

Einfluss von pränatalem Stress auf die fetale  
Gehirnentwicklung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Markus Hermes

geboren am 18.06.1990 in Bumbuli

Gutachter (akademischer Grad, Vor- und Nachname sowie Wirkungsort)

1. apl. Prof. Dr. Matthias Schwab, Jena

2. apl. Prof. Dr. Reinhard Bauer, Jena

3. PD Dr. Thorsten Braun, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2021

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>1 Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>2 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	3
<b>3 Zusammenfassung</b> .....	4
<b>4 Einleitung</b> .....	6
4.1 Pränatal erhöhte Glucocorticoid-Spiegel und neuropsychiatrische Auffälligkeiten im späteren Leben .....	6
4.1.1. Mütterlicher psychosozialer Stress.....	6
4.1.2 Therapeutisch verabreichte Glucocorticoide .....	7
4.2 Stressübertragung von der Mutter auf den Fetus .....	7
4.3 Mechanismen der fetalen Programmierung neuropsychiatrischer Auffälligkeiten.....	8
4.3.1 Programmierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse.....	8
4.3.2 Beeinflussung der funktionellen und strukturellen Entwicklung des Gehirns	9
<b>5 Ziele der Arbeit</b> .....	11
<b>6 Publierte Originalarbeit</b> .....	14
Maternal psychosocial stress during early gestation impairs fetal structural brain development in sheep, Hermes, M., Antonow-Schlorke, I., Hollstein, D., Kuehnel, S., Rakers, F., Frauendorf, V., M. Dreilling, Rupprecht, S., Schubert, H., Witte, O. W. and Schwab, M., Stress, 23:2, 233-242, 2020, doi: 10.1080/10253890.2019.1652266	
<b>7 Diskussion</b> .....	25
7.1 Diskussion der Methodik .....	25
7.1.1 Das chronisch instrumentierte Schaf .....	25
7.1.2 Das Stressmodell .....	25
7.1.3 Die untersuchten Gehirnregionen.....	26
7.1.4 Die Marker der strukturellen Gehirnentwicklung .....	26
7.2 Diskussion der Ergebnisse .....	27
7.2.1 Ausbildung des neuronalen Netzwerkes .....	27
7.2.2 Synaptische Dichte .....	28
7.2.3 Myelinisierung und Zellproliferation .....	28
7.2.4 Programmierter Zelltod .....	29
7.2.5 Vulnerable Zeitfenster für und langfristige Auswirkungen von Stress während der Schwangerschaft.....	30
7.2.6 Limitationen .....	31

<b>8 Schlussfolgerungen</b> .....	32
<b>9 Literatur und Quellenverzeichnis</b> .....	34
<b>10 Anhang</b> .....	40

## 2 Abkürzungsverzeichnis

GC	Glucocorticoide
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
MPS	Mütterlicher psychosozialer Stress
TUNEL-Methode	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung
11 $\beta$ -HSD 2	11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 2
ACTH	Adrenocorticotropin
MRT	Magnetresonanztomographie
MBP	Basisches Myelinprotein

### **3 Zusammenfassung**

Viele Frauen sind während der Schwangerschaft psychosozialen Stress ausgesetzt. Aus Studien der letzten Jahre ist bekannt, dass dies für den Fetus neben unmittelbaren Folgen wie Frühgeburt oder intrauteriner Wachstumsbeschränkung auch das Risiko für kognitive Einschränkungen oder neuropsychiatrische Auffälligkeiten im späteren Leben erhöht. Bei der Übertragung von mütterlichem Stress auf den Fetus spielen erhöhte Cortisolspiegel eine große Rolle. Die erhöhten Cortisolspiegel führen zu einer über eine epigenetische Veränderung am Glucocorticoid (GC)-Rezeptor zu einer Desensitivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse). Die daraus folgenden zeitlebens erhöhten Cortisolspiegel können die spätere Entwicklung von neuropsychiatrischen Auffälligkeiten beeinflussen. Zum anderen führen erhöhte Cortisolspiegel möglicherweise aufgrund ihrer Reifung stimulierenden und Zellteilung hemmenden Wirkung zu einer Störung der strukturellen Gehirnentwicklung. Die Effekte auf die strukturelle Gehirnentwicklung sind jedoch aktuell nicht gut verstanden.

Ziel der Arbeit war es deshalb, die Auswirkung von mütterlichem psychosozialen Stress (MPS) auf die strukturelle fetale Hirnentwicklung am fetalen Schaf zu untersuchen, einem Tiermodell, das sehr gut mit der menschlichen Fetalperiode vergleichbar ist.

Hierzu wurden trächtige Schafe entweder im ersten und zweiten Trimester (n=10; 30.-100. Gestationstag, Gestationsdauer 150 Tage) oder im dritten Trimester (n=10; 100.-120. Gestationstag) durch spezies-spezifischen Stress (Isolation von der Herde) zweimal wöchentlich gestresst. Daneben diente eine ungestresste Gruppe als Kontrolle (n=8).

Nach 130 Tagen Gestationsdauer wurden die Gehirne der Feten im cerebralen Cortex, der darunter liegenden weißen Substanz und im Hippocampus histologisch auf Marker der strukturellen Gehirnentwicklung untersucht. Als Marker diente die Silberimprägnation zur Darstellung des neuronalen Netzwerkes, die immunhistochemische Markierung von Synaptophysin zur Darstellung der synaptischen Dichte, die Markierung des basischen Myelinproteins zur Darstellung der Myelinisierung, die Markierung des Proteins Ki-67 zur Darstellung der Zellproliferation und die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) zur Darstellung von programmiertem Zelltod.

MPS im ersten und zweiten Trimester reduzierte die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und die synaptische Dichte im cerebralen Cortex und im Hippocampus. Die parallele Abnahme der synaptischen Dichte und der neuronalen Fortsätze im Cortex und Hippocampus deutet darauf hin, dass die Abnahme der synaptischen Dichte ein Epiphänomen der

reduzierten Bildung neuronaler Fortsätze sein könnte. Darüber hinaus reduzierte mütterlicher psychosozialer Stress im ersten und zweiten Trimester die Myelinisierung und Zellproliferation in der weißen Substanz. Dieser Effekt könnte durch eine verminderte Proliferation der Oligodendroglia als Myelinproduzierende Zellen vermittelt worden sein. Wir fanden keinen Einfluss von MPS auf den programmierten Zelltod. Keine dieser Effekte trat nach Stress im dritten Trimester auf.

Somit konnten wir feststellen, dass die frühere Schwangerschaft vulnerabler für Stresseffekte auf die strukturelle Gehirnentwicklung ist als die späte Schwangerschaft. Die Veränderungen in der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und der Myelinisierung auch 30 Tage nach der letzten Stress-Exposition deuten auf dauerhafte strukturelle Effekte von mütterlichem psychosozialen Stress im fetalen Gehirn hin.

Eine vertiefende Untersuchung der Effekte von MPS auf die strukturelle Hirnreifung inklusive der Untersuchung vulnerabler Zeitfenster, des Nachweises der Effekte und deren funktionelle Relevanz im späteren Lebensalter sowie der Möglichkeiten einer frühen Intervention ist notwendig. Solange die funktionellen Auswirkungen der Störung der strukturellen Hirnentwicklung nicht endgültig geklärt sind, muss man MPS als prädisponierenden Risikofaktor für spätere kognitive und neuropsychiatrische Auffälligkeiten betrachten.

## **4 Einleitung**

### **4.1 Pränatal erhöhte Glucocorticoid-Spiegel und neuropsychiatrische Auffälligkeiten im späteren Leben**

Eine gesunde Schwangerschaft ist von unschätzbarem Wert für die Gesundheit der Nachkommen im späteren Leben. Seit dem Ende der 1980er Jahre wird dem Einfluss von pränatalen Umweltfaktoren auf die Gesundheit im Erwachsenenalter zunehmende Bedeutung beigemessen. Die so genannte „fetal origins hypothesis“ ist auf Untersuchungen des britischen Epidemiologen David Barker zurückzuführen, der einen Zusammenhang zwischen niedrigem Geburtsgewicht und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen fand (Barker 1998). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Exposition gegenüber Risikofaktoren in utero wie Stress nicht nur die Entwicklung des Fetus stören, sondern auch das Risiko erhöhen können, später im Leben verschiedene gesundheitliche Probleme zu entwickeln (Charil et al. 2010, Van den Bergh et al. 2017). Eine evolutionsbiologische Erklärung für diese Veränderungen könnte die intrauterine Anpassung an ungünstige bevorstehende Umweltbedingungen sein, wie z.B. eine stressreiche Umgebung (Schwab 2009).

#### **4.1.1 Mütterlicher psychosozialer Stress**

MPS ist eine der häufigsten Ursachen für erhöhte fetale Stresshormonspiegel. Zwischen 30 und 41% der schwangeren Frauen sind während der Schwangerschaft psychosozialen Stress ausgesetzt (WHO 2008, Fontein-Kuipers et al. 2014, Van den Bergh et al. 2017). MPS kann zu Frühgeburten, intrauteriner Wachstumseinschränkung und reduziertem fetalen Kopfumfang beim Menschen und bei Tieren führen (Scheinost et al. 2017). Beim Menschen stört MPS die motorische und kognitive Entwicklung und erhöht das Risiko für kognitive, verhaltensbedingte und emotionale Probleme wie Autismus, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS), Depression und Schizophrenie im späteren Leben (Charil et al. 2010, Raikkonen et al. 2011, Van den Bergh et al. 2017). Ebenso ist MPS mit Verhaltensstörungen oder motorischen Defiziten bei den Nachkommen von Nagetieren (Patin et al. 2004, Weinstock 2008), Schafen (Coulon et al. 2015) und nicht-menschlichen Primaten (Schneider et al. 2002) verbunden.



#### **4.1.2 Therapeutisch verabreichte Glucocorticoide**

Neben MPS spielt auch die therapeutische Verabreichung synthetischer GC wie Betamethason bei drohender Frühgeburt zur Lungenreifeinduktion eine große Rolle. Weltweit sind ca. 11 % der Schwangeren von einer drohenden Frühgeburt bedroht (Blencowe et al. 2012), wobei die Rate an Komplikationen für das Baby höher ist, wenn diese früher in der Schwangerschaft auftritt (Dubin 1990, Robertson et al. 1992). Um das Risiko für Folgeschäden, insbesondere für ein Atemnotsyndrom des Neugeborenen zu verringern, erfolgt heutzutage routinemäßig die Gabe von 2 x 8-12 mg Betamethason im Abstand von 24 h zur Induktion der Lungenreife bei drohender Frühgeburt (Pattanittum et al. 2008, Mahony et al. 2010). Die Induktion der Lungenreife wurde durch Liggins und Howie (1972) am Schafmodell entdeckt und konnte erfolgreich auf den Menschen übertragen werden, wodurch die Mortalität nach Frühgeburt signifikant gesenkt wurde (De Kloet et al. 1988, Ballard und Ballard 1995, Crowley 1995). Mehrere Studien zeigten, dass die therapeutische Induktion der pränatalen Lungenreife mit synthetischen GC ähnlich wie MPS, insbesondere bei wiederholter Verabreichung, zu emotionalen und neuroentwicklungsbedingten Störungen, Dysregulation von Stressreaktionen und kognitiven Störungen im Kindesalter führen kann (Charil et al. 2010, Schwab et al. 2010).

Die pränatale GC-Gabe wird für epidemiologische und experimentelle Studien gerne als Modell für MPS genommen, da es sich um eine pharmakologische Intervention handelt, die sich besser als MPS definieren lässt. Stress ist subjektiv und hängt beim Menschen stark vom sozialen Umfeld und Ressourcen zur Bewältigung ab. Jedoch kann man die Effekte von synthetischen GC nicht mit MPS gleichsetzen, da synthetische GC nur GC-Rezeptoren aktivieren und somit ein anderes Wirkungsprofil haben als Cortisol, welches GR und MR aktiviert (Yang et al. 1990). Dabei bindet Cortisol in physiologischen Konzentrationen überwiegend an Mineralocorticoid-Rezeptoren, welche besonders im Hippocampus exprimiert werden (Reul und de Kloet 1985) und primär neuroprotektive Effekte vermitteln (Ter Heegde et al. 2015). Bei erhöhten Cortisolspiegeln werden darüber hinaus GC-Rezeptoren besetzt, welche ubiquitär im Gehirn vorliegen und vorwiegend neurotoxische Effekte auslösen (Hassan et al. 1996).

#### **4.2 Stressübertragung von der Mutter auf den Fetus**

Der Mechanismus der Stressübertragung von der Mutter auf den Fötus ist komplex (Rakers et al. 2017). Im Allgemeinen ist der Fötus vor Stressbelastungen geschützt. Im Uterus beschränkt das Enzym 11 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD 2) die plazentare

Übertragung des mütterlichen Stresshormons Cortisol auf den fetalen Kreislauf (Benediktsson et al. 1997). Normalerweise werden 80 - 90 % des mütterlichen Cortisols in die inaktive Form Cortison umgewandelt. Allerdings wird die Enzymaktivität unter Stressbedingungen herunter reguliert (Jensen Pena et al. 2012, O'Donnell et al. 2012, Chapman et al. 2013, Monk et al. 2016). Therapeutisch angewendete synthetische GC hingegen werden durch die 11 $\beta$ -HSD 2 nicht inaktiviert und können somit ungehindert in den fetalen Kreislauf gelangen.

Bis vor wenigen Jahren war es ein Dogma, dass mütterlicher Stress nur über Kortisol auf den Fetus übertragen wird, da die Plazenta für Katecholamine nicht passierbar ist. Neuere Studien zeigen jedoch indirekte Effekte von Katecholaminen, da diese zu einer über ihre vasokonstriktorische Wirkung zu einer Minderperfusion der Plazenta führen (Rakers et al. 2017). Diese Minderperfusion bedeutet für den Fetus Stress, was durch eine fetale Katecholaminausschüttung nachweisbar ist (Rakers et al. 2015). Weiterhin kommt es zu einer konsekutiven Verschiebung des fetalen Stoffwechsels in Richtung eines anaeroben Zustandes (Rakers et al. 2015). Da die Gehirnreifung sehr viel Energie benötigt (Gibbons 1998), ist es wahrscheinlich, dass ein stressbedingter, längerer anaerober Stoffwechsel die Entwicklung des fetalen Gehirns beeinflusst. Darüber hinaus könnte die durch eine anaerobe Stoffwechsellage vermittelte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen im fetalen Kreislauf auch eine Rolle bei den programmierenden Auswirkungen von mütterlichem Stress spielen (Rakers et al. 2017).

### **4.3 Mechanismen der fetalen Programmierung neuropsychiatrischer Auffälligkeiten**

Die erhöhten Risiken für kognitive und neuropsychiatrische Auffälligkeiten können sowohl das Resultat der Programmierung der HHN-Achse als auch von Reifungseffekten auf die strukturelle Gehirnentwicklung sein.

#### **4.3.1 Programmierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse**

Die HHN-Achse stellt das neuroendokrine System dar, welches letztendlich über die Ausschüttung von Cortisol in den Nebennieren die Stressantwort vermittelt und durch einen negativen Feedback-Mechanismus gesteuert wird (Herman et al. 2003). Trotzdem ist der Fetus im Verlauf der Schwangerschaft wesentlich vom Cortisol der Mutter abhängig. Erst gegen Ende der Schwangerschaft erfolgt die Cortisolsynthese in den Nebennieren des Fetus und initiiert die Kaskade der Geburtseinleitung (Magyar et al. 1980).

Selbst bei kurzfristig supraphysiologisch erhöhten fetalen GC-Spiegeln, wie sie bei der therapeutischen Lungenreifeinduktion mit synthetischen GC oder durch MPS entstehen,

erfolgt eine dauerhafte Sollwertverstellung des negativen Feedback-Mechanismus der HHN-Achse durch eine Desensitivierung von GC-Rezeptoren im Hypothalamus und Hippocampus, die zu einer persistierenden Hyperaktivität der HHN-Achse führt (Schwab et al. 2012, Rakers et al. 2017). Diese Desensitivierung der GC-Rezeptoren beruht auf der epigenetischen Methylierung der Promotoren des GC-Rezeptor-Gens *NR3C1* (Cao et al. 2014). Dies führt im späteren Leben zu einer verminderten Selbstlimitierung der Adrenocorticotropin (ACTH)- und Cortisol-Ausschüttung im Rahmen einer Stressexposition (Glover et al. 2010, Rakers et al. 2012, Moisiadis und Matthews 2014a, Moisiadis und Matthews 2014b). Diese gesteigerte Stressantwort stört die Homöostase der Neurotransmittersysteme wie dem serotonergen oder cholinergen System im Gehirn. Eine solche Überaktivität der Stressachse mit veränderter Aktivität des serotonergen und cholinergen Systems ist auch bei psychiatrischen Erkrankungen, insbesondere bei Depressionen und Schizophrenien, zu beobachten (Esch et al. 2002, Nestler et al. 2002).

