorderen. (70, 71, 112, 115, 116, 120, 122, 124, 125)

#### **2.3.2.3 De thermostatische theorie van voedselconsumptie**

Voedselconsumptie is essentieel bij het op peil houden van de lichaamstemperatuur. Wanneer voedsel schaars is moeten dieren andere methoden, zoals bijvoorbeeld het verhogen van spieractiviteit, aanwenden om hypothermie te voorkomen. Dieren die in het ABA model geconfronteerd worden met voedselrestrictie zullen hun loopwielactiviteit dan ook drastisch verhogen om zichzelf warm te houden. Omgevingstemperatuur beïnvloedt lichaamstemperatuur en is daardoor een zeer belangrijke parameter in het ABA model. In een koudere omgeving zullen dieren immers meer actief zijn in een

poging hun lichaamstemperatuur op peil te houden dan in een warmere omgeving. ABA ratten eten dan ook minder, verliezen sneller gewicht en sterven sneller in een koude omgeving. De extreem hoge loopwielactiviteit bij ABA ratten kan echter niet volledig verklaard worden op basis van (o.b.v.) thermoregulatie aangezien de activiteitsstijging reeds optreedt voordat er enige daling van lichaamstemperatuur meetbaar is. Bovendien zullen ABA ratten ook bij een hoge omgevingstemperatuur hyperactiviteit ontwikkelen.(70, 72, 115, 118, 127)

#### **2.3.2.4 De evolutionaire theorie van activiteitsanorexia**

Deze hypothese stelt dat de hyperactiviteit die we zien bij ABA ratten een uiting is van één van de twee mogelijke strategieën tijdens voedseltekort: een poging om te migreren naar voedselrijke gebieden. De andere strategie bestaat uit stil blijven zitten en energie sparen, een voorbeeld hiervan zie je bij dieren die een winterslaap houden. Deze hypothese wordt ondersteund door observaties dat dieren wiens toegang tot voedsel beperkt wordt tot 3 periodes van 30 minuten in plaats van tot 1 periode van 90 minuten een minder sterke stijging van loopwielactiviteit doormaken. (70, 71, 88)

#### **2.3.2.5 Fysiologische verklaringen**

Ook fysiologische parameters zijn waarschijnlijk bepalend voor het gedrag van ABA ratten. Enkele hypothesen worden hier opgesomd.

- De opiaathypothese: Endogene opiaten kunnen belangrijk zijn in de pathogenese van ABA. Excessieve fysieke activiteit, al dan niet geïnduceerd door voedselrestrictie, zou één of meer opiaten activeren en zo leiden tot onderdrukking van eetlust. Hierbij kan auto-addictie aan endogene opiaten, zoals bijvoorbeeld  $\beta$ -endorfine, het maladaptief gedrag versterken.(71, 106, 115, 118) Data omtrent deze stelling zijn niet eenduidig. De hypothese wordt ondersteund door observaties dat toediening van de opioïde antagonist naloxone bij AN patiënten en bij ABA ratten leidt tot vermindering van activiteit en/of gewichtsstijging en dat AN patiënten gewijzigde plasma- en cerebrospinale vloeistof (csf-) concentraties van bepaalde opiaten vertonen.(70, 71, 88, 106) Maar er zijn ook studieresultaten die in tegenstrijd zijn met de opiaathypothese. Zo werd bijvoorbeeld geobserveerd dat toediening van bepaalde opioïde antagonisten bij ABA ratten loopwielactiviteit niet onderdrukt en voedselinname niet bevordert.(106, 118)
- De dopaminehypothese: Een stijging van mesolimbische dopaminerge activiteit kan een positief belonend effect uitlokken bij fysieke activiteit en zo loopwielactiviteit versterken. Deze hypothese wordt ondersteund door de observatie dat toediening van geneesmiddelen die de dopaminerge activiteit verhogen of verlagen de symptomen van ABA ratten respectievelijk versterkt en vermindert. De dopaminehypothese verklaart het gedrag van ratten in het ABA model niet volledig: ondanks de toediening van dopamine-antagonisten blijft de mortaliteit immers hoog.(113, 115, 118)
- Ook gonadale hormonen hebben waarschijnlijk invloed op de loopwielactiviteit van ratten in het ABA model. (118)

#### **2.3.3 Overeenkomsten tussen ABA en AN**

Tussen het ABA model en AN bestaan er een groot aantal overeenkomsten, onder andere op vlak van uithongering, hyperactiviteit en gewichtsverlies. Hyperactiviteit is een belangrijke factor bij de etiologie, progressie en ontwikkeling van chroniciteit van AN en dus ook bij een model voor deze aandoening. De relatie tussen fysieke activiteit en voedselinname die we zien bij AN patiënten wordt inderdaad weerspiegeld in het ABA model: ABA ratten en AN patiënten eten minder als ze meer fysiek actief zijn.(70-72) Maar het ABA model vertoont ook nog op andere vlakken gelijkenissen met AN. Zo vertonen ABA ratten en AN patiënten gelijkaardige neuro-endocriene afwijkingen, zoals

hyperactiviteit van de HPA as.(70, 72, 102, 128) Ook amenorroe komt voor bij AN en ABA.(70, 72, 102, 128) Dopamine-antagonisten verminderen niet alleen symptomen bij ABA ratten maar ook bij personen met AN.(118) Serotonine blijkt betrokken te zijn in de pathologie van AN en ABA.(88) De lage leptine concentraties die we observeren bij AN patiënten zijn in overeenstemming met de observatie dat toediening van leptine bij ratten hyperactiviteit vermindert en de ontwikkeling van ABA tegengaat. Ook NPY en de opiaten worden in verband gebracht met beide pathologieën. Zo werd bijvoorbeeld reeds gerapporteerd dat bij mensen die intens fysiek actief zijn en meer specifiek bij AN patiënten, de plasma- en csf- concentraties van  $\beta$ -endorfine en dynorfine verstoord zijn, net zoals bij ABA ratten. (70, 71, 106, 114, 115, 119) Hiernaast ontwikkelen ABA ratten en AN patiënten metabole verstoringen zoals een reductie van glucose en insuline plasmaconcentraties. Ook hypothermie komt voor bij AN en ABA en toediening van warmte vermindert de symptomen in beide gevallen. Bovendien is het verstoorde slaappatroon bij AN patiënten vergelijkbaar met de verstoring van circadianritme die optreedt bij ABA ratten. (72) Eens ratten in het ABA model nog ongeveer 75-70% van hun oorspronkelijke lichaamsgewicht wegen, ontwikkelen ze vaak ernstige maagzweren in het glandulaire deel van de maag. Ook 16 % van de AN patiënten ontwikkelt maagzweren.(66, 72, 112, 113, 115, 118) AN komt meer voor bij vrouwen dan bij mannen en vrouwelijke ratten vertonen ernstigere symptomen en overleven minder lang in het ABA model dan hun mannelijke soortgenoten. (70, 113, 118) Tenslotte ontwikkelen AN patiënten en ABA ratten beide reversibele immunodeficiëntie.(87, 129)

### **2.3.4 Verschillen tussen ABA en AN**

Vele aspecten van AN worden gerepliceerd in het ABA model, maar toch zijn er ook belangrijke verschillen tussen beide fenomenen. Zo wordt bij ABA ratten de toegang tot voedsel beperkt door de onderzoekers terwijl AN patiënten zelf beslissen om haast niets meer te eten. De dieren zullen bovendien wanneer ze het model verlaten opnieuw een voldoende hoeveelheid voedsel consumeren om hun lichaamsgewicht op peil te brengen. Het diermodel leert ons dan ook niets over de redenen waarom AN patiënten zichzelf uithongeren. Het is wel zo dat er discussie is over de mate waarin een AN patiënt zelf, vrijwillig stopt met eten. In principe kan je AN immers beschouwen als een syndroom waarbij externe variabelen, zoals socio-culturele factoren, voedselrestrictie veroorzaken en dus doen voor AN patiënten wat de onderzoeker doet voor ABA ratten.(71, 113, 115, 118) Dierne in het ABA model zullen ook reeds tijdens de procedure na een initiële, felle daling in voedselconsumptie terug meer en meer eten, een evolutie die we niet zien bij AN patiënten.(72)

### **2.3.5 Validiteit**

Hoewel het mogelijk is dat diermodellen psychologisch niet voldoende complex zijn om de volledige psychopathologie van een humane psychiatrische aandoening te verklaren, zijn ze wel uitermate bruikbaar bij het repliceren van bepaalde elementen die belangrijk zijn bij zo'n aandoening, zoals een stijging van fysieke activiteit bij AN. Bij het bepalen of een diermodel gebruikt kan worden om een bepaalde psychologische pathologie te modelleren spelen verschillende soorten validiteit een rol. Een belangrijke, overkoepelende vorm van validiteit is inhoudsvaliditeit. Bij het evalueren hiervan wordt nagegaan of het model een goede weerspiegeling is van de menselijke pathologie. Om dit te doen wordt in praktijk geëvalueerd of aan indrukvaliditeit, predictieve validiteit en constructvaliditeit voldaan is.(73, 109) Indrukvaliditeit beschouwt symptomatische parallellen tussen het model en de humane aandoening. Predictieve validiteit betreft de voorspellende waarde van het model: de mate waarin het voorspellen van effecten bij de mens mogelijk is o.b.v. wat we zien bij het dier. Aan constructvaliditeit, tenslotte, wordt voldaan wanneer de variabelen in een experiment precies weerspiegelen wat je wilt meten. Het houdt in dat er bij de ontwikkeling van het diermodel uit werd gegaan van een goed onderbouwde wetenschappelijke redenering waarbij etiologische en



pathologische mechanismen die we kennen bij de mens gemodelleerd worden bij dieren. Naast deze criteria kan bij het nagaan van de validiteit van een diermodel voor een humane aandoening ook de specificiteit van dat model voor die aandoening beschouwd worden. (73, 130)

#### **2.3.5.1 Indruksvaliditeit bij AN**

Aangezien de symptomatische vergelijkbaarheid tussen AN en ABA groot is, bijvoorbeeld op vlak van hyperactiviteit en gewichtsafname, maar niet absoluut wordt aan dit criterium tot op zekere hoogte voldaan. (73, 130)

#### **2.3.5.2 Predictieve validiteit bij AN**

Predictieve validiteit kan nagegaan worden door het testen van mogelijke therapeutische strategieën: als zo'n strategie succesvol is of faalt bij ABA ratten en AN patiënten onderbouwt dit deze vorm van validiteit. Aangezien er op vlak van bestaande therapie alvast grote gelijkenissen zijn tussen ABA en AN, wordt aan dit criterium voldaan. Zo heeft toediening van warmte of dopamine-antagonisten bijvoorbeeld een gunstig effect bij zowel AN als ABA. (72, 73, 118, 130)

#### **2.3.5.3 Constructvaliditeit bij AN**

Voor vele psychiatrische aandoeningen, waaronder ook AN, geldt dat de etiologische en psychopathologische mechanismen grotendeels onopgehelderd blijven. Het is dan ook de vraag of een diermodel van een psychiatrische aandoening wel kan voldoen aan dit criterium. Tussen ABA en AN zijn er in elk geval grote etiologische verschillen, bijvoorbeeld op vlak van de mate waarin voedselrestrictie vrijwillig gebeurt. Het ABA model voldoet dus niet aan het criterium van constructvaliditeit. (130)

#### **2.3.5.4 Specificiteit van ABA voor AN**

ABA wordt niet enkel gebruikt als model voor AN maar bijvoorbeeld ook voor OCD en maagzweren. (18) Het repetitieve, excessieve en maladaptieve rengedrag dat eigen is aan ABA lijkt immers sterk op het obsessieve en compulsieve gedrag dat we zien bij OCD patiënten. Bovendien is het ABA model een eenvoudige manier om maagzweren te induceren. (72, 131) Dit gegeven vermindert de waarde van ABA als model voor AN niet aangezien AN patiënten vaak te maken krijgen met maagzweren en OCD gerelateerd is aan en vaak voorkomt samen met AN. (18, 72)

## **2.4 Elektrische hersenstimulatie**

---

Elektrische hersenstimulatie (EHS) wordt gebruikt als therapie bij verscheidene neurologische aandoeningen, zoals de ziekte van Parkinson, OCD en essentiële tremor. Het is een chirurgische methode die bij therapieresistente psychiatrische aandoeningen een grote impact kan hebben. Het klinisch belang van EHS mag dan wel duidelijk zijn, het precieze mechanisme ervan is nog niet gekend. (132-135)

### **2.4.1 Methode**

Bij EHS worden pulsen gegenereerd die het omliggend hersenweefsel beïnvloeden en zo bepaalde reacties, zoals reductie van tremor bij de ziekte van Parkinson, uitlokken. Drie belangrijke stimulatieparameters zijn stroomsterkte (I), frequentie (f) en pulsbreedte (Pb). Deze parameters bepalen mee de effectiviteit en mogelijke schadelijkheid van EHS. De minimale stroomsterkte die noodzakelijk is om een neuronaal element te stimuleren met een lange pulsduur wordt de rheobase genoemd. De chronaxie is de minimale periode van stimulatie om een neuronaal element te exciteren bij de rheobase. Een andere stimulatieparameter bij EHS is de duur van elke pulstrein. Een pulstrein is

een opeenvolging met een bepaalde frequentie van pulsen met een bepaalde breedte zonder dat er een pauze is tussen de pulsen. Ook de afstand tussen de structuur die je wilt beïnvloeden en de elektrode moet in acht worden genomen. De hoeveelheid stroom die nodig is om een element te beïnvloeden is immers recht evenredig met het kwadraat van die afstand. Doelwitten dicht bij de elektrode worden dus makkelijker gestimuleerd dan verder gelegen regio's. Verder is ook de ladingsdensiteit (LD) of de LD per fase voor bifasische stimulatie, namelijk de stroomsterkte (per fase) gedeeld door het stimulatie-oppervlak van de elektrode, een uitermate belangrijke factor in hersenstimulatie. Wanneer de LD te hoog is, leidt stimulatie tot weefselschade. De LD is recht evenredig met de intensiteit van de puls en de pulsbreedte en omgekeerd evenredig met de oppervlakte van stimulatie. Vervolgens bestaat er bij elektrische stimulatie in weefsel, waar de impedantie niet constant is, de mogelijkheid om of de stroom of de spanning constant te houden. Stimulators die de stroomsterkte constant houden (constante stroom stimulators) doen dit door de spanning aan te passen aan impedantieveranderingen. Deze stimulators worden het meest gebruikt in neurofysiologische studies omdat het effect ervan zeer consistent is. Stimulators die de spanning constant houden (constante spanning stimulators) laten de stroomsterkte variëren met de impedantie. De stroom die bij het doelwit aankomt is hier veranderlijk waardoor ook het effect van stimulatie kan variëren. Deze vorm van stimulatie is daarom niet geschikt voor kwantitatieve analyses, maar wordt wel vaak gebruikt voor therapeutische doeleinden bij patiënten. Stimulatie kan hiernaast monopolaire of bipolaire zijn. Bij bipolaire stimulatie produceren de 2 elektrodes pulsen en worden ze dan ook allebei in het doelweefsel geplaatst. Bij monopolaire stimulatie wordt er gestimuleerd tussen één elektrode in het doelweefsel en een referentieoppervlak, mogelijk een elektrode, dat van het doelwit verwijderd mag zijn. Een voordeel van monopolaire stimulatie is dat de stroomdensiteit daarbij min of meer uniform rond de elektrode verdeeld is waardoor de effecten van stimulatie makkelijk aan de sterkte van de puls gecorreleerd worden. Als stimulatie-elektrode wordt meestal de kathode, de positieve elektrode, gebruikt omdat er bij stimulatie met de anode, de negatieve elektrode, een grotere stroomsterkte noodzakelijk zou zijn om een neuronale structuur te stimuleren. Hiernaast bestaat er een onderscheid tussen bifasische en monofasische stimulatie (zie 2.4.2. weefselschade). Tenslotte zijn ook fysiologische hersenfactoren van essentieel belang. Deze factoren bepalen immers hoe gevoelig bepaalde cellen van een bepaalde nucleus zijn voor EHS en welke effecten hierbij worden uitgelokt.(133, 136-141)

### **2.4.2 Weefselschade**

Elektrische stimulatie kan weefselschade veroorzaken. Neuronale schade is meestal het gevolg van polarisatie en hydrolyse onder invloed van ladingsoverdracht aan de elektrodetip. Hierdoor kan de pH van het weefsel immers drastisch veranderen en kan er gasvorming optreden. Hydrolyse komt typisch voor bij stimulatie met constante stroomsterkte en leidt tot het ontstaan van toxische waterstof- en zuurstofionen. Aan de kathode accumuleert negatieve lading, wat zorgt voor polarisatie terwijl aan de anode metaalionen worden afgezet. De insertie van een niet-lichaamseigen voorwerp in het hersenweefsel kan op zichzelf immunoreacties veroorzaken die interfereren met het effect van stimulatie. Deze acute ontsteking geeft aanleiding tot een chronische reactie die gepaard gaat met de ontwikkeling van blijvend gliaal-littekenweefsel dat de elektrode inkapselt en isoleert. Weefselschade kan hiernaast ook veroorzaakt worden door weefselverhitting tijdens stimulatie. Een bepalende factor bij schade door stimulatie is het gebruik van monofasische of bifasische pulsen. Bifasische stimulatie omvat een afwisseling van positieve en negatieve pulsen en veroorzaakt minder neuronale schade dan monofasische stimulatie aangezien de tweede puls van een bifasisch pulspaar de polarisatie veroorzaakt door de eerste puls opheft. Het verdient verder de voorkeur de pulsbreedte laag te houden aangezien dit de kans op weefselschade vermindert en het therapeutisch venster van EHS vergroot. De LD/fase mag, bij langdurige stimulatie, tenslotte maximaal 30 microcoulomb ( $\mu\text{C}$ ) per vierkante centimeter ( $\text{cm}^2$ ) bedragen om geen letsels in het hersenweefsel te veroorzaken. Als stimulatie met een

bepaalde elektrode relatief weinig weefselschade veroorzaakt, heeft deze een hoge biocompatibiliteit. Bij biocompatibiliteit speelt het materiaal van de elektrode een belangrijke rol. Zo is platinum zeer geschikt voor chronische stimulatie aangezien het relatief weinig toxisch is voor het hersenweefsel. Vaak wordt platinum gecombineerd met iridium voor extra stevigheid. Wolfram en stainless-steel worden ook vaak gebruikt bij EHS omdat ze duurzaam en sterk zijn. Materialen zoals goud, rhodium, zilver en koolstof kunnen best vermeden worden. Weefselschade is groter bij chronische dan bij kortdurende implantatie van elektroden en de gevolgen ervan zijn ernstiger voor recording, het opnemen en verwerken van elektrische hersensignalen, dan voor stimulatie.(136-138, 141, 142)

### **2.4.3 Mechanisme**

Over het mechanisme van EHS is er nog een grote mate van onduidelijkheid. Eén hypothese stelt dat stimulatie leidt tot verhoging van neuronale activiteit. Anderzijds zou bij stimulatie ook het effect van een letsel kunnen nagebootst worden door het verwerken en de overdracht van informatie functioneel te blokkeren, bijvoorbeeld door de productie van neurotransmitters te verminderen of door axonale activiteit te blokkeren door middel van (d.m.v.) niet-synaptische mechanismen. In strijd met het eerste voorbeeld is de observatie dat EHS aanleiding geeft tot vrijzetting van neurotransmitters. EHS leidt, samengevat, tot modulatie van hersenactiviteit van het doelwitweefsel en, via mono- en polysynaptische netwerken, van andere hersenregio's. Letsels en stimulatie kunnen via andere wegen gelijkaardige effecten veroorzaken. Hierdoor kunnen we EHS ook gebruiken in situaties waarbij letsels therapeutisch effectief zijn, zoals bijvoorbeeld in het geval van ABA waarbij letsels in de septale nucleus voedselinname en lichaamsgewicht verhogen.(132-134, 139, 143, 144) Er is verder onduidelijkheid over welke cellen en welke delen van cellen er gestimuleerd worden bij EHS. Zo hebben cellichamen bijvoorbeeld een hogere drempel voor stimulatie dan axonen en dendrieten en is de weerstand van witte stof niet gelijk aan die van grijze stof. Eén hypothese is dat hoog-frequente EHS cellichamen van neuronen dicht bij de kathode inhibeert en axonen in deze regio doet vuren met de frequentie van stimulatie. Verder van de kathode zou het effect op de axonen minder belangrijk zijn. Ook de geometrische configuratie van neuronale elementen in relatie tot de elektrode beïnvloedt het effect van stimulatie.(132, 134, 138-140)

### **2.4.4 Selectie van doelwitten voor EHS en chirurgische precisie**

Selectie van doelwitten voor EHS is niet vanzelfsprekend. Het proces wordt bemoeilijkt door onzekerheden over welke neurale elementen, cellen of vezels geëxciteerd worden bij EHS en over hoe groot het gebied in de hersenen is dat er door beïnvloed wordt. Functionele beeldvorming kan gebruikt worden om doelwitten voor hersenstimulatie te selecteren en om herstel van ziekte-specifieke activiteitspatronen in de hersenen na EHS aan te tonen. Zo wordt er bijvoorbeeld vaak gestimuleerd in hersenregio's die metabool overactief zijn, wat nagegaan kan worden d.m.v. fluorodeoxyglucose (FDG) positron emissie tomografie (PET) of functionele magnetische resonantie beeldvorming (fMRI). Deze strategie heeft onder andere geleid tot de ontwikkeling van therapeutische stimulatie in de posterieure HT bij ernstige hoofdpijn. Functionele beeldvorming onder verdoving geeft echter niet noodzakelijk een optimale weergave van de hersenactiviteit die er zou zijn zonder verdoving. Aangezien bij hoogfrequente EHS vaak dezelfde effecten kunnen uitgelokt worden als bij letsels zijn ook de resultaten van letselstudies bij dieren een belangrijke leidraad bij doelwitselectie. Beeldvorming kan ook gebruikt worden om de effecten van EHS tijdens stimulatie na te gaan.(109, 133, 134, 139) Verder wordt hoge resolutie MRI gebruikt tijdens selectie van doelwitten voor EHS en tijdens functionele neurochirurgie om diepe hersenstructuren accuraat te visualiseren. Ook stereotactische lokalisatie met behulp van een stereotactische atlas is hierbij een belangrijk hulpmiddel. Hiernaast kan registratie van elektrische hersensignalen een idee geven van waar de

elektrode zich bevindt en zo chirurgische precisie verhogen. (134, 145) Tenslotte kan bij dieren na EHS histologisch nagegaan worden of de elektroden in het doelwitweefsel geïmplantéerd werden.

