

**Soziale Belastung während der Trächtigkeit bei
Long-Evans Laborratten (*Rattus norvegicus*) und ihre
Effekte auf die Reproduktion sowie die Physiologie,
das Verhalten und die Reproduktion ihrer Nachkommen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

Lehrstuhl Tierphysiologie
(PD. Dr. Volker Stefanski)

vorgelegt von
Alexander Götz
aus Kirchlauter
Juli 2007

**Soziale Belastung während der Trächtigkeit bei
Long-Evans Laborratten (*Rattus norvegicus*) und ihre
Effekte auf die Reproduktion sowie die Physiologie,
das Verhalten und die Reproduktion ihrer Nachkommen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

Lehrstuhl Tierphysiologie
(PD. Dr. Volker Stefanski)

vorgelegt von
Alexander Götz
aus Kirchlauter
Juli 2007

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Februar 2004 bis Juli 2007 am Lehrstuhl Tierphysiologie der Universität Bayreuth unter Betreuung von PD Dr. Volker Stefanski angefertigt.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth zur Erlangung des akademischen Grades – Doktor der Naturwissenschaften – genehmigten Dissertation.

Promotionsgesuch eingereicht am: 25. Juli 2007

Tag des wissenschaftlichen Kolloquiums: 15. November 2007

Prüfungsausschuss:

PD Dr. Volker Stefanski	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Dietrich von Holst	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Konrad Dettner	(Vorsitzender)
Prof. Dr. Klaus H. Hoffmann	
Prof. Dr. Franz X. Schmid	

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn PD. Dr. Volker Stefanski ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit angefertigt haben zu dürfen. Vielen Dank für die gewährte Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr. Dietrich von Holst für die Möglichkeit, diese Arbeit am Lehrstuhl Tierphysiologie anfertigen zu können, sowie seine konstruktiven Vorschläge und seine Diskussionsbereitschaft.

Ein Dankeschön an Dr. Wolf Stöhr für seine Unterstützung in technischen Angelegenheiten und seine Hilfsbereitschaft.

Dr. Heiko Rödel danke ich für seine Unterstützung in Fragen statistischer Auswertungen und seine stete Gesprächs- und Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch all denjenigen, die mich bei Blutentnahmen und auch anderweitig (im Labor) unterstützt haben (Adrienne Hogg, Antje Bauer, Juliane Klose, Kathrin Jädicke, Marco Fuhrmann, Martin Wolf, Melanie Übelhör, Michael Romio, Sabrina Wittlinger und Simone Bauer).

Vielen Dank an die Mitarbeiter des Laborteams, Andrea Berger und Inge Zerenner-Fritzsche, für ihre Unterstützung und an alle Angehörigen des Lehrstuhls Tierphysiologie für das nette Arbeitsklima.

Viel Dank gilt meiner Familie, Barbara und meinen Mitbewohnern Armin und Lutz für ihre Geduld und ihre moralische Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Manuskripte

Götz A. A., Wolf M., Stefanski V. (2007). **Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats.**

In Press: "Physiology & Behavior" doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.009

Götz A. A., Stefanski V. (2007). **Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring.**

Published in "Physiology & Behavior" 90(1): 108-115.

Götz A. A., Wittlinger S., Stefanski V. (2007). **Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events.**

Published in "Journal of Neuroimmunology" 185(1-2): 95-102

Inhaltsverzeichnis

Ausführliche Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1. Einführung und Stand der Forschung.....	1
1.2. Sozialer Stress, Hormone und Immunsystem	2
1.3. Glucocorticoide und intrauterines Milieu	3
1.4. Maternaler / Pränataler Stress.....	4
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	6
2. Tiere, Material und Methoden	7
2.1. Tiere, Abstammung, Herkunft und Haltung.....	7
2.2. Maternale Belastung und pränatal gestresster Nachwuchs	7
2.3. Durchgeführte Tests und Methoden	8
2.3.1. Aufnahme reproduktionsrelevanter Parameter der F0-Generation	8
2.3.2. Frühe Jungtierparameter der F1-Generation	9
2.3.3. Aufnahme reproduktionsrelevanter Parameter der F1-Generation	9
2.3.4. Verhaltenstests an adulten männlichen F1-Nachkommen	9
2.3.5. Physiologische Untersuchungen an adulten männlichen F1-Nachkommen	10
2.3.5.1. Endokrine Untersuchungen	10
2.3.5.2. Immunologische Untersuchungen.....	10
2.3.6. Physiologische Untersuchungen an adulten männlichen F1-Nachkommen nach sozialer Belastung (Resident-Intruder-Konfrontation)	11
3. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	13
3.1. Einfluss maternaler Belastung auf den Reproduktionserfolg (F0-Generation) und frühe Jungtiercharakteristika der F1-Generation.....	13
3.2. Physiologie adulter männlicher F1-Nachkommen unter Standardhaltungsbedingungen.....	14
3.2.1. Serum-Corticosteron-Konzentrationen	14
3.2.2. Anzahl und Funktion immunrelevanter Zellen des Blutes (Basal)	14
3.3. Physiologie adulter männlicher F1-Nachkommen unter sozialer Belastung	15
3.3.1. Pränataler Stress und postnataler sozialer Konflikt: Corticosteronkonzentration und Körpermasse der F1-Männchen.....	15

3.3.2. Pränataler Stress und postnataler sozialer Konflikt: Anzahl und Funktionalität der Immunzellen im Blut.....	16
3.4 Verhalten adulter männlicher F1-Nachkommen	16
3.5 Einfluss pränataler Belastung auf den Reproduktionserfolg (F1-Generation).....	18
4. Gesamtdiskussion	20
5. Zusammenfassung	30
6. English Summary	32
7. Literaturverzeichnis	34
8. Erklärung über den geleisteten Eigenanteil an den wissenschaftlichen Veröffentlichungen / Manuskripten	46
9. Erklärung	48

Eigene wissenschaftliche Veröffentlichungen / Manuskripte

Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats.	49
Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring.	66
Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events.	91

Ausführliche Zusammenfassung

1. Einleitung

1.1 Einführung und Stand der Forschung

Seit langem beschäftigt sich der Mensch mit der Frage nach der wechselseitigen Beeinflussung von Körper und Psyche. Heutzutage besteht kein Zweifel mehr daran, dass Stressoren das Immunsystem in vielfältiger Form beeinflussen können (Monjan und Collector, 1977; Rogers et al., 1979; Ader et al., 1991; Herbert und Cohen, 1993) und sowohl die Anfälligkeit gegenüber Infekten erhöhen als auch die Entstehung bzw. Ausbreitung von Tumoren begünstigen können (z.B. Cohen und Williamson, 1991; Stefanski und Ben-Eliyahu, 1996). Wie aus epidemiologischen Untersuchungen am Menschen hervorgeht, können psychische Belastungssituationen mit zahlreichen Veränderungen wichtiger Parameter des Immunsystems verbunden sein, die wiederum mit einem erhöhten Krankheitsrisiko in Beziehung stehen (Arnetz et al., 1987; Kiecolt-Glaser et al., 1987; Biondi und Picardi, 1996). Hierzu zählen Situationen wie etwa der Tod des Lebenspartners, die Pflege eines chronisch kranken Familienangehörigen oder der Verlust des Arbeitsplatzes.

Aufgrund ethischer Bedenken ist es am Menschen oftmals nur schwer oder gar nicht möglich, wichtige immunologische Aspekte stressinduzierter Erkrankungen durch gezielte Manipulation am Probanden zu untersuchen. Die Untersuchung des Immunsystems ist jedoch erforderlich, um zugrunde liegende physiologische Mechanismen, die zu Erkrankungen führen, verstehen zu können. Hierzu zählt auch die Verwendung spezifischer Krankheitsmodelle, um die kausalen Beziehungen zwischen Immunsuppression und Krankheit herstellen zu können. Aus diesem Grund stammt die Mehrheit der Erkenntnisse über stressassoziierte Veränderungen des Immunsystems aus Untersuchungen an Tieren, speziell an Laborratten. Hierbei wurden Labortiere vorwiegend artifiziellen, also künstlichen Laborstressoren wie beispielsweise Immobilisierung, intermittierenden Elektroschocks, Hitze- und Kältestress oder Kaltwasserschwimmen ausgesetzt (Übersicht in Ader et al., 1991), um einen physiologischen Belastungszustand zu induzieren. Diese Stressoren können eine Vielzahl von Veränderungen in der humoralen und zellulären Immunantwort hervorrufen (Millan et al., 1996; Tournier et al., 2001; Zheng und Ariizumi, 2007) und darüber hinaus auch endokrine Parameter beeinflussen. So zeigte sich ein Anstieg der Katecholamine sowie der Corticosteroide Cortisol (Morrow-Tesch et

al., 1993) und Corticosteron (Jain et al., 1996; De Groot et al., 1999), welche bei Säugetieren bedeutende Stresshormone darstellen. Allerdings beinhaltet die Verwendung derartiger Stressoren das Problem, dass in der Regel weder Mensch noch Tier solchen Belastungssituationen in ihrer natürlichen Umgebung ausgesetzt sind. Es stellt sich daher die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Ergebnisse (Blanchard et al., 1995; Koolhaas et al., 1997; De Groot et al., 1999; Sgoifo et al., 1999). Daher sind Untersuchungen erforderlich, welche die natürlichen Bedingungen besser wiedergeben.