#### **4.3.2 Beeinflussung der funktionellen und strukturellen Entwicklung des Gehirns**

Die Hirnentwicklung ist eine komplexe Abfolge der Entwicklung verschiedener Strukturen und funktioneller Systeme (Stiles und Jernigan 2010). Beim Menschen liegt der Beginn der Hirnentwicklung in der dritten Schwangerschaftswoche. In der Embryonalperiode kommt es dann zuerst zur Neurogenese in der (Sub)ventrikularzone, um die notwendige Anzahl an neuronalen Vorläuferzellen bereit zu stellen. Von der Subventrikularzone aus migrieren die Zellen in die jeweiligen Zielstrukturen. Aus den Vorläuferzellen differenzieren sich dort die verschiedenen Typen von Neuronen und beginnen, durch Axone und Dendriten das neuronale Netzwerk auszubilden. Ein Teil der Verknüpfung der Neuronen ist die Bildung von Synapsen (Stiles und Jernigan 2010). Im letzten Trimester beginnen Oligodendrozyten von den Basalganglien aus, die Myelinscheiden der Axone zu formen (Jakovcevski et al. 2009). Neben der Zellproliferation laufen parallel apoptotische Prozesse ab. Zum einen werden nur transient notwendige Zellpopulationen und überschüssige Zellen durch proliferativen Zelltod abgebaut, zum anderen werden Neurone durch regulatorischen Zelltod entfernt, welche keine suffizienten Verknüpfungen zu anderen Neuronen bilden können (Stiles und Jernigan 2010). Diese Prozesse laufen in verschiedenen Hirnregionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, bzw. in unterschiedlicher Geschwindigkeit ab (Stiles und Jernigan 2010).

Dass GC-Rezeptoren schon früh in der Schwangerschaft nachweisbar sind (Andrews und Matthews 2000), der Fetus aber erst gegen Ende der Schwangerschaft in der Lage ist, selbst Cortisol zu produzieren, unterstreicht die Bedeutung von mütterlichem Cortisol für die

Entwicklung des Fetus. Die Exposition des Fetus gegenüber MPS oder therapeutischen erhöhten GC-Spiegeln scheint auch direkte Effekte auf die Hirnentwicklung zu haben. Es gibt allerdings bisher nur wenige Studien zum Einfluss von pränatalem Stress auf die strukturelle Gehirnentwicklung. So konnte in Studien an Ratten und Mäusen gezeigt werden, dass MPS die Neurogenese, Neuritenbildung, synaptische Dichte sowie die Myelinisierung des Hippocampus und des frontalen Cortex bei Nachkommen reduziert (Charil et al. 2010, Boersma et al. 2014, Braun et al. 2017). Humane MRT (Magnetresonanztomographie)-Studien bei Neugeborenen, Jugendlichen und Erwachsenen zeigten strukturelle Störungen der Gehirnentwicklung aufgrund von MPS oder Angstzuständen während der Schwangerschaft (Buss et al. 2010, Qiu et al. 2013, Dufoix et al. 2015, Favaro et al. 2015). Auf mechanistischer Ebene sind GC ein starker Reifungsstimulus und notwendig für Neurogenese, Synaptogenese sowie für die Ausbildung der Axone und Dendriten (Liston und Gan 2011, Moisiadis und Matthews 2014b). Die Stimulation der Reifung geht jedoch auf Kosten der Proliferation (Carson et al. 2016). Dem zugrunde liegend konnte eine Veränderung der Expression von Genen gezeigt werden, welche die synaptische Übertragung, Morphologie der Dendriten und Expression der GC-Rezeptoren steuern, insbesondere im Hippocampus und im präfrontalen Cortex (Coulon et al. 2013, Petit et al. 2015, Carson et al. 2016). Ebenso wurde eine Störung der regionalen Expressionsmuster von Rezeptoren der Neurotransmitter wie Dopamin oder Noradrenalin gefunden (Braun et al. 2017). Insgesamt sind die Effekte von MPS auf die Hirnentwicklung noch wesentlich schlechter untersucht als die Effekte auf die Reifung der HHN-Achse. Deshalb sind Studien erforderlich, um detaillierte Mechanismen und vulnerable Zeitperioden zu erklären, da spezifische Hirnstrukturen höchstwahrscheinlich abhängig vom Zeitpunkt ihrer Reifung für Stresseffekte unterschiedlich vulnerabel sind.

## 5 Ziele der Arbeit

Es ist notwendig, die Effekte von MPS auf die fetale Hirnentwicklung besser zu verstehen, um primär präventive Maßnahmen und mögliche therapeutische Interventionen zu entwickeln. Abgesehen von den Mechanismen sind selbst die Effekte von pränatalem Stress auf die fetale Hirnentwicklung im Wesentlichen nur bei nicht gyrierten Nagergehirnen untersucht und bei gyrierten Gehirnen, wie denen des Menschen, weitgehend unklar. Bisherige experimentelle Studien an Nagern und die wenigen Studien an Spezies mit gyrierten Gehirnen wie dem Schaf untersuchten meistens einen bestimmten Aspekt der strukturellen Gehirnentwicklung wie die Myelinisierung oder Neurogenese (Charil et al. 2010, Boersma et al. 2014, Braun et al. 2017). Umfassende Untersuchungen, welche die Komplexität der strukturellen Gehirnentwicklung berücksichtigen, gibt es bisher nicht.

Neben dem Wissen um Stresseffekte fehlt auch eine genaue Kenntnis vulnerabler Zeiträume. Besonders vulnerabel sind wahrscheinlich Hirnstrukturen, die sich während der Exposition gegenüber MPS oder der therapeutischen Applikation von GC gerade in Entwicklung befinden. Dadurch kommt es zu Imbalancen bei der Entwicklung verschiedener Hirnstrukturen und Funktionssysteme. Untersuchungen am Menschen zeigen, dass die frühe Schwangerschaft tendenziell empfindlicher für die Induktion von Verhaltens- und neuropsychiatrischen Auffälligkeiten durch MPS zu sein scheint als die späte Schwangerschaft (Van den Bergh et al. 2017), wobei unklar ist, ob hierbei die Programmierung der HHN-Achse oder Aberrationen in der strukturellen Hirnentwicklung eine Rolle spielen. Die meisten Studien an Versuchstieren, welche die Auswirkungen von MPS auf die fetale Gehirnentwicklung untersuchten, verwendeten Ratten oder Mäuse mit ihren nicht gyrierten Gehirnen und untersuchten nicht den Einfluss von MPS während verschiedener Phasen der fetalen Hirnentwicklung. Zudem sind Nagetiere im Vergleich zum Menschen postnatale Gehirnentwickler, was die Übertragung der Ergebnisse erschwert, insbesondere in Bezug auf vulnerable Perioden der fetalen Gehirnentwicklung für MPS (Dobbing und Sands 1979, Darlington et al. 1999).

**Ziel der Arbeit** war daher, die Auswirkungen von MPS auf die Entwicklung des gyrierten Gehirns an fetalen Schafen untersucht, einem Tiermodell, das in mehrfacher Hinsicht eng mit der menschlichen Physiologie vergleichbar ist (Morrison et al. 2018). Schafe sind eine präkoziale Spezies mit einer pränatalen Gehirnentwicklung ähnlich dem Menschen (Dobbing

und Sands 1979). Sie haben wie der Mensch eine lange Gestationsdauer (150 Tage) im Vergleich zu 20-24 Tagen bei Ratten und Mäusen und bringen im Gegensatz zu den großen Wurfgrößen bei Nagetieren ähnlich dem Menschen nur ein oder zwei Nachkommen zur Welt. Um vulnerable Zeitfenster zunächst grob zu klassifizieren, sollten Effekte von MPS während der frühen und späten Schwangerschaft untersucht werden.

Wir überprüfen in unserer Arbeit folgende **Hypothesen**:

1. MPS stört die strukturelle Reifung des fetalen Gehirns durch eine Störung der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes, der Synapsenbildung, der Myelinisierung und der Zellproliferation. Bei Ratten und Mäusen konnten bereits Effekte von MPS auf diese Marker nachgewiesen werden (Charil et al. 2010, Boersma et al. 2014, Braun et al. 2017).
2. Die Effekte sind abhängig von der untersuchten Hirnstruktur.
3. MPS im ersten und zweiten Trimester hat einen stärkeren Effekt auf die strukturelle Gehirnentwicklung als MPS im dritten Trimester, da primär in der frühen Schwangerschaft die Prozesse der neuronalen Migration, Netzwerkbildung und Myelinisierung ablaufen (Rakic 1988). Damit übereinstimmend haben Studien beim Menschen gezeigt, dass MPS in einem früheren Gestationsalter ausgeprägte Auswirkungen auf die kognitive und neuropsychiatrische Gesundheit im späteren Leben hat (Charil et al. 2010, Van den Bergh et al. 2017).

Um diese Hypothesen zu testen, wurden die Gehirne von fetalen Schafen nach 130 Tagen Gestationsdauer (Gestationsdauer 150 Tage) im cerebralen Cortex, der darunter liegenden weißen Substanz und im Hippocampus histologisch auf Marker der strukturellen Gehirnentwicklung untersucht. Die ausgewählten Regionen in dieser Studie sind wesentliche Schlüsselstrukturen, da sie reich an GC- sowie Mineralocorticoid-Rezeptoren sind und an der Stressverarbeitung beteiligt sind (Moisiadis und Matthews 2014b, Van den Bergh et al. 2017). Dazu wurden die Muttertiere zuvor entweder im ersten und zweiten Trimester (n=10) oder im dritten Trimester (n=10) durch spezie-spezifischen Stress (Isolation von der Herde) gestresst. Daneben diente eine ungestresste Gruppe als Kontrolle (n=8).

Um die Zellproliferation zu untersuchen, wurde das Protein Ki-67 mittels Immunhistochemie markiert, ein Protein, welches nur während der Mitosephase einer Zelle exprimiert wird und somit die Zahl sich teilender Zellen reflektiert (Scholzen und Gerdes 2000). Um die Apoptoserate darzustellen, wurde die TUNEL-Methode verwendet, welche DNA-

Doppelstrangbrüche markiert, wie sie während des programmierten Zelltodes typisch sind, (Negoescu et al. 1996). Zur Darstellung der Ausbildung und Dichte des neuronalen Netzwerkes erfolgte die Golgi-Färbung (Silberimprägnation), welche neuronale Zellkörper und Fortsätze markiert (Sevier und Munger 1965). Als Maß für die synaptische Dichte wurde die Immunmarkierung von Synaptophysin durchgeführt, welches in über 90 % der präsynaptischen Endigungen der Neurone vorkommt (Navone et al. 1986). Um die Myelinisierung darzustellen, erfolgte die Immunmarkierung des Basischem Myelinproteins (MBP), welches Bestandteil der reifen Oligodendrozyten und der Myelinscheiden der Neurone ist (Jakovcevski et al. 2009).


## **6 Publierte Originalarbeit**

**Maternal psychosocial stress during early gestation impairs fetal structural brain development in sheep, Hermes, M., Antonow-Schlorke, I., Hollstein, D., Kuehnel, S., Rakers, F., Frauendorf, V., Dreiling, M., Rupprecht, S., Schubert, H., Witte, O. W. and Schwab, M., Stress, 23:2, 233-242, 2020, doi: 10.1080/10253890.2019.1652266**





## Maternal psychosocial stress during early gestation impairs fetal structural brain development in sheep

Markus Hermes<sup>a\*</sup> , Iwa Antonow-Schlorke<sup>a\*</sup>, Dorothea Hollstein<sup>a</sup>, Sarah Kuehnel<sup>a</sup>, Florian Rakers<sup>a</sup>, Vilmar Frauendorf<sup>a</sup>, Michelle Dreiling<sup>a</sup>, Sven Rupprecht<sup>a,b</sup>, Harald Schubert<sup>c</sup>, Otto W. Witte<sup>a</sup> and Matthias Schwab<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Hans Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, Jena, Germany; <sup>b</sup>Else Kröner-Forschungskolleg AntiAge, Bad Homburg, Germany; <sup>c</sup>Institute of Lab Animal Sciences and Welfare, Jena University Hospital, Jena, Germany

### ABSTRACT

Maternal stress, especially during early pregnancy, predisposes offspring to neuropsychiatric disorders. We hypothesized that maternal psychosocial stress (MPS) during pregnancy affects fetal structural neurodevelopment depending on the gestational age of exposure. Fetal sheep brains were harvested at 130 days gestation (dG, term 150 dG) from ewes frequently isolated from flock-mates during early gestation (first and second trimester;  $n = 10$ ) or late gestation (third trimester;  $n = 10$ ), or from control flock-mates ( $n = 8$ ). Immunohistochemistry for formation of neuronal processes, myelination, synaptic density, cell proliferation and programmed cell death was performed on brain tissue sections. Sections of the cortical gray matter, the hippocampal CA3 region and the superficial, subcortical and deep white matter were examined morphometrically. Stress effects depended on the brain region and time of exposure. Stress during early gestation but not during late gestation reduced the amount of neuronal processes in the cerebral cortex and hippocampus by  $36.9 \pm 10.1\%$  ( $p < 0.05$ , mean  $\pm$  SEM) and  $36.9 \pm 15.8\%$  ( $p < 0.05$ ), respectively, accompanied by a decrease in synaptic density in the cerebral cortex and hippocampus by  $39.8 \pm 23.1\%$  ( $p < 0.05$ ) and  $32.9 \pm 13.4\%$  ( $p < 0.01$ ). Myelination was decreased in white matter layers on average by  $44.8 \pm 11.7\%$  ( $p < 0.05$ ) accompanied by reduced (glial) cell proliferation in the deep white matter by  $83.6 \pm 12.4\%$  ( $p < 0.05$ ). In contrast, stress during the third trimester had no effect in any brain region. Chronic MPS during the first and second trimester induced prolonged effects on neuronal network and myelin formation which might contribute to disturbed neurobehavioral, cognitive and motor development in offspring of stressed mothers.

### LAY SUMMARY

- Many women are exposed to stressful events during pregnancy. Maternal stress especially during early pregnancy predisposes for offspring's neuropsychiatric disorders. In our sheep study, we show that disturbance of fetal brain development is a potential mechanism and is worst during 1st and 2nd trimester.

### ARTICLE HISTORY

Received 30 January 2019  
Accepted 31 July 2019

### KEYWORDS



Cerebral cortex; fetal programming; hippocampus; myelination; prenatal stress; sheep

## Introduction

Fetal exposure to environmental factors *in utero* such as increased stress hormones may not only disturb fetal development but also increase the risk for acquiring health problems later in life (Charil et al., 2010; Van den Bergh et al., 2017). Maternal psychosocial stress (MPS) is one of the most common causes of increased fetal stress hormone levels. Between 30% and 41% of pregnant women experience psychosocial stress during pregnancy (Fontein-Kuipers et al., 2014; Van den Bergh et al., 2017; WHO, 2008).

Previous studies have shown that chronic MPS is detrimental to fetal brain development (Charil et al., 2010; Van den Bergh et al., 2017). In humans, MPS disturbs motor development (Grace, Bulsara, Robinson, & Hands, 2016) and increases the risk for cognitive, behavioral, and emotional

problems such as autism, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), depression and schizophrenia in later life (Charil et al., 2010; Raikkonen, Seckl, Pesonen, Simons, & Van den Bergh, 2011; Van den Bergh et al., 2017). Similarly, MPS is associated with behavioral disorders or motor deficits in the offspring of rodents (Patin, Vincent, Lordi, & Caston, 2004; Weinstock, 2008), sheep (Coulon et al., 2015) and non-human primates (Schneider, Moore, Kraemer, Roberts, & DeJesus, 2002). These effects may be the result of both programming of functional systems like the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and maturational effects on structural brain development. In addition, recent studies have proposed the significance of microglial programming and neuroinflammation as a result of MPS (Desplats, Gutierrez, Antonelli, & Frasch, 2019).