Ook selectie van stimulatieparameters is een moeilijke zaak. Er is een enorme hoeveelheid mogelijke combinaties van parameters en weinig is met zekerheid geweten over de effecten van de verschillende mogelijkheden. De complexiteit wordt geïllustreerd door de selectie van stroomintensiteit: een voldoende hoge intensiteit is noodzakelijk om het gewenste klinisch effect uit te lokken maar wanneer de intensiteit te hoog is leidt dit tot weefselschade. Het is belangrijk de selectie van stimulatieparameters zorgvuldig te doen aangezien de combinatie van stimulatieparameters bepaalt welke neurale elementen op welke afstand van de elektrode geëxciteerd worden.(141)

## 2.5 De septale nucleus

---

### 2.5.1 Situering, morfologie en connecties

De septale nucleus (SN), een belangrijk element van het limbisch systeem, situeert zich ventraal ten opzichte van (t.o.v.) het anterieure deel van het *corpus callosum*, tussen andere delen van het *telencephalon*, zoals de HC, en tussen delen van het *diencephalon* zoals de HT. Het is een kleine en op vlak van cellen en vezels vrij heterogene structuur die bijna volledig omringd wordt door cerebrospinaal vocht. (146-148) De SN kan o.b.v. anatomische en functionele data rostro-caudaal ingedeeld worden, maar momenteel wordt deze structuur meestal o.b.v. onder andere cytoarchitectuur en verbindingen met andere hersenregio's opgedeeld in 4 grote regio's namelijk de laterale, mediale, ventrale en dorsale delen van de SN. De laterale en mediale septale gebieden zijn wederzijds verbonden met de HC. De laterale SN kan verder worden onderverdeeld in dorsale, intermediaire en ventrale regio's op basis van cytoarchitectuur of in rostrale, caudale en ventrale delen op basis van voorkomen van neurotransmitters en hormonale receptoren in elk deel. Het mediale deel van de SN omvat onder andere de diagonale band. Het ventrale septale gebied is wederzijds verbonden met de *amygdala* en een aantal verdelingen rekenen de *bed nucleus van de stria terminalis* tot deze structuur. Het posterieure deel van de SN bestaat uit de septofimbriale en de triangulaire septale nucleï en geeft onder andere input aan de *habenulaire nucleï*.(147, 149-152) De SN heeft extensieve efferente en afferente connecties door een aantal structuren van het CZS, zoals de *fornix*, de 'medial forebrain bundle' (mfb), de *stria terminalis* en de *stria medullaris*, en met een groot aantal hersenregio's zoals de HT, de preoptische gebieden, de *supra-optische nucleï*, tegmentale gebieden, de HC, het mammillaire complex, de *supramammillaire nucleus*, de *olfactorische tuberculi*, de *amygdala*, de *habenula*, de *nucleus incertus*, de thalamus, de paraventriculaire nucleï (PVN), het ventrale *pallidum*, de pyriforme cortex, de *dorsale raphe nucleus*, het *subiculum*, het *tegmentum* en het verlengde merg. Ook tussen de verschillende delen van de SN is er een uitgebreid netwerk van verbindingen. Een aantal van de verbindingen tussen de SN en andere hersengebieden zijn topografisch of wederzijds georganiseerd. (146-148, 150, 151, 153-164) Hiernaast wordt de SN doorkruist door een groot aantal vezels, bijvoorbeeld projecties die vertrekken vanuit delen van de voorhersenen, zoals de HC, naar diencephalische hersenregio's zoals HT of projecties van de *magnocellulaire basale nucleus* naar de cortex. (154, 165)

### 2.5.2 Functie

De enorme anatomische diversiteit op vlak van projecties die eigen is aan de SN reflecteert zich in een even grote functionele diversiteit. De SN is betrokken bij allerlei aspecten van gedrag, onder andere bij autonome, reproductieve, emotionele en sociale functies. Deze structuur is bovendien, waarschijnlijk samen met de HC, betrokken in het verwerken van sensorische informatie. Hiernaast is de SN waarschijnlijk van belang bij het uitlokken van rustgevend effecten, aangezien verwijdering ervan of

het maken van letsels in deze structuur leidt tot hyperactiviteit en frustratie. Ook bij het mediëren van beloning is de SN betrokken, zoals onder andere blijkt uit het succes van septale zelfstimulatie (zie 2.5.3.1 Septale zelfstimulatie). Ten slotte zou de SN ook invloed hebben op het geheugen. Een aantal functies van deze hersenregio worden hieronder nader toegelicht.(146-148, 153, 166-168)

### **2.5.2.1 Invloed op andere hersenregio's**

Aangezien de septale regio extensieve connecties heeft met een groot aantal hersenregio's en neuronale activiteit in de meeste belangrijke hersensystemen kan beïnvloeden, is het moeilijk de functie van de SN te beschouwen zonder de functies van die hersenregio's in acht te nemen.(147, 148) Zo wordt bijvoorbeeld gesteld dat de SN een schakelcentrum is tussen het diencephalon en het telencephalon of tussen limbische en diencephalische structuren, en dus informatieoverdracht tussen deze regio's en hun functies kan beïnvloeden.(151) Bovendien impliceert deze grote mate van verbondenheid met andere hersengebieden ook dat deze gebieden invloed kunnen uitoefenen op activiteit in de SN. Zo zou de septale regio niet enkel beïnvloed worden door de HT maar zelfs door endocriene factoren die vrijgezet worden uit of onder invloed van deze structuur.(154) De SN oefent ook invloed uit op de HT. Septale stimulatie en letsels kunnen bijvoorbeeld zelfstimulatie in de laterale hypothalamus (LH) bij ratten faciliteren en inhiberen. Net zoals andere componenten van het limbisch systeem kan de SN de neurale activiteit in de HT versterken en inhiberen en zo invloed uitoefenen op hypothalamische mechanismen zoals het mediëren van endocriene, viscerale en somatomotorische functies. Bovendien beïnvloedt laterale septale stimulatie de expressie van FOS in de HT. De laterale SN controleert dus waarschijnlijk ook hypothalamische structuren betrokken in neuroendocrinologie. Anderzijds zou hypothalamische stimulatie septale zelfstimulatie kunnen faciliteren en inhiberen. De relatie tussen de SN en de HT is, kortom, dynamisch en bidirectioneel.(146, 149, 169, 170)

Hiernaast zijn pacemakercellen in de mediale SN ook betrokken bij het tot stand komen van het thetaritme in de HC.(171) Het mediale septale gebied vervult hierbij de functie van schakelcentrum tussen de nucleus pontis oralis en de posterieure HT onderweg naar de HC.(172, 173) Verder kan input vanuit de laterale SN neuronen en andere cellen in de PVN inhiberen en, in mindere mate, stimuleren. Dit wordt geïllustreerd door de vaststelling dat er extensieve, topografisch georganiseerde projecties bestaan van de SN naar de PVN en door septale stimulatie-experimenten. De PVN omvat onder andere neurosecretorische cellen die CRH, somatostatine, oxytocine en vasopressine synthetiseren en zou ook essentieel zijn bij de secretie van adrenocorticotroop hormoon (ACTH). Dit verklaart waarom de laterale SN een inhibitorische rol speelt in adrenocorticale secretie.(174) Bovendien maakt het septale gebied deel uit van een groep limbische structuren die de activiteit van neuronen in het respiratoire centrum van het verlengde merg beïnvloeden. Het effect van deze beïnvloeding hangt af van de mate van hypoxie. De invloed van de SN is ok hier voornamelijk inhibitorisch.(153)

### **2.5.2.2 Dorst en waterinname**

De SN is betrokken in de controle van waterinname. Hierbij fungeert deze nucleus als een deel van het dorstcentrum dat ook de HT omvat. Intracerebrale toediening van bepaalde stoffen in de SN heeft kan waterinname uitlokken en inhiberen. Toediening van cholinerge agentia zal bijvoorbeeld drinkgedrag induceren. Hiernaast kunnen septale letsels dorst en waterinname verhogen. Een mogelijk verklaring van dit effect is dat het septale gebied deel uitmaakt van het verzadigingssysteem in de controle van waterinname, waarschijnlijk als centrum voor detectie van expansie van het intracellulair volume of van hyperosmolariteit. Hierbij zou de SN inhibitorische signalen sturen naar de LH en zo vrijzetting en productie van antidiuretisch hormoon kunnen beïnvloeden. Ratten met septale letsels zouden dus meer drinken omdat de signalen die leiden tot het beëindigen van drinkgedrag niet of in mindere mate tot

stand komen. Deze hypothese wordt ondersteund door de observatie dat septale stimulatie waterinname vermindert en dat deze vermindering niet het gevolg is van trager drinken maar van sneller stoppen met drinken. Activatie van de SN zou ook de activiteit van het renine-angiotensine systeem, dat betrokken is bij de fysiologische controle van waterinname, kunnen verminderen. Aangezien de SN ook waterinname kan uitlokken, is septale invloed op hypothalamische functie waarschijnlijk niet beperkt tot inhibitie. De dubbele rol, facilitatie en inhibitie, van het septale gebied in drinkgedrag wordt ook geïllustreerd door de observatie dat septale stimulatie waterinname, uitgelokt door stimulatie van de LH, kan doen toenemen en verminderen. Ook de vermelding dat letsels in de SN soms, maar niet altijd, een effect hebben op waterinname past in dit plaatje. De letsels kunnen immers zowel inhibitorische als faciliterende invloeden elimineren zodat er geen verandering van waterinname optreedt.(9, 146, 175, 176)

### **2.5.2.3 Voedselconsumptie**

Uit de observatie dat stimulatie en letsels in de SN eetgedrag kunnen uitlokken, blijkt dat deze structuur waarschijnlijk ook betrokken is in de controle van voedselconsumptie. De invloed van septale activiteit op voedselinname is weliswaar kleiner dan die op waterconsumptie. Het septale gebied zou belangrijk zijn bij het balanceren van voedsel en waterinname en inhibitorische signalen naar de LH, een hersenregio essentieel bij het regelen van voedselinname, sturen. Dit laatste blijkt ook uit de observatie dat letsels in de mediale en laterale SN de minimale stroom die noodzakelijk is voor het uitlokken van van voedselinname d.m.v. stimulatie in de HT verminderen en hierbij leiden tot een stijging van voedselinname.(146, 177, 178)

### **2.5.2.4 Angst**

Een groot aantal studies suggereren een rol van de SN in inhibitie van angst. Zo ontwikkelen dieren met septale letsels bepaalde gedragingen die afhankelijk zijn van angst-reductie niet. Verder is aangetoond dat de activiteit van neuronen in de SN toeneemt als angst vermindert en afneemt als angst wordt uitgelokt. Ook anxiolytische geneesmiddelen verhogen de neuronale activiteit in deze hersenregio.(179, 180) Bovendien leiden septale letsels tot een verhoogde pijngevoeligheid.(146)

## **2.5.3 Elektrische hersenstimulatie in de septale nucleus bij de rat**

EHS in de SN is in het verleden reeds vaak toegepast. Algemeen gezien heeft septale stimulatie vaak een inhibitorisch effect op autonome en somatische reacties en gedrag.(175) De eerste rapporteringen van septale stimulatie dateren van het midden van de jaren 50 van vorige eeuw. De effecten die nagegaan werden in studies waarin septale stimulatie een belangrijke rol speelt, zijn vrij talrijk. Hieronder wordt een overzicht van deze studies gegeven aan de hand van de geobserveerde effecten.

### **2.5.3.1 Septale zelfstimulatie (SZS)**

#### ***Principe***

Stimulatie in de SN kan een gevoel van beloning genereren. Dit wordt geïllustreerd door een nu klassieke proefopstelling waarbij proefdieren de mogelijkheid krijgen om zichzelf septaal te stimuleren, bijvoorbeeld door op een hendeltje te drukken. Het gevolg is dat de dieren niet 1 of 2 keer op het hendeltje zullen drukken, maar dat de frequentie ervan, de 'response rate', enorm zal toenemen. Het gedrag van de proefdieren wordt volledig toegespitst op het krijgen van septale stimulatie. Deze reactie ontwikkelt echter niet bij alle proefdieren. Dieren waarbij dit wel gebeurt worden 'positive-responders' genoemd, dieren waarbij dit niet gebeurt zijn 'non-responders'. 'Negative-responders' ervaren septale stimulatie als een onaangenaam fenomeen en zullen effectief proberen dit te vermijden. Hun 'response rate' zal lager zijn dan die van controledieren die niet septaal gestimuleerd worden.(181-183) Dit effect werd voor de eerste keer nagegaan door Olds en Miller in 1954. Tijdens

dit experiment drukten ratten tot 742 keer per uur een hendeltje in om septale stimulatie te verkrijgen. Het zelfstimulatie fenomeen kan ook uitgelokt worden in verscheidene andere hersenregio's, zoals bijvoorbeeld de HT, maar de mechanismen bij het verkrijgen van belonende effecten verschillen van regio tot regio. Het belonende effect van septale stimulatie zou bijvoorbeeld het gevolg kunnen zijn van een parasympathische reactie van het autonoom zenuwstelsel of van een reductie van angst.(184) De versterkende kracht van septale stimulatie is groter dan die van stimulatie in vele andere hersenregio's, zoals bepaalde hypothalamische gebieden.(167, 184, 185) Zelfstimulatie in deze laatste regio's wordt dan ook sterker onderdrukt door gelijktijdige onaangename stimulatie, bijvoorbeeld in de dorsale middenhersenen (DM), dan SZS.(186)

### ***Gevolgen***

Brady en Conrad toonden in 1960 aan dat SZS interfereert met de ontwikkeling en het behoud van een geconditioneerde angstrespons. De 'response rate' voor septale stimulatie bleef tijdens deze studie onveranderd ondanks aanwezigheid van een angst inducerende stimulus.(187) SZS heeft geen direct effect op waterinname. Wanneer ze de keuze hebben tussen SZS en water kiezen dieren voor SZS tenzij ze ernstig gedehydrateerd zijn. Bovendien zullen ze niet opteren voor septale stimulatie als ze dit kunnen bekomen door een slecht smakende of toxische vloeistof te drinken.(182, 188) Het gevoel van beloning bij SZS kan gerelateerd worden aan neurale controle van dorst door de SN aangezien bij ratten die een hoge 'response rate' ontwikkelen bij SZS typisch ook het effect van septale stimulatie op waterinname groot is.(9)

### ***Hersenregio's betrokken bij SZS***

Bij het fenomeen van SZS zijn verschillende hersenregio's betrokken. Het gaat hier onder andere over gebieden in de anterieure HT, in de preoptische regio en bij de interpedunculaire nucleus. Verder kunnen ook de habenulointerpedunculaire verbindingen en verbindingen tussen de interpedunculaire nucleus en structuren anterior ervan zoals de mfb belangrijk zijn bij SZS. De hoeveelheid betrokken hersengebieden en de observatie dat letsels in deze gebieden de 'response rate' bij SZS niet tot nul herleiden toont aan dat het systeem van SZS een vrij grote redundantie heeft. Het grote reorganisatievermogen van dit systeem wordt dan weer geïllustreerd door de vinding dat de 'response rate', die na letselinductie in de betrokken hersenregio's daalt, na verloop van tijd terug kan stijgen. (189)

### ***SZS als beloning na gedrag***

Het principe van SZS berust op de beloning die samengaat met septale stimulatie. Hierdoor kan SZS gebruikt worden om bepaalde handelingen aan te moedigen. Pliskoff et al. toonden hierbij aan dat septale stimulatie als beloning niet opvallend verschilt van andere factoren die in onderzoek hiervoor worden gebruikt, zoals voedsel na voedselrestrictie of water na waterdeprivatie.(190) Het gebruik van SZS als beloning na gedrag is wijdverspreid en goed uitgewerkt. Zo zijn er procedures ontwikkeld, bijvoorbeeld de progressieve procedure met vaste ratio's van Keesey en Goldstein, die de betrouwbaarheid van SZS, onder andere door minimalisatie van invloed van motorische neveneffecten, verhogen.(191)

### **2.5.3.2 Septale stimulatie en de hypothalamus**

Het effect van septale stimulatie op de HT is afhankelijk van spontane activiteit van neuronen in de LH. Als ontlading van deze neuronen traag gebeurt, zal septale stimulatie ontlading bevorderen. Wanneer de LH neuronen echter snel ontladen, zal stimulatie van de SN de ontlading inhiberen. Zo kan septale stimulatie zelfstimulatie in de LH bij ratten faciliteren of inhiberen afhankelijk van de activiteit in de LH. Perifere of centrale factoren die de activiteit van LH neuronen beïnvloeden zijn dan ook bepalend voor het effect van septale stimulatie op de HT. De spontane activiteit van neuronen in

de LH stijgt of daalt, in ongeveer gelijke mate, tijdens en na septale stimulatie. De beïnvloeding is sterker bij repetitieve stimulatie, bij grotere Pb en bij hogere f. Aangezien er na stimulatie een 'rebound' fenomeen kan optreden, zijn effecten tijdens en na stimulatie niet noodzakelijk gelijk.(149, 169) Hiernaast beïnvloedt laterale septale stimulatie expressie van het fos-eiwit in de HT.(170)

### **2.5.3.3 Hartritme, bloeddruk en ademhaling**

Septale stimulatie heeft een driefasig effect op hartritme: initieel veroorzaakt het een lichte hartritmevertraging die aanleiding geeft tot een compensatoire versnelling waarna een langere vertraging van het hartritme volgt. De compensatoire versnelling treedt enkel op als de SN weinig lateraal gestimuleerd wordt.(192) Stimulatie van de SN kan ook aanleiding geven tot een bloeddrukdaling die persisteert na stimulatie en gevolgd wordt door bradycardie of tot een bloeddrukstijging. De bloeddrukval is waarschijnlijk niet te wijten aan een daling van hartritme of contractiekracht maar eerder aan andere mechanismen zoals inhibitie van vasoconstrictie, mogelijk gemedieerd door de HC. Hiernaast kan septale stimulatie leiden tot respiratoire veranderingen.(166)

### **2.5.3.4 Effecten van septale stimulatie in verband met eten en drinken**

Septale stimulatie vermindert de effectiviteit van water als beloning bij watergedepriiveerde ratten maar wijzigt de kracht van voedsel als beloning voor voedselgedepriiveerde ratten niet. Dit geeft aan dat de mechanismen waarmee voedsel en water als beloning fungeren verschillend zouden kunnen zijn.(193) Hiernaast kan septale stimulatie waterinname verminderen door de terminatie van drinkgedrag te bespoedigen zonder het lik-tempo te verminderen en dus zonder invloed op motorische aspecten van dit gedrag. Deze vermindering is waarschijnlijk te wijten aan invloed op elementen die instaan voor verzadiging en inhibitie van waterinname. Voor septale stimulatie die waterinname vermindert, is er echter geen effect op voedselinname aangetoond. (9, 175) Stimulatie van de SN voor stimulatie van de LH kan bovendien waterinname uitgelokt door LH stimulatie beïnvloeden. De richting van deze invloed is afhankelijk van de plaats van stimulatie in de SN: dorsale septale stimulatie bevordert drinkgedrag via de fornix terwijl stimulatie in het ventrale deel van de SN dit gedrag inhibeert via de stria terminalis.(176) De observatie dat septale stimulatie bij een rat een gedragsequentie kan uitlokken waarbij het dier eerst zijn lichaam schudt, daarna zichzelf verzorgt en uiteindelijk eet als er voedsel beschikbaar is, zette Altman en Wishart er toe aan het effect van septale stimulatie op voedselconsumptie van naderbij te bekijken. Zij toonden aan dat stimulatie in de anteroventrale SN van de verzadigde rat inderdaad resulteert in een stijging van voedselconsumptie. Dit eetgedrag heeft motivationele eigenschappen aangezien het ook optreedt wanneer de rat zich moet inspannen om het eten te bekomen. Het blijkt echter wel dat het voedselzoekend gedrag dat hier geïnduceerd wordt niet zo intens is als dat bij natuurlijk voorkomende honger of bij directe stimulatie van de LH aangezien ratten in die situaties nog veel moeilijkere taken gaan uitvoeren om voedsel te verkrijgen. Dit effect blijkt voornamelijk na en niet tijdens stimulatie op te treden. Een hypothese hierbij stelt dat de SN na activatie, bijvoorbeeld door stimulatie, inhibitorische informatie doorstuurt naar de LH waardoor voedselconsumptie vermindert. Deze vermindering wordt gevolgd door een 'rebound' effect waardoor consumptie van voedsel geïnitieerd wordt zodra de stimulatie stopt.(177) Ook bij een experiment van Wishart in 1973 werd een initiatie van (gulzig) eetgedrag uitgelokt door stimulatie. De stijging van voedselconsumptie na septale stimulatie was hier echter gecorreleerd met abnormale elektrische activiteit in de HC die hypothalamische gebieden betrokken bij voedselinname kan beïnvloeden. Het is dus niet meteen duidelijk of dit eetgedrag te wijten is aan de septale activatie of aan de abnormale hippocampale activiteit.(194) Hiernaast werd aangetoond dat septale stimulatie ook smaakvoorkeuren kan beïnvloeden. Zo veroorzaakte stimulatie van de mediale en laterale SN in een studie in 1985 afkeer van natriumchloride (NaCl), waarschijnlijk d.m.v. inhibitie van LH neuronen die verantwoordelijk zijn voor NaCl consumptie.(195)



### **2.5.3.5 Stress, angst en septale stimulatie**

Septale stimulatie kan kalmerend werken en stress reduceren. Zo aanvaardden ratten die blootgesteld worden aan een combinatie van septale stimulatie en elektrische schokken meer schokken en vertonen ze minder stressreacties dan ratten die niet septaal gestimuleerd worden. Dit effect is groter voor laterale dan voor mediale septale stimulatie. Bovendien gaat septale stimulatie de ontwikkeling van maagzweren, die door stress geïnduceerd worden, tegen. Hiernaast heeft continue stimulatie van de SN met lage intensiteit een anxiolytisch effect, waarschijnlijk door specifieke angstreducerende eigenschappen hiervan. Ratten die blootgesteld worden aan septale stimulatie ontwikkelen bijvoorbeeld geen of slechts een zwakke geconditioneerde angstreactie. Letsels in de SN hebben een anxiogeen effect.(179, 180, 188, 196)

### **2.5.3.6 Pijn en septale stimulatie**

Septale stimulatie kan hyperalgesie en analgesie uitlokken. De hyperalgesieve werking van stimulatie in de SN blijkt uit de observatie dat het leidt tot een versnelde ontsnappingsreactie op een onaangename perifere prikkel, bijvoorbeeld een elektrische schok aan de poot. Wanneer de onaangename prikkel echter centraal toegediend wordt, bijvoorbeeld door de DM te stimuleren, versnelt septale stimulatie de ontsnappingsreactie enkel bij 'negative responders'. Bij 'positive responders' wordt de ontsnappingsreactie dan zelfs vertraagd. Een hypothese voor het verschil in het effect van stimulatie bij 'positive responders' en 'negative responders' is dat septale stimulatie de middenhersenen respectievelijk meer ventraal en meer dorsaal activeert.(183) Anderzijds werkt SZS met lage intensiteit analgesief. Hierbij verhoogt deze stimulatie de drempel voor en verlaagt het de frequentie en intensiteit van reacties op een simultane elektrische schok aan de poot, mogelijk d.m.v. directe centrale neuronale inhibitie.(197) Een mogelijk analgesief effect van septale stimulatie werd echter niet bevestigd in latere studies.(184)

### **2.5.3.7 Hippocampale effecten van septale stimulatie.**

Septohippocampale projecties spelen een belangrijke rol in het thetaritme van de HC dat betrokken is bij de integratie van sensorische stimuli en motorische reacties. Septale stimulatie heeft dan ook invloed op hippocampaal ritme.(155, 158) Dorsale septale stimulatie onderdrukt activiteit in de HC, wat gepaard gaat met inhibitie van gedrag. In tegenstelling hiermee lokt SZS in het ventrale deel van de septale regio snelle hippocampale activiteit uit.(181) Het effect van septale stimulatie op ritme in de HC heeft geen gevolgen voor het verkrijgen van SZS.(198) Meer specifiek is het mogelijk om het hippocampale thetaritme te sturen door de mediale SN laagfrequent (6-10 Hz) te stimuleren en om dit ritme te blokkeren door deze regio van de SN hoogfrequent (75-200 Hz) te stimuleren. Het sturen van thetaritme door laagfrequente septale stimulatie tijdens consolidatie van gedrag zal dit gedrag weerstandiger maken tegen extinctie. Tijdens extinctie van gedrag zal deze stimulatie echter leiden tot het omgekeerde effect.(171) Het thetaritme in de HC dat uitgelokt wordt door septale stimulatie gaat niet gepaard met het type I gedrag dat bij niet-gestimuleerde dieren met dit ritme geassocieerd is en dat onder andere hoofdbewegingen en loopwielactiviteit omvat.(172, 199) Een mogelijke verklaring voor de dissociatie van verwacht gedrag en neuronale activiteit wordt geboden door de observatie dat septale stimulatie inderdaad leidt tot activatie van het neurale circuit in de HC dat instaat voor het genereren van theta activiteit, maar dit op een niet fysiologische manier. Dit zorgt ervoor dat de elektrofysiologische eigenschappen van uitgelokte theta activiteit niet gelijk zijn aan die van spontane theta activiteit en dat het gedrag dat in beide situaties voorkomt dus ook niet noodzakelijk gelijk is. Naar aanleiding van de hypothese van Bland en Oddie dat voornamelijk de posterieure HT belangrijk is bij het genereren van type I gedrag, formuleerden Bland et al. in 2006 de hypothese dat stimulatie van de mediale SN (MS) er niet alleen niet in slaagt type I gedrag uit te lokken omdat de neurale circuits die betrokken zijn bij het genereren van theta activiteit op een niet-fysiologische manier

geactiveerd worden, maar ook omdat het uitgelokte thetaritme niet geassocieerd is met de sensorimotorische informatie van de posterieure HT die hier in normale situaties wel mee geassocieerd is en die zeer relevant is voor gedrag. Verder werd aangetoond dat stimulatie van de MS bij verdoofde en niet-verdoofde ratten de frequentie van theta activiteit in de HC kan verhogen en verlagen afhankelijk van de activiteit in de hersenstam. Ook heeft deze stimulatie een direct effect op de intensiteit van de theta activiteit.(124, 172, 173)