1.2 Sozialer Stress, Hormone und Immunsystem

Viele Säugetiere sind unter natürlichen Bedingungen in ein enges Sozialgefüge integriert. Diese Sozialgefüge werden durch soziopositive wie auch agonistische Interaktionen zwischen den Mitgliedern einer sozialen Gruppe etabliert und aufrechterhalten. Dabei haben agonistische Interaktionen oftmals entscheidenden Anteil an der Ausbildung von Dominanzbeziehungen. Untersuchungen konnten zeigen, dass sowohl das Behaupten wie auch der Verlust der eigenen Rangposition infolge sozialer Unterlegenheit eine erhebliche Belastung für das jeweilige Individuum darstellen kann (Davis und Christian, 1957; Raab et al., 1986; von Holst, 1986; Fleshner et al., 1989; Stefanski und Engler, 1999; Stefanski et al., 2001) und zu immunologischen, endokrinen und das Verhalten betreffende Veränderungen führen, woraus sich auch gesundheitliche Folgen ergeben könnten. Einen in diesem Zusammenhang häufig verwendeten Laborstressor stellt die soziale Konfrontation männlicher Artgenossen dar. Sie führt bei vielen Tierarten zu agonistischen Interaktionen und zur Ausbildung einer Dominanzbeziehung. Bei Ratten und Mäusen zählt die *Resident-Intruder*-Konfrontation zu einer der klassischen Methoden (Barnett, 1958; Miczek, 1979; Raab et al., 1986; Stefanski und Engler, 1998). Dabei basiert der soziale Konflikt auf der Verteidigung des eigenen Geheges durch ein ansässiges residentes Tier (Residenter) gegenüber unverwandten Artgenossen. Das eigentliche Versuchstier ist ein konfrontationsunerfahrenes Männchen (Intruder). Dieses wird in ein ihm unbekanntes Gehege zu einem fremden, gleichgeschlechtlichen Konfrontationspartner (Residenter) gesetzt. Dies löst zwischen beiden Tieren Kämpfe um die Dominanz aus. Die Konfrontationserfahrung des Residenten, sowie die Unvertrautheit des Intruders mit dem Gehege führen in der Regel zur Unterwerfung des Intruders durch das residente Tier. Diese Form der Konfrontation kann auch bei weiblichen Tieren angewandt werden (Stefanski et

al., 2005). Wie solche Experimente mit Laborratten gezeigt haben, werden neben einer neuroendokrinen Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems (HPA-Achse) und des Sympathicus-Nebennierenmark-Systems (Bartolomucci et al., 2005; Ebner et al., 2005) auch immunologische Veränderungen im peripheren Blut und den sekundären lymphatischen Organen hervorgerufen. Insbesondere bei unterlegenen Männchen konnte man eine starke Beeinträchtigung der humoralen Immunabwehr, sowie deutliche Veränderungen in Anzahl und Funktion von Immunzellen beobachten (Raab et al., 1986; Fleshner et al., 1989; Stefanski und Engler, 1998). Untersuchungen unter Verwendung spezifischer Krankheitsmodelle zeigten zudem, dass soziale Stressoren die Wahrscheinlichkeit eines erneuten Ausbruchs einer latent vorliegenden *Herpes simplex* Virusinfektion erhöhen (Padgett et al., 1998), sowie die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen (Stefanski und Ben-Eliyahu, 1996). In letztgenanntem Fall bestand ein direkter Zusammenhang zwischen Stress, Immunsuppression und erhöhter Tumorraten.

1.3 Glucocorticoide und intrauterines Milieu

Glucocorticoide haben bei adulten Tieren entscheidenden Anteil an der Regulation einer Vielzahl physiologischer Prozesse, wie beispielsweise Stoffwechsel, Elektrolythaushalt und Immunreaktionen (Geley et al., 1996) und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Außerdem sind sie essentiell für eine adäquate Antwort des Organismus auf verschiedenartige Stressoren (Munck et al., 1984; Nyirenda und Seckl, 1998). Diese Antwort führt zu einer Mobilisierung von Energiereserven in Vorbereitung auf längerfristig gesteigerte Aktivität. Während die nur kurzzeitige Aktivierung der HPA-Achse auf akute Stressoren für ein Individuum nützlich bzw. zumindest ungefährlich ist, kann ihre chronische Hyperaktivierung mit der Unterdrückung anaboler Prozesse, einer Erschöpfung der Energiereserven und Suppression des Immunsystems einhergehen und somit drastische Folgen für den Organismus haben (Kofman, 2002; Tsigos und Chrousos, 2002).

Glucocorticoide sind bei den meisten Säugetieren, der Mensch inbegriffen, aber auch in die fötale Entwicklung und Reifung einbezogen (Ballard, 1979). Die Exposition des Fötus im Mutterleib gegenüber erhöhten maternalen Glucocorticoidkonzentrationen steht mit verschiedenen physiologischen und ethologischen Veränderungen des Nachwuchses in Beziehung. Hierzu gehören beispielsweise ein verlangsamtes Wachstum oder eine

Verschlechterung der Feedback-Regulation der HPA-Achse sowie ängstliches und depressionsähnliches Verhalten (Übersicht in: Weinstock, 2005). Befunde am Menschen konnten zeigen, dass eine Verbindung zwischen einem geringen Geburtsgewicht und im späteren Leben auftretenden Stoffwechsel- und Herz-Kreislaufkrankungen besteht (Barker et al., 1993).

1.4 Maternaler / Pränataler Stress

Maternaler Stress kann definiert werden als die Auswirkung eines Stressors auf das trüchtige Weibchen. Untersuchungen auf diesem Gebiet beschäftigen sich im Allgemeinen mit den physiologischen Veränderungen im weiblichen Organismus, die mit der Belastungssituation durch den Stressor einhergehen (Stefanski et al., 2005) sowie mit dem reproduktiven Erfolg des Weibchens (Euker und Riegle, 1973; Pollard, 1984; Lordi et al., 2000).

Effekte maternalen Stresses auf die Reproduktion wurden bereits sehr früh an Säugetieren untersucht (z.B. Christian und Lemunyan, 1958). Viele der vorliegenden Befunde, die vornehmlich aus Studien an Laborratten stammen, sind allerdings widersprüchlich: Einerseits zeigen sie einen negativen Einfluss maternaler Belastung in Form einer Verminderung der Wurfgröße oder einer erhöhten Mortalitätsrate der Neugeborenen (Euker und Riegle, 1973; Wildt et al., 1975; Pollard, 1984; de Catanzaro, 1988; Lordi et al., 2000; Tuchscherer et al., 2002), sowie auch einen Einfluss auf die Trächtigkeitsdauer der Mütter und das Geschlechterverhältnis eines Wurfes. Letzteres bedeutet oftmals eine Verschiebung hin zum weiblichen Geschlecht (Pollard, 1984; Clutton-Brock und Iason, 1986; Glöckner und Karge, 1991; Sobrian et al., 1997; Lordi et al., 2000; Lesage et al., 2004). Andererseits zeigen viele Studien an Laborratten auch keine Effekte mütterlicher Belastung auf die eben genannten Parameter (Poltyrev et al., 1996; Llorente et al., 2002; Griffin et al., 2003; Morley-Fletcher et al., 2003b; Estanislau und Morato, 2005).

Pränataler Stress bezeichnet den Einfluss eines Stressors auf den sich entwickelnden Fötus, welcher durch die Belastungssituation der Mutter vermittelt wird. Studien auf diesem Gebiet beschäftigen sich mit einer Vielzahl physiologischer und ethologischer Parameter des Nachwuchses. Hierzu gehört beispielsweise die frühe Jungtierentwicklung hinsichtlich Körpermasse, die Entwicklung endokriner und immunologischer Werte, wie auch Kognition, Lernfähigkeit und Ängstlichkeit. Untersuchungen dieser Art beschränken sich

nicht nur auf die frühe postnatale Phase, sondern werden auch am erwachsenen Tier untersucht, um die Dauerhaftigkeit möglicher im Kindheits- und Jugendalter beobachteter Effekte und Veränderungen zu überprüfen (Klein und Rager, 1995; Kay et al., 1998; Kofman, 2002; Llorente et al., 2002; Austin et al., 2005; Kaiser und Sachser, 2005; Kapoor und Matthews, 2005).