**CONTACT** Matthias Schwab  [matthias.schwab@med.uni-jena.de](mailto:matthias.schwab@med.uni-jena.de)  Hans Berger Department of Neurology, Jena University Hospital, Am Klinikum 1, Jena D-07747, Germany

\*These authors contributed equally to this study.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

While much data exist on the glucocorticoid (GC)-induced programming of the activity of the HPA axis by epigenetic mechanisms (Glover, O'Connor, & O'Donnell, 2010; Moisiadis & Matthews, 2014b), not much is known on the influence of MPS on structural brain development. Human MRI studies have shown abnormalities in offspring brain development in neonates, adolescents and adults due to MPS or increased anxiety during pregnancy (Buss, Davis, Muftuler, Head, & Sandman, 2010; Dufoix et al., 2015; Favaro, Tenconi, Degortes, Manara, & Santonastaso, 2015; Qiu et al., 2013). Studies in rodents have shown that MPS reduces neurogenesis, neurite formation, synaptic density, as well as myelination of the hippocampus and frontal cortex in the offspring (Boersma et al., 2014; Braun et al., 2017; Charil et al., 2010). However, little is known about stress sensitive periods of fetal brain development. Data on rodents are difficult to translate to humans, since rodents are postnatal brain developers compared to humans (Darlington, Dunlop, & Finlay, 1999; Dobbing & Sands, 1979).

We hypothesized that MPS during pregnancy affects fetal structural neurodevelopment in relation to the gestational age of exposure since previous studies have shown that effects of MPS on functional, behavioral and neuropsychiatric outcome are dependent on the gestational age of the fetus (Charil et al., 2010; Van den Bergh et al., 2017). We examined the effects of MPS on neurodevelopment in fetal sheep, an animal model that is closely comparable to human physiology in multiple aspects (Morrison et al., 2018). Sheep are prenatal brain developer similar to humans (Dobbing & Sands, 1979). Like humans, they have a prolonged gestational period of 150 days compared to 20–24 days in rodents. Unlike rodents, sheep give birth only to one or two offspring. The stress model we used involved repetitive isolation of pregnant ewes from the rest of the flock which is widely regarded as a model of human psychosocial stress (Rakers et al., 2013). We examined the effects of MPS on the formation of neuronal processes and synapses as well as on myelination, cell proliferation and cell death since these developmental processes are affected by GC (Antonow-Schlorke et al., 2009; Brodhun et al., 2004).

## Materials and methods

### Animals

All experiments were approved by the Animal Welfare Commission of the Thuringian government. Long-Wool Merino Sheep were crossbred on a single occasion. After verification of pregnancy using ultrasound at  $30 \pm 2$  days of gestation (dG, term 150 dG), ewes were randomly divided into three experimental groups that were exposed to stress either during the first and second trimester or during the third trimester of pregnancy or served as respective controls. Control and stressed ewes were held in different paddocks at the same facility. Ewes were fed 100% of appropriate nutritional requirements during pregnancy, and water was provided *ad libitum*. Temperature and the light-dark-rhythm resembled that of the natural environment. The study was conducted during springtime.

### Maternal stress protocol

We used isolation as a well-described animal model of MPS in sheep (for details see (Rakers et al., 2013)). Briefly, ewes were repeatedly separated in a well-lit box ( $3.0\text{ m} \times 3.0\text{ m} \times 1.4\text{ m}$ ) with no visual, tactile, or auditory contact with their flock-mates and no access to food or water twice per week for a duration of three hours between 30 and  $100 \pm 2$  dG (equals 0.2–0.67 gestation, stress during the first and second trimester,  $n = 10$ ) or between 100 and  $120 \pm 2$  dG (equals 0.67–0.8 gestation, stress during the third trimester,  $n = 10$ ). The animals could move freely in the confined space. Control ewes did not undergo isolation stress (controls,  $n = 8$ ). Repetitive isolation provokes a physiological and hormonal stress response with only minor habituation (Rakers et al., 2013).

### Fetal instrumentation and brain collection

After the end of the control or stress periods, ewes were transported to the surgical facility three days before chronic fetal instrumentation at  $104 \pm 1$  dG (controls, stress during the first and second trimester) or  $124 \pm 1$  dG (stress during the third trimester). Fetuses were chronically instrumented with catheters inserted into the carotid artery and the jugular vein and ECG electrodes to measure stress responsiveness of the HPA axis using a single hypotensive challenge (Rakers et al., 2013). Maternal and fetal arterial blood samples were taken before anesthesia to analyze blood gases using a blood gas analyzer (ABL600, Radiometer, Copenhagen, Denmark; measurements corrected to  $39^\circ\text{C}$ ). At 130 dG, ewes were anesthetized with 4% halothane and fetuses were delivered by Cesarean section. Fetuses were euthanized by rapid exsanguination while still under general anesthesia. Thereafter, ewes were euthanized by *i.v.* injection of a 16% solution of pentobarbital sodium (Fatal-Plus, Vortech Pharmaceuticals, Dearborn, MI, USA). Brains were harvested, and one hemisphere was cut in tissue blocks of 7 mm thickness that were immediately transferred into 4% neutrally buffered paraformaldehyde solution.

### Histological processing

After immersion fixation of 7 to 9 days, blocks were embedded in paraffin. Paraffin slices ( $6\ \mu\text{m}$ ) were cut according to a fetal sheep brain atlas (Johnson, Sudheimer, Davis, & Winn, 2016) at the level of the frontal cortex (sections 0481–0599) and at the level of the hippocampal formation (sections 1121–1241). For anatomical orientation, slices were treated with hematoxylin–eosin (HE). In order to evaluate myelin formation, myelin basic protein immunohistochemistry was performed using the ABC technique as described in detail earlier (Antonow-Schlorke et al., 2009). Briefly, after antigen-retrieval (microwave, 750 W, 10 min, 0.01 M citrate buffer), immunohistochemistry was performed on tissue slices with a monoclonal rat anti-MBP antibody (MAB386, 1:500, Chemicon, Temecola, CA, USA) using the avidin–biotin–peroxidase complex method (Vectastain Elite ABC staining kit, Vector Labs, Burlingame, USA). MBP is selectively expressed

by mature cells of the oligodendroglial lineage (Sternberger, Itoyama, Kies, & Webster, 1978). MBP IR marks oligodendrocyte somata and the myelin sheath that contains MBP as an integral and essential component of brain myelin (Sternberger et al., 1978). Adjacent tissue sections were used for silver staining (Sevier & Munger, 1965) to estimate neurite density, and to relate possible changes of myelination to neural process formation. In order to estimate the synaptic density of the cerebral cortex, slices were treated with anti-synaptophysin antibody (mouse anti-synaptophysin; S5768, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.; 1:800) using the ABC technique. The immunohistochemical distribution of synaptophysin shows 95% of all neocortical synapses as an integral Ca<sup>2+</sup>-binding membrane protein of their presynaptic vesicles (Navone et al., 1986). Cell proliferation was assessed using the ABC method for immunohistochemistry against ki67 (mouse anti-NCL-ki67-MM1; #600185, Novocastra, Newcastle, UK; 1:100), a marker protein in proliferative-active cells that was shown to be expressed during all phases of the cell cycle with exception of the resting phase (Scholzen & Gerdes, 2000). Developmental cell death was visualized by the TUNEL *in situ* method (TUNEL kit, Roche, Indianapolis, IN, U.S.A.).

### Histological examination

Histological examination was performed as described previously (Antonow-Schlorke et al., 2009; Colberg et al., 2004) using light microscopy within the frontal lobe – the cerebral cortex, superficial white matter, subcortical white matter, deep white matter – and the CA3 region of the hippocampal formation. Light-microscopic images (Axioplan2, Zeiss, Oberkochen, Germany; x 63) were digitized using a three CCD color video camera (Axiocam HR, Zeiss) under standardized conditions. All images were analyzed using an image analysis program (Image J 1.48v, NIH, USA). Scale was calibrated using a microscope stage micrometer. The number of ki67+ cells and TUNEL+ cells were counted manually in all regions within an area of 1.50 mm<sup>2</sup> in a standardized field. Microscopic pictures of MBP IR, SYN IR and silver staining were transformed into binary images. The area of marked structures was measured after applying Otsu's threshold clustering algorithm (Otsu, 1979) to select the region of interest. Otsu's algorithm was chosen because it performed best for our samples compared to other algorithms available in Image J. Large blood vessels were excluded manually to prevent false-positive measurement. The area of MBP IR and silver staining was quantified in all brain regions, whereas the area of SYN IR was only assessed in selected regions of gray matter, here the cerebral cortex and the CA3 region of the hippocampus.

### Statistics

Differences in the topographical distribution of silver staining, MBP IR, SYN IR and in the number of ki-67+ cells and TUNEL+ cells between brain regions within the control group and differences in the area of silver staining, MBP IR, SYN IR as well as in the number of ki-67+ cells and TUNEL+ cells

between the experimental groups were tested with Generalized Estimating Equations (GEE) (Hardin & Hilbe, 2014) and the Sidak test was used as *post hoc* test to correct for multiple testing. We used sheep as subject variables, the immunohistochemical method as dependent variable and both experimental group and brain region as factors. Differences in physiological parameters of maternal and fetal blood gas analysis between the experimental groups were tested using one-way ANOVA, and the Sidak test was used as *post hoc* test to correct for multiple testing. Significance was chosen at *p* level of <0.05. Results are presented as mean ± SEM.

## Results

### Blood gas analysis

There were no differences in the pH values and concentration of maternal or fetal arterial blood gases between the first and second trimester or third trimester stress groups and controls. All parameters were within the physiological range (Table 1).

### Formation of neuronal processes

Neurons and their processes were visualized in all cortical layers using silver staining. The topographical distribution of the area of silver staining in control fetuses increased in direction from the superficial to the deep white matter reflecting increasing density of axonal processes (*p* < 0.01, Table 2, Figure 1). The area of silver staining in the hippocampus was similar to that seen in superficial white matter (Table 2, Figure 1). MPS during the first and second trimester reduced the area of silver staining in the cerebral cortex by 36.9 ± 10.1% (*p* < 0.05) and in the hippocampus by 36.9 ± 15.8% (*p* < 0.05) but it did not change the area of silver staining in the superficial, subcortical and deep white matter (Table 2, Figures 1 and 2). In contrast to the effects of stress during the first and second trimester, stress during the third trimester did not change the area of silver staining in any brain region (Table 2, Figures 1 and 2).

### Synaptic density

Synaptophysin immunoreactivity (SYN IR) was widely distributed in the cerebral cortex and hippocampus. Here, SYN IR appeared as a granular pattern in cell bodies and in the neuropil. In controls, the area of SYN IR in the cerebral cortex

**Table 1.** Maternal and fetal blood gases before brain collection.

Group	pH	pCO <sub>2</sub> (mmHg)	pO <sub>2</sub> (mmHg)	O <sub>2</sub> sat. (%)
<i>Ewes</i>				
Controls	7.49 ± 0.02	33.17 ± 1.50	99.05 ± 8.17	99.53 ± 0.52
1st/2nd trimester stress	7.49 ± 0.02	32.37 ± 0.98	100.80 ± 9.26	99.86 ± 0.20
3rd trimester stress	7.49 ± 0.05	35.05 ± 3.45	98.05 ± 15.37	98.07 ± 1.77
<i>Fetuses</i>				
Controls	7.36 ± 0.02	41.77 ± 4.08	23.50 ± 1.97	76.55 ± 8.92
1st/2nd trimester stress	7.35 ± 0.03	42.36 ± 3.65	23.89 ± 2.62	77.50 ± 7.80
3rd trimester stress	7.36 ± 0.04	45.00 ± 6.53	22.57 ± 2.11	72.60 ± 8.33

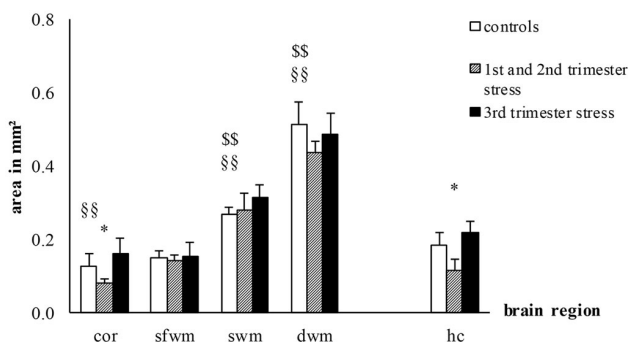
Controls: *n* = 8, 1st/2nd trimester stress: *n* = 10, 3rd trimester stress: *n* = 10.

**Table 2.** Chronic effects of maternal psychosocial stress on structural brain development at 0.87 gestation.

Marker	Group	Cerebral Cortex Area (mm <sup>2</sup> )	Superficial white matter Area (mm <sup>2</sup> )	Subcortical white matter Area (mm <sup>2</sup> )	Deep white matter Area (mm <sup>2</sup> )	Hippocampus Area (mm <sup>2</sup> )
Neuronal network	Controls	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.51 ± 0.06	0.18 ± 0.03
	1st/2nd trimester stress	0.08 ± 0.01*	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.12 ± 0.03*
	3rd trimester stress	0.16 ± 0.04	0.15 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.49 ± 0.06	0.22 ± 0.03
Synaptic density	Controls	0.74 ± 0.12				0.42 ± 0.03
	1st/2nd trimester stress	0.45 ± 0.17*				0.28 ± 0.06**
	3rd trimester stress	0.57 ± 0.10				0.39 ± 0.05
Myelination	Controls	0.03 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.36 ± 0.11	0.34 ± 0.07	0.12 ± 0.06
	1st/2nd trimester stress	0.02 ± 0.00	0.08 ± 0.03**	0.22 ± 0.02*	0.18 ± 0.05*	0.06 ± 0.01
	3rd trimester stress	0.03 ± 0.01	0.14 ± 0.05	0.47 ± 0.11	0.43 ± 0.03	0.20 ± 0.06
		Cell count	Cell count	Cell count	Cell count	Cell count
Cell proliferation	Controls	9.17 ± 8.13	6.90 ± 7.30	33.04 ± 24.47	15.67 ± 7.00	5.57 ± 3.72
	1st/2nd trimester stress	4.63 ± 5.28	3.13 ± 3.44	5.38 ± 5.31	2.56 ± 1.94*	2.75 ± 2.45
	3rd trimester stress	9.42 ± 5.72	9.30 ± 6.76	43.48 ± 20.28	39.16 ± 30.32	9.44 ± 6.42
Cell death	Controls	0.86 ± 0.73	1.79 ± 1.84	3.14 ± 1.45	4.25 ± 3.31	2.80 ± 1.44
	1st/2nd trimester stress	2.05 ± 1.25	2.25 ± 1.60	4.90 ± 3.12	5.00 ± 2.80	3.20 ± 1.05
	3rd trimester stress	0.00 ± 0.00	0.29 ± 0.36	3.95 ± 2.78	4.54 ± 3.16	1.11 ± 0.57

Ag: Silver staining; SYN: Anti-synaptophysin-immunohistochemistry; MBP: Anti-MBP-immunohistochemistry; ki-67: Anti-ki-67-immunohistochemistry; TUNEL-method

\* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to controls. Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .



**Figure 1.** Effects of chronic maternal stress on neuronal network formation in fetal sheep brain at 0.87 gestation. Silver staining of the cerebral cortex (cor), superficial white matter (sfwm), subcortical white matter (swm), deep white matter (dwm) and the CA3 region of the hippocampus (hc). \* $p < .05$ , compared to controls;  $^{\$}$  $p < .01$  compared to the next more superficial brain region;  $^{\$}$  $p < .01$  compared to the hippocampus. Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .

was higher than in the hippocampus ( $p < 0.01$ , Table 2, Figure 3). MPS during the first and second trimester reduced SYN IR in the cerebral cortex by  $39.8 \pm 23.1\%$  ( $p < 0.05$ ) and in the hippocampus by  $32.9 \pm 13.4\%$  ( $p < 0.01$ , Table 2, Figures 3 and 4). In contrast to the effects of stress during the first and second trimester, stress during the third trimester did not change the area of SYN IR in both brain regions (Table 2, Figures 3 and 4).