#### **2.5.3.8 Onderdrukking van gedrag.**

Laagfrequente stimulatie van de laterale of mediale SN kan gedrag, bijvoorbeeld loopwielactiviteit, onderdrukken. Dit effect is waarschijnlijk niet te wijten aan belonende of afstraffende effecten van septale stimulatie en is het sterkst voor gedrag dat veel inspanning vereist. Hetzelfde geldt voor stimulatie van de prefrontale cortex die verbonden is met het de SN via de thalamus, wat wijst op een relatie tussen deze twee hersenregio's op vlak van inhibitie van gedrag.(200)

#### **2.5.3.9 Invloed op andere hersenregio's**

Septale stimulatie faciliteert en inhibeert de activiteit van neuronen in de PVN en van respiratoire neuronen in de medulla oblongata tijdens hypoxie. Hierbij overheersen inhibitorische invloeden die voornamelijk uitgaan van de ventrale SN. De invloed is groter in de initiële dan in de late, ernstigere, fase van hypoxie.(153, 174)

## **2.6 Probleemstelling**

---

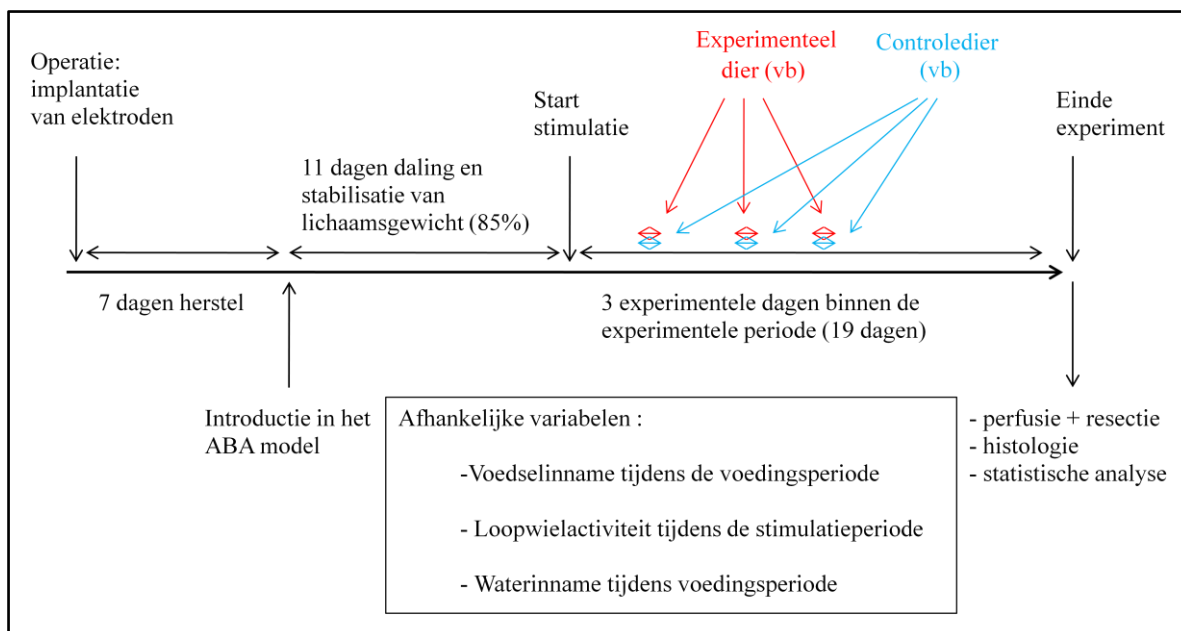
De hoge mortaliteits-, herval- en chroniciteitscijfers die geassocieerd zijn met AN maken dat de nood aan effectieve therapeutische strategieën die een oplossing kunnen bieden voor ernstig zieke AN patiënten hoog is. Aangezien de rol van het CZS bij deze aandoening aangetoond is bestaat een mogelijkheid hiervoor in therapiën die rechtstreeks op de hersenen aangrijpen, zoals EHS. De zoektocht naar een geschikt doelwit voor EHS bij AN is echter geen gemakkelijke zaak. Op basis van preliminaire studies naar de functie van hersenregio's en effecten van hersenletsels bij dieren die al dan niet geïntroduceerd zijn in het ABA model blijkt dat de SN een kandidaatregio is voor EHS. Zo tonen verschillende studies van het laboratorium voor experimentele functionele neurochirurgie, waarbij d.m.v. kortstondige, intense elektrische stimulatie letsels worden gecreëerd in de SN aan dat septale beschadiging gevolgen heeft voor een aantal belangrijke factoren bij ABA en AN. Meer bepaald leiden bilaterale elektrolytische letsels in het middelste en posterieure deel van de SN bij ABA ratten tot een significante verhoging van lichaamsgewicht en voedselinname.(143) Stimulatiestudies ondersteunen verder een mogelijke rol van de SN in voedselinname, waterinname en motorische activiteit. Het stimulatie experiment dat verder in dit document beschreven wordt werd uitgevoerd om te evalueren of EHS in de SN van AN patiënten een oplossing kan bieden voor het gebrek aan effectieve behandelingen voor deze levensverwoestende aandoening. Hiertoe werd EHS in de SN toegepast bij ratten in het ABA model en werden de effecten hiervan op voedselinname, loopwielactiviteit en waterinname nagegaan.

# 3 Materialen en Methoden

## 3.1 Experimentele opzet

Het experiment had als doel na te gaan of bilaterale elektrische stimulatie in de SN een significant effect heeft op voedselinname, loopwielactiviteit en waterinname in een diemodel voor AN bij de rat. Hierbij werd een experimentele groep met stimulatie in de SN vergeleken met een controlegroep zonder stimulatie. Het betrof een gerandomiseerd, gecontroleerd, geblindeerd ‘‘crossover’’ experiment waarbij 2 verschillende sets van stimulatieparameters getest werden en het lichaamsgewicht van de ratten constant werd gehouden. Elke set van stimulatieparameters werd bij elke rat van de experimentele groep getest.

## 3.2 Experimentele procedure



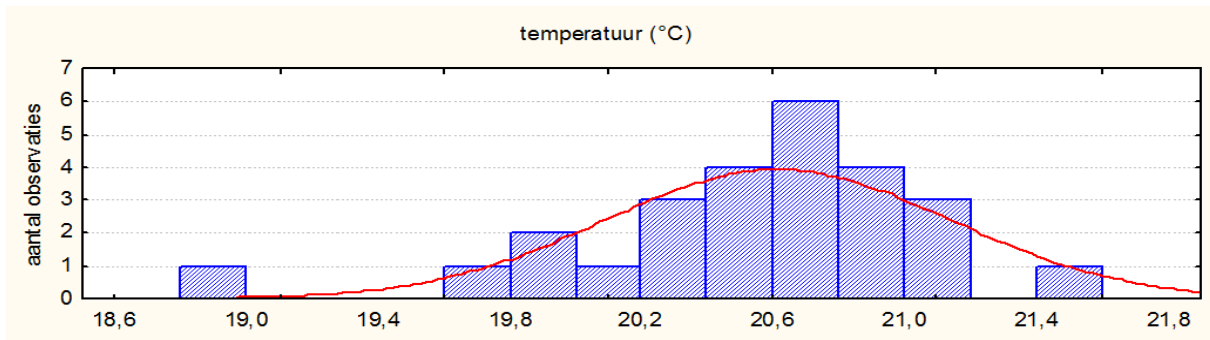
Figuur 1: Experimenteel verloop (tijdslijn + afhankelijke variabelen) van het experiment. Voor elk dier waren er tijdens de experimentele periode 3 experimentele dagen. In deze figuur wordt een voorbeeld gegeven van de 3 experimentele dagen van een koppel van een stimulatiedier (rood) en een controledier (blauw). De stimulatieperiode omvat 1,5 uur voor en 1,5 uur tijdens de voedingsperiode. vb = voorbeeld

De experimentele procedure begon zowel bij de ratten van de experimentele groep als bij de ratten van de controle groep met een operatie waarbij 2 elektrodes werden ingeplant (zie figuur 1). Na operatie en na een herstelperiode van minstens 7 dagen met *ad libitum* voedsel- (Ssnif Spezialdiäten GmbH, Duitsland) en watervoorziening (kraantjeswater) werden alle ratten in de ABA model kooien geplaatst (zie figuur 2). Deze kooien zijn 36 centimeter (cm) hoog, 36,8 cm breed en 36,5 cm diep. Ze zijn voorzien van een loopwiel (diameter 35 cm, Campden



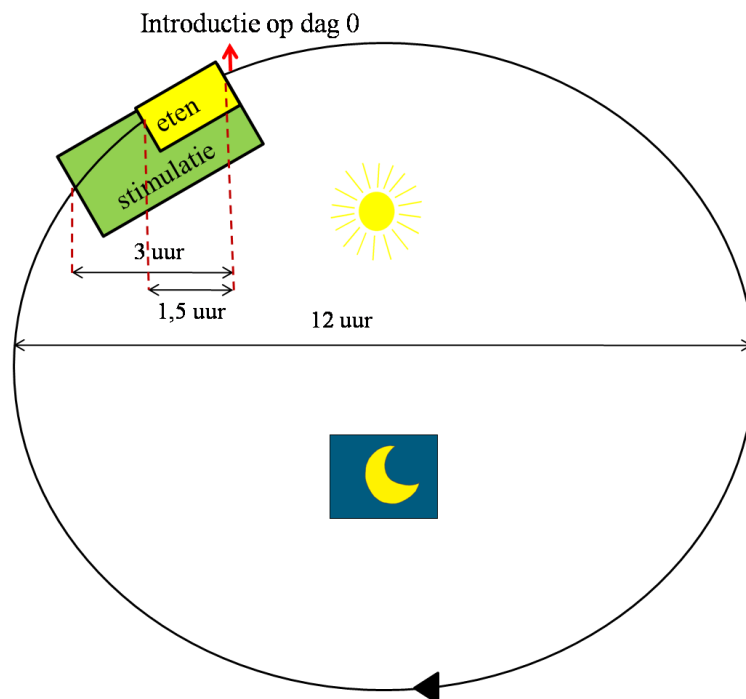
Figuur 2: Foto van een ABA model kooi. (kooinumnummer 4)

Instruments, Loughborough,UK) waarin de ratten onbeperkt kunnen lopen. De kamertemperatuur in het lokaal met de ABA-kooien (het ABA-lokaal) werd gedurende het experiment zo constant mogelijk gehouden en schommelde rond een gemiddelde van 20,6 °C tussen 18,9 °C en 21,5 °C (zie figuur 3). De temperatuur werd steeds opgemeten in de voormiddag.



Figuur 3: Histogram van de kamertemperatuur tijdens het experiment. (gemiddelde temperatuur = 20,6 °C, standaardafwijking = 0,528)

In het ABA-lokaal werd een dag-nacht ritme aangelegd d.m.v tijdschakelaars zodat het daar steeds 12 uur op 24 licht was (zie figuur 4). De ratten hadden gedurende 1,5 uur per dag toegang tot een *ad libitum* hoeveelheid voedsel (50 gram). Door dit voedingsschema en de permanente beschikbaarheid van een loopwiel kunnen bepaalde gedragseffecten uitgelokt worden die ook geobserveerd worden bij AN patiënten. De toegang tot water werd niet beperkt. Op dag 0 werden de ratten in het ABA model geïntroduceerd op het tijdstip dat overeenkwam met het einde van de stimulatie en van de 1,5 uur durende voedingsperiode in het model. Elektrische stimulatie in de SN gebeurde steeds gedurende 3 uur per dag (de stimulatieperiode): 1,5 uur voor en 1,5 uur tijdens de voedingsperiode.



Figuur 4: Stimulatie, dag-nacht ritme en beschikbaarheid van voedsel gedurende het experiment.

Er werd nog niet gestimuleerd meteen na introductie in het ABA model: eerst werd een periode ingelast ter daling van het lichaamsgewicht van de ratten tot een min of meer stabiel niveau rond 85% en tussen 75% en 90% (het 85% niveau) van het gewicht dat ze hadden bij introductie in het ABA model (gewicht op dag 0). Deze periode duurde 11 dagen. Hierna volgde een periode waarbinnen alle stimulaties plaatsvonden (de experimentele periode). Omwille van praktische redenen duurde deze periode 19 dagen. Na de experimentele periode was de experimentele procedure voor alle dieren afgerond. Voor elke rat waren er gedurende die experimentele periode 3 experimentele dagen. Gegevens bekomen op die dagen werden gebruikt voor de analyse van groepsverschillen tijdens de experimentele periode. Voor experimentele dieren waren dit: een dag met stimulatie met set 1 van stimulatieparameters, een dag met stimulatie met set 2 van stimulatieparameters en een dag zonder stimulatie (zie 3.8 Stimulatie). Voor de experimentele dieren vonden deze experimentele dagen plaats op willekeurige dagen met een random volgorde binnen de experimentele periode. Voor elk stimulatie-dier, op 2 na, was er 1 controledier waarvan de experimentele dagen exact overeenkwamen met die van hem. In 1 geval was er slechts 1 controledier voor 2 stimulatie-dieren.

De randomisatie van de volgorde en de situering van de experimentele dagen binnen de experimentele periode en het koppelen van stimulatie-dieren met controledieren had als doel tijdseffecten in de analyse van de bekomen gegevens te voorkomen. Hierdoor werd immers de kans dat alle gegevens van 1 van de 3 experimentele dagen bekomen werden tijdens 1 deelperiode van de experimentele periode (bijvoorbeeld wanneer alle experimentele dagen waarop de stimulatie-dieren niet gestimuleerd worden aan het begin van de experimentele periode zouden plaatsvallen) en dat de gegevens die vergeleken werden tussen experimentele dieren en controledieren bekomen werden op verschillende dagen verkleind. De symptomen van ABA kunnen immers evolueren doorheen de tijd waardoor zelfs bij 1 rat de gegevens die bekomen werden in de begin periode van ABA sterk kunnen verschillen van de gegevens die bij diezelfde rat 2 weken later bekomen werden.

De gegevens die op experimentele dagen geregistreerd werden betroffen waterinname en voedselinname tijdens de voedingsperiode en loopwielactiviteit tijdens de stimulatieperiode. Loopwielactiviteit werd elektronisch en continu geregistreerd d.m.v. een elektromagnetische draaipulsgever (TWK-Elektronik GmbH; Düsseldorf, Duitsland) die vastgemaakt werd aan de kooi voor continue registratie van de positie van het loopwiel met een digitale I/O kaart (National Instruments; Austin, Texas, U.S.A) en het computerprogramma LabVIEW 7.0 (National Instruments). Waterinname en voedselinname werden manueel opgemeten ( met behulp van (m.b.v.) een digitale weegschaal) tijdens de voedingsperiode.

Het lichaamsgewicht van elk dier werd zoveel mogelijke constant gehouden op het 85% niveau. Om dit te bewerkstelligen werd bij alle ratten dagelijks het lichaamsgewicht na de voedingsperiode gemeten en werd voor elke percent dat het gewicht van een dier na de voedingsperiode onder het 85% niveau gezakt was 1 gram extra voedsel bijgegeven meteen na de voedingsperiode. Wanneer het gewicht van het dier na de voedingsperiode echter gezakt was tot minder dan 75% van het gewicht voor introductie in het ABA model werd 1,5 g voedsel per percent onder het 85% niveau bijgegeven. Dit betrof telkens een zeer beperkte hoeveelheid voedsel.

De volledige duur in het ABA model was niet voor alle ratten gelijk: wanneer de 3 experimentele dagen voor een specifieke rat doorlopen waren, werd deze uit het model gehaald. Hierna vond opoffering en perfusie, resectie en histologische analyse van het hersenweefsel plaats en werd statistische analyse uitgevoerd.

### 3.3 Randomisatie en blinding

---

Aan het begin van het experiment werden de dieren *at random* in 2 groepen verdeeld: een controlegroep en een experimentele groep. Ook de volgorde waarin de ratten geopereerd werden was *at random*. Om tijdseffecten op de resultaten van de analyses te vermijden werd voor elk dier van de experimentele groep de volgorde van de drie experimentele dagen (geen stimulatie, set 1 en set 2) en de situering ervan binnen de experimentele periode bovendien *at random* bepaald zodat deze voor verschillende dieren verschillend waren. Met het oog op blinding werd tijdens het experiment onderscheid gemaakt tussen de persoon die de stimulatie controleerde (de operator) en de personen die de metingen van voedselinname, waterinname en lichaamsgewicht uitvoerden (de observatoren). De operator wist welke dieren deel uitmaakten van de controlegroep en welke van de stimulatiegroep en wist welke dieren van de stimulatiegroep op een bepaalde dag met een bepaalde set stimulatieparameters gestimuleerd werden. De observatoren wisten dit niet. Om dit mogelijk te maken werden elektrodes geïmplanteerd bij alle dieren van beide groepen, bleven alle dieren tijdens de 3 experimentele dagen verbonden met de stimulatie apparatuur en waren observatoren nooit betrokken bij het instellen van stimulatieparameters of het initiëren van stimulatie. Blinding werd verbroken nadat de hele stimulatieprocedure voor een dier doorlopen was en het uit het ABA model verwijderd was.

### 3.4 Variabelen, beginvoorwaarde en ‘drop-out’ condities

---

De afhankelijke variabelen in dit experiment waren voedselinname (gram), waterinname (gram) en locomotorische activiteit (aantal loopwielrotaties per tijdseenheid) (zie figuur 4). Aangezien de loopwieldiameter 35 cm is komt 1 loopwielomwenteling overeen met 110 cm. De onafhankelijke variabelen tijdens dit experiment waren de groepsindeling (stimulatie of geen stimulatie) en de experimentele conditie binnen de stimulatiegroep (geen stimulatie, laagfrequente stimulatie en hoogfrequente stimulatie). De beginvoorwaarde voor stimulatie was een relatief stabiel lichaamsgewicht dat het 85% niveau benadert. De verschillende ‘drop-out’ condities waren: een lichaamsgewicht groter dan 90% van het gewicht voor ABA introductie, een lichaamsgewicht lager dan 70 % van het gewicht voor ABA introductie en het afbreken van de tandcementconstructie. Deze condities werden vastgelegd als criteria voor eliminatie uit het model en vroegtijdige euthanasie, d.m.v. een overdosis Nembutal (3 milliliter (ml) pentobarbital i.p.; CEVA Santé Animale, Brussel, België). Ze werden echter nooit bereikt.

### 3.5 Dieren

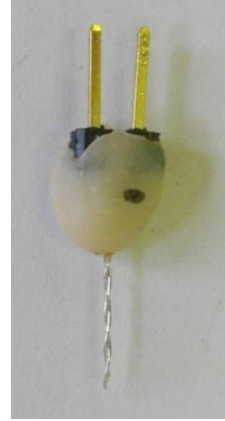
---

Bij het experiment werden enkel jonge vrouwelijke Wistar ratten gebruikt. Dit verhoogt de klinische relevantie van deze studie aangezien AN het meest voorkomt bij jonge vrouwelijke patiënten. De ratten hadden een lichaamsgewicht van 218-240 gram voor operatie. Tijdens de herstelperiode werden de ratten individueel gehuisvest met een *ad libitum* voorziening van voedsel en water, hierna werden ze in het ABA model geïntroduceerd. In het totaal werden 14 ratten gebruikt. 1 rat stierf tijdens de operatie (vermoedelijk door een overdosis anestheticum). 13 dieren overleefden het experiment en werden na de volledige procedure opgeofferd. 7 van deze 13 ratten behoorden tot de experimentele

groep, 6 tot de controlegroep. Alle experimenten werden goedgekeurd door de Ethische Commissie Dierproeven van de K.U.Leuven.

### 3.6 Elektrodes

De elektrodes werden ter plaatse geproduceerd volgens de methode die hieronder beschreven wordt. De elektrode omvat 2 deelelektroden: een referentie-elektrode en een stimulatie-elektrode. Hiertoe werden bij de productie van de elektroden 2 geïsoleerde stimulatiedraden (10Ir7T, diameter met isolatie = 0,009 inch, diameter zonder isolatie = 0,007 inch) rond elkaar opgedraaid. Hiervan werd voor elke elektrode 1,5 cm gebruikt. Aan 1 uiteinde van dit opgedraaide stukje stimulatiedraad werd van de twee draden een stukje isolatiemateriaal (ongeveer 1-2 mm) afgeschraapt. De niet geïsoleerde uiteindes werden met soldeertin (Multiscore Solders Ltd. Hemel Hempstead, hertfordshire, Verenigd Koninkrijk) vastgemaakt aan de twee korte beentjes van een connector (Cat No: HEAD1R40; Aitec bvba, Heverlee, België). Hierna werd 1 van de 2 stimulatiedraden ingekort, zodat deze (de referentie deelelektrode) ongeveer 1 mm korter ( $\pm 0,2$  mm) werd dan de andere (de stimulatie deelelektrode), om kortsluiting tijdens EHS te vermijden. Dit werd onder de microscoop geëvalueerd. Ter isolatie werd een laag tandcement (TAB 2000 PWD LIGHT/MEDIUM 50 g (Item No.61771/2) en TAB 2000 REG 50 ml (Item No. 61774); Kerr, Verenigde Dental Depots, Gullegem, België) aangebracht zodat de korte beentjes van de connector, het soldeertin en een deel van de opgewonden draden bedekt werd. Hierbij bleef een totale afstand van 8,2 mm ( $\pm 0,5$  mm) van de draden gevrijwaard. Ook werd met een stip aangeduid welke kant van de connector verbonden was met de langste stimulatiedraad (zie figuur 5). Tenslotte werd getest of het circuit tussen de twee elektroden gesloten was door de tippen onder te dompelen in saline en de doorgang van stroom te meten.



Figuur 5: Zelfgemaakte elektrode.

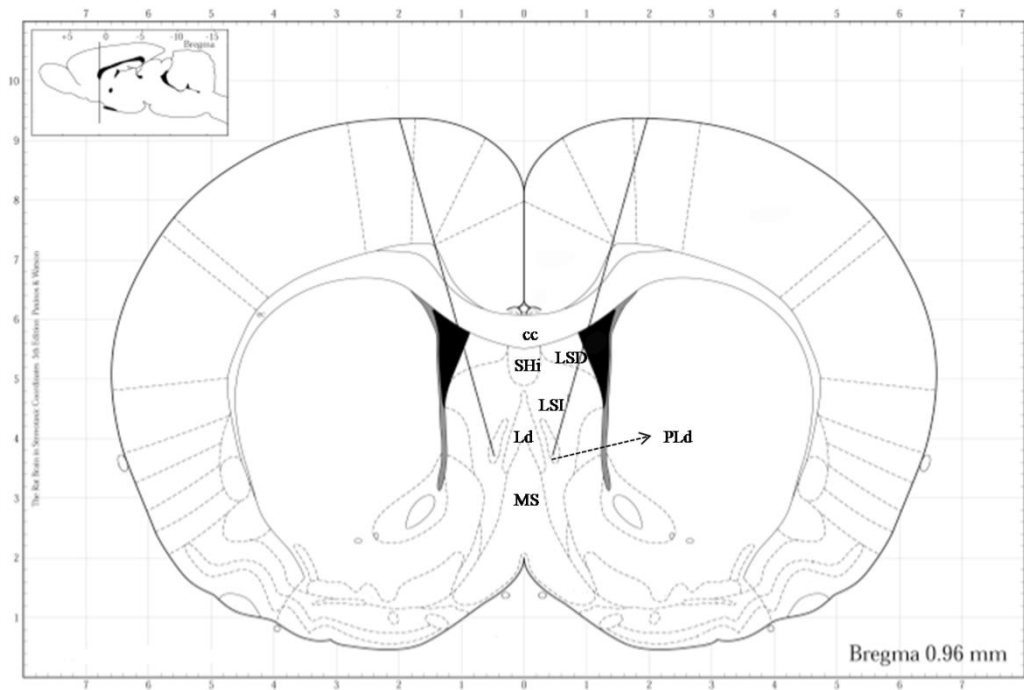
### 3.7 Implantatie van elektrodes

De instrumenten (boortjes, klemmen, pincet), elektrodes en kompressen werden voorafgaand aan de operatie gesteriliseerd d.m.v een autoclaaf (minimum 30 minuten op 130°C). De ratten werden onder algemene anesthesie gebracht d.m.v. een subcutane injectie (1 ml per 100 gram lichaamsgewicht) van chloralhydraat (Fluka 23100, een verdunning van 1,5 gram per 30 ml steriel saline (Ecotainer®; 0,9% B.Braun Mesungen AG; Nederland)). Na een half uur werd, afhankelijk van de 'tail pinch' respons van de rat, nog een tweede chloralhydraat injectie gegeven (0,2-0,3 ml). Dit werd in enkele gevallen nogmaals herhaald na 1 uur (0,2-0,3 ml) wegens persistierende 'tail pinch' respons. Vervolgens werd de kop van de rat gedeeltelijk geschoren en gefixeerd in een stereotactisch apparaat zodat *Bregma* en *Lambda* in een horizontaal vlak lagen. De opstelling van het stereotactisch



Figuur 6: Opstelling stereotactisch apparaat.

apparaat wordt weergegeven in figuur 6. De ogen van de dieren werden beschermd tegen uitdroging d.m.v. een oogzalf (Terra-Cortril® met polymyxine B, Pfizer S.A., Brussel, België). Ook werd een anale probe gebruikt om de lichaamstemperatuur te registreren en een warmtedekentje om deze op peil te houden. Nadat de hoofdhuid ontsmet was met joodalcohol (isopropanolische joodoplossing 1%; VWR international) werd deze lokaal verdoofd d.m.v. een subcutane injectie van lidocaïne (0,6 ml s.c.; Xylocaïne® 2%; AstraZeneca S.A.; Brussel, België). Nadien kon de schedel blootgelegd worden door de hoofdhuid overlans open te snijden met een steriele scalpel. In de schedel werden met een boortje 4 gaatjes geboord ter bevestiging van vijsjes. Die vijsjes laten toe om een cementblok (zie verder) stevig vast te hechten aan de schedel. Vervolgens werd 1 elektrode vastgemaakt aan een stereotactische arm die onder een hoek van 15° boven de schedel werd geplaatst, zodat de tip van de elektrode zich precies boven *Bregma* bevond. De anterior-posterieure (AP), subdurale (Sd) en laterale (L) coördinaten (t.o.v. *Bregma*) van het doelwit in de SN werden bepaald op basis van de atlas van Paxinos en Watson (5<sup>e</sup> editie; 0,96 mm (AP), 0,5 mm (L), 5,2 mm (Sd); zie figuur 7). Volgens deze coördinaten werd de elektrode verschoven naar de gewenste insertieplaats in de schedel (0,96mm (AP), 2,0 mm (L)).