Die Auswirkungen pränataler Belastung auf das Verhalten waren bereits häufig Gegenstand ethologischer Untersuchungen. Die Mehrzahl der Befunde spricht dafür, dass pränataler Stress bei Laborratten zu gesteigertem Ängstlichkeitsverhalten bzw. zu einem verminderten Erkundungsverhalten in einer für sie neuartigen Umweltsituation führt (z.B. Poltyrev et al., 1996; Cabrera et al., 1999). Bis heute liegen allerdings nur wenige Befunde über die Effekte pränataler Belastung auf das Immunsystem vor (Bakker et al., 1995; Klein und Rager, 1995; Coe et al., 1996; Kay et al., 1998). Diese wenigen, unter Verwendung artifizieller Stressoren erlangten Erkenntnisse, zeigen eine Verschlechterung verschiedener immunrelevanter Parameter bei pränatal gestressten Nachkommen (Bakker et al., 1995; Coe et al., 1996; Kay et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten auch eine Verbindung zwischen pränatalem Stress und einer gesteigerten Sekretion von Corticosteron als Antwort auf eine Belastungssituation (z.B. Barbazanges et al., 1996; Vallee et al., 1999; Morley-Fletcher et al., 2003a; Kapoor und Matthews, 2005) sowie einen Einfluss auf die Reproduktion. Dieser spiegelt sich in Form von seltenerer Trächtigkeit, häufigeren spontanen Aborten und einer geringeren Nachkommenschaft wieder (Herrenkohl, 1979).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich Effekte maternaler Belastung sowohl auf die Parentalgeneration (F0-Generation) selbst, wie auch auf die pränatal gestressten Nachkommen (F1-Generation) zeigen können. Allerdings herrscht bislang noch kein genereller Konsens über diese Auswirkungen. Die Gründe hierfür sind häufig Unterschiede methodischer Art zwischen einzelnen Studien (Übersicht in Braastad, 1998). Des Weiteren wurden in fast allen vorangegangenen Untersuchungen künstliche Laborstressoren verwendet, um eine maternale Belastungssituation zu induzieren, obwohl bereits bekannt ist, dass sich soziale Stressoren in ihrer Wirkung von nicht-sozialen Stressoren unterscheiden können (Sgoifo et al., 1996). Zudem liegen bis heute keine umfassenden Untersuchungen zu den Auswirkungen einer sozialen maternalen Belastung auf das Immunsystem von F1-Nachkommen vor.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Erstes Ziel dieser Studie war es, den Einfluss chronischer maternaler Belastung während der Trächtigkeit, induziert durch wiederholte soziale Konfrontationen mit Artgenossen, auf die Reproduktion der Weibchen der Parentalgeneration (F0-Generation) zu untersuchen. Diese Untersuchung umfasste Parameter wie das Alter zu Beginn der Reproduktion, Wurfgröße und die maternale Gewichtsinvestition in den Nachwuchs.

Das zweite Ziel dieser Studie lag darin, den Einfluss pränataler Belastung auf Verhalten und Physiologie des Nachwuchses (F1-Generation) zu untersuchen, insbesondere des Immunsystems. Im Vordergrund der Untersuchungen standen dabei adulte männliche F1-Nachkommen. In diesem Zusammenhang wurden Anzahl, Verteilungsmuster und Funktionalität immunrelevanter Zellen sowie die Konzentration des Stresshormons Corticosteron aus peripherem Blut bestimmt. Dies erfolgte sowohl unter Standardhaltungsbedingungen ohne zusätzlichen Stressor, um eine Aussage über den Grad der Belastung der Tiere zu ermöglichen, als auch in Reaktion auf soziale Belastung im Adultalter. Zusätzlich wurde ein Teil der männlichen F1-Nachkommen standardisierten Verhaltenstests unterzogen, um Neugierde und Ängstlichkeitsverhalten gegenüber neuen Umweltsituationen beschreiben zu können.

Mit der Geburt der F1-Nachkommen wurden zudem frühe Jungtiercharakteristika wie das Geburtsgewicht, die Entwicklung dessen bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung von der Mutter und die Überlebenswahrscheinlichkeit der Jungtiere während dieser Zeitspanne erfasst. Dies diente dem Zweck, mögliche Unterschiede zwischen pränatal gestressten Nachkommen und ungestressten Nachkommen von Kontrollweibchen bereits im Jugendalter feststellen zu können. Ab Erreichen der Geschlechtsreife erfolgte zudem eine Bestimmung reproduktionsrelevanter Parameter. Dies sollte die Frage klären, ob sich die pränatale Belastung auf die Anzahl der Nachkommen der F1-Generation auswirken kann.

2 Tiere, Material und Methoden

2.1 Tiere, Abstammung, Herkunft und Haltung

Die Untersuchungen wurden an männlichen und weiblichen Long-Evans Laborratten durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Auszuchtstamm (ILAR-Code: Hsd:LE) der Wanderratte (*Rattus norvegicus*) mit schwarz-weißer Fellfärbung. Alle Tiere entstammten der Zucht des Lehrstuhls Tierphysiologie der Universität Bayreuth.

In den nächsten Unterkapiteln erfolgt eine Beschreibung der Prozedur der maternalen Belastung, der durchgeführten Tests und der dabei verwendeten Methoden. Die chronologische Abfolge der Untersuchungseinheiten ist aus Gründen der Veranschaulichung am Ende dieses Kapitels graphisch dargestellt (Abbildung 1).

Die Haltung der Tiere erfolgte in Standard-Haltungsräumen. Männchen – Weibchen Paare wurden in transparenten Makrolonkäfigen (Macrolon Typ III, Ehert GmbH) mit den Ausmaßen 42 x 26 x 15 cm gehalten, welche von einem Metallgitter abgedeckt und mit groben, staubfreien Holzspänen als Einstreu ausgelegt waren. Den Tieren stand standardisiertes Pelletfutter (altromin 1324, Haltungsdiet für Ratten und Mäuse, Altromin GmbH) sowie Wasser *ad libitum* zur Verfügung. In den Haltungsräumen wurde mittels einer Zeitschaltuhr ein Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden (Helligkeitsphase von 13.00 Uhr - 01.00 Uhr) erzeugt. Der Umgang mit den Tieren während der Dunkelphase wurde durch eine schwache Rotlichtquelle (25 Watt) ermöglicht. Die Raumtemperatur in den Haltungsräumen betrug ständig $20 \pm 1^\circ \text{C}$, die relative Luftfeuchte 45 – 50%.

Konfrontationen wurden in Bodenboxen ($0,5 \text{ m}^2$) durchgeführt, die aus Spanholzwänden (Höhe: 75 cm), einer Abdeckung aus rostfreiem Maschendraht und einem gefliesten Boden bestanden. Bei den residenten Tieren handelte es sich nicht um im Blickpunkt stehende Versuchstiere, sondern um zusätzliche Tiere aus der lehrstuhleigenen Tierhaltung. Die Haltungsbedingungen während Konfrontationen entsprachen den oben genannten Bedingungen. Alle Experimente wurden während der Dunkelphase (Aktivitätsphase) durchgeführt.

2.2 Maternale Belastung und pränatal gestresster Nachwuchs

Für den ersten Teil dieser Studie wurden trächtige F0-Weibchen einer chronischen sozialen Belastungssituation ausgesetzt. Diese bestand aus täglich zweistündigen *Resident-Intruder-*

Konfrontationen mit weiblichen Artgenossen, welche mit dem Tag nach der Geburt des ersten Wurfes eines jeden Weibchens begannen und sich jeweils über die gesamte Dauer der zweiten und dritten Trächtigkeit erstreckten. Nicht konfrontierte Kontroll-Weibchen verblieben während des Versuchszeitraumes ungestört in ihren Heimatkäfigen. Das Alter der Tiere zu Beginn der Konfrontationsphase betrug 3-4 Monate.

Das Hauptaugenmerk der Untersuchung lag auf der Nachkommengeneration aus den dritten Würfen der Kontroll- und Stressweibchen. Diese Nachkommen der dritten Würfe wurden für die Untersuchung gewählt, da sich die Weibchen der Stressgruppe während der gesamten Trächtigkeit mit diesen Jungtieren, von der Konzeption bis zur Geburt, in einer chronischen Belastungssituation befanden. Zur Erklärung: Dies traf auf die Situation der zweiten Würfe nicht notwendigerweise zu, da die täglichen Konfrontationen erst einen Tag nach der Geburt des ersten Wurfes begannen und die Weibchen zu diesem Zeitpunkt schon wieder trächtig sein konnten.