### Formation of myelin

Myelin basic protein immunoreactivity (MBP IR) clearly revealed single MBP+ oligodendrocytes and myelinated fibers in the cerebral cortex and in the superficial, subcortical and deep white matter. In parallel to the increase in the density of axonal processes, the amount of MBP IR increased from the cerebral cortex towards the subcortical and deep white matter in control fetuses ( $p < 0.01$ , Table 2, Figure 5). MPS during the first and second trimester reduced MBP IR in the superficial, subcortical and deep white matter by  $49.9 \pm 18.0\%$  ( $p < 0.01$ ),  $40.3 \pm 5.0\%$  ( $p < 0.05$ ) and  $47.1 \pm 15.9\%$

( $p < 0.05$ ) respectively (Table 2, Figures 5 and 6) reflecting lower myelination. Stress during the first and second trimester did not change MBP IR in both the cerebral cortex and in the hippocampus (Table 2, Figure 5). In contrast to the effects of MPS during the first and second trimester, stress during the third trimester did not change MBP IR in any brain region (Table 2, Figures 5 and 6).

### Cell proliferation

Ki-67 IR selectively revealed proliferative-active cells. In control fetuses, the number of ki67+ cells in subcortical white matter was higher than in superficial white matter ( $p < 0.05$ , Table 2, Figure 7). MPS during the first and second trimester diminished the number of ki-67+ cells in the deep white matter by  $83.6 \pm 12.4\%$  ( $p < 0.05$ , Table 2, Figures 7 and 8) but did not change the number of ki-67+ cells in the cortical gray matter, in the superficial and subcortical white matter or in the hippocampus (Table 2, Figure 7). In contrast to the effects of MPS during the first and second trimester, stress during the third trimester did not change the number of ki67+ cells in any region (Table 2, Figures 7 and 8).

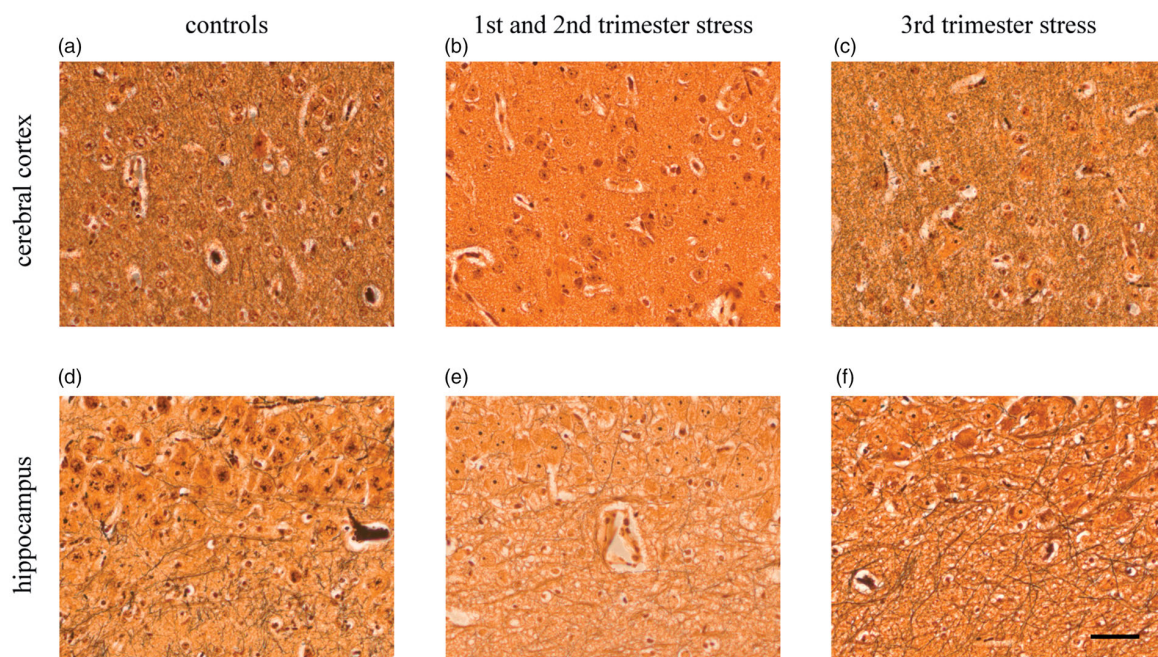
### Developmental cell death

Individual TUNEL+ cells appeared in all the regions examined. In control fetuses, the number of TUNEL+ cells was similarly low in all brain regions (Table 2, Figure 9). Both MPS during the first and second trimester or during the third trimester did not change the number of TUNEL+ cells in any brain region (Table 2, Figures 9 and 10).

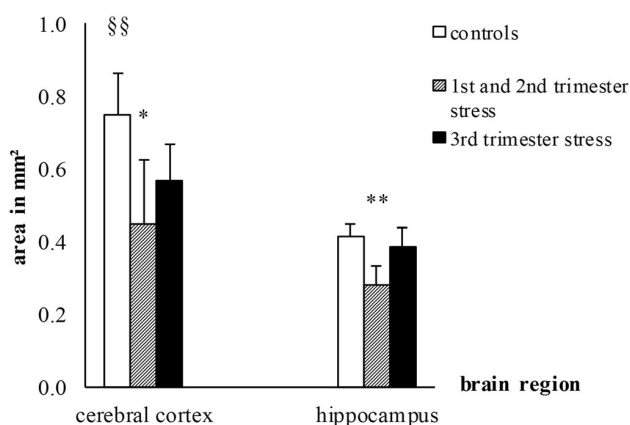
### Discussion

Most animal studies investigating the effects of prenatal stress on structural brain development used rodents and focused on a single time of stress exposure or a specific aspect of structural brain development such as myelination





**Figure 2.** Effects of chronic maternal stress on neuronal network formation in frontal cortex and hippocampus of the fetal sheep brain at 0.87 gestation. Representative photomicrographs of silver staining of the cerebral cortex (a–c) and the CA3 region of the hippocampus (d–f). Stress during the first and second trimester but not stress during the third trimester reduced the area of silver staining. Scale bar 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 3.** Effects of chronic maternal stress on synaptic density in fetal sheep brain at 0.87 gestation. Anti-synaptophysin-immunohistochemistry in the cerebral cortex and the CA3 region of the hippocampus. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to controls; §§ $p < .01$  compared to the hippocampus. Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .

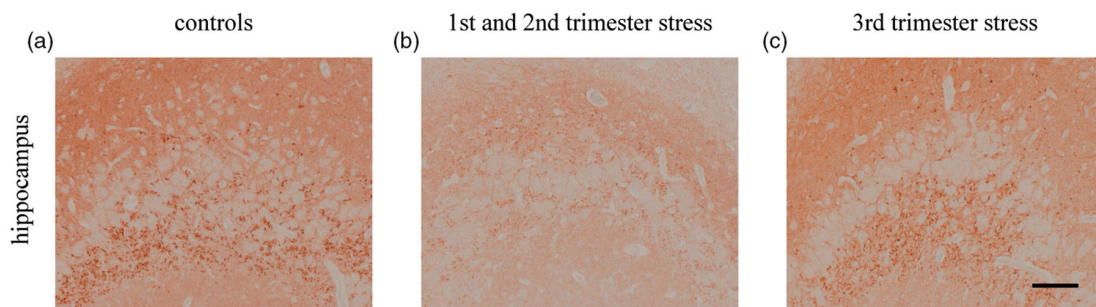
or neurogenesis (Boersma et al., 2014; Braun et al., 2017; Charil et al., 2010). We performed a comprehensive analysis of stress effects on brain development in multiple brain regions at two different fetal developmental periods in sheep, an animal model that is close to the time-course of brain development in humans. Our study provides evidence that prolonged MPS changes structural brain development of the fetus. Stress effects were dependent on the cerebral region and time period of exposure to maternal stress. Stress during the first and second trimester but not during the third trimester induced an alteration of the neuronal network formation shown by a reduced number of neuronal processes and synaptic density in the cerebral cortex and hippocampus,

as well as decreased proliferative activity and reduced myelination in the white matter.

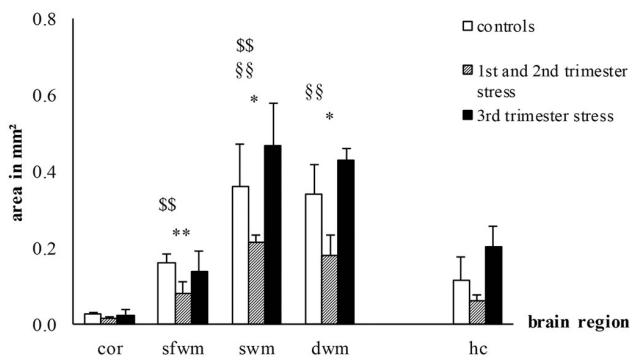
### Neuronal network formation

The reduced neuronal network formation in the fetal brain highly likely reflects aberrant network maturation. It has previously been shown that MPS in the form of aversive handling of ewes during the second half of gestation delayed spine maturation in the hippocampus and the prefrontal cortex (Petit et al., 2015). On the mechanistic level, stress-associated exposure to increased cortisol concentrations seems to play an important role. In our stress model, MPS induces increased fetal cortisol levels (Dreiling et al., 2016). Corticosterone, the principal murine GC is a critical regulator of dendritic spine development (Liston & Gan, 2011). In previous studies in sheep and baboons, the cytoskeletal microtubule-associated proteins MAP1B and MAP2 that are critically involved in neuronal development were reduced transiently after administration of betamethasone during the last trimester of pregnancy (Antonow-Schlorke et al., 2003, 2007). Causally, the authors assumed catabolic GC effects, since GC suppress activity of mitochondrial respiratory chain enzymes (Schwab et al., 2006).

A lower energy supply could have reduced synaptic protein synthesis in our study. The comparable decrease in synaptic density and axonal density in the cerebral cortex and the hippocampus suggests that the reduction in synaptic density could be an epiphenomenon of the reduced axonal density. Our result on the decrease in synaptic density is in agreement with adverse effects of MPS on fetal hippocampal synaptic density in rats and non-human primates (Charil et al., 2010; Xu et al., 2013).



**Figure 4.** Effects of chronic maternal stress on synaptic density in frontal cortex of the fetal sheep brain at 0.87 gestation. Representative photomicrographs of synaptophysin immunohistochemistry (brown precipitation) of the CA3 region of the hippocampus (a–c). Stress during the first and second trimester but not stress during the third trimester reduced synaptophysin IR. Scale bar 100  $\mu$ m.



**Figure 5.** Effects of chronic maternal stress on myelination in fetal sheep brain at 0.87 gestation. Anti-MBP-immunohistochemistry of the cerebral cortex (cor), superficial white matter (sfwm), subcortical white matter (swm), deep white matter (dwm), and the CA3 region of the hippocampus (hc). \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$  compared to controls;  $^{SS}p < .01$  compared to the next more superficial brain region;  $^{SS}p < .01$  compared to the hippocampus. Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .

### Myelin formation

Parallel to the altered network formation after MPS during the first and second trimester, we demonstrated decreased myelination and proliferative cell activity specifically in the subcortical and deep white matter where myelination was most advanced. Because the stress-related decrease of MBP IR was not accompanied by a loss of axonal processes, our results point to a specific stress effect on myelination. This effect may be mediated by decreased oligodendroglial proliferation. Although we did not differentiate between neuronal and glial proliferative activity, it is highly likely that the decrease in proliferative-active cells mainly involves glial cells since glial but not neuronal proliferation peaks during the second half of gestation (Barlow, 1969; McIntosh, Baghurst, Potter, & Hetzel, 1979). The low susceptibility of the cerebral cortex to stress may be due to the later onset of cortical myelination at the end of third trimester of pregnancy (Barlow, 1969). Indeed, myelination was still very low in the cerebral cortex during the third trimester. The effects of MPS on myelination in the white matter during the first and second trimester are in general agreement with findings in rodents (Suzuki et al., 2016; Xu et al., 2013). Although rodents were exposed to mid-to-late gestational stress, the stress period resembles that in our study since mice are born very prematurely with brains at a developmental stage of 0.25 to

0.5 gestation compared to sheep and humans (Bayer, Altman, Russo, & Zhang, 1993; Darlington et al., 1999).

The absence of the effects of MPS on brain development during the third trimester in the present study is in contrast to the effects of synthetic GC in the third trimester (Antonow-Schlorke et al., 2009; Huang, Harper, Evans, Newnham, & Dunlop, 2001) and could be explained by the ability of synthetic GC to cross the placental blood barrier unaffected by the placental 11 $\beta$ -HSD 2 (Benediktsson, Calder, Edwards, & Seckl, 1997) which inactivates 80–90% of maternal cortisol to cortisone (Rakers et al., 2017). Moreover synthetic GC do not bind to mineralocorticoid receptors which are known to produce neuroprotective effects (Hassan, von Rosenstiel, Patchev, Holsboer, & Almeida, 1996).

### Developmental cell death

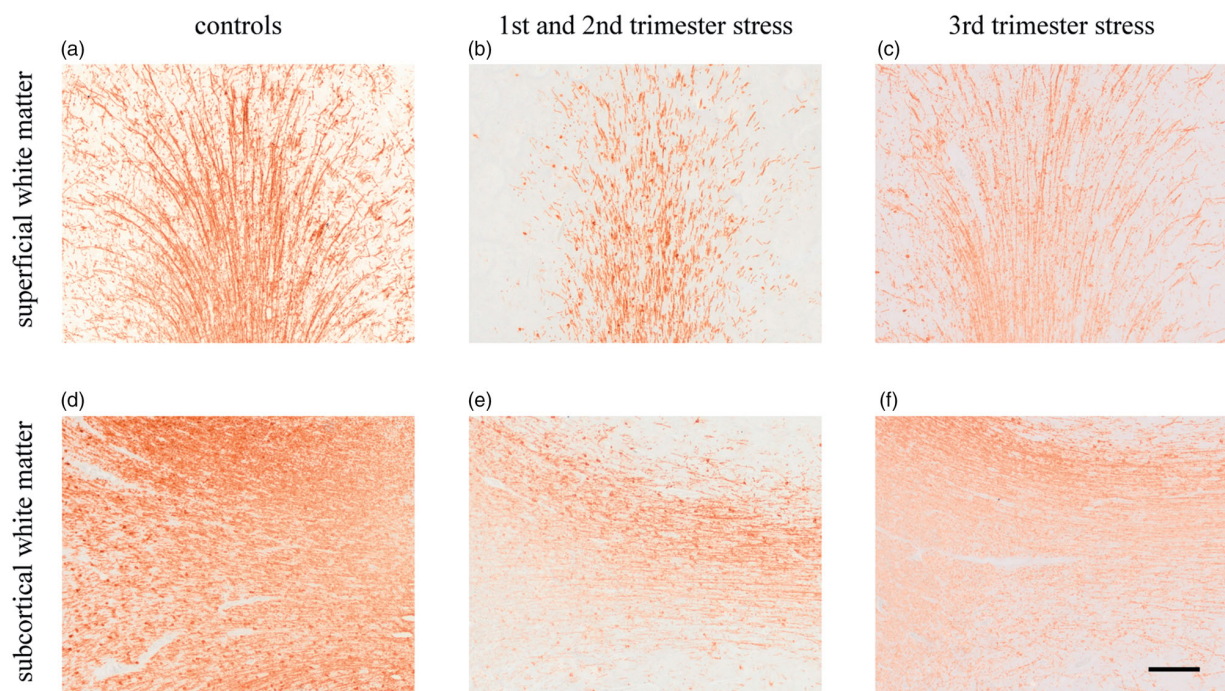
Although previous studies have shown an increase of developmental cell death in nonhuman primates (Uno et al., 1994) and humans (Tijsseling et al., 2012) following antenatal GC treatment during the third trimester, we did not find any effect of MPS on TUNEL+ cells. This may be in part due to low number and high variance of TUNEL+ cells in our study. Again, the different binding characteristics of synthetic GC and cortisol to GR and mineralocorticoid receptors may also explain the absent effect of MPS in our study (Hassan et al., 1996).