Figuur 7: Coronale doorsnede op 0,96 mm anterior t.o.v. *Bregma* (atlas van Paxinos en Watson). De volle zwarte lijnen geven de gewenste positie van de elektrodes weer. Deze werden geplaatst onder een hoek van 15° en zo dat de tippen ervan verwacht werden overeen te komen met volgende coördinaten: 0,96 mm AP, 0,5 mm L, 5,2 mm Sd. De insertieplaats in de schedel had de volgende coördinaten: 0,96 mm AP, 2,0 mm L. (cc = corpus callosum, Shi = septohippocampale nucleus, LSD = dorsale deel van de laterale SN, LSI = intermediair deel van de laterale SN, Ld = lambdoïdale septale zone, PLd = paralambdaïdale SN)

Nadat een gaatje in de schedel was geboord en de *dura mater* met een naald was doorprikt, werd een stuk van de elektrode met een lengte van 6,0 mm in de hersenen gebracht tot in het doelwit in de SN. De elektrode werd steeds zo ingeplant dat de langste draad (de stimulatiekant, de kathode) van de elektrode aan de anterieure kant lag. Tenslotte werd de elektrode losgemaakt van de stereotactische arm. Deze procedure werd herhaald voor de tweede elektrode. Hierna werd tandcement aangebracht op de schedel van de rat, over de vijsjes, tot aan het connectie-oppervlak van de connectoren. De rat werd vrijgemaakt uit het stereotactisch apparaat en de hoofdhuid werd met chirurgische draad dichtgehecht. Figuur 8 toont 2 momentopnames: 1 tijdens de operatie en 1 na recovery.





Figuur 8: Links: Rat met 2 geïmplanteerde elektrodes, ongeveer 10 dagen na implantatie. De lange beentjes van de connectoren die tijdens stimulatie verbonden werden met de stimulatie-apparaat zijn zichtbaar. Rechts: Rat tijdens operatie, gefixeerd in het stereotactisch apparaat. Een gealigneerde elektrode is geplaatst in een boorgat en 4 vijsjes zijn in de schedel bevestigd.

### 3.8 Stimulatie

Alle dieren waren op de experimentele dagen met de stimulatieapparatuur verbonden, maar stimulatie gebeurde enkel bij de dieren van de experimentele groep op 2 van de 3 experimentele dagen. Stimulatie gebeurde steeds bilateraal en was bifasisch en monopolair. De experimentele dieren werden steeds gedurende 3 uren continu gestimuleerd. 2 verschillende sets van stimulatieparameters werden getest: een eerste set voor relatief hoogfrequente (HF) stimulatie, een tweede voor relatief laagfrequente (LF) stimulatie (zie tabel 1). Elke rat van de experimentele groep werd eenmaal gestimuleerd in de SN met elke set stimulatieparameters. Stimulatie gebeurde aan de elektrodetip aangezien enkel de tip vrijgemaakt was van isolatie.

Tabel 1: Overzicht van de gebruikte stimulatieparameters.

	HF stimulatie	LF stimulatie
frequentie	100 Hz	7 Hz
pulsbreedte	0,1 ms	0,1 ms
stroomsterkte	80 $\mu$ A	80 $\mu$ A

(ms = milliseconde, Hz = Hertz,  $\mu$ A = microampère)

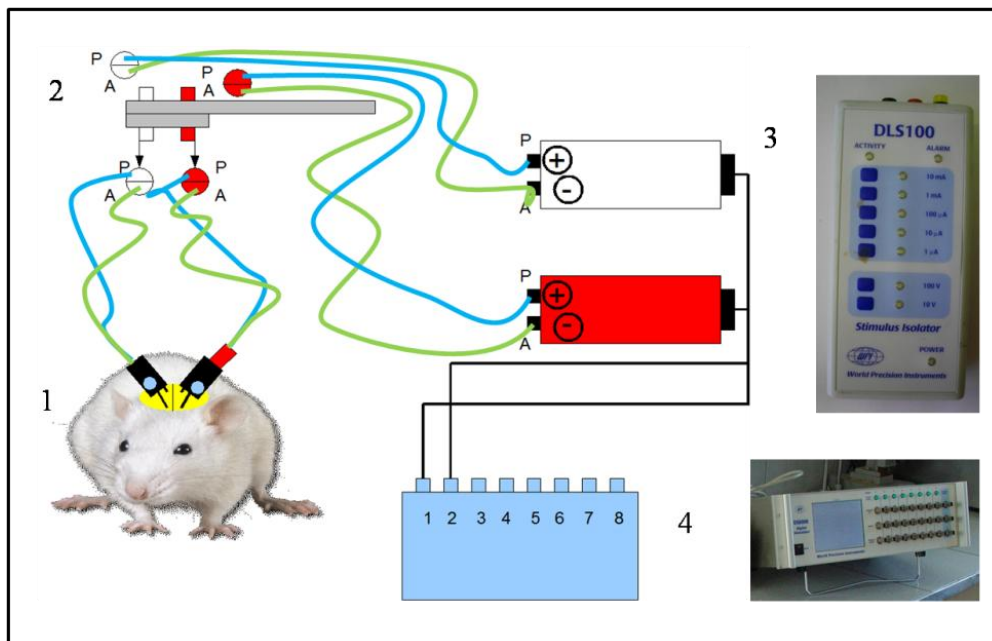
Bij het selecteren van stimulatieparameters werd rekening gehouden met de LD per fase. Wanneer bij (langdurige) stimulatie de waarde van 30  $\mu$ C/cm<sup>2</sup> voor deze parameter overschreden wordt kan dit leiden tot letselvorming in het hersenweefsel. Anderzijds kan stimulatie met een te lage pulsbreedte en een te lage stroomsterkte ineffectief zijn. Om zowel letsels als ineffectieve stimulatie te vermijden werden de stimulatieparameters zo gekozen dat gebruik ervan leidt tot een LD per fase die de waarde van 30  $\mu$ C/cm<sup>2</sup> benadert. De berekening van de LD per fase wordt getoond in figuur 9. Voorafgaand aan het bepalen van de LD per fase voor een bepaalde elektrode en een bepaalde set van stimulatieparameters moet de stimulatieoppervlakte van de elektrode berekend worden. Deze oppervlakte is bij de elektrode die tijdens dit experiment gebruikt werd de oppervlakte van een cirkel met als diameter de diameter van de elektrode (zonder isolatiemateriaal) aangezien het aanwezige isolatiemateriaal niet werd verwijderd van de wand van de stimulatiedraad. Om de waarde van 30  $\mu$ C/cm<sup>2</sup> te benaderen werd er bij dit experiment een pulsbreedte van 0,1 ms en een stroomsterkte van 80  $\mu$ A gebruikt. De LD per fase die zo bereikt werd bedroeg 32,2  $\mu$ C/cm<sup>2</sup>. Aangezien het hier korte termijn stimulatie betreft is het acceptabel dat de grens van 30  $\mu$ C/cm<sup>2</sup> licht overschreden werd.

$$\begin{array}{ll}
 \text{a) } opp = \pi r^2 & \text{d) } LD \text{ per fase} = \frac{Pb(\text{ms}) \times I(\text{mA})}{opp(\text{cm}^2)} \\
 \text{b) } r = \frac{d}{2} = \frac{0,01778}{2} = 0,00889 \text{ cm} & \text{e) } LD \text{ per fase} = \frac{0,1 \times 0,08}{0,000248} = 32,220820 \frac{\mu\text{C}}{\text{cm}^2} \\
 \text{c) } opp = \pi \times 0,00889^2 = 0,000248 \text{ cm}^2 &
 \end{array}$$

Figuur 9: berekening van de LD per fase. a) formule voor de berekening van de oppervlakte van een cirkel. b) berekening van de straal van de elektrode c) berekening van de stimulatieoppervlakte van de elektrode d) formule voor de LD per fase e) berekening van de LD per fase voor een pulsbreedte van 0,1 ms en een stroomsterkte van 80  $\mu\text{A}$ . (opp = oppervlakte, Pb = pulsbreedte)

Ook werd er bij de selectie van stimulatieparameters rekening gehouden met gegevens uit de beschikbare literatuur omtrent EHS in de SN (zie bijlage). Hieruit bleek dat stimulatie in de SN reeds gebeurde met frequenties tussen 5 Hz en 100 Hz, met pulsbreedtes tussen 0,1 ms en 500 ms (eenmaal werd ook een pulsbreedte van 1s gebruikt) en met stroomsterktes tussen 20  $\mu\text{A}$  en 20 milliampère (mA) (eenmaal werd een stroomsterkte van 300 mA gebruikt). Een vaak voorkomende lage frequentie was 7 Hz. Er werd geopteerd om 2 sets van stimulatieparameters met twee verschillende frequenties die de uitersten van het frequentiespectrum beschreven in de literatuur uitmaken te vergelijken. De gebruikte pulsbreedte en stroomsterkte werden voornamelijk bepaald aan de hand van de LD per fase maar ook hierbij werd verzekerd dat de gebruikte parameters beschreven werden in de literatuur.

Om stimulatie tot stand te brengen werd elke elektrode via 2 connectiedraden, een stimulus isolator (DLS100 Stimulus Isolator; World Precision Instruments, Inc.; Sarasota, Florida, Verenigde Staten) en een swivel verbonden met een stimulator (DS8000 Digital Stimulator; World Precision Instruments, Inc.; Sarasota, Florida, Verenigde Staten) die stimulatie met constante stroomsterkte leverde (zie figuur 10). Het gebruik van een swivel heeft als doel de ratten minimaal te hinderen in hun bewegingen ondanks de aanwezigheid van de stimulatiedraden.



Figuur 10: Schematische weergave van de stimulatie-opstelling. 1 de elektrode; 2: de 'swivel'; 3: de isolator; 4: de stimulator

## 3.9 Opoffering en perfusie

---

Aan het einde van het experiment werden alle ratten opgeofferd d.m.v. een overdosis Nembutal (3 ml pentobarbital i.p.; CEVA Santé Animale, Brussel, België) en werden de hersenen van alle ratten bewaard voor histologisch onderzoek. Hiertoe werden de ratten transcardiaal geperfuseerd met het 'Perfusion Two' systeem ([www.myneurolab.com](http://www.myneurolab.com)). Hierbij werd perfusie met 10% sucrose in water op 300 millimeter kwik (mmHg) gevolgd door fixatie met 4% formaldehyde in gedistilleerd water. Tijdens de procedure werd de borstkas opengesneden en het hartje blootgelegd. Om een optimale perfusie en fixatie te bekomen werd de dalende thoracale aorta (*pars descendens aortae*) afgeklemd. Daarna werd een naald verbonden met het perfusietoestel en via de apex in de linkerkamer van het hart binnengebracht. Om overdruk te vermijden werd het rechter hartootje opengeknipt. Na perfusie en fixatie werden de hersenen meteen uit de schedel gedisseceerd, werd de cementblok met de elektrodes uit de hersenen gelicht en werd het cerebellum verwijderd. De geresseceerde hersenen werden tenslotte bewaard in de reeds beschreven formaldehydeverdunning.

## 3.10 Histologie

---

De gefixeerde hersenen werden ingebed in paraffine zodat deze met een microtoom (Microtome HM 360 & Section Transfer System, Microm International GmbH, Walldorf, Duitsland) in 5 micrometer ( $\mu\text{m}$ ) dikke coronale coupes gesneden konden worden. Vervolgens werden deze coupes gekleurd met een Nissl-kleuring, waarbij de Nissl lichaampjes (of het endoplasmatisch reticulum) van de gefixeerde neuronen en gliacellen paarsblauw gekleurd worden d.m.v. cresyl violet. 2 verschillende methoden werden gebruikt bij dit proces (zie tabel 3). In beide gevallen werd eerst de paraffine onttrokken uit de coupes d.m.v. 'Clear-Rite' (Cat. No. 4111; Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI49008, Verenigde staten). Daarna werden de coupes gehydrateerd door onderdompeling in een reeks van dalende alcoholconcentraties (alcohol in gedistilleerd water; Ethanol absolut, Sigma-Aldrich, Seelze, Duitsland). Na een spoeling in water werden de coupes gekleurd met cresyl violet (0,5% cresyl violet acetaat in gedistilleerd water, Merck KGaA, Darmstadt, Duitsland). Vervolgens werden ze na spoeling in water terug gehydrateerd en behandeld met 'Clear-Rite'. Bij 1 van de 2 werkwijzen werden de coupes na kleuring en spoeling terug deels ontkleurd met azijnzuur (0,25% in 100% alcohol; Azijnzuur 100%, ijsazijn; Merck, Darmstad, Duitsland). Naar de tweede methode werd overgeschakeld om het aantal barsten in de gekleurde coupes te verminderen. Ten slotte werd op de coupes een dekglasje aangebracht d.m.v. 'Mounting Medium' (Cat No.6901; Richard Allan Scientific; Kalamazoo, MI 49008, Verenigde Staten) en werden ze gedurende minstens 24 uur gedroogd op een warme strekplaat (40°C).

Tabel 2: Methoden voor het uitvoeren van kleuringen.

Werkwijze	Clear-Rite	Dehydratatie			Spoeling	Kleuring	Spoeling	Hydratatie (+ ontkleuren)			Clear-Rite
		Alc 100%	Alc 95%	Alc 70%				Alc 100%	Alc 95%	Alc 70%	
Werkwijze 1		Alc 100%	Alc 95%	Alc 70%	Kraantjeswater	Cresyl violet	Kraantjeswater	Alc 100%	Alc 95%	Alc 70%	
	5'	5'	5'	5'	3xo.	2'	3xo.	5'	5'	5'	5'
Werkwijze 2		Alc 100%	Alc 95%	Alc 70%	Kraantjeswater	Cresyl violet	Kraantjes water	Azijnzuur in Alc. 0,25%		Alc 100%	
	5xo.	5xo.	5xo.	5xo.	5xo.	15'	5xo.	6xo.		2xo.	5xo.

*o.* = kort onderdompelen, *Alc* = Alcohol

Vervolgens werd d.m.v. microscopie de locatie van de 2 elektrodetippen bij elke rat bepaald om na te gaan of deze zo gelocaliseerd waren dat in de SN gestimuleerd kon worden. Hiertoe werden de coronale coupes waarop de uiteinden van de schachten van de elektrodes zichtbaar waren geselecteerd. De uiteinden van de schachten geven de vermoedelijke plaats weer van de elektrodetip tijdens het experiment. Deze coupes werden vergeleken met overeenkomstige histologische figuren uit de atlas van Paxinos en Watson (5<sup>e</sup> editie). M.b.v. het computerprogramma 'Adobe Photoshop CS4' werd elke vermoedelijke elektrodetip aangeduid op de atlasfiguur waarmee de geselecteerde coronale coupe het best overeenkwam. Een voorbeeld hiervan wordt gegeven in figuur 14 (alle elektrodetipfiguren: zie bijlage). Aan de hand van de atlas van Paxinos en Watson (5<sup>e</sup> editie) werden vervolgens de 3 coördinaten van de locaties van de vermoedelijke elektrodetippen en de hersenregio's die hiermee overeen kwamen, bepaald.



Figuur 11: Een histologische coronale foto (linksonder) met de bijhorende elektrodetipfiguur voor de rat met identificatienummer MePD367 en een detail van de coronale foto (rechts). De richting van de schachten van de elektrodes wordt weergegeven met een rode stippellijn. De vermoedelijke locatie van elke elektrodetip wordt aangegeven met een zwarte stip.

## 3.11 Statistische data analyse

---

De statistische analyses werden uitgevoerd m.b.v. de programma's 'Statistica 9.0', 'SAS 9.2' ('Statistical Analysis Software' versie 9.2). Voor alle testen werden p-waarden kleiner dan 0,05 als significant beschouwd. Eenzijdige testen werden gebruikt als dit gepast was: wanneer enkel effecten in 1 richting verwacht werden en enkel deze effecten relevant waren voor het onderzoek.

### 3.11.1 Analyses van groepsverschillen

Elke analyse van verschillen tussen de twee groepen (stimulatiegroep en controlegroep) werd uitgevoerd met de parametrische *t-test* voor ongepaarde vergelijkingen ('Statistica 9.0') als aan assumpties van normaliteit en constante variantie voldaan was. Uiteindelijk werd met de niet-parametrische *Wilcoxon rank sum* test voor ongepaarde vergelijkingen tussen 2 groepen ('Statistica 9.0', ook *Mann-Whitney U* test genoemd) voor de afhankelijke variabelen (voedselinname, loopwielactiviteit en waterinname) nagegaan of er statistisch significante verschillen waren tijdens de experimentele periode tussen de stimulatiegroep en de controlegroep omdat niet aan de assumpties voldaan was. In het geval van meerdere *Wilcoxon* testen werden de p-waarden achteraf gecorrigeerd voor 'multiple testing' d.m.v. de 'False Discovery Rate' (FDR) correctiefactor ('SAS 9.2'). In het geval van de analyse van het groepsverschil op vlak van lichaamsgewicht tussen de 2 groepen was voldaan aan de assumpties. Hier werd met de parametrische *t-test* voor ongepaarde vergelijkingen ('Statistica 9.0') nagegaan of er een statistisch significant verschil was op vlak van gemiddeld relatief lichaamsgewicht tijdens de experimentele periode tussen de 2 groepen.

### 3.11.2 Analyses van verschillen binnen de stimulatiegroep

Met de niet-parametrische *Friedman-Anova by ranks* test voor gepaarde vergelijkingen tussen meer dan 2 onderverdelingen van 1 groep ('Statistica' 9.0) werd binnen de stimulatiegroep nagegaan of er voor de afhankelijke variabelen statistisch significante verschillen waren tussen de verschillende experimentele dagen (dag waarop de stimulatie dieren niet gestimuleerd werden, dag waarop de stimulatie dieren met laagfrequente stimulatie in de SN gestimuleerd werden en dag waarop de stimulatie dieren met hoogfrequente stimulatie in de SN gestimuleerd werden).

### 3.11.3 Correlatieanalyses

De niet-parametrische *Spearman* test ('Statistica 9.0') werd gebruikt om de aanwezigheid van significante correlaties tussen de dag na ABA introductie en voedselinname of loopwielactiviteit en tussen de vermoedelijke locatie van de elektrodetip en de verschillende afhankelijke variabelen binnen de stimulatiegroep na te gaan. In het geval van meerdere correlatieanalyses werden de p-waarden achteraf gecorrigeerd voor 'multiple testing' d.m.v. de FDR correctiefactor ('SAS 9.2').

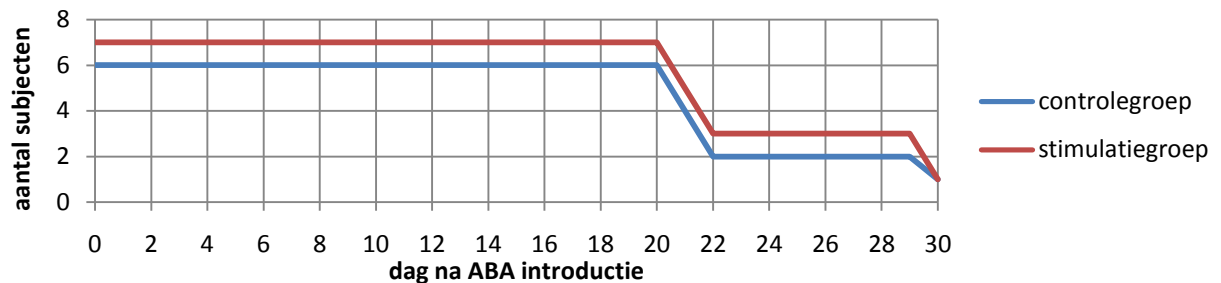
### 3.11.4 'Power' analyse

Bij het berekenen van de 'power' van de analyses van groepsverschillen werd gebruik gemaakt van het programma 'G\*power 3.1.2.'.

# 4 Resultaten

## 4.1 Evoluties doorheen de tijd in het ABA model

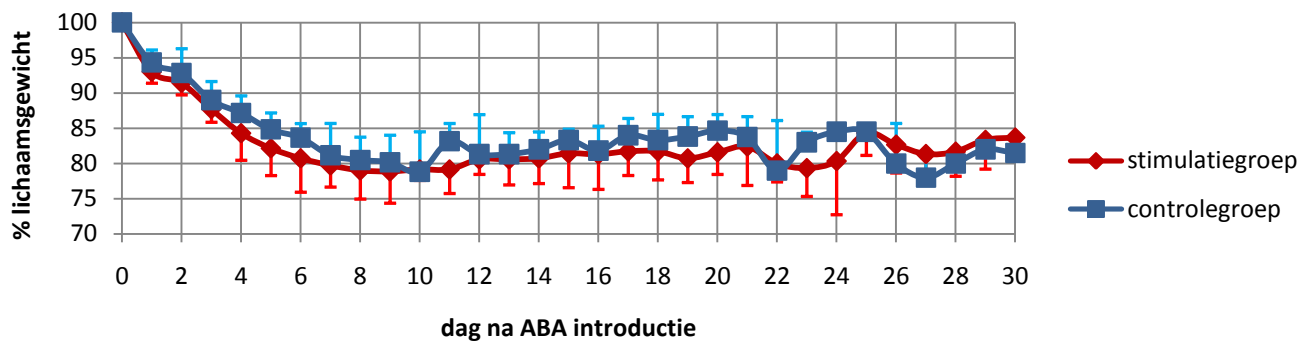
Vooraleer de evoluties van lichaamsgewicht, voedselinname en loopwielactiviteit in het ABA model besproken worden, moet in acht worden genomen dat het aantal subjecten in het ABA model daalde vanaf dag 21 na ABA introductie (zie figuur 12). Elk dier werd immers uit het model geëlimineerd wanneer zijn experimentele dagen doorlopen waren, en dat was voor verschillende dieren op verschillende momenten tijdens de experimentele periode. De eliminatie van ratten uit het model gebeurde steeds meteen na de voedingsperiode.



Figuur 12: Weergave van het aantal ratten per groep vanaf dag 0 (introductie in het ABA model) tot dag 30 (laatste dag van de experimentele periode) dat tot en met de voedingsperiode in het ABA model bleef.