Nachdem die Jungtiere eines jeden dritten Wurfes geboren waren, wurden keinerlei Konfrontation mehr durchgeführt. Die pränatal gestressten (engl.: prenatal stress: PS) und von Kontrollmüttern abstammenden F1-Nachkommen (engl.: prenatal control: PC) eines jeden dritten Wurfes verblieben bei ihren Müttern bis zur Entwöhnung im Alter von 21 Tagen. Sie stellen die im weiteren Verlauf dieser Studie untersuchten Tiere der F1-Generation chronisch belasteter und unbelasteter F0-Weibchen dar.

2.3 Durchgeführte Tests und Methoden

2.3.1 Aufnahme reproduktionsrelevanter Parameter der Parentalgeneration (F0-Generation)

Um eine Aussage über die Effekte chronischer maternaler Belastung infolge sozialer Konfrontationen auf den Erfolg der Reproduktion treffen zu können, wurden ab dem Zeitpunkt der Geschlechtsreife reproduktionsrelevante Parameter der weiblichen Tiere der Parentalgeneration erhoben. Dies umfasste das Feststellen des Zeitpunkts des Trächtigkeitsbeginns der F0-Weibchen sowie des Geburtstermins ihrer Jungtiere. Daraus ergaben sich die Dauer der Trächtigkeit, sowie das Zeitintervall zwischen aufeinander folgenden Würfen. Zudem wurde das Alter der Weibchen zum Wurftermin, die Anzahl der geworfenen Jungtiere, sowie das Gewicht eines jeden Muttertieres nach erfolgtem Werfen ermittelt. Aus dem mütterlichen Gewicht und dem Gesamtwurfgewicht (Summe der Jungtiergewichte eines jeden Wurfes) wurde der prozentuale Anteil der mütterlichen

Gewichtsinvestition (engl.: maternal body mass investment) in den jeweiligen Wurf ermittelt.

2.3.2 Frühe Jungtierparameter der F1-Generation

Innerhalb von zehn Stunden nach der Geburt der Jungtiere des dritten Wurfs wurden die Wurfgröße und das Geburtsgewicht der Jungtiere bestimmt. Im Alter von 21 Tagen erfolgte die Feststellung der Anzahl der bis dahin überlebenden Jungtiere sowie die Bestimmung des Geschlechts und des Gewichts eines jeden Jungtieres. Ab diesem Zeitpunkt wurden die F1-Tiere eines jeden Wurfs wie unter 2.1 beschrieben in Männchen-Weibchen Paaren gehalten.

2.3.3 Aufnahme reproduktionsrelevanter Parameter der F1-Generation

Mit Erreichen der Geschlechtsreife wurde untersucht, wie sich die pränatale Belastung auf den reproduktiven Erfolg der F1-Generation auswirken könnte. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Beginn der Reproduktion (Alter der F1-Weibchen zum Zeitpunkt des ersten Werfens) bis zu einem Alter von 180 Tagen. Erfasst wurde die Anzahl der im Untersuchungszeitraum erfolgten Würfe, die Anzahl der Nachkommen (F2-Generation), deren Geburtsgewicht, sowie das Gewicht der F1-Mütter nach der Geburt ihrer Jungen. Auch bei F1-Weibchen wurden die mütterlichen Gewichtsinvestitionen in ihre Würfe ermittelt. Zudem wurde der Geburtszeitpunkt der Jungtiere der F2-Generation innerhalb des 12:12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bestimmt.

2.3.4 Verhaltenstests an adulten männlichen F1-Nachkommen

Im Alter von 127 und 134 Tagen wurde ein Teil der männlichen F1-Tiere in zwei Standardverhaltenstests untersucht. Der *elevated plus-maze* Test (*EPM*) und der *open-field* Test (*OF*) zielen auf Verhaltensantworten der Versuchstiere auf eine ihnen unbekanntere Umwelt ab. Im Blickpunkt steht die Beurteilung von Neugierde und Ängstlichkeit eines Tieres. Beim *EPM* stehen dem Tier „geschlossene“ wie auch „offene Arme“ eines Versuchsareals frei begehbar zur Verfügung. Während die Flächen der beiden sich gegenüberliegenden „geschlossenen Arme“ dem Tier durch ihre Wände Schutz bieten, stehen die sich gegenüberliegenden „offenen Arme“ für „Gefahr“. Dieser Test beruht darauf, dass ängstliche Ratten „offene Arme“ seltener betreten und dort weniger Zeit verbringen, als weniger ängstliche Tiere (z.B. Pellow et al., 1985; Lister, 1987). Im

Unterschied zum *EPM* erfolgt eine Beurteilung der Neugierde bzw. der Ängstlichkeit eines Tieres beim *open-field* Test anhand des gezeigten Verhaltens in einer von Wänden umgebenen Testarena (hier: Rechteck von 1m²). Analog zum *EPM* sollten sich ängstliche Tiere häufiger und für längere Zeit in den äußeren, von Wänden umgebenen Bereichen der Testarena aufhalten (Walsh und Cummins, 1976).

2.3.5 Physiologische Untersuchungen an adulten männlichen F1-Nachkommen

2.3.5.1 Endokrinologische Untersuchungen

Die Serum-Konzentration des wichtigen Stresshormons Corticosteron im Blut wurde sowohl unter normalen Standardhaltungsbedingungen (Basalwerte) als auch als Reaktion auf ACTH-Injektionen untersucht. Bei diesem sogenannten *ACTH challenge* Test wird dem zu untersuchenden Tier eine Dosis des synthetisch hergestellten Analogs (Synacten) des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) subkutan injiziert, was zu einer maximalen Glucocorticoid-Konzentration im Blut führt. Diese Maximalkonzentration spiegelt den adaptiven Zustand des adrenocorticalen Systems eines Individuums wieder (von Holst, 1998; Koolhaas et al., 1999).

2.3.5.2 Immunologische Untersuchungen

Der Zweck der immunologischen Untersuchungen des Blutes lag darin, ein möglichst umfangreiches Spektrum der Parameter des spezifischen und unspezifischen Immunsystems zu erfassen, um die Immunkompetenz eines Tieres beschreiben zu können. Hierzu wurden sowohl Anzahl als auch Funktionalität von Immunzellen bestimmt. In diesem Zusammenhang ist eine Untersuchung des peripheren Blutes geeignet, da sie wiederholte Probenentnahmen an einem Tier erlaubt, und somit mehrfach punktuellen Einblick auf verschiedene Immunparameter ermöglicht.

Die immunologischen Untersuchungen umfassten die Bestimmung der Gesamtzellzahlen der Leukozyten, deren Verteilung auf einzelne Subpopulationen, sowie eine Überprüfung der Funktionalität der Subpopulation der B- und T-Lymphozyten. Die absolute Leukozytenzahl im Blut wurde mit Hilfe eines elektronischen Partikelzählgerätes ermittelt. Zur Unterscheidung lymphoider und myeloider Zellen und deren Subpopulationen wurde ein Differentialblutbild aus Vollblut mittels Durchflusszytometrie erstellt (Stefanski und Engler, 1999). Detektiert wurden die verschiedenen Zelltypen durch Fluoreszenzmarkierung mittels Verwendung monoklonaler Antikörper gegen spezifische

Oberflächenantigene. Myeloide Zellen wurden über die ED9-Expression (CD45⁺/ED9⁺) identifiziert und anhand ihrer physikalischen Eigenschaften in Granulozyten (GRA) und Monozyten (Mon) differenziert. Lymphozyten wurden über die fehlende ED9-Expression (CD45⁺/ED9⁻) bestimmt. Folgende Subpopulationen der Lymphozyten wurden bestimmt: T-Helfer-Zellen (CD3⁺/CD4⁺), cytotoxische T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺), Natürliche Killer-Zellen (CD3⁻/NKR-P1A⁺); der Prozentsatz der B-Zellen ergibt sich rechnerisch aus den Prozentsätzen der vorgenannten Lymphozytensubpopulationen.

Eine Untersuchung der Funktionalität der Lymphozyten erfolgte mittels Vollblut-Proliferations-Assays. Lymphoide Zellen können *in vitro* polyklonal durch Mitogene zur Teilung (Proliferation) angeregt werden. Während ihrer Proliferation beziehen die Zellen die Bausteine für ihr Wachstum aus einem Kulturmedium. Wird diesem radioaktiv markiertes Methyl-[³H]-Thymidin hinzugefügt, so wird dieses von den Zellen in die DNA-Synthese miteinbezogen. Nach definierter Inkubationszeit kann die Menge des in die Zellen eingebauten Methyl-[³H]-Thymidin in einem Beta-Counter bestimmt werden. Neben der mitogenstimulierten Proliferation durch Concanavalin A (Con A), das bei der Ratte vornehmlich die T-Lymphozyten stimuliert, wurde durch das Pokeweed-Mitogen (PWM) vornehmlich die Proliferationsfähigkeit der B-Lymphozyten stimuliert.