### Vulnerable periods and long-term implications

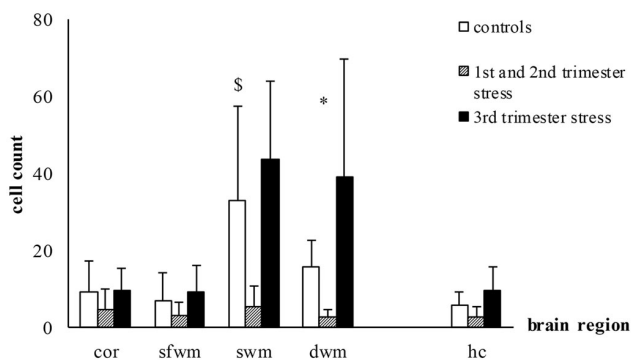
There was no effect of MPS during the third trimester on markers of structural brain development. The higher vulnerability of brain maturation to MPS during the first and second trimester is most likely due to the ongoing processes of neuronal migration, network formation and myelination at this earlier stage of development (Rakic, 1988). In agreement with our results, Xu et al. (2013) showed that restraint stress in rats during mid-to-late gestation has more pronounced effects on myelination and synaptophysin expression in the fetal brain than restraint stress in late gestation.

The high sensitivity of structural brain development to stress during the first and second trimester parallels the vulnerability of the fetus at this gestational age to programming effects of the activity of the HPA axis (Rakers et al., 2013).





**Figure 6.** Effects of chronic maternal stress on myelination in white matter of fetal sheep brain at 0.87 gestation. Representative photomicrographs of MBP immunohistochemistry (brown precipitation) of the superficial white matter (a–c) and the subcortical white matter (d–f). Stress during the first and second trimester but not stress during the third trimester reduced MBP IR. Scale bar 200  $\mu$ m.

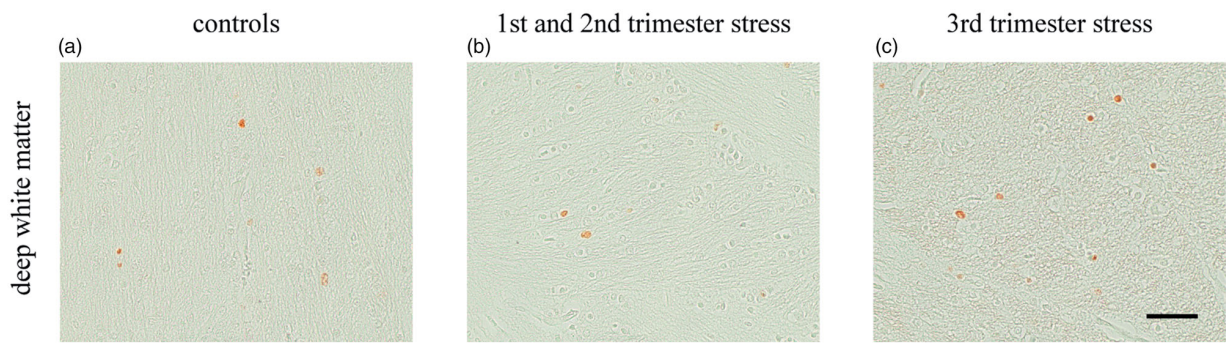


**Figure 7.** Effects of chronic maternal stress on cell proliferation in fetal sheep brain at 0.87 gestation. Anti-ki-67-immunohistochemistry of the cerebral cortex (cor), superficial white matter (sfwm), subcortical white matter (swm), deep white matter (dwm) and the CA3 region of the hippocampus (hc). \* $p < .05$  compared to controls;  $^{\$}p < .05$  compared to the next more superficial brain region. Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .

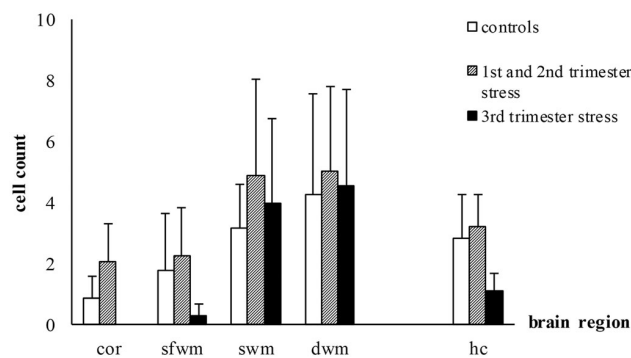
Thus, the effects of MPS on structural brain development may be mediated in part by programming of the hyperactivity of the HPA axis. On the other hand, GC receptor mRNA was not detected before 60 dG in fetal sheep (Andrews & Matthews, 2000). However, it is not clear whether GC receptors are indispensable for mediating stress effects on brain development. For example, oxidative stress, immunomodulatory cytokines and catecholamines (via an acute reduction of the utero-placental perfusion) can also transfer maternal stress to the fetus (Rakers et al., 2017).

It is unlikely that chronic fetal instrumentation for a three week period following stress during the first and second trimester was responsible for the adverse effects on structural brain development, since maternal and fetal blood gas

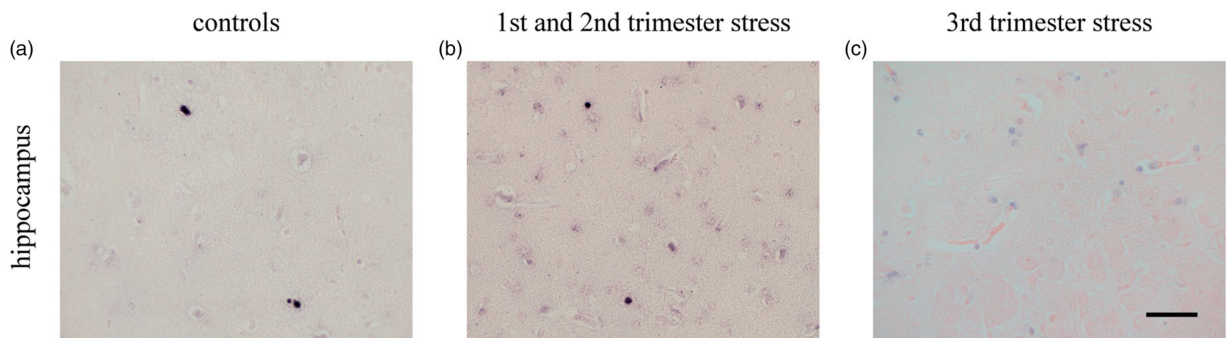
analysis showed normal physiological values throughout the period of instrumentation. Moreover, the period of fetal instrumentation in this group was during the third trimester when stress did not show any effect on structural brain development. Thus, the changes in neuronal network formation and myelination even 30 days after the last stress exposure indicate lasting structural effects of MPS in the fetal brain. Indeed, adverse effects of MPS on spine density of hippocampal and prefrontal cortical neurons could be still shown in adult rats (Radley et al., 2006). In rhesus monkeys, in whom a loss of cortical and hippocampal pyramidal neurons was seen at term after antenatal GC treatment in the early third trimester, a reduced hippocampal volume was still detectable by MRI at 19 to 20 months of age (Uno et al., 1994). In humans, delayed hippocampal growth was shown in children of mothers who reported either increased anxiety during the first or second trimester (Qiu et al., 2013) or experienced stress due to a natural disaster while pregnant (Dufoix et al., 2015). Similarly, gray matter volume was decreased in children of mothers who reported high anxiety during mid gestation (Buss et al., 2010) or had experienced highly stressful events during pregnancy (Favaro et al., 2015). The higher sensitivity of structural brain development to MPS during the first and second than during the third trimester is also associated with more pronounced long-term behavioral and neuropsychiatric consequences in rats (Patin et al., 2004), non-human primates (Schneider, Roughton, Koehler, & Lubach, 1999) and humans (Van den Bergh et al., 2017) although some studies in humans found more pronounced effects of late gestation stress on motor development (Grace et al., 2016; Simcock et al., 2016).



**Figure 8.** Effects of chronic maternal stress on cell proliferation in white matter of fetal sheep brain at 0.87 gestation. Representative photomicrographs of cell proliferation (ki-67 immunohistochemistry, brown precipitation) of the deep white matter (a–c). Stress during the first and second trimester but not stress during the third trimester decreased cell proliferation seen by the lower number of ki-67 marked cells. Scale bar 50  $\mu$ m.



**Figure 9.** Effects of chronic maternal stress on developmental cell death in fetal sheep brain at 0.87 gestation. TUNEL-method of the cerebral cortex (cor), superficial white matter (sfwm), subcortical white matter (swm), deep white matter (dwm) and the CA3 region of the hippocampus (hc). Controls:  $n = 8$ , 1st/2nd trimester stress:  $n = 10$ , 3rd trimester stress:  $n = 10$ .



**Figure 10.** Effects of chronic maternal stress on developmental cell death in white matter of fetal sheep brain at 0.87 gestation. Representative photomicrographs of developmental cell death (TUNEL, black color, counterstaining with Nuclear Fast Red) of the deep white matter (a–c). Partly due to the low number of TUNEL marked cells and the high variance there were no effects on developmental cell death. Scale bar 50  $\mu$ m.

### Limitations

Since we only distinguished between MPS during the first and second trimester or the third trimester, we cannot determine the exact time period during the first or second trimester that is particularly vulnerable. We also cannot exclude that the longer duration of fetal exposure to stress over the first and second trimester compared to the shorter exposure over the third trimester contributed to the more pronounced effects of MPS. It is important to note that we did not examine sex effects in this exploratory study. A few previous

studies suggest greater vulnerability to MPS in male rodent offspring, possibly because of lower expression and activity of 11 $\beta$ -HSD 2 and therefore higher maternal-fetal cortisol transfer in males (Charil et al., 2010). Fetal neuroinflammation and microglial programming which may affect brain development also seem to be sex-specific and to be more pronounced in males (Desplats et al., 2019; Hanamsagar & Bilbo, 2016). However, studies which examined sex-specific effects of MPS on brain development in humans showed inconsistent results, depending on the kind of stressor used and the



structural or functional system that was examined (Van den Bergh et al., 2017).

## Conclusions

In agreement with clinical studies showing more pronounced effects of MPS exposure on behavioral and neuropsychiatric outcome during early rather than late pregnancy (Van den Bergh et al., 2017), we could demonstrate that prolonged MPS exposure during the first and second but not during the third trimester has complex and multifactorial effects on neuronal network and myelin formation in the fetal sheep brain. Neuronal network and myelin formation represent hallmarks of brain development which determine proper brain function. These stress effects on structural brain development are complementary to the higher sensitivity of the HPA axis to the programming effects of MPS during the first and second rather than during the third trimester (Rakers et al., 2013). The stress effects on structural brain development seem to be longer lasting, since they were still present after a recovery period of 30 days. Future studies are needed to determine the long-term functional relevance of the aberrations in neuronal network and myelin formation. Furthermore, region-specific differences in neuroinflammation and microglial activity would be of interest to extend the findings in our study.

## Acknowledgement

The authors thank Ina Ingrisich, Claudia Sommer and Thi Kim Chi Le for excellent technical assistance and are grateful to Nasim Kroegel for language editing.

## Disclosure statement

All authors report no conflicts of interest.

## Funding

This work was supported by the European Community (FP7 Health project) under Grant 2798219.

## ORCID

Markus Hermes  <http://orcid.org/0000-0002-2922-1507>

## References

- Andrews, M.H., & Matthews, S.G. (2000). Regulation of glucocorticoid receptor mRNA and heat shock protein 70 mRNA in the developing sheep brain. *Brain Research*, 878, 174–182. doi:10.1016/S0006-8993(00)02735-9
- Antonow-Schlorke, I., Helgert, A., Gey, C., Coksaygan, T., Schubert, H., Nathanielsz, P.W., ... Schwab, M. (2009). Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstetrics & Gynecology*, 113, 142–151. doi:10.1097/AOG.0b013e3181924d3b
- Antonow-Schlorke, I., Müller, T., Brodhun, M., Wicher, C., Schubert, H., Nathanielsz, P.W., ... Schwab, M. (2007). Betamethasone-related acute alterations of microtubule-associated proteins in the fetal sheep brain are reversible and independent of age during the last one-third of gestation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196, 553.e1–556. doi:10.1016/j.ajog.2006.10.898
- Antonow-Schlorke, I., Schwab, M., Li, C., & Nathanielsz, P.W. (2003). Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *The Journal of Physiology*, 547, 117–123. doi:10.1111/j.1469-7793.2003.00117.x
- Barlow, R.M. (1969). Foetal sheep – morphogenesis of nervous system and histochemical aspects of myelination. *The Journal of Comparative Neurology*, 135, 249–262. doi:10.1002/cne.901350302
- Bayer, S.A., Altman, J., Russo, R.J., & Zhang, X. (1993). Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14, 83–144.
- Benediktsson, R., Calder, A.A., Edwards, C.R.W., & Seckl, J.R. (1997). Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: A key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical Endocrinology*, 46, 161–166. doi:10.1046/j.1365-2265.1997.1230939.x
- Boersma, G.J., Bale, T.L., Casanello, P., Lara, H.E., Lucion, A.B., Suchecki, D., & Tamashiro, K.L. (2014). Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 26, 587–602. doi:10.1111/jne.12153
- Braun, K., Bock, J., Wainstock, T., Matas, E., Gaisler-Salomon, I., Fegert, J., ... Segal, M. (2017). Experience-induced transgenerational (re-)programming of neuronal structure and functions: Impact of stress prior and during pregnancy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, pii: S0149-7634(16)30731-X.
- Brodhun, M., Mueller, T., Coksaygan, T., Antonow-Schlorke, I., Schubert, H., Patt, S., ... Schwab, M. (2004). Neurogenesis and programmed cell death (PCD) during development of the fetal sheep brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 11, 253a–253a.
- Buss, C., Davis, E.P., Muftuler, L.T., Head, K., & Sandman, C.A. (2010). High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6–9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*, 35, 141–153. doi:10.1016/j.psychneuen.2009.07.010
- Charil, A., Laplante, D.P., Vaillancourt, C., & King, S. (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Research Reviews*, 65, 56–79. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.06.002
- Colberg, C., Antonow-Schlorke, I., Muller, T., Schubert, H., Witte, O.W., & Schwab, M. (2004). Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0.75 of gestation. *Neuroscience Letters*, 364, 130–134. doi:10.1016/j.neulet.2004.04.052
- Coulon, M., Nowak, R., Andanson, S., Petit, B., Levy, F., & Boissy, A. (2015). Effects of prenatal stress and emotional reactivity of the mother on emotional and cognitive abilities in lambs. *Developmental Psychobiology*, 57, 626–636. doi:10.1002/dev.21320
- Darlington, R.B., Dunlop, S.A., & Finlay, B.L. (1999). Neural development in metatherian and eutherian mammals: Variation and constraint. *The Journal of Comparative Neurology*, 411, 359–368. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19990830)411:3<359::AID-CNE1>3.3.CO;2-A
- Desplats, P., Gutierrez, A.M., Antonelli, M.C., & Frasch, M.G. (2019). Microglial memory of early life stress, epigenetic mechanisms and susceptibility to neurodegeneration in adulthood. arXiv e-prints. Retrieved January, 01, 2019,
- Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3, 79–83. doi:10.1016/0378-3782(79)90022-7
- Drailing, M., Bischoff, S., Schiffner, R., Rupprecht, S., Kiehnopf, M., Schubert, H., ... Rakers, F. (2016). Stress-induced decrease of uterine blood flow in sheep is mediated by alpha 1-adrenergic receptors. *Stress*, 19, 547–551. doi:10.1080/10253890.2016.1203417
- Dufoix, R., Charil, A., Laplante, D.P., Paus, T., Pruessner, J., & King, S. (2015). Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts hippocampus volumes in males at age 11: Project Ice Storm. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47, 12. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.04.042
- Favaro, A., Tenconi, E., Degortes, D., Manara, R., & Santonastaso, P. (2015). Neural correlates of prenatal stress in young women. *Psychological Medicine*, 45, 2533–2543. doi:10.1017/S003329171500046X
- Fontein-Kuipers, Y.J., Nieuwenhuijze, M.J., Ausems, M., Bude, L., & de Vries, R. (2014). Antenatal interventions to reduce maternal distress: A systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BJOG: An*