### 4.1.1 Lichaamsgewicht na ABA introductie

Tijdens dit experiment werd aan elke rat van de stimulatiegroep op verschillende dagen na ABA introductie stimulatie met 2 verschillende sets van stimulatieparameters toegediend. Effecten van stimulatie op afhankelijke variabelen werden bepaald na vergelijking met de controlegroep. Om een “crossover” onderzoek uit te voeren bij een evoluerende aandoening zoals AN is het van belang dat de resultaten van de verschillende therapeutische condities (de verschillende sets van stimulatieparameters) bekomen werden in vergelijkbare omstandigheden. Daarom werd het lichaamsgewicht zo constant mogelijk gehouden gedurende de experimentele periode. Hier werd gekozen het lichaamsgewicht min of meer constant te houden op een niveau van 85% van het gewicht voor ABA introductie (tussen 75% en 90%) omdat een gewichtsverlies van ongeveer 15% een van de diagnostisch criteria voor AN bij de mens is. In figuur 13 wordt getoond dat het gemiddelde lichaamsgewicht van alle ratten min of meer stabiel is en de waarden van 75% en 90% niet overschreden worden tijdens de experimentele periode. Bovendien toont deze grafiek dat de lichaamsgewichten van controle- en stimulatie dieren (tijdens de experimentele periode) zeer vergelijkbaar zijn. Dit werd ook statistisch nagegaan. De nulhypothese was dat er geen verschil was op vlak van gemiddeld relatief lichaamsgewicht tussen stimulatie dieren en controle dieren tijdens de experimentele periode. Aangezien voor beide groepen aan assumpties van normaliteit en constante variantie voldaan was, werd hier geopteerd voor de parametrische *t*-test voor ongepaarde vergelijkingen. Hiermee werd geen significant verschil aangetoond op vlak van gemiddeld relatief lichaamsgewicht tijdens de experimentele periode tussen de twee groepen ( $p = 0,249$ , tweezijdig).



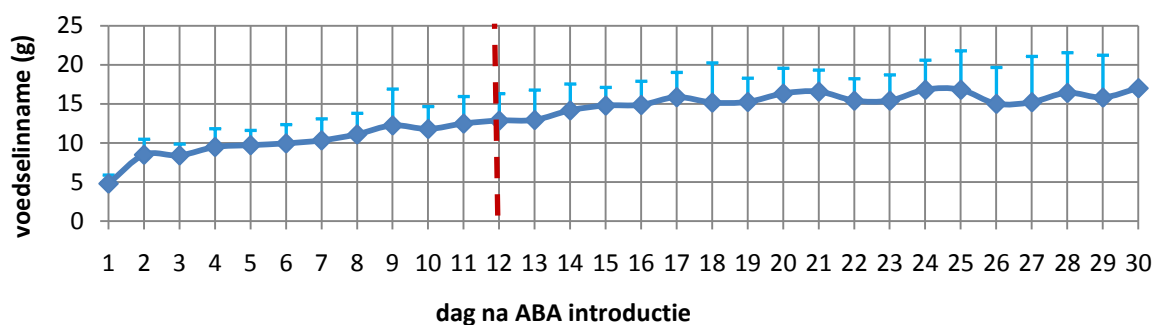
Figuur 13: Weergave van het gemiddelde relatief lichaamsgewicht (uitgedrukt in %) per dag en per groep met bijhorende standaarddeviaties.

#### 4.1.2 Voedselinname en loopwielactiviteit in het ABA model

Er werd bij controledieren nagegaan of er tijdens een acuut experiment in het ABA model waarbij het lichaamsgewicht van de dieren constant wordt gehouden, veranderingen optreden doorheen de tijd op vlak van voedselinname en loopwielactiviteit. Hiertoe werd nagegaan of er een statistisch significante correlatie bestond tussen het aantal dagen na ABA introductie en voedselinname of loopwielactiviteit. Hierbij werden enkel gegevens van controledieren beschouwd aangezien stimulatie bij stimulatie dieren de evolutie van voedselinname en loopwielactiviteit kan beïnvloeden.

##### 4.1.2.1 Voedselinname in het ABA model

In figuur 14 wordt per dag de gemiddelde voedselinname (in gram) tijdens de voedingsperiode van de controledieren weergegeven. Aangezien niet voldaan was aan de assumptie van normaliteit werd hier gekozen voor de niet-parametrische *Spearman correlatie test*. Hiermee werd geen significante correlatie aangetoond tussen de dag na ABA introductie en de voedselinname tijdens de voedingsperiode (spearmancoëfficiënt = 0,198,  $p = 0,103$ ).

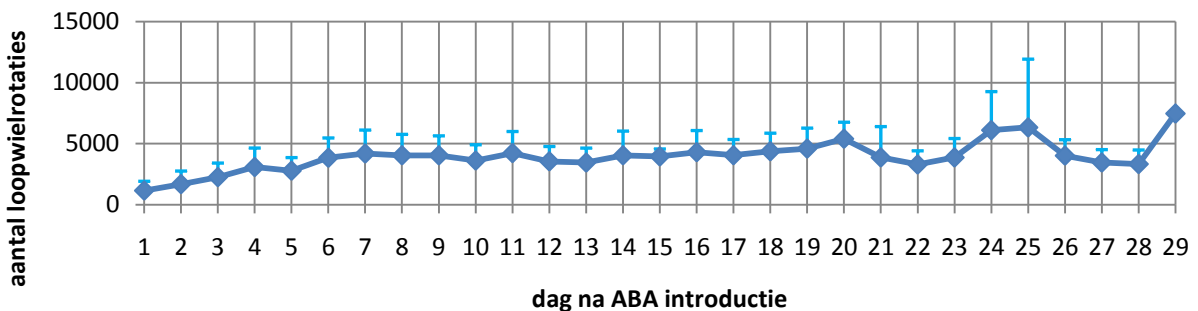


Figuur 14: Weergave van de gemiddelde dagelijkse voedselinname (gram) van controledieren met bijhorende standaarddeviaties. De experimentele periode start op dag 12.

##### 4.1.2.2 Loopwielactiviteit in het ABA model

Onderstaande figuur geeft het gemiddeld aantal loopwielrotaties per dag weer voor controleratten. Aangezien niet voldaan was aan de assumptie van normaliteit werd hier geopteerd voor de niet-parametrische *Spearman correlatie test*. Daarmee werd geen significante correlatie aangetoond tussen

de dag na ABA introductie en de dagelijkse loopwielactiviteit (spearmancoëfficiënt = 0,171,  $p = 0,160$ ).



Figuur 15: Weergave van het gemiddeld aantal loopwielrotaties per dag van controledieren met bijhorende standaarddeviaties. De experimentele periode start op dag 12.

Aangezien hier gewerkt wordt met het aantal loopwielrotaties per dag en de dieren de laatste dag in het ABA model niet volledig doorliepen (slechts tot meteen na de voedingsperiode), worden de loopwielrotaties van die laatste dag hier niet opgenomen. Concreet betekent dit dat het aantal subjecten waar per dag loopwieldata van verwerkt werd niet overeenkomt met wat in figuur 1 gevisualiseerd wordt. Tot en met dag 19 telde de controlegroep 6 dieren, op dag 20 telde deze er 4, van dag 21 tot en met dag 28 bleven er 2 dieren in deze groep en op dag 29 (laatste volledige dag ABA model voor het laatste dier) zakte dit aantal tot 1 rat. De maximale dagelijkse loopwielactiviteit die bekomen werd tijdens dit experiment bedroeg 10274 loopwielrotaties en werd bereikt door een controlerat. Dit komt overeen met 11,3 kilometer.

## 4.2 Histologische analyse

Vooraleer groepsverschillen en verschillen binnen de stimulatiegroep geanalyseerd werden, werd eerst de vermoedelijke locatie van elke elektrodetip, AP t.o.v. *Bregma*, lateraal (L) t.o.v. de middellijn en subduraal (Sd), bepaald (elektrodetipfiguren: zie Bijlage) om na te gaan of elke rat bilateraal in de SN gestimuleerd kon worden. Hierbij overschrijdt het gebied van stimulatie de vermoedelijke locatie van de elektrodetip, vooral naar dorsaal toe, aangezien er gestimuleerd werd tussen de aangeduide elektrodetip (tip van de stimulatie deelelektrode) en de tip van een referentie deelelektrode die korter en dus hoger gelegen was. Uit de figuur kan afgeleid worden dat bij alle ratten de elektrodes zo geïmplant waren dat stimulatie in de SN mogelijk was. Bijgevolg werd geen enkele rat uitgesloten van verdere analyse en werden alle statistische analyses uitgevoerd o.b.v. 7 experimentele- en 6 controleratten. Tabel 3 geeft voor elk dier de coördinaten van de vermoedelijke locatie van de elektrodetip en de overeenkomstige hersenregio's weer.



Tabel 3: Overzicht van de coördinaten en betreffende deelregio's van de SN voor de vermoedelijke elektrodetiplocaties van alle ratten.

		links				rechts			
		AP	L	Sd	Subregio SN	AP	L	Sd	Subregio SN
MePD360	stim	1,08	0,9	5,5	LSV	0,96	0,1	5,8	MS
MePD361	con	0,96	0,2	5	LSI; Ld	0,36	1,1	5,5	LSV
MePD362	stim	0,84	0,6	5,8	LSI; LSV; Ld	0,6	0,8	5,9	SHy
MePD363	stim	0,84	0,4	4,8	LSI	0,48	0,5	4,8	LSI
MePD364	con	0,6	0,3	4,7	LSI; Ld	0,24	0,7	5	LSI
MePD365	con	0,6	0,5	5,7	LSI; Ld	0,96	0,6	5,6	LSI; PLd
MePD366	stim	1,44	0,1	5,2	LSV	1,44	0,8	5,6	LSV; AcbSh
MePD367	stim	0,96	0,6	5,5	LSI	0,96	0,3	5,2	LSI; PLd
MePD368	con	0,48	0,2	5,6	MS	0,36	1	5,3	LSV
MePD369	stim	0,6	1	5,3	LSI; LSV	0,96	0,5	5,6	PLd
MePD370	con	0,96	0,5	5	LSI	0,84	0,5	5	LSI
MePD371	stim	0,96	0,4	5,2	PLd	0,96	0,2	5,2	LSI; PLd
MePD372	con	0,24	0,6	5,6	MS, SFi	0,84	1	5,6	LSV

Afstanden AP, L en Sd worden uitgedrukt in mm. MePD nummers in de linkerkolom dienen ter identificatie. stim = stimulatiedier; con = controledier; LSV = ventrale deel van de Laterale SN; Sfi = septofimbriale nucleus; Shy = septohypothalamische nucleus; AcbSh = 'shell' van de nucleus accumbens

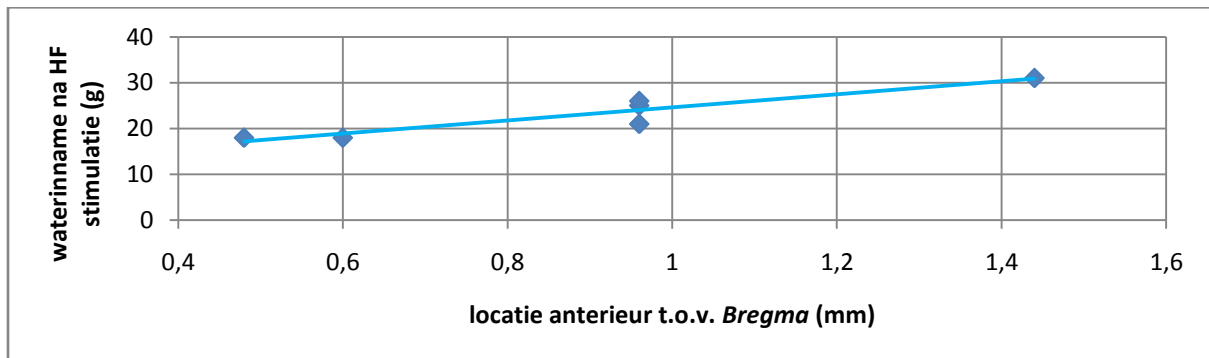
Om na te gaan of er statistisch significante correlaties waren tussen de afhankelijke variabelen voor de verschillende experimentele dagen en de vermoedelijke locatie van de elektrodetip anterior t.o.v. *Bregma* binnen de stimulatiegroep werd hier gebruik gemaakt van de niet-parametrische *spearman-correlatie* test aangezien niet voldaan was aan de assumptie van normaliteit. Bij hoogfrequente stimulatie werd een statistisch significante positieve correlatie aangetoond tussen de afstand van de vermoedelijke locatie van de rechtse elektrodetip t.o.v *Bregma* en voedselname ( $p = 0,029$ ) en tussen deze afstand en waterinname ( $p = 0,008$ ) (zie tabel 4 en figuren 16 en 17).

Tabel 4: Overzicht van de Spearman correlatiecoëfficiënten per hersenzijde voor de stimulatiegroep.

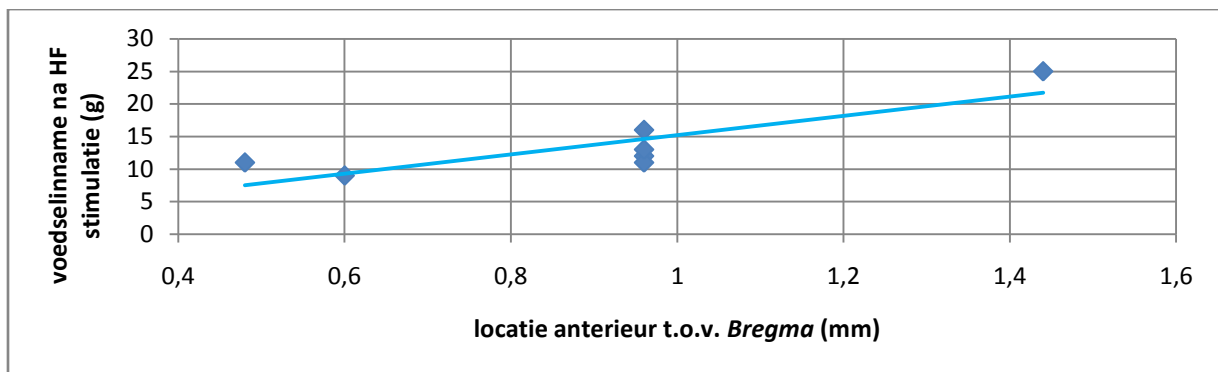
	voedselname		waterinname		loopwielactiviteit	
	LF-stimulatie	HF-stimulatie	LF-stimulatie	HF stimulatie	LF-stimulatie	HF-stimulatie
Locatie AP t.o.v. <i>Bregma</i>						
links	0,396	0,349	0,058	0,388	-0,346	0,309
rechts	0,245	<b>0,805</b>	0,334	<b>0,924</b>	-0,335	-0,374

De correlaties tussen 3 afhankelijke variabelen, gemeten bij 2 sets van stimulatieparameters (namelijk voedselname, aantal loopwielrotaties(loopwielactiviteit) en waterinname bij laag- en hoogfrequente stimulatie en de afstand van de vermoedelijke locatie van de elektrodetip t.o.v. *Bregma* worden weergegeven. Significante correlatiecoëfficiënten zijn **vet en rood** gedrukt

Dit wil zeggen dat waterinname en voedselinname na HF stimulatie hoger zijn naarmate de elektrode meer anterior ingeplant is.



Figuur 16: Positieve correlatie tussen waterinname na hoogfrequente stimulatie (in gram, bij stimulatiedieren) en de vermoedelijke locatie van de elektrodetip anterior t.o.v. Bregma in millimeter.



Figuur 17: Positieve correlatie tussen voedselinname na hoogfrequente stimulatie (in gram, bij stimulatiedieren) en de vermoedelijke locatie van de elektrodetip anterior t.o.v. Bregma in millimeter.

Na FDR correctie voor ‘multiple testing’ werden hier echter geen significante correlaties meer teruggevonden (respectievelijk  $p = 0,173$  en  $p = 0,101$ ).

### 4.3 Analyses van groepsverschillen tijdens de experimentele periode

De volgende (alternatieve) hypothesen werden getoetst: ratten in het ABA model die bilateraal elektrisch gestimuleerd worden in de SN eten significant meer, hebben een significant lagere loopwielactiviteit en drinken een significant andere hoeveelheid dan ratten in het ABA model waarbij wel elektroden ingeplant worden in de SN maar die niet cerebraal gestimuleerd worden. Hierbij werd onderzocht of de hierboven beschreven effecten van stimulatie optraden bij HF en/of LF stimulatie. Deze analyses gebeurden o.b.v data bekomen op experimentele dagen. Vooraleer de verschillen geanalyseerd werden, werd de spreiding van de 3 random over de experimentele periode verdeelde experimentele dagen (voor de stimulatiedieren: dag zonder stimulatie, dag met LF stimulatie in de SN en dag met HF stimulatie in de SN) over de experimentele periode nagegaan om te verzekeren dat een bepaalde experimentele dag niet altijd tijdens 1 specifieke deelperiode binnen de experimentele periode plaatsvond. Dit wordt in onderstaande tabel weergegeven. De experimentele dagen blijken gelijkmatig verdeeld over de volledige experimentele periode.

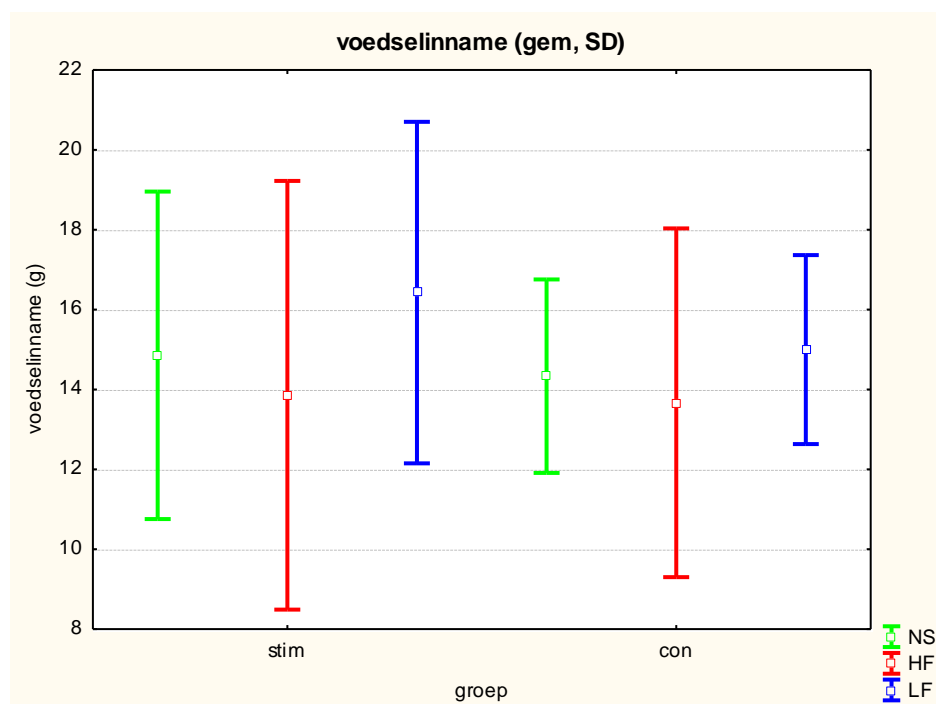
Tabel 5: Overzicht van de verdeling van de 3 verschillende experimentele dagen voor stimulatiedieren over de experimentele periode.

	NS	LF	HF
Dag 1-6	4	2	3
Dag 7-12	1	2	2
Dag 13-19	2	3	2

NS = dag waarop stimulatiedieren niet gestimuleerd werden, LF = dag waarop stimulatiedieren met laagfrequente stimulatie in de SN gestimuleerd werden; HF = dag waarop stimulatiedieren met hoogfrequente stimulatie in de SN gestimuleerd werden. De dagen die weergegeven worden in de linkerkolom zijn de dagen vanaf de start van de experimentele periode (Dag 1 = eerste dag van de experimentele periode).

### 4.3.1 Voedselinname

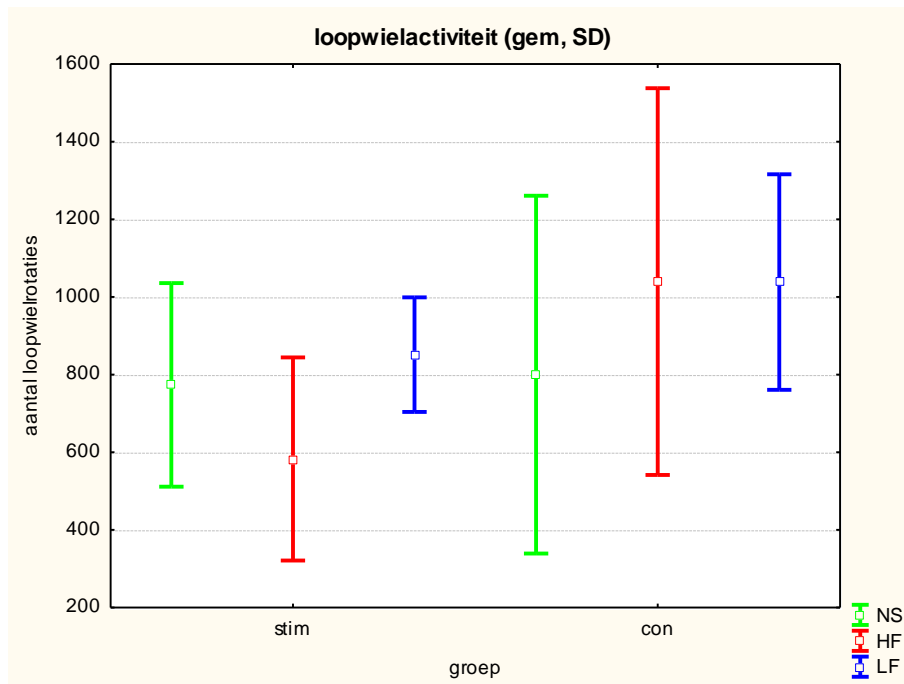
Onderstaande figuur toont de gemiddelde voedselinname (in gram) per groep en per experimentele dag. Aangezien niet aan de assumptie van normaliteit voldaan was werd hier, en bij de analyses van loopwielactiviteit en waterinname, gekozen voor niet-parametrische testen. Met de niet-parametrische *Wilcoxon rank sum* test voor ongepaarde vergelijkingen werd er geen significant verschil aangetoond op vlak van gemiddelde dagelijkse voedselinname tussen de stimulatiegroep en de controlegroep voor de verschillende experimentele dagen. (NS: exact  $p = 0,418$ , eenzijdig; LF: exact  $p = 0,418$ , eenzijdig; HF: exact  $p = 0,418$ , eenzijdig) Met de niet parametrische *Friedman-Anova by ranks test* werd geen significant verschil tussen de 3 experimentele dagen binnen de stimulatiegroep aangetoond ( $p = 0,087$ , tweezijdig).



Figuur 18: weergave van de gemiddelde voedselinname (gram) per experimentele dag en per groep met bijhorende standaarddeviaties. gem = gemiddelde; SD = standaarddeviatie, stim = stimulatiegroep, con = controlegroep

### 4.3.2 Loopwielactiviteit

Onderstaande grafische representatie geeft de gemiddelde loopwielactiviteit (aantal loopwielrotaties) tijdens de experimentele periode per experimentele dag en per groep weer.

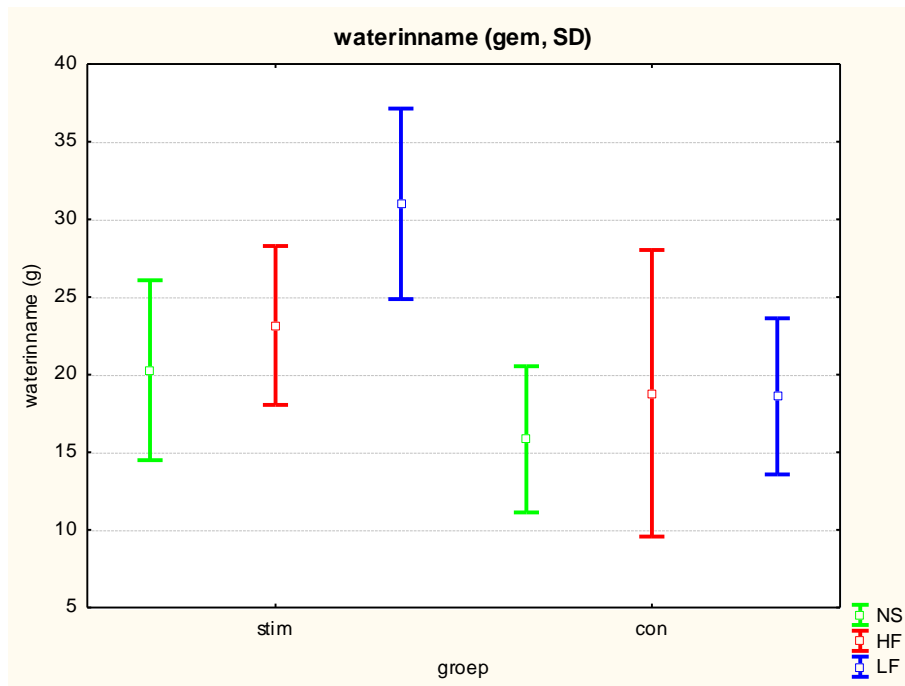


Figuur 19: Weergave van het gemiddeld aantal loopwielrotaties tijdens de experimentele periode per experimentele dag en per groep met bijhorende standaarddeviaties.