2.3.6 Physiologische Untersuchungen an adulten männlichen F1-Nachkommen nach sozialer Belastung (*Resident-Intruder*-Konfrontation)

Einige physiologische Parameter der F1-Männchen wurden unter Standardhaltungsbedingungen (Basalwerte) sowie unter sozialer Belastung untersucht, da sich die Auswirkungen pränataler Belastungen unter postnataler Belastung verstärken können (Maccari et al., 1995; Cabrera et al., 1999).

Hierzu wurden männliche Nachkommen von gestressten Müttern (PS-Männchen) sowie von Kontrollmüttern (PC-Männchen) über zehn Tage hinweg einer täglich zweistündigen *Resident-Intruder*-Konfrontation mit männlichen Artgenossen unterzogen. Eine soziale Unterwerfung des Intruders erfolgte in allen Fällen während der ersten zehn Minuten der Konfrontation. Sie galt als erfolgreich, sobald der Intruder auf Angriffe des Residenten mit defensiven Verhaltensweisen reagierte (unterwürfiges Verhalten bzw. Fluchtverhalten). Nach erfolgreicher Attacke durch das residente Männchen wurde der Intruder in einen Schutzkäfig innerhalb des Geheges des Residenten umgesetzt, um ihn vor Verwundung zu

schützen. Dort verblieb er bis zum Erreichen der täglichen Gesamtkonfrontationsdauer von zwei Stunden. Anschließend wurden die Intruder-Tiere in Standardhaltung zurückgesetzt. Blutentnahmen von Intruder-Tieren erfolgten am 1. und 10. Tag jeweils direkt nach der zweistündigen Konfrontation. Bereits fünf Tage vor Beginn der Konfrontationsphase erfolgte eine Blutentnahme zur Bestimmung basaler physiologischer Werte des Blutes. Ebenso erfolgte fünf Tage nach Beendigung der wiederholten Konfrontationen eine Blutentnahme zur Bestimmung von Nachwerten (Erholungswerte). Von jedem Intruder wurden an Blutentnahmetagen sowohl die Corticosteronkonzentration, die Gesamtzellzahl immunrelevanter Zellen des Blutes und ihre Aufteilung in Subpopulationen sowie die Funktionalität der Subpopulation der B- und T-Lymphozyten bestimmt.

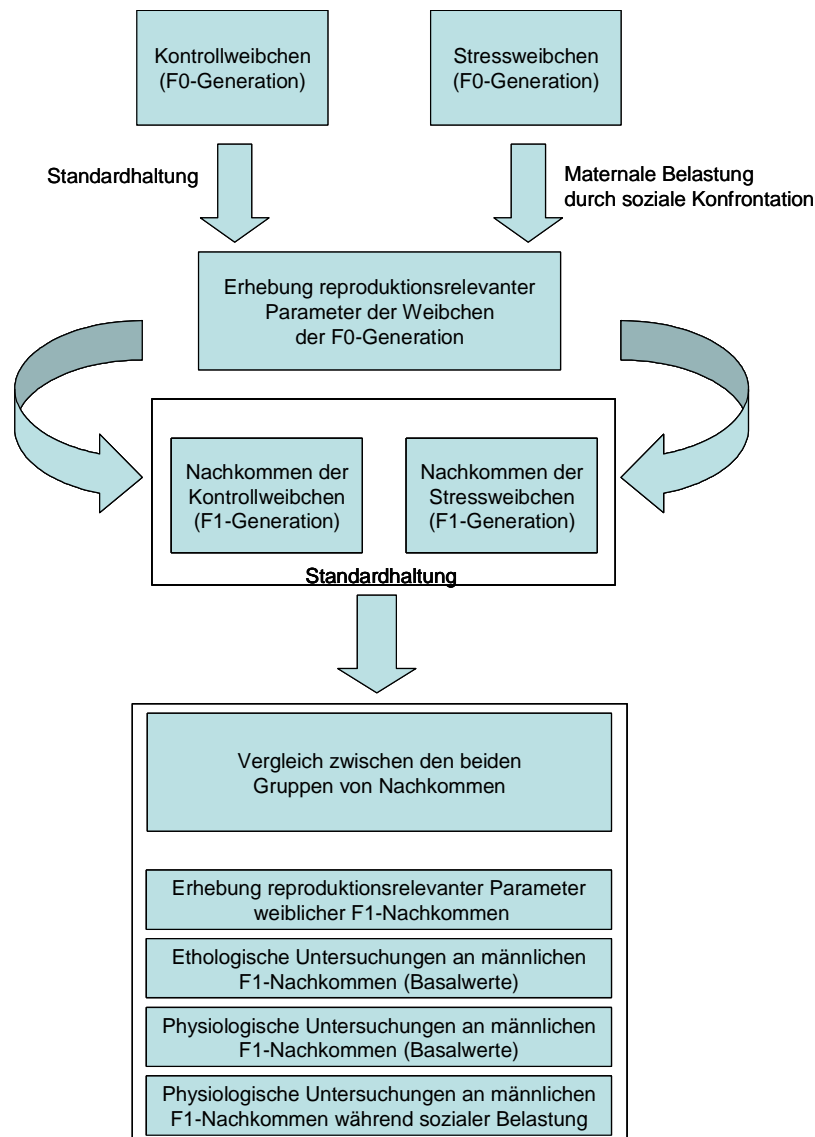


Abb. 1: Übersicht über die verwendeten Versuchstiere und Untersuchungseinheiten

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung lag vornehmlich darin, den Einfluss maternaler sozialer Belastung auf die Reproduktion der F0-Generation selbst, sowie den Einfluss pränataler Belastung auf Verhalten und Physiologie der Nachkommengeneration (F1-Generation) zu untersuchen. Auf pränataler Ebene umfasste dies hauptsächlich die Untersuchung des Immunsystems des adulten Nachwuchses, aber auch Untersuchungen zur Charakterisierung der frühen Jungtierphase und der Reproduktion.

Im Folgenden werden zunächst die Effekte der maternalen Belastung auf die Parentalgeneration vorgestellt (Götz et al., 2007b). Anschließend wird auf die Effekte der pränatalen Belastung auf die F1-Generation (Götz und Stefanski, 2007; Götz et al., 2007a) eingegangen. Diese Ergebnisse sind in den Zeitschriften „Physiology & Behavior“ sowie „Journal of Neuroimmunology“ publiziert, bzw. bei „Physiology & Behavior“ zur Publikation eingereicht.

3.1 Einfluss einer maternalen Belastung auf den Reproduktionserfolg von F0-Weibchen und frühe Jungtiercharakteristika der F1-Generation

Chronische soziale Belastung zeigte einen deutlichen Einfluss auf die Reproduktion der Weibchen der Parentalgeneration (F0-Weibchen) (für Details siehe Manuskript: Götz et al., 2007b).

Belastete F0-Weibchen warfen im Mittel 10,5 (\pm 0,5) Jungtiere und somit 2,8 Jungtiere weniger als F0-Weibchen der Kontrollgruppe (13,3 \pm 0,6). Keine Unterschiede ergab der Vergleich der individuellen Geburtsgewichte der F1-Jungtiere: Sie betragen im Mittel gut 6 Gramm. Zum Zeitpunkt der Entwöhnung (Tag 21) waren Nachkommen belasteter F0-Weibchen mit durchschnittlich 36 g etwa 13 % schwerer als Nachkommen unbelasteter F0-Weibchen. Unterschiede in den Körpermassen zwischen den Geschlechtern waren nicht vorhanden. Die Jungtiermortalität war in beiden Gruppen etwa gleich hoch.

3.2 Physiologie adulter männlicher F1-Nachkommen unter Standardhaltungsbedingungen

Da Untersuchungen über das Immunsystem pränatal gestresster Nachkommen fast völlig fehlen, diente dieser Teil der Studie primär der Klärung der Frage, ob soziale maternale Belastung Einfluss auf das Immunsystem adulter männlicher F1-Nachkommen hat (Götz und Stefanski, 2007). Aufgrund der Tatsache, dass die HPA-Achse über die Ausschüttung von Corticosteron Anzahl und Funktionalität immunrelevanter Zellen beeinflussen kann, wurde die Konzentration des Stresshormons Corticosteron im Blutserum der Tiere bestimmt. Zusätzlich wurde auch die durch die Injektion des ACTH-Analogs induzierte maximale Corticosteronkonzentration im Blut der Tiere als Maß für einen Belastungszustand bestimmt. Diese Ergebnisse sind schematisch in Tabelle 1 zusammengefasst.

3.2.1 Serum-Corticosteron-Konzentrationen

Die basalen Werte der Konzentrationen des Stresshormons Corticosteron im Blutserum lagen bei PC-Männchen um etwa zwölf Prozent höher als bei PS-Männchen (PC: $125,8 \pm 4,8$ [ng/ml]; PS: $112,4 \pm 3,9$ [ng/ml]; $P=0,033$).