- International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121, 389–397. doi:10.1111/1471-0528.12500
- Glover, V., O'Connor, T.G., & O'Donnell, K. (2010). Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35, 17–22. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.11.008
- Grace, T., Bulsara, M., Robinson, M., & Hands, B. (2016). The impact of maternal gestational stress on motor development in late childhood and adolescence: A longitudinal study. *Child Development*, 87, 211–220. doi:10.1111/cdev.12449
- Hanamsagar, R., & Bilbo, S.D. (2016). Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 127–133. doi:10.1016/j.jsmb.2015.09.039
- Hardin, J.W., & Hilbe, J.M. (2014). Generalized estimating equations: Introduction. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*.
- Hassan, A.H., von Rosenstiel, P., Patchev, V.K., Holsboer, F., & Almeida, O.F. (1996). Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Experimental Neurology*, 140, 43–52. doi:10.1006/exnr.1996.0113
- Huang, W.L., Harper, C.G., Evans, S.F., Newnham, J.P., & Dunlop, S.A. (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19, 415–425. doi:10.1016/S0736-5748(01)00026-0
- Johnson, J. L., Sudheimer, K. D., Davis, K. K., & Winn, B. M. (2016). The navigable atlas of the sheep brain. Retrieved from: <https://msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>
- Liston, C., & Gan, W.B. (2011). Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 16074–16079. doi:10.1073/pnas.1110444108
- McIntosh, G.H., Baghurst, K.I., Potter, B.J., & Hetzel, B.S. (1979). Foetal brain development in the sheep. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 5, 103–114. doi:10.1111/j.1365-2990.1979.tb00664.x
- Moisiadis, V.G., & Matthews, S.G. (2014). Glucocorticoids and fetal programming part 2: Mechanisms. *Nature Reviews Endocrinology*, 10, 403–411. doi:10.1038/nrendo.2014.74
- Morrison, J.L., Berry, M.J., Botting, K.J., Darby, J.R.T., Frasch, M.G., Gatford, K.L., ... Tellam, R.L. (2018). Improving pregnancy outcomes in humans through studies in sheep. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 315, R1123–R1153. doi:10.1152/ajpregu.00391.2017
- Navone, F., Jahn, R., Di Gioia, G., Stukenbrok, H., Greengard, P., & De Camilli, P. (1986). Protein p38: An integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *The Journal of Cell Biology*, 103, 2511–2527. doi:10.1083/jcb.103.6.2511
- Otsu, N. (1979). A threshold selection method from Gray-level histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 9, 62–66. doi:10.1109/TSMC.1979.4310076
- Patin, V., Vincent, A., Lordi, B., & Caston, J. (2004). Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Developmental Brain Research*, 149, 85–92. doi:10.1016/j.devbrainres.2003.12.008
- Petit, B., Boissy, A., Zanella, A., Chaillou, E., Andanson, S., Bes, S., ... Coulon, M. (2015). Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs. *Behavioural Brain Research*, 291, 155–163. doi:10.1016/j.bbr.2015.05.025
- Qiu, A., Rifkin-Graboi, A., Chen, H., Chong, Y.-S., Kwek, K., Gluckman, P.D., ... Meaney, M.J. (2013). Maternal anxiety and infants' hippocampal development: Timing matters. *Translational Psychiatry*, 3, e306.
- Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G.M., Liston, C., Hof, P.R., ... Morrison, J.H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 16, 313–320. doi:10.1093/cercor/bhi104
- Raikkonen, K., Seckl, J.R., Pesonen, A.K., Simons, A., & Van den Bergh, B.R. (2011). Stress, glucocorticoids and liquorice in human pregnancy: Programmers of the offspring brain. *Stress*, 14, 590–603. doi:10.3109/10253890.2011.602147
- Rakers, F., Frauendorf, V., Rupprecht, S., Schiffner, R., Bischoff, S.J., Kiehnopf, M., ... Schwab, M. (2013). Effects of early- and late-gestational maternal stress and synthetic glucocorticoid on development of the fetal hypothalamus-pituitary-adrenal axis in sheep. *Stress*, 16, 122–129. doi:10.3109/10253890.2012.686541
- Rakers, F., Rupprecht, S., Dreiling, M., Bergmeier, C., Witte, O.W., & Schwab, M. (2017). Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, pii: S0149-7634(16)30719-9.
- Rakic, P. (1988). Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Progress in Brain Research*, 73, 15–37.
- Schneider, M.L., Moore, C.F., Kraemer, G.W., Roberts, A.D., & DeJesus, O.T. (2002). The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: Perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 285–298. doi:10.1016/S0306-4530(01)00050-6
- Schneider, M.L., Roughton, E.C., Koehler, A.J., & Lubach, G.R. (1999). Growth and development following prenatal stress exposure in primates: An examination of ontogenetic vulnerability. *Child Development*, 70, 263–274. doi:10.1111/1467-8624.00020
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182, 311–322. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9
- Schwab, M., Wichmann, G., Maurer, I., Loehle, M., Nathanielsz, P.W., & Witte, O.W. (2006). Antenatal glucocorticoids (GC) suppress mitochondrial activity but do not decrease ATP content in the fetal ovine brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13, 306a–306a.
- Sevier, A.C., & Munger, B.L. (1965). Technical note: A silver method for paraffin sections of neural tissue. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 24, 130–135. doi:10.1097/00005072-196501000-00012
- Simcock, G., Kildea, S., Elgbeili, G., Laplante, D.P., Stapleton, H., Cobham, V., & King, S. (2016). Age-related changes in the effects of stress in pregnancy on infant motor development by maternal report: The Queensland Flood Study. *Developmental Psychobiology*, 58, 640–659. doi:10.1002/dev.21407
- Sternberger, N.H., Itoyama, Y., Kies, M.W., & Webster, H.D. (1978). Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75, 2521–2524. doi:10.1073/pnas.75.5.2521
- Suzuki, A., Iinuma, M., Hayashi, S., Sato, Y., Azuma, K., & Kubo, K. (2016). Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced hypomyelination, synaptic alterations, and learning impairment in mouse offspring. *Brain Research*, 1651, 36–43. doi:10.1016/j.brainres.2016.09.007
- Tijsseling, D., Wijnberger, L.D.E., Derks, J.B., van Velthoven, C.T.J., de Vries, W.B., van Bel, F., ... Visser, G.H.A. (2012). Effects of antenatal glucocorticoid therapy on hippocampal histology of preterm infants. *PLoS One*, 7, e33369. doi:10.1371/journal.pone.0033369
- Uno, H., Eisele, S., Sakai, A., Shelton, S., Baker, E., DeJesus, O., & Holden, J. (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Hormones and Behavior*, 28, 336–348. doi:10.1006/hbeh.1994.1030
- Van den Bergh, B.R.H., van den Heuvel, M.I., Lahti, M., Braeken, M., de Rooij, S.R., Entringer, S., ... Schwab, M. (2017). Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, pii: S0149-7634(16)30734-5.
- Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32, 1073–1086. doi:10.1016/j.neubiorev.2008.03.002
- WHO. (2008). Maternal mental health and child health and development in low and middle income countries: Report of the meeting, Geneva: Switzerland, 30 January–1 February, 2008.
- Xu, J., Yang, B., Yan, C., Hu, H., Cai, S., Liu, J., ... Shen, X. (2013). Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain Research*, 1527, 57–66. doi:10.1016/j.brainres.2013.06.025

## **7 Diskussion**

### **7.1 Diskussion der Methodik**

#### **7.1.1 Das chronisch instrumentierte Schaf**

Das chronisch instrumentierte Schaf ist ein etabliertes Modell für pränatale (patho)physiologische Untersuchungen, insbesondere auch für die Erforschung der Gehirnentwicklung. Von Vorteil sind die Einlings- oder Zwillingsträchtigkeiten, die ähnliche Größe der Feten bei Geburt und die Tatsache dass der Verlauf der Gehirnentwicklung im Wesentlichen dem des Menschen entspricht, auch wenn die Myelinisierung und funktionelle Reife des Schafgehirns bei Geburt etwas fortgeschrittener sind. (Morrison et al. 2018). Die Größe der Tiere erlaubt die intrauterine Instrumentierung der Feten, wodurch sich die Möglichkeit der kontinuierlichen Messung von Vitalparametern sowie der einfachen Bestimmung der fetalen Laborparameter ergibt.

Durch die behördlichen Auflagen zur Durchführung von Großtierexperimenten war die Anzahl der Versuchstiere zwar limitiert, jedoch ausreichend für die geplanten Untersuchungen dieser explorativen Studie. Aufgrund der potentiellen Effekte von Zwillingsträchtigkeiten auf das Wachstum und die Entwicklung der Feten (Phillips et al. 2001) schlossen wir nur Einlinge in die Untersuchung ein, um eine Verfälschung der Daten auszuschließen.

#### **7.1.2 Das Stressmodell**

Als Herdentiere sind Schafe sehr sensitiv für Isolationsstress. Dieses Stressmodell ist in unserer Arbeitsgruppe etabliert (Rakers et al. 2012). Im Verlauf der Gestation kommt es nur zu einer vernachlässigbaren Habituation gegenüber dem repetitiven Stress (Rakers et al. 2012). Da die Tiere im ersten und zweiten Trimester von Gestationstag 30-100 und im dritten Trimester von Gestationstag 100-120 gestresst wurden, können wir nicht ausschließen, dass die längere Dauer der Stress-Exposition im ersten und zweiten Trimester im Vergleich zur kürzeren Exposition im dritten Trimester zu den stärkeren Auswirkungen von MPS beigetragen hat.

Nach Abschluss der chronischen Stressperiode erfolgte die chronische Instrumentierung der Feten, um die Programmierung der Stressreaktivität der fetalen HHN-Achse zu untersuchen (Rakers et al. 2012; nicht Thema dieser Arbeit). Es ist unwahrscheinlich, dass die chronische fetale Instrumentierung für einen Zeitraum von drei Wochen nach Stress im ersten und zweiten Trimester für die Auswirkungen auf die strukturelle Gehirnentwicklung

verantwortlich war, da die fetalen Blutgasanalysen physiologische Werte während des gesamten Zeitraums der Instrumentierung zeigten. Darüber hinaus lag die fetale Instrumentierung in dieser Gruppe im dritten Trimesters, in dem Stress keinen Einfluss auf die strukturelle Gehirnentwicklung zeigte.

### **7.1.3 Die untersuchten Gehirnregionen**

Wir untersuchten den Einfluss von MPS auf die fetale Gehirnentwicklung im cerebralen Cortex, im Subcortex und in der CA3-Region des Hippocampus. Frühere Studien konnten in diesen Regionen bereits eine verminderte Neurogenese, Synapsenbildung, Ausbildung der dendritischen Spines und Myelinisierung durch MPS bei Nagetieren und Primaten feststellen (Charil et al. 2010, Boersma et al. 2014, Braun et al. 2017). Das limbische System, zu dem auch der Hippocampus gehört, ist reich an GC- sowie Mineralocorticoid-Rezeptoren und an der Regulierung der Aktivität der HHN-Achse und der Stressverarbeitung sowie an der Regulierung des Verhaltens beteiligt (Moisiadis und Matthews 2014b). Die Untersuchung des Cortex und Subcortex, welche wesentlich in die Kognition involviert sind, erfolgte zum Nachweis von Stresseffekten auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes, der synaptischen Verbindungen sowie der Myelinisierung.

### **7.1.4 Die Marker der strukturellen Gehirnentwicklung**

Die Immunhistochemie stellt ein semiquantitatives Verfahren dar, mit welchem die Menge der exprimierten Proteine nicht direkt gemessen wird, sondern welche nur eine semiquantitative Aussage durch Bestimmung der markierten Fläche oder der Intensität der Markierung zulässt. Dafür erlaubt es die räumliche Auflösung der stressbedingten Strukturveränderungen. Dahingegen ermöglichen mRNA-Techniken genauere quantitative Beurteilungen, jedoch keine Aussagen über eine räumliche Auflösung. Für die Durchführung der Immunhistochemie ist eine Perfusionsfixation notwendig, um die anatomischen Strukturen zu erhalten, daher ist der simultane Einsatz einer mRNA-Technik, welche natives Gewebe benötigt, nicht möglich. Durch die behördlichen Auflagen für Großtierexperimente wäre die Durchführung beider Methoden mit der dafür notwendigen doppelten Anzahl an Tieren nicht möglich gewesen.

Silberimprägnation, MBP-Immunmarkierung, Synaptophysin-Immunmarkierung, Ki-67-Immunmarkierung und TUNEL-Methode stellen basalen Prozesse der strukturellen Gehirnentwicklung dar: Ausbildung des neuronalen Netzwerkes, Myelinisierung, Synapsenbildung, Zellteilung und programmierten Zelltod. Dies erlaubt daher eine

umfassende Beurteilung der strukturellen Gehirnreifung. Diese Marker wurden bereits in früheren Studien erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe am Schafmodell verwendet (Brodhun et al. 2004, Colberg et al. 2004, Antonow-Schlorke et al. 2009, Anegroaie et al. 2017).

Wir haben uns in unserer Studie auf die Effekte von MPS auf die neuronale Reifung konzentriert. In den letzten Jahren wurde die Bedeutung der Effekte von MPS auf die Programmierung von Immunzellen im zentralen Nervensystem wie der Mikroglia vermehrt untersucht. Die physiologische Interaktion der Mikroglia mit Neuronen ist essentiell für die gesunde Gehirnentwicklung (Cunningham et al. 2013). Daher sollten Veränderungen der Mikroglia in den hier betrachteten Gehirnregionen in zukünftigen Studien untersucht werden.

## **7.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **7.2.1 Ausbildung des neuronalen Netzwerkes**

MPS im ersten und zweiten Trimester reduzierte die markierte Fläche in der Silberimprägnation als Marker für die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes im cerebralen Cortex und im Hippocampus. MPS im ersten und zweiten Trimester hatte keinen Einfluss auf die markierte Fläche im Subcortex. MPS im dritten Trimester hatte keinen Einfluss auf die markierte Fläche in allen untersuchten Gehirnregionen.

Die Reduktion der neuronalen Netzwerkbildung im fetalen Gehirn spiegelt höchstwahrscheinlich eine abnormale Reifung wider. In Übereinstimmung hiermit verzögerte MPS in der zweiten Hälfte der Gestation bei Schafen die Reifung der dendritischen Spines der Nervenzellen im Hippocampus und im präfrontalen Cortex (Petit et al. 2015). Erhöhte Cortisolkonzentrationen als Folge der Stressexposition scheinen mechanistisch eine wichtige Rolle zu spielen. In unserem Stressmodell induziert MPS erhöhte fetale Cortisolspiegel (Dreiling et al. 2016). Corticosteron, das wichtigste murine GC, ist ein wichtiger Regulator der dendritischen Spines (Liston und Gan 2011). In früheren Studien an Schafen und Pavianen reduzierte die Verabreichung von Betamethason im letzten Schwangerschaftsdrittel vorübergehend die Expression der zytoskelettalen Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1B und MAP2, welche maßgeblich an der neuronalen Aussprossung beteiligt sind (Antonow-Schlorke et al. 2003, Antonow-Schlorke et al. 2007). Kausal nahmen die Autoren katabole GC-Effekte an, da GC die Aktivität von mitochondrialen Enzymen der Atmungskette vermindern (Schwab et al. 2006).

### **7.2.2 Synaptische Dichte**

MPS im ersten und zweiten Trimester reduzierte die Fläche der Immunmarkierung von Synaptophysin als unspezifischer Marker aller Synapsen im cerebralen Cortex und im Hippocampus. MPS im dritten Trimester hatte keinen Einfluss auf die markierte Fläche in allen untersuchten Gehirnregionen.

Eine Reduzierung der mitochondrialen Aktivität der Atmungskette als Folge der erhöhten fetalen Cortisolspiegel könnte auch die reduzierte Synthese des synaptischen Proteins Synaptophysin in unserer Studie erklären (Schwab et al. 2006). Die parallele Abnahme der synaptischen Dichte und der neuronalen Fortsätze im Cortex und Hippocampus deutet darauf hin, dass die Abnahme der synaptischen Dichte ein Epiphänomen der reduzierten Bildung neuronaler Fortsätze sein könnte. Ein ähnlicher Effekt von MPS auf die synaptische Dichte im fetalen Hippocampus konnte auch schon bei Ratten und Primaten nachgewiesen werden (Charil et al. 2010, Xu et al. 2013).