Met de *Wilcoxon rank sum* test werd een significant verschil aangetoond tussen de twee groepen op de experimentele dag waarop de stimulatiedieren hoogfrequent gestimuleerd werden in de SN (exact  $p = 0,026$ , eenzijdig). Na de FDR correctie voor ‘multiple testing’ werd dit verschil echter niet meer significant bevonden (gecorrigeerde  $p = 0,076$ , eenzijdig). Met dezelfde test werd geen significant verschil aangetoond op vlak van gemiddeld aantal loopwielrotaties tijdens de experimentele periode tussen de stimulatiegroep en de controlegroep voor de experimentele dagen waarop stimulatiedieren laagfrequent of niet gestimuleerd werden in de SN. (NS: exact  $p = 0,473$ , eenzijdig; LF: exact  $p = 0,051$ , eenzijdig). Met de niet parametrische *Friedman-Anova by ranks* test werd geen significant verschil tussen de 3 experimentele dagen binnen de stimulatiegroep aangetoond ( $p = 0,156$ , tweezijdig).

### 4.3.3 Waterinname

Onderstaande figuur toont de gemiddelde waterinname (in gram) tijdens de voedingsperiode per experimentele dag en per groep. Met de *Wilcoxon rank sum* test werd geen significant verschil aangetoond op vlak van gemiddelde waterinname tijdens de voedingsperiode tussen de stimulatiegroep en de controlegroep voor 2 verschillende experimentele dagen: de dag zonder stimulatie en de dag met hoogfrequente stimulatie in de SN. (NS: exact  $p = 0,181$ , tweezijdig; HF: exact  $p = 0,537$ , tweezijdig) Met deze test werd wel een significant verschil aangetoond tussen de twee groepen op vlak van waterinname bij laagfrequente stimulatie (exact  $p = 0,009$ , tweezijdig). Ook na de FDR correctie voor ‘multiple testing’ bleken ratten die bilateraal laagfrequent gestimuleerd werden in de SN een significant andere hoeveelheid (meer) te drinken dan controleratten (gecorrigeerde  $p = 0,026$ , tweezijdig). Met de niet parametrische *Friedman-Anova by ranks* test werd geen significant verschil tussen de 3 experimentele dagen binnen de stimulatiegroep aangetoond ( $p = 0,084$ , tweezijdig).



*Figuur 20: Weergave van de gemiddelde waterinname (gram) tijdens de voedingsperiode per groep en per experimentele dag met bijhorende standaarddeviaties.*

## 5 Discussie

---

### 5.1 Een acuut stimulatie-experiment in het ABA model

---

Tijdens de studie werd het lichaamsgewicht van de ABA ratten constant gehouden, door het bijgeven van extra eten, om een ‘crossover’ stimulatie-experiment te kunnen doorvoeren. In het geval van een ‘crossover’ experiment waarbij bij elk dier 2 therapeutische opties (2 sets van stimulatieparameters) worden getest, moeten de condities waaraan dit dier onderworpen wordt immers zo constant mogelijk zijn om de resultaten van de tests te kunnen vergelijken. Bij een evoluerende aandoening zoals AN of ABA vereist dit ingrepen van de onderzoeker. Naast het lichaamsgewicht werd met dit doel voor ogen onder andere ook de omgevingstemperatuur zo constant mogelijk gehouden. Wanneer het lichaamsgewicht van ABA model ratten niet door de onderzoekers op peil gehouden wordt, zal dit dalen tot ver onder het 85% niveau waarop het hier werd gestabiliseerd. Bovendien zal, wanneer het lichaamsgewicht niet op peil wordt gehouden na verloop van tijd de loopwielactiviteit in het model toenemen en de voedselinname, die meteen na ABA introductie fel daalt, terug stijgen.<sup>(72)</sup> De vraag rees dan ook of deze 2 factoren dezelfde evolutie doormaken in een ABA model waar het lichaamsgewicht constant wordt gehouden. Hoewel er op grafiek een lichte stijging waarneembaar is van zowel voedselinname als loopwielactiviteit blijkt uit de resultaten van dit onderzoek nu dat er tijdens de experimentele periode geen statistisch significante stijging of daling van deze parameters optreedt bij ABA ratten waarvan het lichaamsgewicht constant wordt gehouden. Een hypothese die hierbij kan gesteld worden is dat de stijging van voedselinname en loopwielactiviteit secundair zijn aan de daling van lichaamsgewicht. Hoe het zit met de validiteit van deze vorm van het ABA model voor AN is nog onduidelijk: de afwezigheid van een stijging van voedselinname lijkt alvast de relevantie van het model te verhogen.

### 5.2 Elektrische hersenstimulatie in de SN bij ABA ratten

---

#### 5.2.1 De locatie van de elektrodetip en het effect van stimulatie

Uit preliminair onderzoek blijkt dat het effect van letsels in de SN afhangt van de AP locatie hiervan binnen deze structuur. Meer specifiek werd aangetoond dat letsels in het anterieure deel van de SN geen significant positief effect hebben op voedselinname en daling van lichaamsgewicht in het ABA model, terwijl dit wel zo is voor letsels in het midden en in het posterieure deel van het septale gebied (ongepubliceerde data). Op basis hiervan rees de vraag of ook het effect van septale stimulatie op de bestudeerde variabelen afhankelijk is van de AP locatie van de elektrodetip. Dit bleek niet het geval: associaties tussen de AP locatie van de rechter-elektrodetip en voedsel- en waterinname tijdens hoogfrequente stimulatie in de SN bleken de enige 2 correlaties die statistisch significant waren voor ‘multiple testing’ correctie. Meer anterieure stimulatie leverde hier een hogere voedselinname en waterinname op dan minder anterieure stimulatie. Na correctie bleken ook deze correlaties niet statistisch significant. Een mogelijke verklaring voor de discrepantie van dit stimulatie-experiment met letselstudies in het verleden is dat bij dit experiment slechts binnen een klein deel van het septale gebied gestimuleerd werd. Bij de letselstudies werden letsels toegebracht op 2,3 mm (anterieure deel van de SN) en 1mm (midden van de SN) anterieur en op 0,3 mm posterieur (posterieure deel van de SN) van *Bregma*. De elektrodetippen waren tijdens dit stimulatie-experiment steeds tussen 1,44 en 0,24 mm en voornamelijk tussen 0,6 en 0,96 mm anterieur van *Bregma* gelocaliseerd. Dit houdt in dat stimulatie zich beperkte tot de middelste regio van de SN en andere regio’s van deze structuur niet of

nauwelijks aan bod kwamen. De implicaties van de AP locatie van de elektrodetip voor het effect van stimulatie kunnen hier dan ook moeilijk nagegaan worden.

### **5.2.2 Septale stimulatie en voedselinname**

ABA model ratten die bilateraal elektrisch gestimuleerd worden in de SN hebben geen hogere voedselinname dan ABA ratten die geen hersenstimulatie ondergaan. Bovendien is er binnen de groep van dieren die gestimuleerd worden in de SN ook geen significant verschil op vlak van voedselinname tussen de dagen waarop ze niet, HF of LF gestimuleerd worden. Hoewel bilaterale letsels in de SN bij ABA ratten leiden tot een verhoogde voedselinname is dit resultaat niet in tegenstrijd met de literatuur omtrent septale stimulatie en voedselinname. Zo is onder andere reeds aangetoond dat septale stimulatie enkel leidt tot een stijging van voedselinname bij ratten wanneer deze *ad libitum* beschikking hebben over voedsel, en niet in het geval van voedseldeprivatie, zoals in het ABA model. (177) Bovendien kan een stijging van voedselinname na septale stimulatie gecorreleerd worden met abnormale elektrische activiteit in de HC die eetgedrag kan beïnvloeden via de HT. Het is dus niet zeker dat de uitgelokte septale activiteit oorzakelijk is bij de stijging van voedselconsumptie bij niet-hongerige dieren.(194) Bij beide bovenvernoemde studies kon niet afgeleid worden met welke stroomsterkte de stimulatie gebeurde, wel kan verondersteld worden dat deze hoger was dan de stroomsterkte die hier gebruikt werd aangezien stimulatie gepaard ging met heftige schud-reacties, epileptische aanvallen en andere duidelijke verstoringen van normaal gedrag die hier niet geobserveerd werden. Hiernaast werd in 2007 aangetoond dat chemische stimulatie met CRH receptor agonisten in de SN leidt tot een daling van voedselinname.(119)

### **5.2.3 Septale stimulatie en loopwielactiviteit**

Binnen de groep van ratten in het ABA model die bilateraal gestimuleerd worden in de SN zijn er geen verschillen op vlak van loopwielactiviteit. Hiernaast hebben deze dieren voor geen enkele experimentele dag een significant lagere loopwielactiviteit dan ABA ratten die niet cerebraal gestimuleerd worden. Desondanks is er wel een tendens tot verlaagde loopwielactiviteit in de stimulatiegroep t.o.v. de controlegroep bij hoog- en laagfrequente stimulatie. Deze daling is in overeenstemming met de literatuur omtrent septale stimulatie aangezien elektrische stimulatie in de SN geassocieerd wordt met een vertraging van hartritme, een reductie van stress en een kalmerend en anxiolytisch effect.(180, 188, 192, 196) Bovendien wordt stimulatie in de SN ook in verband gebracht met onderdrukking van gedrag, waaronder ook loopwielactiviteit. Bij de studie die dit laatste verband aantoonde, betrof het echter stimulatie met lange pulsbreedte bij niet-hongerige ratten terwijl het hier stimulatie met korte pulsbreedte betreft bij uitgehongerde ratten.(200) Deze twee factoren zijn mogelijk mee bepalend voor de afwezigheid van significantie op vlak van loopwielactiviteit (andere factoren: zie 5.3 Limitaties van het onderzoek).

### **5.2.4 Septale stimulatie en waterinname.**

Binnen de stimulatiegroep zijn er geen statistisch significante verschillen op vlak van waterinname. Wel is het zo dat ABA ratten die LF gestimuleerd worden in de SN significant meer drinken dan dieren die niet septaal gestimuleerd worden. In de literatuur komen associaties tussen de septale nucleus en waterinname of dorst frequent voor. De septale nucleus is dan ook betrokken bij cardiovasculaire regulatie en het evenwicht tussen water en elektrolyten, waarbij controle over waterinname en -excretie essentieel is. Het belang van de SN in drinkgedrag blijkt uit de observatie dat eliminatie van het volledige septale gebied aanleiding geeft tot een verandering van waterinname. De SN lijkt betrokken te zijn bij inhibitorische en excitatorische mechanismen in de controle van waterinname.

De betrokkenheid van het septale gebied in de excitatorische controle van waterconsumptie komt onder andere naar voor bij de hypothese dat een deel van dit gebied, de MS, deel uitmaakt van het circuit in de voorhersenen dat bij activatie waterinname induceert. Dit blijkt uit observaties dat cholinerge en adrenerge activatie van de MS een dipsinogene respons uitlokt en dus leidt tot een stijging van waterinname en dat zowel cholinerge blokkades als elektrolytische letsels in de MS aanleiding geven tot een daling van waterinname. Dit laatste fenomeen treedt enkel op als de letsels of blokkades gesitueerd zijn in de MS en niet in andere regio's van de SN. Ook reduceert het blokkeren van angiotensine receptoren in de MS waterinname terwijl de activatie van deze receptoren en van vasopressine receptoren in de MS en de laterale SN waterinname verhoogt. Verder leiden bepaalde neurotoxische letsels in het laterale septale gebied tot een reductie van waterinname en geeft elektrische stimulatie van de dorsale SN aanleiding tot een facilitatie van drinkgedrag uitgelokt door hypothalamische stimulatie. Bovendien is van bilaterale elektrolytische letsels in de LSI aangetoond dat ze aanleiding geven tot een reductie van waterinname uitgelokt door angiotensinerge activatie. Hiernaast gaat het blokkeren van zowel V1-vasopressine als angiotensine receptoren in de laterale SN de stijging van waterinname uitgelokt door vasopressinerge activatie tegen. Het belang van de SN in de inhibitie van waterinname blijkt dan weer onder andere uit de observatie dat elektrolytische letsels in de laterale SN ook kunnen leiden tot een stijging van waterinname en dorst veroorzaakt door activatie van angiotensine- en osmoreceptoren. Dit effect wordt toegewezen aan eliminatie van inhibitorische mechanismen in de controle van waterinname. Ook is reeds geobserveerd dat stimulatie van de anterieure SN waterinname reduceert en dat ventrale septale stimulatie drinkgedrag uitgelokt door hypothalamische stimulatie onderdrukt. Bovendien zijn ook niet-septale hersenregio's betrokken bij de rol van de SN in de controle van waterinname. Zo zal het effect van laterale en mediale septale vasopressinerge activatie gereduceerd worden door vasopressinerge blokkade in de PVN en zal het effect van mediale septale angiotensinerge activatie opgeheven worden door  $\alpha$ 1-adrenerge blokkade maar toenemen door  $\alpha$ 2-adrenerge blokkade in dezelfde hersenregio. Kortom kan gesteld worden dat de verschillende delen van de SN verschillende rollen, zowel inhibitorische als excitatorische, kunnen spelen in de controle van waterinname. De MS en de LSI maken hierbij samen waarschijnlijk deel uit van het circuit dat bij activatie dipsinogene reacties induceert. (9, 72, 175, 176, 201-207) 17 van de 26 elektrodetippen die bij dit experiment werden ingeplant bleken gesitueerd te zijn in de MSN of de LSI. Bovendien strekte stimulatie zich waarschijnlijk ook bij tenminste een deel van de 9 overige elektrodes uit tot deze hersenregio's. De stijging van waterinname die hier aangetoond wordt is dus alvast niet in tegenstrijd met wat er in de literatuur over de SN en waterinname bekend is.

Hiernaast is in het verleden ook reeds aangetoond dat septale stimulatie een effect kan hebben op waterinname zonder invloed op voedselinname en dat deze stimulatie ook de aantrekkingskracht van water kan veranderen zonder die van voedsel te beïnvloeden.(9, 193)

Het belang van waterinname in dit experiment wordt overigens niet enkel geïllustreerd door frequente associaties van septale stimulatie met veranderd drinkgedrag maar ook door functionele betrokkenheid ervan in het ABA model. Zo blijkt dat niet alleen voedsel- maar ook waterdeprivatie in combinatie met onbeperkte toegang tot een loopwiel kan leiden tot ABA.(73) Ook neemt waterinname toe wanneer dieren waarvan de voedselinname beperkt wordt toegang krijgen tot een loopwiel en is loopwielactiviteit positief gecorreleerd met waterinname, zowel met als zonder voedselrestrictie. De piek van loopwielactiviteit meteen voor de voedingsperiode in het ABA model gaat bovendien samen met een piek van waterinname.(120, 121)

### **5.2.5 Het 'septal rage' syndroom**

Het 'septal rage' syndroom is een geheel van gedragingen, zoals agressiviteit bij vastnemen, ontsnappingsgedrag, en algemene agitatie, dat vaak voorkomt bij dieren met septale letsels. Wanneer



deze effecten ook optreden bij septale stimulatie beperkt dit de therapeutische mogelijkheden daarvan en moet er gezocht worden naar effectieve stimulatieparameters die dit neveneffect vermijden. Tijdens dit onderzoek werd er echter geen evidentie gevonden voor het optreden van het ‘septal rage’ syndroom bij stimulatie in de SN.

## 5.3 Limitaties van het onderzoek

---

### 5.3.1 Elektrische hersenstimulatie en histologische analyse

Problematisch bij elektrische hersenstimulatie is dat het hersengebied dat gestimuleerd wordt moeilijk exact te bepalen is. In de praktijk wordt er vanuit de locatie van de elektrodetip, die bepaald wordt d.m.v. histologie, geëxtrapoleerd tot wat het verwachte gebied van stimulatie is. Tijdens histologische analyse wordt slechts de vermoedelijke locatie van de elektrodetip bepaald aan de hand van de schacht die zichtbaar blijft na het verwijderen van de elektrode. Verder ontstaan er bij het proces van perfusie, resectie en het snijden van coupes uit het hersenweefsel ook vaak misvormingen van de hersenen die de analyse achteraf nog moeilijker maken. Om het probleem van histologie, wat overigens een zeer arbeids- en tijdsintensief proces is, kan overgeschakeld worden naar visualisatie d.m.v. beeldvorming.

EHS en lokale chemische stimulatietechnieken, het gebruik van intracerebraal toegediende receptoragonisten, zijn complementair aangezien EHS toelaat alle elementen van een bepaald gebied in de hersenen te stimuleren terwijl het bij de chemische stimulatietechnieken mogelijk is specifieke subregio's van hersengebieden te stimuleren. In een experiment waar enkel EHS wordt toegepast is de afwezigheid van specifieke, doelgerichte stimulatie dan ook een beperking. Hiernaast is de uniformiteit van elektrische hersenstimulatie in dit experiment geen zekerheid aangezien de eigenschappen van verschillende zelfgemaakte elektrodes niet noodzakelijk gelijk zijn. Zo zijn bijvoorbeeld kleine beschadigingen van de isolatielaag niet uit te sluiten. Ook de variabele weefseleigenschappen en interindividuele verschillen op vlak van onder andere lokale neuroanatomie en de locatie van *Bregma* kunnen de uniformiteit van stimulatie in het gedrang brengen. Hiernaast kan weefselschade, mogelijks mee veroorzaakt door het gebruik van een elektrode die bestaat uit 2 opgedraaide deelelektrodes en die dus een eerder grote doorsnede heeft, niet uitgesloten worden. Verder werden slechts 2 sets van stimulatieparameters uitgetest en werd slechts 1 stimulatiedoelwit binnen de SN geselecteerd, waardoor het mogelijk is dat significante effecten van stimulatie gemist werden doordat niet met de ideale stimulatieparameters gestimuleerd werd en niet het juiste stimulatiedoelwit binnen het septale gebied werd geselecteerd.

### 5.3.2 Omgevingsfactoren en procedurele limitaties

De kamertemperatuur van het lokaal waar de ratten gehuisvest waren werd zo constant mogelijk gehouden. Desondanks varieerde deze om technische redenen vrij sterk doorheen het experiment. Zo werd er bijvoorbeeld, onafhankelijk van de reeds vroeger beschreven variaties tussen 18,9°C en 21,5°C, bij een continue temperatuurmeting gedurende 4 dagen een piektemperatuur van meer dan 24°C opgemeten. Aangezien de omgevingstemperatuur een zeer belangrijke factor is in het ABA model die onder ander invloed heeft op loopwielactiviteit en voedselinname kunnen de temperatuurschommelingen een impact gehad hebben op deze variabelen.(72) Bovendien kunnen momenten van verhoogde stress voor de dieren, bijvoorbeeld door lawaaihinder of door de veelvuldige manipulaties die noodzakelijk zijn bij elektrische hersenstimulatie, niet uitgesloten worden. Het experiment was echter gerandomiseerd en koppels van controle- en stimulatiedieren werden steeds blootgesteld aan dezelfde temperaturen en andere omgevingsfactoren zodat de resultaten van het onderzoek hierdoor niet vertekend zouden mogen zijn. Hiernaast gebeurden de metingen van

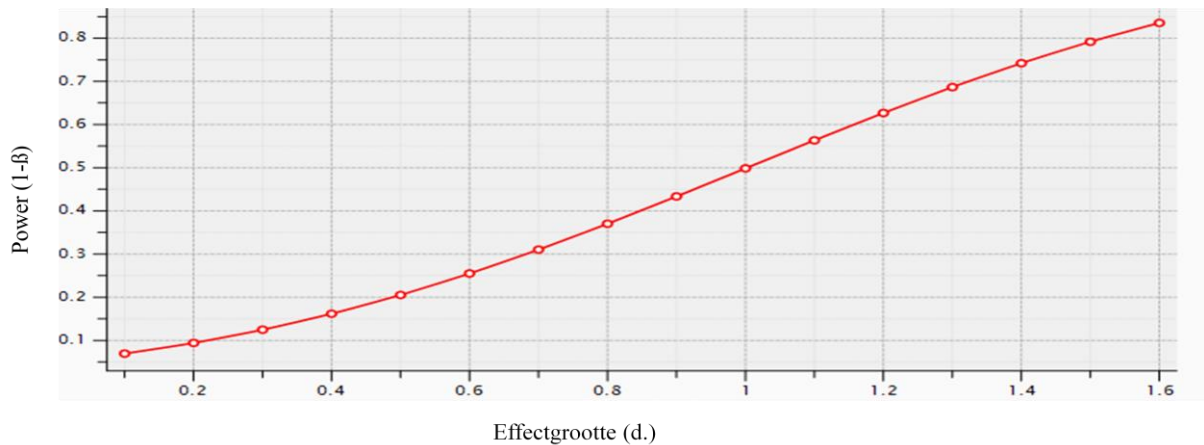
waterinname niet 100% exact, zo vielen er soms druppels uit de flessen tijdens de metingen (1 druppel water weegt ongeveer 50 milligram). Implementatie van automatische meetinstallaties voor waterinname, bijvoorbeeld druppeltellers, die minder manipulaties vereisen, zou dit probleem kunnen oplossen en stress bij de dieren reduceren. Verder werd tijdens dit experiment gewerkt met vrouwelijke ratten omdat de incidentie van AN 10 maal hoger is bij vrouwen dan bij mannen. Het is echter zo dat bij vrouwelijke ratten voedselinname en loopwielactiviteit fluctueren tijdens de hormonale cyclus waardoor de variabiliteit van deze parameters doorheen het experiment toeneemt en de kans groter wordt dat kleine verschillen niet gedetecteerd worden.(18) Bovendien werd de dieren de toegang tot het loopwiel niet ontzegd tijdens de voedingsperiode, waardoor het mogelijk was dat loopwielactiviteit interfereerde met voedselinname. Niet alle koppels van dieren, tenslotte, werden op hetzelfde moment uit het ABA model verwijderd, waardoor de weergegeven evoluties van voedselinname en loopwielactiviteit aan het einde van het experiment op minder en minder proefdieren gebaseerd zijn, wat de interpretatie ervan bemoeilijkt.

### 5.3.3 Statistische data-analyse

Een belangrijk begrip bij statistische analyse is de type 2 fout. Bij het maken van een type 2 fout wordt een nulhypothese niet verworpen terwijl de alternatieve hypothese toch juist is. Een maat voor de kans op een type 2 fout bij een specifieke analyse van een specifieke steekproef is de 'power'. De 'power' van een statistische test wordt gedefinieerd als: "1 min de kans op een type 2 fout ( $\beta$ )". Als de 'power' laag is, is de kans op het maken van een type 2 fout groot en is de kans dat de nulhypothese verworpen wordt klein, ook al was deze in feite fout. Er zijn geen formele standaarden waaraan de 'power' moet voldoen, maar algemeen wordt een waarde van 0,8 als voldoende groot beschouwd. In het geval van niet-significante testresultaten loont het de moeite om de 'power' van de gebruikte tests na te gaan. *Post hoc* power analyse werd hier uitgevoerd om het studie design van de testen voor de analyse van groepsverschillen tijdens de experimentele periode op vlak van voedselinname en loopwielactiviteit te evalueren. De mogelijkheid van deze studies om een effect met een bepaalde effectgrootte te detecteren werd nagegaan. Hierbij werd gebruik gemaakt van gestandaardiseerde maten voor effectgrootte, de *Cohen* maten, waarbij de power berekend wordt voor drie niveaus van effectgroottes: kleine, middelmatige en grote groottes.(208) Onderstaande analyses werden uitgevoerd m.b.v. het computerprogramma G\*power 3.1.2.

De 'power' voor een eenzijdige *Wilcoxon* test, zoals gebruikt bij de analyse van groepsverschillen in de experimentele periode op vlak van voedselinname en loopwielactiviteit, bij een steekproef met 6 leden in de ene (controlegroep) en 7 in de andere groep (stimulatiegroep) voor het detecteren van een middelmatige *Cohen* effectgrootte (effectgrootte  $d = 0,5$ ) blijkt 0,21 te bedragen, voor een grote *Cohen* effectgrootte ( $d = 0,8$ ) is dit 0,37. Bij deze test is de kans op een type 2 fout bij grote en middelmatige *Cohen* effectgrootte dus respectievelijk gelijk aan 63 % en 79%. De 'power' is dus niet hoog genoeg om te kunnen stellen dat er geen middelmatig of groot effect (*Cohen* effectgroottes) is van stimulatie op voedselinname en/of loopwielactiviteit en de kans bestaat dat een reëel effect van de stimulatie op deze afhankelijke variabelen gemist werd.