Die Applikation des ACTH-Analogs resultierte in einem deutlichen Anstieg der Corticosteronkonzentration im Blut der Tiere beider Gruppen um ca. 200%. Jedoch lagen die Corticosteron-Werte bei PC-Männchen deutlich höher als bei PS-Männchen (PC: $340,8 \pm 11,1$ [ng/ml]; PS: $313,5 \pm 10,1$ [ng/ml]; $P=0,021$). Das Fehlen einer statistisch signifikanten Interaktion zwischen dem Faktor „Gabe von ACTH“ und dem Faktor „pränataler Stress“ zeigte eine gleichgerichtete Reaktion der Tiere beider Gruppen auf den *ACTH-challenge*.

3.2.2 Anzahl und Funktion immunrelevanter Zellen des Blutes (Basal)

Wie die Untersuchung immunrelevanter Zellen des Blutes zeigte, wiesen PS-Männchen eine deutlich geringere Anzahl an Leukozyten in ihrem Blut auf als PC-Männchen. Eine genauere Betrachtung ergab, dass dieser Effekt auf deutlich niedrigeren Zellzahlen von T-Lymphozyten beruhte, aber nicht durch eine verminderte Anzahl der B-Lymphozyten oder NK-Zellen verursacht wurde. Die Zellzahlen von $CD4^+$ -T-Zellen, den T-Helfer-Zellen,

lagen bei PS-Männchen um deutliche 23,4 % niedriger als bei PC-Männchen. Ein ähnlicher Trend ergab sich für die CD8⁺-Zellen (zytotoxische T-Zellen). Tests bezüglich der funktionalen Kapazität ergaben zudem eine deutlich niedrigere proliferative Antwort der Lymphozyten der PS-Männchen auf Stimulation mit PWM, welches vornehmlich B-Lymphozyten stimuliert.

3.3 Physiologie adulter männlicher F1-Nachkommen unter sozialer Belastung

Aktuelle Untersuchungen (Maccari et al., 1995; Cabrera et al., 1999) lieferten Hinweise darauf, dass sich pränatale Belastungseffekte unter Bedingungen postnataler Belastung verstärken können. Aus diesem Grund wurden PS- und PC-Männchen einer zehntägigen *Resident-Intruder*-Konfrontation unterzogen. Diese Form der sozialen Konfrontation führt zu tief greifenden Veränderungen verschiedener physiologischer Parameter (Stefanski und Engler, 1998). Von besonderem Interesse waren in dieser Untersuchung die durch sozialen Stress induzierten immunologischen Veränderungen der F1-Nachkommen (Intruder) (Götz et al., 2007a).

3.3.1 Pränataler Stress und postnataler sozialer Konflikt:

Corticosteronkonzentration und Körpermasse der F1-Männchen

Die Konfrontation hatte einen gleichermaßen starken Einfluss auf die Corticosteronkonzentration des Blutes bei PS- wie auch bei PC-Intrudern. Die Hormonkonzentrationen stiegen allerdings nur am ersten Tag der Konfrontation deutlich an und lagen am Tag zehn bereits wieder etwa auf Höhe ihrer Ausgangsniveaus. Während der Konfrontationsphase nahmen PS- und PC-Tiere leicht ab. Dieser Verlust an Körpermasse war aber bereits fünf Tage nach Ende der letzten Konfrontation wieder kompensiert. Die Entwicklung der Körpermasse im Untersuchungszeitraum unterschied sich nicht zwischen den Tieren beider Gruppen.

3.3.2 Pränataler Stress und postnataler sozialer Konflikt:

Anzahl und Funktionalität der Immunzellen im Blut

Die Konfrontationen hatten deutlichen Einfluss auf Anzahl und Funktionalität immunrelevanter Zellen sowohl der PS- als auch der PC-Männchen: Die Zahl der Lymphozyten und der Monozyten nahm hierbei ab, die Anzahl der Granulozyten stieg hingegen an. Die Verminderung der Gesamtlymphozytenzahl stellte sich als die Summe aus verminderten B- und T-Lymphozytenzahlen, sowie zu geringerem Anteil auch aus Natürlichen Killerzellen dar (Götz et al., 2007a).

Neben diesen generellen Veränderungen im Konfrontationszeitraum, die in beiden Gruppen auftraten, zeigten sich auch deutliche Unterschiede zwischen PC- und PS-Männchen. Die Zellzahlen der Monozyten, der Granulozyten, T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen des Blutes lagen bei den PS-Männchen generell niedriger als bei PC-Männchen, und zwar sowohl zu Beginn wie auch am Ende des Konfrontationszeitraums. Gleiches galt für die funktionale Kapazität der Lymphozyten der PS-Tiere; ihre B- und T-Lymphozyten reagierten auf Stimulation mit beiden Mitogenen (ConA und PWM) mit geringerer Proliferation. Darüber hinaus zeigten sich im Konfrontationsverlauf weitere Unterschiede zwischen beiden Gruppen: Zwar waren an Tag eins der Konfrontationsphase sowohl bei PS- und PC-Männchen die Zellzahlen der T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen stark vermindert, jedoch zeigte sich nur bei PC-Männchen eine partielle Erholung an Tag zehn der Konfrontation und eine vollständige Erholung fünf Tage nach Beendigung der Konfrontationen.

3.4 Verhalten adulter männlicher F1-Nachkommen

Frühere Studien beschrieben bereits ein verändertes Verhalten pränatal gestresster Individuen, wie zum Beispiel eine verminderte Erkundungsfreudigkeit bzw. eine erhöhte Emotionalität oder Ängstlichkeit in neuen Umweltsituationen (z.B. Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Estanislau und Morato, 2005). Jedoch fanden bislang soziale Stressoren für die Beurteilung pränatalen Stresses auf das Verhalten nur unzureichend Verwendung (Lordi et al., 2000; Patin et al., 2005) oder aber pränatale Phase und frühe postnatale Einflüsse während der Laktationsphase standen gleichermaßen im Blickpunkt der Untersuchungen (Kaiser und Sachser, 1998; Kaiser und Sachser, 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde das explorative Verhalten und das Ängstlichkeitsverhalten adulter männlicher F1-Nachkommen in zwei Standardtests untersucht (Götz und Stefanski, 2007), deren Ergebnisse schematisch in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Verhalten im *Elevated plus-maze* und im *Open-field* Test

Im *Elevated plus-maze* verhielten sich PS-Männchen deutlich aktiver und weniger ängstlich als PC-Männchen. Dies äußerte sich in einem signifikant häufigeren Betreten der zentralen Plattform sowie der offenen Arme der Apparatur.

Um eine Aussage über die Aktivität eines Tieres unabhängig von dessen Grundaktivität treffen zu können, wurde der Prozentsatz des Betretens der offenen Arme, gemessen an der Gesamtzahl des Betretens der Arme beider Kategorien, ermittelt. PS-Tiere besuchten die offenen Arme auch prozentual häufiger als PC-Tiere (PC: $17,3 \pm 3,2\%$; PS: $25,1 \pm 3,5\%$), allerdings verfehlte dieser Unterschied das statistische Signifikanzniveau ($P=0,114$).

Wenngleich statistisch ebenfalls nicht signifikant, so zeigten sich im *Open-field* dennoch Unterschiede in den aufgenommenen Verhaltensparametern zwischen PC- und PS-Männchen: PS-Männchen verbrachten einen höheren Prozentsatz der Zeit innerhalb der inneren Quadrate des Open-field (PS: $8,8 \% \pm 1,5$; PC: $6,1 \% \pm 0,8$; $P=0,115$). Zudem bewegten sie sich innerhalb der inneren Quadrate auch für eine längere Zeitdauer als PC-Männchen (PS: $26,6 \text{ sec.} \pm 5,1$; PC: $16,3 \text{ sec.} \pm 3,4$; $P=0,104$).

Tabelle 1: Schematische Gegenüberstellung ethologischer Charakteristika und einiger verschiedener physiologischer Werte zwischen pränatal gestressten männlichen Nachkommen (PS) und männlichen Nachkommen von Kontrollweibchen (PC).