### **7.2.3 Myelinisierung und Zellproliferation**

MPS im ersten und zweiten Trimester reduzierte die Fläche der Immunmarkierung von MBP als Marker der Myelinisierung in der superfiziellen, subcorticalen und tiefen weißen Substanz aber nicht im cerebralen Cortex oder im Hippocampus. MPS im dritten Trimester hatte keinen Einfluss auf die markierte Fläche in allen untersuchten Gehirnregionen. MPS im ersten und zweiten Trimester reduzierte die Anzahl der Zellen in der Immunmarkierung von Ki-67 als Marker der Zellproliferation in der tiefen weißen Substanz, jedoch nicht in der superfiziellen und subcorticalen weißen Substanz oder im cerebralen Cortex und Hippocampus. MPS im dritten Trimester hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der markierten Zellen in allen untersuchten Gehirnregionen.

Parallel zur gestörten Netzwerkbildung nach MPS im ersten und zweiten Trimester konnten wir damit eine verminderte Myelinisierung und proliferative Zellaktivität zeigen, speziell in der subcorticalen und tiefen weißen Substanz, den Gehirnregionen, in welchen die Myelinisierung am weitesten fortgeschritten war. Da die stressbedingte Reduktion der Immunmarkierung von MBP nicht mit einem Verlust von axonalen Prozessen in der weißen Substanz einherging, deuten unsere Ergebnisse auf einen spezifischen Stresseffekt auf die Myelinisierung hin. Dieser Effekt könnte durch eine verminderte Proliferation der Oligodendroglia vermittelt worden sein. Obwohl wir nicht zwischen neuronaler und glialer proliferativer Aktivität unterscheiden haben, ist es sehr wahrscheinlich, dass der durch uns nachgewiesene Rückgang der proliferativ-aktiven Zellen hauptsächlich Gliazellen betrifft, da

die gliale, nicht aber die neuronale Proliferation während des untersuchten Zeitraumes gipfelt (Barlow 1969, McIntosh et al. 1979). Die geringe Anfälligkeit der Myelinisierung im cerebralen Cortex für Stresseffekte kann auf den späteren Beginn der corticalen Myelinisierung am Ende des dritten Trimesters der Schwangerschaft zurückzuführen sein (Barlow 1969). Tatsächlich war die Myelinisierung in der Großhirnrinde selbst im dritten Trimester noch sehr gering. Die Verzögerung der Myelinisierung in der weißen Substanz durch MPS im ersten und zweiten Trimester stimmt mit Befunden bei Nagetieren überein (Xu et al. 2013, Suzuki et al. 2016). Obwohl die Nagetiere Stress in der mittleren bis späten Gestation ausgesetzt waren, ähnelt diese Stressperiode der in unserer Studie, da Ratten und Mäuse im Vergleich zu Schafen und Menschen in einem früheren Entwicklungsstadium geboren werden und die Gehirnentwicklung zum großen Teil postnatal erfolgt (Bayer et al. 1993, Darlington et al. 1999).

Das Fehlen von Auswirkungen von MPS auf die Myelinisierung im dritten Trimester in der vorliegenden Studie steht im Gegensatz zu den die Myelinisierung vermindernenden Effekten synthetischer GC im dritten Trimester (Huang et al. 2001, Antonow-Schlorke et al. 2009) und könnte durch die höhere biologische Potenz und die Eigenschaft der synthetischen GC erklärt werden, die Plazenta-Schranke unbeeinflusst vom Enzym 11 $\beta$ -HSD 2 zu überschreiten (Benediktsson et al. 1997), welches 80 - 90 % des mütterlichen Cortisols zu Cortison inaktiviert (Rakers et al. 2017). Darüber hinaus binden synthetische GC im Gegensatz zu Cortisol nicht an Mineralocorticoid-Rezeptoren, von denen bekannt ist, dass sie neuroprotektive Effekte vermitteln (Hassan et al. 1996).

#### **7.2.4 Programmierter Zelltod**

Obwohl frühere Studien eine erhöhte Rate von programmiertem Zelltod im Hippocampus von Primaten (Uno et al. 1994). und Menschen (Tijsseling et al. 2012) nach pränataler Behandlung mit synthetischen GC im dritten Trimester gezeigt haben, fanden wir keinen Effekt von MPS auf die Anzahl an TUNEL+ Zellen, einem Marker für den programmierten Zelltod. Dies kann zum Teil auf die geringe Anzahl und hohe interindividuelle Varianz der TUNEL+ Zellen zum untersuchten Zeitpunkt in unserer Studie zurückzuführen sein. Außerdem können auch hier die unterschiedlichen Bindungseigenschaften von synthetischen GC, die mit erhöhter Aktivität und spezifisch am GC-Rezeptor binden, während Cortisol auch am Mineralocorticoid-Rezeptor bindet. Die Bindung am Mineralocorticoid-Rezeptor hat neuroprotektive Eigenschaften, was die fehlende apoptoseinduzierende Wirkung von MPS zumindest im Hippocampus in unserer Studie erklären könnte (Hassan et al. 1996).

### **7.2.5 Vulnerable Zeitfenster für und langfristige Auswirkungen von Stress während der Schwangerschaft**

Wir fanden keine Effekte von MPS im dritten Trimester auf die Marker der strukturellen Gehirnentwicklung. Die höhere Anfälligkeit der strukturellen Hirnreifung gegenüber MPS im ersten und zweiten Trimester ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das unreifere Gehirn vulnerabler für äußere Einflüsse ist. Zu diesem Zeitpunkt laufen primär die Prozesse der neuronalen Migration, Netzbildung und Myelinisierung ab (Rakic 1988). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Xu et al. (2013), dass Stress durch Einschränkung der Bewegungsfreiheit bei Ratten während der mittleren Schwangerschaft ausgeprägtere negative Auswirkungen auf die Myelinisierung und die Expression von Synaptophysin im fetalen Gehirn hat als Stress in der späteren Schwangerschaft.

Die hohe Empfindlichkeit der strukturellen Gehirnentwicklung gegenüber Stress während des ersten und zweiten Trimesters entspricht zeitlich der Vulnerabilität des Fetus in diesem Schwangerschaftsalter für programmierende Effekte von MPS auf die Aktivität der HNN-Achse (Rakers et al. 2012). So können die Auswirkungen von MPS auf die strukturelle Gehirnentwicklung teilweise durch Programmierung einer Hyperaktivität der HNN-Achse mit konsekutivem Hypercortisolismus (Rakers et al. 2012, Schwab et al. 2012) vermittelt werden. Die Veränderungen in der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und der Myelinisierung, die noch 30 Tage nach der letzten Stress-Exposition nachweisbar waren, deuten auf dauerhafte strukturelle Effekte von MPS im fetalen Gehirn hin. Tatsächlich konnten negative Auswirkungen von MPS auf die Dichte der dendritischen Spines im Hippocampus und präfrontalen Cortex noch bei erwachsenen Ratten nachgewiesen werden (Radley et al. 2006). Bei Rhesusaffen wurde nach einer pränatalen GC-Behandlung im frühen dritten Trimester ein Verlust von corticalen und hippocampalen Neuronen am Ende der Gestation beobachtet und auch im Alter von 19 bis 20 Monaten war noch ein reduziertes hippocampales Volumen mittels MRT nachweisbar (Uno et al. 1994). Beim Menschen zeigte sich ein verzögertes Wachstum des Hippocampus im Alter von 6 Monaten bei Kindern von Müttern, die über vermehrte Angst während des ersten oder zweiten Trimesters berichteten (Qiu et al. 2013). Bei Kindern von Müttern, welche aufgrund einer Naturkatastrophe während der Schwangerschaft Stress ausgesetzt waren, wurde im Alter von 11 Jahren ein verringertes Volumen des Hippocampus gefunden (Dufoix et al. 2015). Ebenso war das Volumen der grauen Substanz bei Kindern im Alter von 6-9 Jahren von Müttern verringert, welche über Angstzustände in der Mitte der Schwangerschaft berichteten (Buss et al. 2010). Die höhere



Sensitivität der strukturellen Gehirnentwicklung gegenüber MPS im ersten und zweiten im Vergleich zum dritten Trimester ist generell auch mit ausgeprägteren langfristigen Verhaltens- und neuropsychiatrischen Auffälligkeiten bei Ratten (Patin et al. 2004), Primaten (Schneider et al. 1999) und Menschen (Van den Bergh et al. 2017) verbunden, obwohl einige Studien am Menschen stärkere Auswirkungen von Stress in der späten Schwangerschaft auf die motorische Entwicklung fanden (Grace et al. 2016, Simcock et al. 2016).

### **7.2.6 Limitationen**

Da wir nur zwischen MPS während des ersten und zweiten Trimesters oder des dritten Trimesters unterschieden haben, können wir den genauen Zeitraum während des ersten oder zweiten Trimesters nicht bestimmen, der besonders vulnerabel für Stress ist. Es ist zudem wichtig zu beachten, dass wir in dieser explorativen Studie aufgrund der Fallzahlbeschränkung keine Geschlechts-Effekte untersucht haben. Einige frühere Studien deuten auf eine größere Anfälligkeit für MPS bei männlichen Nagetieren hin, möglicherweise wegen einer geringeren Expression und Aktivität von 11 $\beta$ -HSD 2 und damit einem höheren mütterlich-fetalen Cortisoltransfer bei männlichen Feten (Charil et al. 2010). Die nicht untersuchte fetale Programmierung der Neuroinflammation über eine Aktivierung der Mikroglia, die die Gehirnentwicklung beeinflussen kann, scheint auch geschlechtsspezifisch und bei Männern stärker ausgeprägt zu sein, womöglich durch geschlechtsspezifische Unterschiede in Anzahl und Morphologie der Mikroglia (Hanamsagar und Bilbo 2016, Desplats et al. 2019). Insgesamt zeigten jedoch Studien, die geschlechtsspezifische Effekte von MPS auf die Gehirnentwicklung beim Menschen untersuchten, inkonsistente Ergebnisse, abhängig von der Art des verwendeten Stressors und dem untersuchten strukturellen oder funktionellen System (Van den Bergh et al. 2017).

Möglicherweise benötigt die Ausprägung der Stresseffekte auf die Hirnentwicklung auch Zeit, um messbare Effekte zu induzieren. Da die Feten, welche im dritten Trimester MPS ausgesetzt waren, nur 10 Tage nach Ende der Stressperiode untersucht wurden, könnte dies theoretisch den fehlenden Nachweis von Effekten von MPS im 3. Trimester auf die Hirnentwicklung erklären. Dieser Effekt ist jedoch nicht sehr wahrscheinlich, da die für Stress vulnerablen Prozesse der neuronalen Migration, Netzbildung und Myelinisierung primär in der frühen Schwangerschaft ablaufen (Rakic 1988). Nichtsdestotrotz sollten postnatale Untersuchungen angestrebt werden, um mögliche langfristige Folgen nicht nur von Stress in der frühen Schwangerschaft sondern auch von Stress in der späten Schwangerschaft nachzuweisen.

## 8 Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse stimmen mit klinischen Studien überein, welche stärkere Auswirkungen von MPS während der frühen im Gegensatz zur späten Schwangerschaft auf das Verhalten und die neuropsychiatrische Entwicklung der Kinder fanden (Van den Bergh et al. 2017). So konnten wir zeigen, dass eine chronische MPS-Exposition während des ersten und zweiten, aber nicht während des dritten Trimesters komplexe Auswirkungen auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes und die Myelinisierung im fetalen Schafhirn hat. Parallel zu den Stresseffekten auf die strukturelle Gehirnentwicklung in dieser Studie, insbesondere auch die reduzierte Ausbildung der neuronalen Fortsätze und der synaptischen Dichte im Hippocampus als Teil des limbischen Systems, konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine höhere Empfindlichkeit der HNN-Achse gegenüber den programmierenden Effekten von MPS während des ersten und zweiten im Gegensatz zum dritten Trimester zeigen (Rakers et al. 2012). Diese Effekte werden höchstwahrscheinlich durch eine epigenetische Desensitivierung von GC-Rezeptoren im limbischen System, das auch in die negative Rückkopplung der HHN-Achse involviert ist, vermittelt (Cao et al. 2014). Durch eine Einschränkung des negativen Feedbackmechanismus kommt es später zu einer stärkeren Cortisol-Ausschüttung im Rahmen einer Stressantwort (Rakers et al. 2017). Erhöhte Cortisolspiegel im späteren Leben, die durch die von MPS programmierte Hyperaktivität der Stressachse verursacht werden, haben ebenfalls Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit, kognitive Hirnfunktion und Prädisposition für neuropsychiatrische Erkrankungen (Le Menuet und Lombes 2014, McEwen et al. 2016). MPS kann damit sowohl über die Programmierung der HHN-Achse als auch über die Beeinflussung der strukturellen Gehirnentwicklung zu neuropsychiatrischen Auffälligkeiten im späteren Leben führen. Der konkrete Beitrag dieser Mechanismen zur Entwicklung der einzelnen neuropsychiatrischen Auffälligkeiten muss in zukünftigen Studien gezeigt werden. Die von uns nachgewiesenen Stresseffekte auf die strukturelle Gehirnentwicklung scheinen länger anhaltend zu sein, da sie auch nach einer Erholungszeit von 30 Tagen nach Ende der Stressperiode noch zu finden waren. Eine Untersuchung der strukturellen und funktionellen Auswirkungen im späteren Lebensalter ist jedoch notwendig. Um die Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, könnten zukünftige Studien beim Menschen Aberrationen im neuronalen Netzwerk und Myelinisierungsstörungen nach MPS im fetalen MRT und die langfristige funktionelle Relevanz dieser Veränderungen z.B. anhand von resting state Untersuchungen und dem Nachweis neuropsychiatrischer Auffälligkeiten bestimmen.

Kognitive Störungen und neuropsychiatrische Erkrankungen sind von sehr hoher individueller, gesellschaftlicher und ökonomischer Relevanz (Van den Bergh et al. 2018). Die Möglichkeit frühzeitiger stresspräventiver aber auch interventioneller Maßnahmen, z.B. durch eine erhöhte Zuwendung, wie es für Ratten gezeigt werden konnte (Meaney und Szyf 2005), welche das Auftreten kognitiver Störungen und neuropsychiatrischer Auffälligkeiten als Folge von MPS verhindern oder zumindest abschwächen könnten, ist daher ein bedeutendes Ziel aktueller Forschung. Allerdings lassen die bisherigen Daten noch keine definitiven Aussagen zu, welche prä- und postnatalen Interventionen beim Menschen dazu geeignet wären. Deshalb ist derzeit eine Stressprävention, insbesondere im ersten und zweiten Trimester, wenn der Mutterschutz noch nicht besteht, die Maßnahme der Wahl, solange mögliche Interventionen beim Menschen nicht untersucht sind.

## 9 Literatur und Quellenverzeichnis

- Andrews MH, Matthews SG. 2000. Regulation of glucocorticoid receptor mRNA and heat shock protein 70 mRNA in the developing sheep brain. *Brain Res*, 878 (1-2):174-182.
- Anegroaie P, Frasch MG, Rupprecht S, Antonow-Schlorke I, Muller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2017. Development of somatosensory-evoked potentials in foetal sheep: effects of betamethasone. *Acta Physiol (Oxf)*, 220 (1):137-149.
- Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW. 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *Journal of Physiology-London*, 547 (1):117-123.
- Antonow-Schlorke I, Muller T, Brodhun M, Wicher C, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2007. Betamethasone-related acute alterations of microtubule-associated proteins in the fetal sheep brain are reversible and independent of age during the last one-third of gestation. *Am J Obstet Gynecol*, 196 (6):553.e1-553.e6.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Coksaygan T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M. 2009. Adverse effects of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol*, 113 (1):142-151.
- Ballard PL, Ballard RA. 1995. Scientific Basis and Therapeutic Regimens for Use of Antenatal Glucocorticoids. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173 (1):254-262.
- Barker DJ. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, 95 (2):115-128.
- Barlow RM. 1969. Foetal Sheep - Morphogenesis of Nervous System and Histochemical Aspects of Myelination. *Journal of Comparative Neurology*, 135 (3):249-261.
- Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X. 1993. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14 (1):83-144.
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CRW, Seckl JR. 1997. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: A key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clinical Endocrinology*, 46 (2):161-166.
- Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Garcia CV, Rohde S, Say L, Lawn JE. 2012. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet*, 379 (9832):2162-2172.
- Boersma GJ, Bale TL, Casanello P, Lara HE, Lucion AB, Suchecki D, Tamashiro KL. 2014. Long-term impact of early life events on physiology and behaviour. *J Neuroendocrinol*, 26 (9):587-602.
- Braun K, Bock J, Wainstock T, Matas E, Gaisler-Salomon I, Fegert J, Ziegenhain U, Segal M. 2017. Experience-induced transgenerational (re-)programming of neuronal structure and functions: Impact of stress prior and during pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev*. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.05.021
- Brodhun M, Mueller T, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M. 2004. Neurogenesis and programmed cell death (PCD) during development of the fetal sheep brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 11 (2):253a-253a.
- Buss C, Davis EP, Muftuler LT, Head K, Sandman CA. 2010. High pregnancy anxiety during mid-gestation is associated with decreased gray matter density in 6-9-year-old children. *Psychoneuroendocrinology*, 35 (1):141-153.
- Cao XJ, Laplante DP, Brunet A, Ciampi A, King S. 2014. Prenatal Maternal Stress Affects Motor Function in 5 1/2-Year-Old Children: Project Ice Storm. *Developmental Psychobiology*, 56 (1):117-125.