Met sensitiviteitsanalyse werd verder nagegaan welke effectgrootte bij deze test vereist is voor detectie bij een vooraf vastgelegde 'power' van 0,8. Hiermee werd aangetoond dat de effectgrootte die detecteerbaar is bij een 'power' van 0,8 in het geval van een eenzijdige *Wilcoxon* test voor de vergelijking van twee groepen bij een totale steekproefgrootte van 13 1,517 bedraagt. De evolutie van 'power' in functie van effectgrootte wordt weergegeven in figuur 19.



Figuur 21: Evolutie van power in functie van effectgrootte voor een eenzijdige Wilcoxon test voor vergelijkingen tussen 2 groepen bij een totale steekproefgrootte van 13. De effectgrootte die detecteerbaar is bij een power van 0,8 bedraagt 1,517.

Een ander belangrijk begrip bij statistische analyse is het ‘multiple testing’ probleem.(98) Dit begrip houdt in dat de kans op een type 1 fout (het ongerechtvaardigd verwerpen van de nulhypothese) stijgt naarmate meer consecutieve significantietesten worden uitgevoerd. Correctie voor dit probleem, bijvoorbeeld d.m.v. *Bonferroni* correctie kan leiden tot een verhoging van de kans op een type 2 fout. Om deze verhoging zoveel mogelijk te beperken werd gebruikgemaakt van een minder strikte correctiefactor: de *False Discovery Rate*.(209)

## 5.4 Toekomstig onderzoek

Het onderzoek naar de betrokkenheid van en therapiemogelijkheden verbonden aan de SN in ABA en AN en naar de hersenregio's waarmee deze structuur connecties heeft is nog niet afgerond. Zo zou het interessant zijn om het neurale circuit rond de SN verder uit te werken met letsel- en stimulatietechnieken om de effecten van stimulatiestudies wetenschappelijk te ondersteunen en om de neurale basis van het ABA syndroom te achterhalen. Bij dit verklarende onderzoek kunnen onder andere excitotoxische letseltechnieken gebruikt worden. Hierbij worden specifieke types van neuronen, bijvoorbeeld glutamaterge neuronen, vernietigd d.m.v. intracerebrale injecties van neurotoxines, zoals kaïnezuur.(210) Zo kan achterhaald worden welke types van neuronen en welke specifieke connecties van de SN met andere hersenregio's betrokken zijn bij ABA en bij de effecten van elektrische stimulatie- en letselstudies. Ook zijn naast elektrische hersenstimulatie ook lokale chemische stimulatietechnieken een optie voor verder onderzoek. Deze technieken omvatten het injecteren van specifieke receptoragonisten (zoals bijvoorbeeld vasopressine) in specifieke delen van de hersenen om bepaalde receptoren of groepen van receptoren te activeren.(72, 201-207) Zo kan achterhaald worden welke receptoren en agonisten essentieel zijn voor de effecten van EHS en voor de ontwikkeling en progressie van ABA. Ook bestaat de mogelijkheid het onderzoek uit te breiden tot analyse van endocrinologische processen, die niet alleen bij ABA maar ook bij AN vaak ontregeld zijn. Tenslotte kan zowel het stimulatie- als het letselonderzoek uitgevoerd worden bij mannelijke en vrouwelijke dieren om mogelijke invloed van het geslacht op de effecten van stimulatie en letsels na te gaan.

Met het oog op de therapiemogelijkheden van EHS in de SN bij patiënten met ernstige AN is er bovendien nog nood aan preklinisch onderzoek. Zo zou dit experiment eventueel herhaald kunnen worden met een groter aantal subjecten om de ‘power’ te verhogen. Het huidige experiment toont echter wel aan dat er geen (erg) groot effect is van stimulatie op voedselinname en loopwielactiviteit

en het zijn net die erg grote effecten van EHS op de symptomen van AN die klinisch relevant zijn. Het lijkt dus meer aangewezen dit acute stimulatie-experiment te herhalen met andere stimulatieparameters of andere stimulatiedoelwitten in de SN om na te gaan of dit leidt tot betere resultaten. Hierbij bestaat de mogelijkheid stimulatie uit te voeren tijdens beeldvorming om zo tijdens stimulatie vast te stellen of de SN geactiveerd wordt en dan de ideale stimulatieparameters te selecteren. Om de therapeutische effectiviteit van EHS in de SN nauwkeuriger na te gaan kan ook het fenomeen van SZS in beschouwing genomen worden. Het is geweten dat dit fenomeen niet bij alle dieren die aan de SZS procedure onderworpen worden ontwikkelt. Bovendien blijkt dat bij dieren die dit fenomeen sterk ontwikkelen, en dus een hoge 'respons rate' bereiken, het effect van septale stimulatie op waterinname groter is dan bij 'non-responders'. Een optie voor toekomstig onderzoek bestaat er dan ook in eerst de ontwikkeling van het SZS fenomeen na te gaan en dan enkel bij 'positive-responders' het effect van door de onderzoeker toegediende septale stimulatie op variabelen zoals waterinname, voedselinname en loopwielactiviteit te onderzoeken. Hiernaast kunnen acute stimulatie-experimenten ook uitgevoerd worden in andere hersenregio's waarvan vastgesteld is dat ze betrokken zijn bij voedselinname, loopwielactiviteit, lichaamsgewicht of overleving in het ABA model. Als er uit de acute experimenten blijkt dat stimulatie gunstige effecten heeft op deze variabelen kan d.m.v. chronische experimenten nagegaan worden wat de effecten en mogelijke neveneffecten zijn van langdurige stimulatie. De neveneffecten van septale stimulatie, bijvoorbeeld op vlak van geheugen en motoriek, moeten in elk geval grondig gekarakteriseerd worden vooraleer overgeschakeld kan worden naar patiënten. Tenslotte kunnen nog bijkomende stimulatie-experimenten uitgevoerd worden om na te gaan wat het effect is van stimulatie in de SN op andere (psychiatrische) symptomen van AN. Zo kan bijvoorbeeld in een diermodel voor angst nagegaan worden wat de effecten zijn van septale stimulatie op angst.

## 6 *Besluit*

---

Uit dit onderzoek blijkt dat bilaterale elektrische hersenstimulatie met frequenties van 100 Hz en 7 Hz, een pulsbreedte van 1 ms en een stroomintensiteit van 80  $\mu$ A in de SN de loopwielactiviteit van ratten in het ABA model niet verlaagt en hun voedselinname niet verhoogt. Wel blijken ABA ratten die laagfrequent (7 HZ) septaal gestimuleerd worden significant meer te drinken dan ratten in het ABA model die niet cerebraal gestimuleerd worden. Bovendien is er geen significante daling of stijging van voedselinname en loopwielactiviteit bij ABA ratten wanneer hun lichaamsgewicht constant wordt gehouden. Een mogelijke rol van de septale nucleus in voedselinname en activiteit, die reeds onderbouwd is door preliminair onderzoek, wordt hiermee echter niet uitgesloten. De mogelijkheid bestaat immers dat limitaties, onder andere i.v.m. selectie van stimulatieparameters, er toe geleid hebben dat significante resultaten werden gemist. Vooraleer de SN als mogelijk doelwit van EHS bij AN patiënten wordt uitgesloten dient verder onderzoek uitgevoerd te worden waarbij andere sets van stimulatieparameters en andere doelwitten in de SN worden uitgetest. Bovendien moet er voor de overstap naar de mens gemaakt wordt nog onderzocht worden wat de lange-termijn effecten en neveneffecten van bilaterale elektrische stimulatie in de SN zijn bij ABA model ratten.

# 7 Referenties

---

1. Klein DA, Walsh BT. Eating disorders. *Int Rev Psychiatry*. 2003 Aug;15(3):205-16.
2. Eddy KT, Keel PK, Dorer DJ, Delinsky SS, Franko DL, Herzog DB. Longitudinal comparison of anorexia nervosa subtypes. *Int J Eat Disord*. 2002 Mar;31(2):191-201.
3. Yager J, Andersen AE. Clinical practice. Anorexia nervosa. *N Engl J Med*. 2005 Oct 6;353(14):1481-8.
4. Sellar CA, Ravalia A. Anaesthetic implications of anorexia nervosa. *Anaesthesia*. 2003 May;58(5):437-43.
5. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th edition. DSM-IV-TR; 2000.
6. WHO. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th revision; 2007.
7. Lee S, Lee AM, Ngai E, Lee DT, Wing YK. Rationales for Food Refusal in Chinese Patients with Anorexia Nervosa. *Int J Eat Disord*. 2001 Mar;29(2):224-9.
8. Watson TL, Andersen AE. A critical examination of the amenorrhea and weight criteria for diagnosing anorexia nervosa. *Acta Psychiatr Scand*. 2003 Sep;108(3):175-82.
9. Treasure JL, Wheeler M, King EA, Gordon PA, Russell GF. Weight gain and reproductive function: ultrasonographic and endocrine features in anorexia nervosa. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1988 Dec;29(6):607-16.
10. Marshall JC, Fraser TR. Amenorrhoea in anorexia nervosa: assessment and treatment with clomiphene citrate. *Br Med J*. 1971 Dec 4;4(5787):590-2.
11. Warren MP, Vande Wiele RL. Clinical and metabolic features of anorexia nervosa. *Am J Obstet Gynecol*. 1973 Oct 1;117(3):435-49.
12. Ohzeki T, Egi S, Kagawa J, Nagafuchi S, Igarashi Y, Hanaki K, et al. Prolonged suppression of gonadotropin secretion after weight recovery in an anorectic patient with Turner's syndrome: reduced gonadal function in anorexia nervosa is independent in part on nutrition. *Horm Metab Res*. 1989 Nov;21(11):626-9.
13. Hoek HW, van Hoeken D. Review of the prevalence and incidence of eating disorders. *Int J Eat Disord*. 2003 Dec;34(4):383-96.
14. Hay P, Bacaltchuk J, Claudino A, Ben-Tovim D, Yong PY. Individual psychotherapy in the outpatient treatment of adults with anorexia nervosa. *Cochrane Database Syst Rev*. 2003(4):CD003909.
15. Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and other eating disorders. *Curr Opin Psychiatry*. 2006 Jul;19(4):389-94.
16. Joergensen J. The epidemiology of eating disorders in Fyn County, Denmark, 1977-1986. *Acta Psychiatr Scand*. 1992 Jan;85(1):30-4.

17. Nielsen S. The epidemiology of anorexia nervosa in Denmark from 1973 to 1987: a nationwide register study of psychiatric admission. *Acta Psychiatr Scand.* 1990 Jun;81(6):507-14.
18. Welkenhuysen M, Van Kuyck K, Das J, Sciot R, Nuttin B. Electrical stimulation in the lateral hypothalamus in rats in the activity-based anorexia model. *Neurosurg Focus.* 2008;25(1):E7.
19. Moller-Madsen SM, Nystrup J. [Increased incidence of anorexia nervosa in Denmark]. *Ugeskr Laeger.* 1994 May 30;156(22):3291-3.
20. Eagles JM, Johnston MI, Hunter D, Lobban M, Millar HR. Increasing incidence of anorexia nervosa in the female population of northeast Scotland. *Am J Psychiatry.* 1995 Sep;152(9):1266-71.
21. Jones DJ, Fox MM, Babigian HM, Hutton HE. Epidemiology of anorexia nervosa in Monroe County, New York: 1960-1976. *Psychosom Med.* 1980 Nov;42(6):551-8.
22. Lucas AR, Beard CM, O'Fallon WM, Kurland LT. Anorexia nervosa in Rochester, Minnesota: a 45-year study. *Mayo Clin Proc.* 1988 May;63(5):433-42.
23. Szmukler GI. The epidemiology of anorexia nervosa and bulimia. *J Psychiatr Res.* 1985;19(2-3):143-53.
24. Milos G, Spindler A, Schnyder U, Martz J, Hoek HW, Willi J. Incidence of severe anorexia nervosa in Switzerland: 40 years of development. *Int J Eat Disord.* 2004 Jul;36(1):118-9.
25. Willi J, Grossmann S. Epidemiology of anorexia nervosa in a defined region of Switzerland. *Am J Psychiatry.* 1983 May;140(5):564-7.
26. Lucas AR, Beard CM, O'Fallon WM, Kurland LT. 50-year trends in the incidence of anorexia nervosa in Rochester, Minn.: a population-based study. *Am J Psychiatry.* 1991 Jul;148(7):917-22.
27. Pawluck DE, Gorey KM. Secular trends in the incidence of anorexia nervosa: integrative review of population-based studies. *Int J Eat Disord.* 1998 May;23(4):347-52.
28. Fombonne E. Anorexia nervosa. No evidence of an increase. *Br J Psychiatry.* 1995 Apr;166(4):462-71.
29. Hall A, Hay PJ. Eating disorder patient referrals from a population region 1977-1986. *Psychol Med.* 1991 Aug;21(3):697-701.
30. Hoek HW, Bartelds AI, Bosveld JJ, van der Graaf Y, Limpens VE, Maiwald M, et al. Impact of urbanization on detection rates of eating disorders. *Am J Psychiatry.* 1995 Sep;152(9):1272-8.
31. Papadopoulos FC, Ekblom A, Brandt L, Ekselius L. Excess mortality, causes of death and prognostic factors in anorexia nervosa. *Br J Psychiatry.* 2009 Jan;194(1):10-7.
32. Steinhausen HC. The outcome of anorexia nervosa in the 20th century. *Am J Psychiatry.* 2002 Aug;159(8):1284-93.
33. Eckert ED, Halmi KA, Marchi P, Grove W, Crosby R. Ten-year follow-up of anorexia nervosa: clinical course and outcome. *Psychol Med.* 1995 Jan;25(1):143-56.
34. Neumarker KJ. Mortality and sudden death in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 1997 Apr;21(3):205-12.
35. Deter HC, Herzog W. Anorexia nervosa in a long-term perspective: results of the Heidelberg-Mannheim Study. *Psychosom Med.* 1994 Jan-Feb;56(1):20-7.

36. Sullivan PF. Mortality in anorexia nervosa. *Am J Psychiatry*. 1995 Jul;152(7):1073-4.
37. Bulik CM, Reba L, Siega-Riz AM, Reichborn-Kjennerud T. Anorexia nervosa: definition, epidemiology, and cycle of risk. *Int J Eat Disord*. 2005;37 Suppl:S2-9; discussion S20-1.
38. Signorini A, De Filippo E, Panico S, De Caprio C, Pasanisi F, Contaldo F. Long-term mortality in anorexia nervosa: a report after an 8-year follow-up and a review of the most recent literature. *Eur J Clin Nutr*. 2007 Jan;61(1):119-22.
39. Hebebrand J, Himmelman GW, Herzog W, Herpertz-Dahlmann BM, Steinhausen HC, Amstein M, et al. Prediction of low body weight at long-term follow-up in acute anorexia nervosa by low body weight at referral. *Am J Psychiatry*. 1997 Apr;154(4):566-9.
40. Strober M, Freeman R, Morrell W. The long-term course of severe anorexia nervosa in adolescents: survival analysis of recovery, relapse, and outcome predictors over 10-15 years in a prospective study. *Int J Eat Disord*. 1997 Dec;22(4):339-60.
41. Keel PK, Dorer DJ, Eddy KT, Franko D, Charatan DL, Herzog DB. Predictors of mortality in eating disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Feb;60(2):179-83.
42. Bulik CM, Sullivan PF, Fear JL, Pickering A, Dawn A, McCullin M. Fertility and reproduction in women with anorexia nervosa: a controlled study. *J Clin Psychiatry*. 1999 Feb;60(2):130-5; quiz 5-7.
43. Rigotti NA, Neer RM, Skates SJ, Herzog DB, Nussbaum SR. The clinical course of osteoporosis in anorexia nervosa. A longitudinal study of cortical bone mass. *Jama*. 1991 Mar 6;265(9):1133-8.
44. Szmukler GI, Brown SW, Parsons V, Darby A. Premature loss of bone in chronic anorexia nervosa. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1985 Jan 5;290(6461):26-7.
45. Sullivan PF, Bulik CM, Fear JL, Pickering A. Outcome of anorexia nervosa: a case-control study. *Am J Psychiatry*. 1998 Jul;155(7):939-46.
46. Connan F, Campbell IC, Katzman M, Lightman SL, Treasure J. A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol Behav*. 2003 Jun;79(1):13-24.
47. Walters EE, Kendler KS. Anorexia nervosa and anorexic-like syndromes in a population-based female twin sample. *Am J Psychiatry*. 1995 Jan;152(1):64-71.
48. Lilenfeld LR, Kaye WH, Greeno CG, Merikangas KR, Plotnicov K, Pollice C, et al. A controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 Jul;55(7):603-10.
49. Strober M, Freeman R, Lampert C, Diamond J, Kaye W. Controlled family study of anorexia nervosa and bulimia nervosa: evidence of shared liability and transmission of partial syndromes. *Am J Psychiatry*. 2000 Mar;157(3):393-401.
50. Devlin B, Bacanu SA, Klump KL, Bulik CM, Fichter MM, Halmi KA, et al. Linkage analysis of anorexia nervosa incorporating behavioral covariates. *Hum Mol Genet*. 2002 Mar 15;11(6):689-96.
51. Grice DE, Halmi KA, Fichter MM, Strober M, Woodside DB, Treasure JT, et al. Evidence for a susceptibility gene for anorexia nervosa on chromosome 1. *Am J Hum Genet*. 2002 Mar;70(3):787-92.



52. Klump KL, Kaye WH, Strober M. The evolving genetic foundations of eating disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 2001 Jun;24(2):215-25.
53. Klump KL, Wonderlich S, Lehoux P, Lilienfeld LR, Bulik CM. Does environment matter? A review of nonshared environment and eating disorders. *Int J Eat Disord.* 2002 Mar;31(2):118-35.
54. Bulik CM, Sullivan PF, Wade TD, Kendler KS. Twin studies of eating disorders: a review. *Int J Eat Disord.* 2000 Jan;27(1):1-20.
55. Hebebrand J, Remschmidt H. Anorexia nervosa viewed as an extreme weight condition: genetic implications. *Hum Genet.* 1995 Jan;95(1):1-11.
56. Gorwood P, Kipman A, Foulon C. The human genetics of anorexia nervosa. *Eur J Pharmacol.* 2003 Nov 7;480(1-3):163-70.
57. Hu X, Giotakis O, Li T, Karwautz A, Treasure J, Collier DA. Association of the 5-HT2c gene with susceptibility and minimum body mass index in anorexia nervosa. *Neuroreport.* 2003 May 6;14(6):781-3.
58. Bergen AW, van den Bree MB, Yeager M, Welch R, Ganjei JK, Haque K, et al. Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33-36 linkage region: serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2003 Apr;8(4):397-406.
59. Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF. Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2002;7(1):86-9.
60. Vink T, Hinney A, van Elburg AA, van Goozen SH, Sandkuijl LA, Sinke RJ, et al. Association between an agouti-related protein gene polymorphism and anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2001 May;6(3):325-8.
61. Urwin RE, Bennetts B, Wilcken B, Lampropoulos B, Beumont P, Clarke S, et al. Anorexia nervosa (restrictive subtype) is associated with a polymorphism in the novel norepinephrine transporter gene promoter polymorphic region. *Mol Psychiatry.* 2002;7(6):652-7.
62. Casper RC. The 'drive for activity' and "restlessness" in anorexia nervosa: potential pathways. *J Affect Disord.* 2006 May;92(1):99-107.
63. Davis C, Claridge G, Cerullo D. Personality factors and weight preoccupation: a continuum approach to the association between eating disorders and personality disorders. *J Psychiatr Res.* 1997 Jul-Aug;31(4):467-80.
64. Casper RC. Behavioral activation and lack of concern, core symptoms of anorexia nervosa? *Int J Eat Disord.* 1998 Dec;24(4):381-93.
65. Connan F, Troop N, Landau S, Campbell IC, Treasure J. Poor social comparison and the tendency to submissive behavior in anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 2007 Dec;40(8):733-9.
66. Cnattingius S, Hultman CM, Dahl M, Sparen P. Very preterm birth, birth trauma, and the risk of anorexia nervosa among girls. *Arch Gen Psychiatry.* 1999 Jul;56(7):634-8.
67. Shoebridge P, Gowers SG. Parental high concern and adolescent-onset anorexia nervosa. A case-control study to investigate direction of causality. *Br J Psychiatry.* 2000 Feb;176:132-7.
68. Crisp AH. Reported birth weights and growth rates in a group of patients with primary anorexia nervosa (weight phobia). *J Psychosom Res.* 1970 Mar;14(1):23-50.

69. Davis C. Eating disorders and hyperactivity: a psychobiological perspective. *Can J Psychiatry*. 1997 Mar;42(2):168-75.
70. Hebebrand J, Exner C, Hebebrand K, Holtkamp C, Casper RC, Remschmidt H, et al. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiol Behav*. 2003 Jun;79(1):25-37.
71. Epling W, Pierce W. Activity-based anorexia: A biobehavioral perspective *International Journal of Eating Disorders*. 1988;7(4):475-85.
72. Abrao Saad W, Antonio De Arruda Camargo L, Sergio Cerri P, Simoes S, Abrao Saad W, Garcia G, et al. Influence of arginine vasopressin receptors and angiotensin receptor subtypes on the water intake and arterial blood pressure induced by vasopressin injected into the lateral septal area of the rat. *Auton Neurosci*. 2004 Mar 31;111(1):66-70.
73. Laessle RG, Fischer M, Fichter MM, Pirke KM, Krieg JC. Cortisol levels and vigilance in eating disorder patients. *Psychoneuroendocrinology*. 1992 Oct;17(5):475-84.
74. Katz JL. Long-distance running, anorexia nervosa, and bulimia: a report of two cases. *Compr Psychiatry*. 1986 Jan-Feb;27(1):74-8.
75. Yates A, Leehey K, Shisslak CM. Running--an analogue of anorexia? *N Engl J Med*. 1983 Feb 3;308(5):251-5.
76. Smith NJ. Excessive weight loss and food aversion in athletes simulating anorexia nervosa. *Pediatrics*. 1980 Jul;66(1):139-42.
77. Davis C, Kennedy SH, Ravelski E, Dionne M. The role of physical activity in the development and maintenance of eating disorders. *Psychol Med*. 1994 Nov;24(4):957-67.
78. Brewerton TD, Stelfox EJ, Hibbs N, Hodges EL, Cochrane CE. Comparison of eating disorder patients with and without compulsive exercising. *Int J Eat Disord*. 1995 May;17(4):413-6.
79. Miaskiewicz S, Levey GS, Owen O. Severe metabolic ketoacidosis induced by starvation and exercise. *Am J Med Sci*. 1989 Mar;297(3):178-80.
80. Katzman DK, Christensen B, Young AR, Zipursky RB. Starving the brain: structural abnormalities and cognitive impairment in adolescents with anorexia nervosa. *Semin Clin Neuropsychiatry*. 2001 Apr;6(2):146-52.
81. Kaye WH. Anorexia nervosa, obsessional behavior, and serotonin. *Psychopharmacol Bull*. 1997;33(3):335-44.
82. Lambe EK, Katzman DK, Mikulis DJ, Kennedy SH, Zipursky RB. Cerebral gray matter volume deficits after weight recovery from anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Jun;54(6):537-42.
83. Giordano GD, Renzetti P, Parodi RC, Foppiani L, Zandrino F, Giordano G, et al. Volume measurement with magnetic resonance imaging of hippocampus-amygdala formation in patients with anorexia nervosa. *J Endocrinol Invest*. 2001 Jul-Aug;24(7):510-4.
84. Chui HT, Christensen BK, Zipursky RB, Richards BA, Hanratty MK, Kabani NJ, et al. Cognitive function and brain structure in females with a history of adolescent-onset anorexia nervosa. *Pediatrics*. 2008 Aug;122(2):e426-37.