Ängstlichkeit in neuer Umweltsituation	PS < PC
Corticosteronkonzentration basal	PS < PC
Corticosteron nach <i>ACTH challenge</i>	PS < PC
Gesamtzahl an Leukozyten	PS < PC
Anzahl an Lymphozyten	PS < PC
T-Helfer-Zellen	PS < PC
Zytotoxische T-Zellen	PS ≤ PC
B-Zellen	PS ≈ PC
Natürliche Killer-Zellen	PS ≈ PC
Anzahl an Granulozyten	PS ≈ PC
Anzahl an Monozyten	PS ≈ PC
Con A induzierte Proliferation (T-Zellen)	PS ≈ PC
PWM induzierte Proliferation (B-Zellen)	PS < PC

Legende: <: statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Nachkommengruppen;
 ≤: Tendenz zwischen beiden Nachkommengruppen;
 ≈: kein statistisch signifikanter Unterschied;

3.5 Einfluss pränataler Belastung auf den Reproduktionserfolg (F1-Generation)

Die Untersuchung reproduktionsrelevanter Parameter geschlechtsreifer PC- und PS-Weibchen (für Details siehe Manuskript: Götz et al., 2007b) erfolgte, um abschätzen zu können, ob sich Effekte maternaler Belastung auch auf die Reproduktion ihrer Nachkommen fortsetzen könnten.

Bis zum Erreichen eines Alters von 180 Tagen zeigten sich zwischen PC- und PS-Weibchen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der erfolgten Würfe und der daraus resultierenden Anzahl an Nachkommen. Allerdings waren Nachkommen der PS-Weibchen bei der Geburt im Mittel um etwa sechs Prozent schwerer als entsprechende Kontroll-Nachkommen. Die Untersuchung der genauen Wurfzeitpunkte innerhalb des Tag-

Nacht-Rhythmus zeigte, dass beide Gruppen der F1-Weibchen ihre Jungen hauptsächlich während einer Kernzeit in der Hellphase zwischen 16:00 bis 23:00 gebären. In diesem Zeitraum traten deutlich mehr Wurfereignisse auf, als bei zufälliger Verteilung zu erwarten gewesen waren. Dabei zeigte sich, dass PS-Weibchen verglichen mit PC-Weibchen ihre Jungen zu einem wesentlich höheren Prozentsatz außerhalb dieser Kernzeit gebären (PS: 36,6 % gegenüber PC: 23,6 %).

4. Gesamtdiskussion

Maternaler Stress und Reproduktion (F0-Generation); frühe F1-Jungtiercharakteristika

Wie die Ergebnisse des ersten Teils dieser Studie zeigen, können soziale Konflikte zwischen Artgenossen, wie sie auch unter natürlichen Lebensbedingungen in freier Wildbahn auftreten können, einen deutlichen Einfluss auf das Ergebnis der Trächtigkeit ausüben. Gewichtsverlust bzw. eine verlangsamte Körpermassenzunahme während der Trächtigkeit infolge von Belastung wurde bereits mehrfach für die Verwendung nicht-sozialer Laborstressoren beschrieben (z.B. Guo et al., 1993; Darnaudery et al., 2004) und stellt oftmals ein zuverlässiges Anzeichen für die „Stärke“ einer Belastungssituation dar. Weil der hier gewählte Stressor zu keinem Gewichtsverlust der trächtigen F0-Weibchen führte, kann er als mild bezeichnet werden.

Die maternale Belastung manifestierte sich in einer Verminderung der Anzahl der Nachkommen. Auffällig ist, dass dies weder mit einem verminderten Geburtsgewicht der Jungtiere einherging, noch auf deren Überlebenswahrscheinlichkeit bis zum Absetzalter Einfluss nahm, wie früher bereits beschrieben (Pollard, 1984; Lordi et al., 2000). Weiter zeigte die Untersuchung der frühen Jungtierentwicklung ein stärkeres Wachstum der Nachkommen belasteter F0-Weibchen bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung. Die Verminderung der Nachkommenzahl stellt einen Befund dar, der bereits in vielen Studien bei Labortieren gezeigt werden konnte (Übersicht in de Catanzaro, 1988). Allerdings erscheint ein direkter Vergleich früherer Studien mit den aktuellen Befunden aufgrund methodischer Unterschiede häufig nur bedingt als sinnvoll. So wurden meist sehr starke Laborstressoren wie eine Immobilisierung von Laborratten in Rückenlage, die Exposition von Hausmäusen (*Mus musculus*) gegenüber eines potentiellen Fressfeindes (*Rattus norvegicus*) oder aber starker „sozialer Dichtestress“ (*crowding*) bei Hausmäusen (Christian und Lemunyan, 1958) verwendet, um eine Belastungssituation bei den Tieren zu induzieren (Christian und Lemunyan, 1958; Euker und Riegle, 1973; de Catanzaro, 1988). Andererseits zeigt sich jedoch eine Parallele zu einer Untersuchung an Goldhamstern (*Mesocricetus auratus*) (Pratt und Lisk, 1989), in welcher sich sozialer Konflikt mit Artgenossen während der Trächtigkeit ebenfalls negativ auf die Nachkommenzahl auswirkte. Allerdings handelt es sich bei Goldhamstern um eine solitär lebende Spezies.

Generell sollte diese Reduktion der Fekundität durch sozialen Stress nicht zwingend als maladaptiv betrachtet werden, d.h. als bloße Reduktion der Anzahl der Nachkommen eines Wurfes. Im Gegenteil könnte dieser Mechanismus eine adaptive Anpassung der

Reproduktion der Mutter an unwirtliche Umweltbedingungen darstellen. Sozialer Stress könnte dabei als Auslöser wirken, der in einer unwirtlichen Umwelt eher zu kleineren Wurfgrößen führt, etwa durch die Induktion intrauteriner Teilresorptionen (Chang und Tatum, 1975; Cornwall et al., 1984; Wentzel et al., 2006). Bei reduzierter Wurfgröße könnte die Mutter somit postnatal mehr in das einzelne Jungtier investieren; ein derartiger negativer Zusammenhang zwischen Wurfgröße und individuellem Jungtierwachstum während der Laktationsphase zeigt sich bei zahlreichen Säugetierarten (trade off zwischen Jungtierqualität und Quantität; (Roff, 1992; Stearns, 1992; Beispiele in: König et al., 1988; Rogowitz und McClure, 1995; Dobson et al., 1999). Entsprechend waren auch in vorliegender Studie gesteigerte Wachstumsraten der abhängigen Jungtiere belasteter Mütter erkennbar.

Ein höheres Jungtiergewicht zum Absetzzeitpunkt könnte wiederum gerade unter unwirtlichen Umweltbedingungen die Überlebenswahrscheinlichkeit der Nachkommen bis zur Geschlechtsreife erhöhen; derartige Zusammenhänge zwischen Jungtierwachstum und Überleben bis zur Geschlechtsreife zeigen sich bei vielen Säugetierarten (Guinness et al., 1978; Murie und Boag, 1984; Unsworth et al., 1999; Cote und Festa-Bianchet, 2001; Rödel et al., 2004). Weiterhin könnten schwerere Jungtiere in guter körperlicher Verfassung einen Vorteil bei der Abwanderung (dispersal) in neue Areale besitzen. Gerade für junge Männchen ist die Abwanderung aus der Geburtskolonie (natal dispersal) oft mit hohen Kosten verbunden (Metzgar, 1967; Ambrose, 1972; Beacham, 1979). Somit könnte unter unwirtlichen Umweltbedingungen die erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit von größeren Nachkommen aus kleineren Würfen einen zwar nur kleinen, aber positiven Beitrag zur Fitness der Mutter leisten - dies wäre jedoch für die Mutter vorteilhafter als der komplette Verlust eines großen Wurfs mit entsprechend kleineren und damit schlechter angepassten Jungtieren.

Pränataler Stress, Corticosteron und immunrelevante Parameter

Die Unterschiede in den Konzentrationen des Stresshormons Corticosteron im Blutserum zwischen PC- und PS-Männchen stützen die Ansicht, dass pränataler Stress neuroendokrine Systeme, wie die HPA-Achse in Laborratten beeinflusst. Allerdings deuten die Befunde niedrigerer Corticosteronbasalwerte (in Standardhaltung) und geringerer maximaler Corticosteronsekretion nach Gabe des ACTH-Analogs (als Maß für einen Belastungszustand) bei PS-Männchen auf eine insgesamt niedrigere Aktivität des adrenocorticalen Systems hin. Dies steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen,

welche bei pränatal gestressten Nachkommen ähnlich hohe oder erhöhte basale Konzentrationen dieses Hormons feststellten (Barbazanges et al., 1996; Koehl et al., 1999; Vallee et al., 1999; Morley-Fletcher et al., 2003b), sowie eine deutlicher ausgeprägte Corticosteronsekretion als Antwort auf eine Belastungssituation (Barbazanges et al., 1996; Vallee et al., 1999; Morley-Fletcher et al., 2003a). Demnach deuten geringere Corticosteronkonzentrationen bei PS-Männchen diesbezüglich auf einen vorteilhaften Effekt milder pränataler Belastung hin. Diese Diskrepanz zwischen den vorliegenden Befunden und denen früherer Untersuchungen könnte nach Sgoifo und Mitarbeitern damit erklärt werden, dass die Art eines Stressors (psychophysisch gegenüber psychosozial) das Ergebnis physiologischer Untersuchungen maßgeblich beeinflussen kann (Sgoifo et al., 1996) Darüber hinaus könnten aber auch Unterschiede methodischer Art, wie Dauer und Häufigkeit der Belastungssituation oder der Zeitpunkt der Stressor-Applikation während der Trächtigkeit der Mutter einen Einfluss auf die Befunde bei den Nachkommen gehabt haben.