- Carson R, Monaghan-Nichols AP, DeFranco DB, Rudine AC. 2016. Effects of antenatal glucocorticoids on the developing brain. *Steroids*, 114:25-32.
- Chapman K, Holmes M, Seckl J. 2013. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiological Reviews*, 93 (3):1139-1206.
- Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. 2010. Prenatal stress and brain development. *Brain Res Rev*, 65 (1):56-79.
- Colberg C, Antonow-Schlorke I, Muller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M. 2004. Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0.75 of gestation. *Neuroscience Letters*, 364 (2):130-134.
- Coulon M, Wellman CL, Marjara IS, Janczak AM, Zanella AJ. 2013. Early adverse experience alters dendritic spine density and gene expression in prefrontal cortex and hippocampus in lambs. *Psychoneuroendocrinology*, 38 (7):1112-1121.
- Coulon M, Nowak R, Andanson S, Petit B, Levy F, Boissy A. 2015. Effects of prenatal stress and emotional reactivity of the mother on emotional and cognitive abilities in lambs. *Developmental Psychobiology*, 57 (5):626-636.
- Crowley PA. 1995. Antenatal corticosteroid therapy: a meta-analysis of the randomized trials, 1972 to 1994. *Am J Obstet Gynecol*, 173 (1):322-335.
- Cunningham CL, Martinez-Cerdeno V, Noctor SC. 2013. Microglia Regulate the Number of Neural Precursor Cells in the Developing Cerebral Cortex. *Journal of Neuroscience*, 33 (10):4216-4233.
- Darlington RB, Dunlop SA, Finlay BL. 1999. Neural development in metatherian and eutherian mammals: variation and constraint. *J Comp Neurol*, 411 (3):359-368.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Vaneecken JAM, Sutanto W, Levine S. 1988. Stress, Glucocorticoids and Development. *Progress in Brain Research*, 73:101-120.
- Desplats P, Gutierrez AM, Antonelli MC, Frasch MG. 2019. Microglial memory of early life stress, epigenetic mechanisms and susceptibility to neurodegeneration in adulthood. *arXiv preprint arXiv:1901.00099*
- Dobbing J, Sands J. 1979. Comparative Aspects of the Brain Growth Spurt. *Early Human Development*, 3 (1):79-83.
- Dreiling M, Bischoff S, Schiffner R, Rupprecht S, Kiehnopf M, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M, Rakers F. 2016. Stress-induced decrease of uterine blood flow in sheep is mediated by alpha 1-adrenergic receptors. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress*, 19 (5):547-551.
- Dubin SB. 1990. Assessment of Fetal Lung Maturity - in Search of the Holy-Grail. *Clinical Chemistry*, 36 (11):1867-1869.
- Dufoix R, Charil A, Laplante DP, Paus T, Pruessner J, King S. 2015. Prenatal maternal stress from a natural disaster predicts hippocampus volumes in males at age 11: Project Ice Storm. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 47:12.
- Esch T, Stefano GB, Fricchione GL, Benson H. 2002. The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuro Endocrinol Lett*, 23 (3):199-208.
- Favaro A, Tenconi E, Degortes D, Manara R, Santonastaso P. 2015. Neural correlates of prenatal stress in young women. *Psychological Medicine*, 45 (12):2533-2543.
- Fontein-Kuipers YJ, Nieuwenhuijze MJ, Ausems M, Bude L, de Vries R. 2014. Antenatal interventions to reduce maternal distress: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. *Bjog-an International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 121 (4):389-397.
- Gibbons A. 1998. Solving the brain's energy crisis. *Science*, 280 (5368):1345-1347.
- Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. 2010. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*, 35 (1):17-22.

- Grace T, Bulsara M, Robinson M, Hands B. 2016. The Impact of Maternal Gestational Stress on Motor Development in Late Childhood and Adolescence: A Longitudinal Study. *Child Development*, 87 (1):211-220.
- Hanamsagar R, Bilbo SD. 2016. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160:127-133.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF. 1996. Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140 (1):43-52.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 24 (3):151-180.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA. 2001. Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19 (4):415-425.
- Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. 2009. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat*, 3:5.
- Jensen Pena C, Monk C, Champagne FA. 2012. Epigenetic effects of prenatal stress on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PLoS One*, 7 (6):e39791.
- Le Menuet D, Lombes M. 2014. The neuronal mineralocorticoid receptor: from cell survival to neurogenesis. *Steroids*, 91:11-19.
- Liggins GC, Howie RN. 1972. Controlled Trial of Antepartum Glucocorticoid Treatment for Prevention of Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants. *Pediatrics*, 50 (4):515-525.
- Liston C, Gan WB. 2011. Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (38):16074-16079.
- Magyar DM, Fridshal D, Elsner CW, Glatz T, Eliot J, Klein AH, Lowe KC, Buster JE, Nathanielsz PW. 1980. Time-Trend Analysis of Plasma-Cortisol Concentrations in the Fetal Sheep in Relation to Parturition. *Endocrinology*, 107 (1):155-159.
- Mahony R, McKeating A, Murphy T, McAuliffe F, O'Herlihy C, Foley M. 2010. Appropriate antenatal corticosteroid use in women at risk for preterm birth before 34 weeks of gestation. *BJOG*, 117 (8):963-967.
- McEwen BS, Nasca C, Gray JD. 2016. Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, 41 (1):3-23.
- McIntosh GH, Baghurst KI, Potter BJ, Hetzel BS. 1979. Foetal brain development in the sheep. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 5 (2):103-114.
- Meaney MJ, Szyf M. 2005. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci*, 7 (2):103-123.
- Moisiadis VG, Matthews SG. 2014a. Glucocorticoids and fetal programming part 1: outcomes. *Nature Reviews Endocrinology*, 10 (7):391-402.
- Moisiadis VG, Matthews SG. 2014b. Glucocorticoids and fetal programming part 2: mechanisms. *Nat Rev Endocrinol*, 10 (7):403-411.
- Monk C, Feng TS, Lee S, Krupska I, Champagne FA, Tycko B. 2016. Distress During Pregnancy: Epigenetic Regulation of Placenta Glucocorticoid-Related Genes and Fetal Neurobehavior. *American Journal of Psychiatry*, 173 (7):705-713.

- Morrison JL, Berry MJ, Botting KJ, Darby JRT, Frasch MG, Gatford KL, Giussani DA, Gray CL, Harding R, Herrera EA, Kemp MW, Lock MC, McMillen IC, Moss TJ, Musk GC, Oliver MH, Regnault TRH, Roberts CT, Soo JY, Tellam RL. 2018. Improving pregnancy outcomes in humans through studies in sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 315 (6):R1123-R1153.
- Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P. 1986. Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol*, 103 (6 Pt 1):2511-2527.
- Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, Brambilla C, Brambilla E. 1996. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem*, 44 (9):959-968.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. 2002. Neurobiology of depression. *Neuron*, 34 (1):13-25.
- O'Donnell KJ, Jensen AB, Freeman L, Khalife N, O'Connor TG, Glover V. 2012. Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11 beta-HSD2. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (6):818-826.
- Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. 2004. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Brain Res Dev Brain Res*, 149 (2):85-92.
- Pattanittum P, Ewens MR, Laopaiboon M, Lumbiganon P, McDonald SJ, Crowther CA, Group S-OS. 2008. Use of antenatal corticosteroids prior to preterm birth in four South East Asian countries within the SEA-ORCHID project. *BMC Pregnancy Childbirth*, 8:47.
- Petit B, Boissy A, Zanella A, Chaillou E, Andanson S, Bes S, Levy F, Coulon M. 2015. Stress during pregnancy alters dendritic spine density and gene expression in the brain of new-born lambs. *Behavioural Brain Research*, 291:155-163.
- Phillips DI, Davies MJ, Robinson JS. 2001. Fetal growth and the fetal origins hypothesis in twins--problems and perspectives. *Twin Res*, 4 (5):327-331.
- Qiu A, Rifkin-Graboi A, Chen H, Chong YS, Kwek K, Gluckman PD, Fortier MV, Meaney MJ. 2013. Maternal anxiety and infants' hippocampal development: timing matters. *Translational Psychiatry*, 3 (9):e306.
- Radley JJ, Rocher AB, Miller M, Janssen WGM, Liston C, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH. 2006. Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*, 16 (3):313-320.
- Raikkonen K, Seckl JR, Pesonen AK, Simons A, Van den Bergh BR. 2011. Stress, glucocorticoids and liquorice in human pregnancy: programmers of the offspring brain. *Stress*, 14 (6):590-603.
- Rakers F, Rupprecht S, Dreiling M, Bergmeier C, Witte OW, Schwab M. 2017. Transfer of maternal psychosocial stress to the fetus. *Neurosci Biobehav Rev*. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.02.019
- Rakers F, Frauendorf V, Rupprecht S, Schiffner R, Bischoff SJ, Kiehntopf M, Reinhold P, Witte OW, Schubert H, Schwab M. 2012. Effects of early- and late-gestational maternal stress and synthetic glucocorticoid on development of the fetal hypothalamus-pituitary-adrenal axis in sheep. *Stress-the International Journal on the Biology of Stress*, 16 (1):122-129.
- Rakers F, Bischoff S, Schiffner R, Haase M, Rupprecht S, Kiehntopf M, Kuhn-Velten WN, Schubert H, Witte OW, Nijland MJ, Nathanielsz PW, Schwab M. 2015. Role of catecholamines in maternal-fetal stress transfer in sheep. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213 (5):684.e1-684.e9.
- Rakic P. 1988. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. *Prog Brain Res*, 73:15-37.

- Reul JM, de Kloet ER. 1985. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117 (6):2505-2511.
- Robertson B, Curstedt T, Tubman R, Strayer D, Berggren P, Kok J, Koppe J, Vansonderen L, Halliday H, McClure G, Reid M, Oetemo SB, Okken A, Speer C, Schroter W, Svenningsen N, Walti H, Relier JP. 1992. A 2-Year Follow-up of Babies Enrolled in a European Multicenter Trial of Porcine Surfactant Replacement for Severe Neonatal Respiratory-Distress Syndrome. *European Journal of Pediatrics*, 151 (5):372-376.
- Scheinost D, Sinha R, Cross SN, Kwon SH, Sze G, Constable RT, Ment LR. 2017. Does prenatal stress alter the developing connectome? *Pediatr Res*, 81 (1-2):214-226.
- Schneider ML, Roughton EC, Koehler AJ, Lubach GR. 1999. Growth and development following prenatal stress exposure in primates: an examination of ontogenetic vulnerability. *Child Dev*, 70 (2):263-274.
- Schneider ML, Moore CF, Kraemer GW, Roberts AD, DeJesus OT. 2002. The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinology*, 27 (1-2):285-298.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Schwab M. 2009. [Intrauterine programming of disorders of brain function in later life]. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch*, 49 (1):13-28.
- Schwab M, Coksaygan T, Rakers F, Nathanielsz PW. 2012. Glucocorticoid exposure of sheep at 0.7 to 0.75 gestation augments late-gestation fetal stress responses. *Am J Obstet Gynecol*, 206 (3):253.e16-253.e22.
- Schwab M, Wichmann G, Maurer I, Loehle M, Nathanielsz PW, Witte OW. 2006. Antenatal glucocorticoids (GC) suppress mitochondrial activity but do not decrease ATP content in the fetal ovine brain. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 13 (2):306a.
- Schwab M, Heinemann S, Schwab K, Thoms I, Rupprecht S, Hoyer H, Ligges C, Hoyer D, Schleussner E. 2010. Effects of Prenatal Betamethasone (BM) Exposure on Cortical Activity at the Age of Eight Years-A Pilot Study. *Reproductive Sciences*, 17 (3):292a-293a.
- Sevier AC, Munger BL. 1965. Technical Note: A Silver Method for Paraffin Sections of Neural Tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*, 24:130-135.
- Simcock G, Kildea S, Elgbeili G, Laplante DP, Stapleton H, Cobham V, King S. 2016. Age-Related Changes in the Effects of Stress in Pregnancy on Infant Motor Development by Maternal Report: The Queensland Flood Study. *Developmental Psychobiology*, 58 (5):640-659.
- Stiles J, Jernigan TL. 2010. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*, 20 (4):327-348.
- Suzuki A, Inuma M, Hayashi S, Sato Y, Azuma K, Kubo K. 2016. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced hypomyelination, synaptic alterations, and learning impairment in mouse offspring. *Brain Research*, 1651:36-43.
- Ter Heegde F, De Rijk RH, Vinkers CH. 2015. The brain mineralocorticoid receptor and stress resilience. *Psychoneuroendocrinology*, 52:92-110.
- Tijsseling D, Wijnberger LD, Derks JB, van Velthoven CT, de Vries WB, van Bel F, Nikkels PG, Visser GH. 2012. Effects of antenatal glucocorticoid therapy on hippocampal histology of preterm infants. *PLoS One*, 7 (3):e33369.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J. 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav*, 28 (4):336-348.
- Van den Bergh BRH, Dahnke R, Mennes M. 2018. Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. *Dev Psychopathol*, 30 (3):743-762.



- Van den Bergh BRH, van den Heuvel MI, Lahti M, Braeken M, de Rooij SR, Entringer S, Hoyer D, Roseboom T, Raikkonen K, King S, Schwab M. 2017. Prenatal developmental origins of behavior and mental health: The influence of maternal stress in pregnancy. *Neurosci Biobehav Rev*. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.07.003
- Weinstock M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev*, 32 (6):1073-1086.
- WHO. 2008. Maternal mental health and child health and development in low and middle income countries: report of the meeting, Geneva, Switzerland, 30 January-1 February, 2008. URL: [https://www.who.int/mental\\_health/prevention/suicide/mmh\\_jan08\\_meeting\\_report.pdf](https://www.who.int/mental_health/prevention/suicide/mmh_jan08_meeting_report.pdf) [Stand 04.03.2020]
- Xu J, Yang B, Yan C, Hu H, Cai S, Liu J, Wu M, Ouyang F, Shen X. 2013. Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain Res*, 1527:57-66.
- Yang K, Jones SA, Challis JRG. 1990. Changes in Glucocorticoid Receptor Number in the Hypothalamus and Pituitary of the Sheep Fetus with Gestational-Age and after Adrenocorticotropin Treatment. *Endocrinology*, 126 (1):11-17.

## **10 Anhang**

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. Matthias Schwab, Herr Dr. Florian Rakers, Herr Dr. Sven Rupprecht, Frau Iwa Antonow-Schlorke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Marburg, den 03.06.2020

Markus Hermes

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei meinem Vater für das frühe Interesse an der Medizin bedanken, bei Prof. Olaf Witte und dem IZKF für die Unterstützung durch das Stipendium, bei Dr. Sven Rupprecht, Dr. Florian Rakers und Dr. Michelle Dreiling für die Beratung bei der statistischen Auswertung und beim Publikationsverfahren sowie bei Ina Ingrisch für die Hilfe bei den histologischen Färbungen im Labor. Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Matthias Schwab für die Vergabe des Promotionsthemas und die unzähligen Stunden im Büro sowie bei Iwa Antonow-Schlorke für die Betreuung der Promotion und die gemeinsame Arbeit an der Publikation. Meiner Ehefrau möchte ich für die wundervollen gemeinsamen Jahre danken.