85. Nico D, Daprat E, Nighoghossian N, Carrier E, Duhamel JR, Sirigu A. The role of the right parietal lobe in anorexia nervosa. *Psychol Med*. 2009 Nov 17:1-9.
86. Stoving RK, Bennedbaek FN, Hegedus L, Hagen C. Evidence of diffuse atrophy of the thyroid gland in patients with anorexia nervosa. *Int J Eat Disord*. 2001 Mar;29(2):230-5.
87. Allende LM, Corell A, Manzanares J, Madruga D, Marcos A, Madrono A, et al. Immunodeficiency associated with anorexia nervosa is secondary and improves after refeeding. *Immunology*. 1998 Aug;94(4):543-51.
88. Morse AD, Russell JC, Hunt TW, Wood GO, Epling WF, Pierce WD. Diurnal variation of intensive running in food-deprived rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1995 Oct;73(10):1519-23.
89. Castro-Fornieles J, Bargallo N, Lazaro L, Andres S, Falcon C, Plana MT, et al. Adolescent anorexia nervosa: cross-sectional and follow-up frontal gray matter disturbances detected with proton magnetic resonance spectroscopy. *J Psychiatr Res*. 2007 Dec;41(11):952-8.
90. Stoving RK, Hangaard J, Hansen-Nord M, Hagen C. A review of endocrine changes in anorexia nervosa. *J Psychiatr Res*. 1999 Mar-Apr;33(2):139-52.
91. Stewart DE, Raskin J, Garfinkel PE, MacDonald OL, Robinson GE. Anorexia nervosa, bulimia, and pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1987 Nov;157(5):1194-8.
92. Treasure JL, Russell GF. Intrauterine growth and neonatal weight gain in babies of women with anorexia nervosa. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988 Apr 9;296(6628):1038.
93. Brinch M, Isager T, Tolstrup K. Anorexia nervosa and motherhood: reproduction pattern and mothering behavior of 50 women. *Acta Psychiatr Scand*. 1988 May;77(5):611-7.
94. Conti J, Abraham S, Taylor A. Eating behavior and pregnancy outcome. *J Psychosom Res*. 1998 Mar-Apr;44(3-4):465-77.
95. Herrmann TS, Siega-Riz AM, Hobel CJ, Aurora C, Dunkel-Schetter C. Prolonged periods without food intake during pregnancy increase risk for elevated maternal corticotropin-releasing hormone concentrations. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Aug;185(2):403-12.
96. Vestergaard P, Emborg C, Stoving RK, Hagen C, Mosekilde L, Brixen K. Fractures in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa, and other eating disorders--a nationwide register study. *Int J Eat Disord*. 2002 Nov;32(3):301-8.
97. Kaye WH, Bulik CM, Thornton L, Barbarich N, Masters K. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. *Am J Psychiatry*. 2004 Dec;161(12):2215-21.
98. Halmi KA, Eckert E, Marchi P, Sampugnaro V, Apple R, Cohen J. Comorbidity of psychiatric diagnoses in anorexia nervosa. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Aug;48(8):712-8.
99. Bulik CM, Klump KL, Thornton L, Kaplan AS, Devlin B, Fichter MM, et al. Alcohol use disorder comorbidity in eating disorders: a multicenter study. *J Clin Psychiatry*. 2004 Jul;65(7):1000-6.
100. Grant JE, Kim SW, Eckert ED. Body dysmorphic disorder in patients with anorexia nervosa: prevalence, clinical features, and delusional quality of body image. *Int J Eat Disord*. 2002 Nov;32(3):291-300.
101. Nielsen S, Emborg C, Molbak AG. Mortality in concurrent type 1 diabetes and anorexia nervosa. *Diabetes Care*. 2002 Feb;25(2):309-12.

102. Burden VR, White BD, Dean RG, Martin RJ. Activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is elevated in rats with activity-based anorexia. *J Nutr.* 1993 Jul;123(7):1217-25.
103. Sodersten P, Bergh C, Zandian M. Psychoneuroendocrinology of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology.* 2006 Nov;31(10):1149-53.
104. Kaye WH. Neuropeptide abnormalities in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 1996 Apr 16;62(1):65-74.
105. Exner C, Hebebrand J, Renschmidt H, Wewetzer C, Ziegler A, Herpertz S, et al. Leptin suppresses semi-starvation induced hyperactivity in rats: implications for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2000 Sep;5(5):476-81.
106. Aravich PF, Rieg TS, Lauterio TJ, Doerries LE. Beta-endorphin and dynorphin abnormalities in rats subjected to exercise and restricted feeding: relationship to anorexia nervosa? *Brain Res.* 1993 Sep 17;622(1-2):1-8.
107. Frank GK, Kaye WH, Meltzer CC, Price JC, Greer P, McConaha C, et al. Reduced 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding after recovery from anorexia nervosa. *Biol Psychiatry.* 2002 Nov 1;52(9):896-906.
108. Pike KM. Long-term course of anorexia nervosa: response, relapse, remission, and recovery. *Clin Psychol Rev.* 1998 Jun;18(4):447-75.
109. Luyten L, Welkenhuysen M, van Kuyck K, Fieuws S, Das J, Sciote R, et al. The effects of electrical stimulation or an electrolytic lesion in the mediodorsal thalamus of the rat on survival, body weight, food intake and running activity in the activity-based anorexia model. *Brain Res Bull.* 2009 Apr 29;79(2):116-22.
110. Mehanna H, Nankivell PC, Moledina J, Travis J. Refeeding syndrome - awareness, prevention and management. *Head Neck Oncol.* 2009;1(1):4.
111. Nillius SJ, Fries H, Wide L. Successful induction of follicular maturation and ovulation by prolonged treatment with LH-releasing hormone in women with anorexia nervosa. *Am J Obstet Gynecol.* 1975 Aug 15;122(8):921-8.
112. Boakes RA, Dwyer DM. Weight loss in rats produced by running: effects of prior experience and individual housing. *Q J Exp Psychol B.* 1997 May;50(2):129-48.
113. Boakes RA, Mills KJ, Single JP. Sex differences in the relationship between activity and weight loss in the rat. *Behav Neurosci.* 1999 Oct;113(5):1080-9.
114. Brown AJ, Avena NM, Hoebel BG. A high-fat diet prevents and reverses the development of activity-based anorexia in rats. *Int J Eat Disord.* 2008 Jul;41(5):383-9.
115. Dwyer DM, Boakes RA. Activity-based anorexia in rats as failure to adapt to a feeding schedule. *Behav Neurosci.* 1997 Feb;111(1):195-205.
116. Kanarek RB, Collier GH. Self-starvation: a problem of overriding the satiety signal? *Physiol Behav.* 1983 Feb;30(2):307-11.
117. Koh MT, Lett BT, Grant VL. Activity in the circular alley does not produce the activity anorexia syndrome in rats. *Appetite.* 2000 Apr;34(2):153-9.
118. Lambert KG. The activity-stress paradigm: possible mechanisms and applications. *J Gen Psychol.* 1993 Jan;120(1):21-32.

119. Bakshi VP, Newman SM, Smith-Roe S, Jochman KA, Kalin NH. Stimulation of lateral septum CRF2 receptors promotes anorexia and stress-like behaviors: functional homology to CRF1 receptors in basolateral amygdala. *J Neurosci*. 2007 Sep 26;27(39):10568-77.
120. Perez-Padilla A, Magalhaes P, Pellon R. The effects of food presentation at regular or irregular times on the development of activity-based anorexia in rats. *Behav Processes*. Feb 20.
121. Lambert KG, Peacock LJ. Feeding regime affects activity-stress ulcer production. *Physiol Behav*. 1989 Oct;46(4):743-6.
122. Boakes RA, Juraskova I. The role of drinking in the suppression of food intake by recent activity. *Behav Neurosci*. 2001 Jun;115(3):718-30.
123. Watanabe K, Hara C, Ogawa N. Feeding conditions and estrous cycle of female rats under the activity-stress procedure from aspects of anorexia nervosa. *Physiol Behav*. 1992 Apr;51(4):827-32.
124. Scarlett D, Dypvik AT, Bland BH. Comparison of spontaneous and septally driven hippocampal theta field and theta-related cellular activity. *Hippocampus*. 2004;14(1):99-106.
125. Hampstead BM, LaBounty LP, Hurd C. Multiple exposure to activity anorexia in rats: effects on eating, weight loss, and wheel running. *Behav Processes*. 2003 Mar 31;61(3):159-66.
126. Dixon DP, Ackert AM, Eckel LA. Development of, and recovery from, activity-based anorexia in female rats. *Physiol Behav*. 2003 Nov;80(2-3):273-9.
127. Brobeck JR. Food intake as a mechanism of temperature regulation. *Yale J Biol Med*. 1948 Jul;20(6):545-52.
128. Pirke KM, Broocks A, Wilckens T, Marquard R, Schweiger U. Starvation-induced hyperactivity in the rat: the role of endocrine and neurotransmitter changes. *Neurosci Biobehav Rev*. 1993 Fall;17(3):287-94.
129. Mustafa A, Ward A, Treasure J, Peakman M. T lymphocyte subpopulations in anorexia nervosa and refeeding. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997 Mar;82(3):282-9.
130. Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1986;10(6):677-90.
131. Altemus M, Glowa JR, Murphy DL. Attenuation of food-restriction-induced running by chronic fluoxetine treatment. *Psychopharmacol Bull*. 1993;29(3):397-400.
132. Benabid AL, Wallace B, Mitrofanis J, Xia C, Piallat B, Fraix V, et al. Therapeutic electrical stimulation of the central nervous system. *C R Biol*. 2005 Feb;328(2):177-86.
133. Perlmutter JS, Mink JW. Deep brain stimulation. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:229-57.
134. Hardesty DE, Sackeim HA. Deep brain stimulation in movement and psychiatric disorders. *Biol Psychiatry*. 2007 Apr 1;61(7):831-5.
135. Nuttin BJ, Gabriels LA, Cosyns PR, Meyerson BA, Andreewitch S, Sunaert SG, et al. Long-term electrical capsular stimulation in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neurosurgery*. 2003 Jun;52(6):1263-72; discussion 72-4.
136. Tehovnik EJ. Electrical stimulation of neural tissue to evoke behavioral responses. *J Neurosci Methods*. 1996 Mar;65(1):1-17.

137. Cheung KC. Implantable microscale neural interfaces. *Biomed Microdevices*. 2007 Dec;9(6):923-38.
138. Jayakar P. Physiological principles of electrical stimulation. *Adv Neurol*. 1993;63:17-27.
139. Kringsbach ML, Jenkinson N, Owen SL, Aziz TZ. Translational principles of deep brain stimulation. *Nat Rev Neurosci*. 2007 Aug;8(8):623-35.
140. Ranck JB, Jr. Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res*. 1975 Nov 21;98(3):417-40.
141. Kuncel AM, Grill WM. Selection of stimulus parameters for deep brain stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2004 Nov;115(11):2431-41.
142. Polikov VS, Tresco PA, Reichert WM. Response of brain tissue to chronically implanted neural electrodes. *J Neurosci Methods*. 2005 Oct 15;148(1):1-18.
143. Naessens E. Het effect van elektrolytische letsels in het posterieur deel van de septale nucleus op voedselinname, activiteit en lichaamsgewicht in een diermodel voor anorexia nervosa. Leuven: Katholieke Universiteit Leuven; 2009.
144. Durand DM, Jensen A, Bikson M. Suppression of neural activity with high frequency stimulation. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;1:1624-5.
145. Bootin ML. Deep brain stimulation: overview and update. *J Clin Monit Comput*. 2006 Oct;20(5):341-6.
146. Fried PA. Septum and behavior: a review. *Psychol Bull*. 1972 Oct;78(4):292-310.
147. Swanson LW. The anatomical organization of septo-hippocampal projections. *Ciba Found Symp*. 1977(58):25-48.
148. Powell E. septal efferents revealed by axonal degeneration in the rat. *experimental neurology*. 1963;8:406-22.
149. Miller JJ, Mogenson GJ. Effect of septal stimulation on lateral hypothalamic unit activity in the rat. *Brain Res*. 1971 Sep 10;32(1):125-42.
150. Swanson LW, Cowan WM. The connections of the septal region in the rat. *J Comp Neurol*. 1979 Aug 15;186(4):621-55.
151. Raisman G. The connexions of the septum. *Brain*. 1966 Jun;89(2):317-48.
152. Risold PY, Swanson LW. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997 Sep 19;24(2-3):91-113.
153. Akopyan NS, Adamyan NY, Sarkisyan NV, Arutyunyan RS. Responses of respiratory neurons in the medulla oblongata to stimulation of the septal nuclei during hypoxia. *Neurosci Behav Physiol*. 2004 Jan;34(1):105-8.
154. Garris DR. Direct septo-hypothalamic projections in the rat. *Neurosci Lett*. 1979 Jun;13(1):83-90.
155. Gaykema RP, van der Kuil J, Hersh LB, Luiten PG. Patterns of direct projections from the hippocampus to the medial septum-diagonal band complex: anterograde tracing with Phaseolus

- vulgaris leucoagglutinin combined with immunohistochemistry of choline acetyltransferase. *Neuroscience*. 1991;43(2-3):349-60.
156. Meibach RC, Siegel A. Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res*. 1977 Jan 1;119(1):1-20.
157. Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Brain Res Rev*. 1997 Sep 19;24(2-3):115-95.
158. Teruel-Marti V, Cervera-Ferri A, Nunez A, Valverde-Navarro AA, Olucha-Bordonau FE, Ruiz-Torner A. Anatomical evidence for a ponto-septal pathway via the nucleus incertus in the rat. *Brain Res*. 2008 Jul 7;1218:87-96.
159. Waselus M, Galvez JP, Valentino RJ, Van Bockstaele EJ. Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J Chem Neuroanat*. 2006 Jun;31(4):233-42.
160. Staines WA, Yamamoto T, Dewar KM, Daddona PE, Geiger JD, Nagy JI. Distribution, morphology and habenular projections of adenosine deaminase-containing neurons in the septal area of rat. *Brain Res*. 1988 Jul 5;455(1):72-87.
161. Sperlagh B, Magloczky Z, Vizi ES, Freund TF. The triangular septal nucleus as the major source of ATP release in the rat habenula: a combined neurochemical and morphological study. *Neuroscience*. 1998 Oct;86(4):1195-207.
162. Borhegyi Z, Freund TF. Dual projection from the medial septum to the supramammillary nucleus in the rat. *Brain Res Bull*. 1998 Jul 15;46(5):453-9.
163. Borhegyi Z, Magloczky Z, Acsady L, Freund TF. The supramammillary nucleus innervates cholinergic and GABAergic neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *Neuroscience*. 1998 Feb;82(4):1053-65.
164. Kiss J, Csaki A, Bokor H, Shanabrough M, Leranath C. The supramammillo-hippocampal and supramammillo-septal glutamatergic/aspartatergic projections in the rat: a combined [<sup>3</sup>H]D-aspartate autoradiographic and immunohistochemical study. *Neuroscience*. 2000;97(4):657-69.
165. Saper CB. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Magnocellular basal nucleus. *J Comp Neurol*. 1984 Jan 20;222(3):313-42.
166. Covian MR, Lico MC, Rodrigues JA. Blood pressure and respiratory changes by stimulation of brain septal area in rats. *Acta Physiol Lat Am*. 1966;16(2):99-105.
167. Olds J, Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*. 1954 Dec;47(6):419-27.
168. Loewy AD. Forebrain nuclei involved in autonomic control. *Prog Brain Res*. 1991;87:253-68.
169. Miller JJ, Mogenson GJ. Modulatory influences of the septum on lateral hypothalamic self stimulation. *Exp Neurol*. 1971 Dec;33(3):671-83.
170. Varoquaux F, Poulain P. Projections of the mediolateral part of the lateral septum to the hypothalamus, revealed by Fos expression and axonal tracing in rats. *Anat Embryol (Berl)*. 1999 Mar;199(3):249-63.
171. Gray JA. Effects of septal driving of the hippocampal theta rhythm on resistance to extinction. *Physiol Behav*. 1972 Mar;8(3):481-90.

172. Bland BH, Bird J, Jackson J, Natsume K. Medial septal modulation of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways in the freely moving rat. *Hippocampus*. 2006;16(1):11-9.
173. Jackson J, Bland BH. Medial septal modulation of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways in the anesthetized rat. *Hippocampus*. 2006;16(1):1-10.
174. Saphier D, Feldman S. Effects of septal and hippocampal stimuli on paraventricular nucleus neurons. *Neuroscience*. 1987 Mar;20(3):749-55.
175. Wishart TB, Mogenson GJ. Reduction of water intake by electrical stimulation of the septal region of the rat brain. *Physiol Behav*. 1970 Dec;5(12):1399-404.
176. Sibole W, Miller JJ, Mogenson GJ. Effects of septal stimulation on drinking elicited by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Exp Neurol*. 1971 Sep;32(3):466-77.
177. Altman JL, Wishart TB. Motivated feeding behavior elicited by electrical stimulation of the septum. *Physiol Behav*. 1971 Feb;6(2):105-9.
178. Oliveira LA, Gentil CG, Covian MR. Role of the septal area in feeding behavior elicited by electrical stimulation of the lateral hypothalamus of the rat. *Braz J Med Biol Res*. 1990;23(1):49-58.
179. Yadin E, Thomas E. Stimulation of the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. *Physiol Behav*. 1996 Apr-May;59(4-5):883-6.
180. Yadin E, Thomas E, Grishkat HL, Strickland CE. The role of the lateral septum in anxiolysis. *Physiol Behav*. 1993 Jun;53(6):1077-83.
181. Muneyuki I. Hippocampal electrical correlates of self-stimulation in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1966 Sep;21(3):261-8.
182. Asdourian D. Interaction effects of intracranial stimulation with rewarding and aversive solutions. *J Comp Physiol Psychol*. 1962 Oct;55:685-90.
183. Gardner L, Malmo RB. Effects of low-level septal stimulation on escape: significance for limbic-midbrain interactions in pain. *J Comp Physiol Psychol*. 1969 May;68(1):65-73.
184. Grauer E, Thomas E. Conditioned suppression of medial forebrain bundle and septal intracranial self-stimulation in the rat: evidence for a fear-relief mechanism of the septum. *J Comp Physiol Psychol*. 1982 Feb;96(1):61-70.
185. Malmo RB. Slowing of heart rate after septal self-stimulation in rats. *Science*. 1961 Apr 14;133:1128-30.
186. Routtenberg A, Olds J. Stimulation of dorsal midbrain during septal and hypothalamic self-stimulation. *J Comp Physiol Psychol*. 1966 Oct;62(2):250-5.
187. Brady JV, Conrad DG. Some effects of limbic system selfstimulation upon conditioned emotional behavior. *J Comp Physiol Psychol*. 1960 Apr;53:128-37.
188. Falk JL. Septal stimulation as a reinforcer of and an alternative to consumatory behavior. *J Exp Anal Behav*. 1961 Jul;4:213-7.
189. Boyd ES, Celso MB. Effect of some brain lesions on septal intracranial self-stimulation in the rat. *Am J Physiol*. 1970 Sep;219(3):734-41.



190. Pliskoff SS, Wright JE, Hawkins TD. Brain Stimulation as a Reinforcer: Intermittent Schedules. *J Exp Anal Behav.* 1965 Mar;8:75-88.
191. Keesey RE, Goldstein MD. Use of progressive fixed-ratio procedures in the assessment of intracranial reinforcement. *J Exp Anal Behav.* 1968 May;11(3):293-301.
192. Malmo RB. Heart Rate Reactions and Locus of Stimulation within the Septal Area of the Rat. *Science.* 1964 May 22;144:1029-30.
193. Mabry P, Peeler D. Response rate for food and water in the rat as a function of noncontingent reinforcing septal stimulation *psychon sci.* 1968;13(1):51-2.
194. Wishart TB, Bland BH, Vanderwolf CH, Altman JL. Electroencephalographic correlates of behaviors elicited by electrical stimulation of the septum: seizure induced feeding. *Behav Biol.* 1973 Dec;9(6):763-9.
195. Vasudev R, Gentil CG, Covian MR. Taste preferences in a free-choice situation following electrical stimulation and lesion of septal area in rats. *Physiol Behav.* 1985 Apr;34(4):619-24.
196. Kasper P. Attenuation of passive avoidance by continuous septal stimulation *Psychon sci.* 1964;1:219-20.
197. Breglio V, Anderson DC, Merrill HK. Alteration in footshock threshold by low-level septal brain stimulation. *Physiol Behav.* 1970 Jul;5(7):715-9.
198. Ball GG, Gray JA. Septal self-stimulation and hippocampal activity. *Physiol Behav.* 1971 May;6(5):547-9.
199. Kramis RC, Routtenberg A. Dissociation of hippocampal EEG from its behavioral correlates by septal and hippocampal electrical stimulation. *Brain Res.* 1977 Apr 8;125(1):37-49.
200. Wilcott RC. A further analysis of the response suppression during stimulation of the septal area in the rat. *Physiol Behav.* 1988;42(2):167-72.
201. Paulin RF, Menani JV, Colombari E, De Paula PM, Colombari DS. Role of the medial septal area on pilocarpine-induced salivary secretion and water intake. *Brain Res.* 2009 Nov 17;1298:145-52.
202. Barbosa SP, de Gobbi JI, Zilioli L, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, et al. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. *Brain Res Bull.* 1995;37(5):463-6.
203. Maria Pavan de Arruda Camargo G, Antonio de Arruda Camargo L, Saad WA. Vasopressin and angiotensin receptors of the medial septal area of the brain in the control of thirst and salt appetite induced by vasopressin in water-deprived and sodium-depleted rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Oct;87(4):393-9.
204. de Arruda Camargo LA, Saad WA, Cerri PS. Effects of V1 and angiotensin receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the water intake induced by vasopressin injected into the lateral septal area. *Brain Res Bull.* 2003 Sep 30;61(5):481-7.
205. Camargo LA, Saad WA. Role of the alpha(1)- and alpha(2)-adrenoceptors of the paraventricular nucleus on the water and salt intake, renal excretion, and arterial pressure induced by angiotensin II injection into the medial septal area. *Brain Res Bull.* 2001 Apr;54(6):595-602.

206. Camargo LA, Saad WA, Simoes S, Santos TA, Saad WA. Interaction between paraventricular nucleus and septal area in the control of physiological responses induced by angiotensin II. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Sep;35(9):1017-23.
207. Freiria-Oliveira AH, Blanch GT, Camargo LA, Menani JV, Saad WA. Involvement of the intermediate nucleus of the lateral septal area on angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses. *Regul Pept.* 2009 Oct 9;157(1-3):14-8.
208. Thomas L. Retrospective power analysis. *Conservation Biology.* 1997;11(1):276-80.
209. Verhoeven KJF. Implementing false discovery rate control: increasing your power *oikos.* 2005;108:643-7.
210. Coyle JT. Kainic acid: insights into excitatory mechanisms causing selective neuronal degeneration. *Ciba Found Symp.* 1987;126:186-203.

# 8 Bijlagen

---

## 8.1 Literatuuroverzicht: stimulatieparameters bij septale stimulatie

---

auteur (jaar)	context	frequentie	pulsbreedte	stroomsterkte
Olds (1954)	beloning			
Brady (1960)	angst	100 Hz	0,2 ms	25 mA
Malmö (1961)	hartritme	100 Hz	0,5 ms	
Kasper (1964)	angst	100 Hz	0,5 ms	20 µA-350 µA
Covian (1965)	bloeddruk	50 Hz	10 ms	0,2 mA
Muneyuki (1966)	hippocampus	100 Hz	0,1 ms	
Routtenberg (1966)	SZS	60 Hz		30 µA
Mabry (1968)	waterinname	60 Hz	0,5 ms	50 µA
Keeseey (1968)	methodologie	100 Hz	0,2 ms	0,2-2,5 mA
Gardner (1969)	pijn	100 Hz	5 ms	35-300 mA/ 0,75-2 mA
Breglio (1970)	pijn	60 Hz	1 s	0-0,3 mA (low)
Wishart (1970)	waterinname	50 Hz	0,1 ms	
Boyd (1970)	SZS	60 Hz	0,4 s	15-150 µA
Altman (1971)	voedselinname	20 Hz	0,6 ms	
Gray (1971)	hippocampus	6-10 Hz/75-200Hz	0,5 ms	
Miller (1971)a	hypothalamus	1-20 Hz	0,5 ms	0,1-0,4 mA
Miller (1971)b	hypothalamus	50 Hz	0,5 ms	50-100 µA
Sibole (1971)	waterinname		0,1-0,5 ms	100-150 µA
Gray (1972)	hippocampus	7,7 Hz	0,5 ms	0-600 µA
Wishart (1973)	voedselinname	5-100 Hz/5-20 Hz	0,1 ms	
Kramis (1977)	hippocampus	5-20 Hz	1 ms	
Gordon (1981)	waterinname	60 Hz	500 ms	30-90 µA
Grauer (1982)	beloning	100 Hz	0,2 ms	0,5-0,7 mA
Saphier (1987)	paraventriculaire nucleus	0,2-0,5 Hz	1 ms	1 mA
Wilcott (1988)	onderdrukking gedrag	10 Hz	2 ms	0,03-0,15 mA
Yadin (1993)	angst	100 Hz	0,1 ms	25-100 µA
Yadin (1996)	angst	100 HZ	0,1 ms	50 µA
Bland (2006)	hippocampus	7/10 Hz		
Jackson (2006)	hippocampus	5/10 Hz	0,1 ms	300-600 µA

# 8.2 Elektrodetipfiguren