Im Gegensatz zu den Corticosteronwerten stehen die vorliegenden immunologischen Befunde niedrigerer Anzahl und Funktionalität immunrelevanter Zellen im Blut von PS-Männchen gegenüber PC-Männchen in Standardhaltung im Einklang mit früheren Befunden unter Verwendung nicht-sozialer maternaler Stressoren. Llorente und Mitarbeiter fanden beispielsweise ebenso eine verminderte Zahl der Subpopulation der zytotoxischen T-Zellen im Blut erwachsener männlicher Nachkommen belasteter Mütter (Llorente et al., 2002) wie Kay und Mitarbeiter eine verminderte Teilungsaktivität der Lymphozyten der Milz feststellten (Kay et al., 1998).

Diese Verminderungen der Anzahl und Funktionalität der Immunzellen sprechen für einen nachteiligen Effekt der pränatalen Belastung und könnten, wie es in früheren Studien impliziert wurde, negative Konsequenzen für die Gesundheit eines Individuums haben (Fauci und Dale, 1974; Fauci, 1975; Fleshner et al., 1995; Moynihan und Ader, 1996; Stefanski, 2001; Engler et al., 2004). Dabei sind die hier beschriebenen immunologischen Effekte der pränatalen Belastung auf die F1-Nachkommen in ihrer Größenordnung allerdings nicht mit denen vergleichbar, wie sie sich unter akuter sozialer Belastung bei Long-Evans Laborratten zeigen (Stefanski und Engler, 1998). Jedoch sollte in Betracht gezogen werden, dass diese Veränderungen dauerhaft sind.

Versucht man die niedrigere Anzahl und Funktionalität der Immunzellen der PS-Tiere mit der in ihrem Blutserum vorliegenden Konzentration an Corticosteron in Verbindung zu stellen, so zeigt sich: Erhöhte Glucocorticoidkonzentrationen führen im Blut zu einer

Verminderung der Lymphozytenzahl (Lymphopenie), sowie zu einer Unterdrückung der Proliferationsfähigkeit der T-Lymphozyten (z.B.: Fauci und Dale, 1974; Fauci, 1975; Bauer et al., 2001). Entsprechend sollten höhere Konzentrationen an Corticosteron mit niedrigerer Zellzahl und geringerer Zellaktivität einhergehen. Folglich wäre zu erwarten gewesen, dass höhere Corticosteronkonzentrationen bei PC-Männchen auch zu dem Befund niedrigerer Lymphozytenzahlen bei diesen Tieren führen würden. Jedoch zeigte sich der umgekehrte Fall: Obgleich PC-Tiere höhere Corticosteronkonzentrationen aufwiesen, lag auch die Anzahl ihrer Lymphozyten höher als bei PS-Tieren. Somit lassen sich die Befunde niedrigerer Immunwerte bei PS-Männchen nicht durch ihre Corticosteronspiegel im Adultalter erklären. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob mütterliches Corticosteron möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf das Immunsystem der PS-Tiere während der pränatalen Phase gehabt haben könnte.

Die Plazentaschranke, die Barriere zwischen mütterlichem und fötalem Blutkreislauf, ist die entscheidende Schnittstelle für die Entfaltung der Wirkung der Glucocorticoide maternaler Herkunft auf den Fötus. Obwohl Glucocorticoide hoch lipophile Moleküle sind und biologische Barrieren wie die Plazenta schnell passieren können (Dupouy et al., 1975; Takeshita, 1990; Young und Morrison, 1998; Welberg et al., 2005), besitzt ein Fötus normalerweise wesentlich niedrigere Konzentrationen physiologisch aktiver Glucocorticoide als seine Mutter (Beitins et al., 1973; Campbell und Murphy, 1977; Kapoor et al., 2006). Dieser Konzentrationsunterschied wird durch das plazentale Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase des Typs 2 (11 β -HSD 2) hervorgerufen. Es katalysiert den Umbau von Cortisol (Mensch) und Corticosteron (Ratte) in inaktive Metabolite (Cortison bzw. 11-Dehydrocorticosteron) (Murphy et al., 1974; Blasco et al., 1986; Yang, 1997; Welberg und Seckl, 2001). Man geht heute davon aus, dass die Funktion der 11 β -HSD 2 darin liegt, den Fötus vor überhöhten Konzentrationen physiologisch aktiver Glucocorticoide maternalen Ursprungs und sich hieraus ergebender nachteiliger Effekte auf das fötale Wachstum und die Entwicklung zu schützen (Seckl, 1997; Welberg und Seckl, 2001). Eine neuere Studie an Laborratten zeigt, dass akuter Stress (einmalige Immobilisierung über 45 Minuten), nicht aber chronische Belastung der Mutter (wiederholte Immobilisierung von Tag 14 bis Tag 19) während der Trächtigkeit zu einer Adaption im Sinne einer gesteigerten Aktivität der 11 β -HSD 2 führt (Welberg et al., 2005). Da Stefanski und Mitarbeiter für das hier ebenfalls verwendete Modell der chronischen Belastung durch wiederholte Konfrontationen einen stärkeren Anstieg maternalen Corticosterons zeigen konnten, (Stefanski et al., 2005), ist eine maßgebliche Beeinflussung

des Immunsystems der Föten sehr wahrscheinlich. Inwiefern solch eine Modulation im Uterus für die immunologischen Unterschiede zwischen den PC- und PS-Tieren im Erwachsenenalter verantwortlich sein könnte, bleibt allerdings weitgehend unklar. Ein möglicher Erklärungsansatz erfolgt im weiteren Verlauf.

Pränataler Stress und soziale Belastung im Adultalter (F1-Generation)

Während des Konfrontationsexperimentes verloren konfrontierte F1-Männchen (Intruder) beider Nachkommengruppen nur leicht an Körpermasse. Zusätzlich zeigte sich nur nach der ersten, nicht aber nach der zehnten Konfrontation ein starker Anstieg der Corticosteronkonzentrationen. Dies könnte darauf schließen lassen, dass sich die Tiere nach der zehnten Konfrontation an den wiederholt auftretenden Stressor gewöhnt haben. Die immunologischen Befunde widersprechen jedoch dieser Ansicht. Sie zeigten vielmehr den nachhaltigen Effekt verminderter Zellzahl und Zellaktivität der Lymphozyten und eine erhöhte Granulozytenzahl. Dieses Muster immunologischer Veränderungen steht in weiter Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zu chronischem sozialen Stress an Säugetieren (Raab et al., 1986; Stefanski und Engler, 1998; von Holst, 1998; Engler et al., 2004) und deutet auf eine mögliche Verschiebung in der Balance des Immunsystems von spezifischer zu unspezifischer Immunabwehr im peripheren Blut hin.

Darüber hinaus zeigte sich der Befund deutlicher Unterschiede in den Zellzahlen der Lymphozyten zwischen PC- und PS-Männchen während der Konfrontationsphase, speziell der T-Lymphozyten. Dabei entsprechen die Unterschiede der T-Lymphozytenzahlen in ihrer Qualität den in dieser Studie bereits für die Situation unter standardisierten Haltungsbedingungen beschriebenen (Götz und Stefanski, 2007). Des Weiteren zeigt dieses Experiment, dass sich die durch pränatalen Stress induzierten Unterschiede in Absolutzahl und Verteilungsmuster der Zellen nicht nur auf den Zeitraum der Konfrontationen erstrecken, sondern selbst bis in die Erholungsphase nach deren Beendigung existent bleiben: So zeigten PS-Männchen im Vergleich zu PC-Männchen weder eine teilweise Erholung der Zellzahlen der T-Lymphozyten (und Monozyten) während der Konfrontation, noch eine vollständige Erholung fünf Tage nach Ende der Konfrontationsphase. Es handelt sich also bei den stressinduzierten immunologischen Veränderungen bei PS-Männchen um längerfristige, nicht schnell umkehrbare Veränderungen.

Erklärt werden könnten diese insgesamt niedrigeren Niveaus in Anzahl und Funktionalität der Immunzellen der PS-Männchen durch eine Verschiebung der Sollwerte für diese Zellen im peripheren Blut. Solch eine Sollwertverschiebung könnte auf einer veränderten Rezeptordichte auf diesen Immunzellen und/oder Endothelzellen basieren, und durch unterschiedliche Exposition gegenüber maternalen Stresshormonen, wie dem Corticosteron, während der intrauterinen Entwicklung hervorgerufen worden sein. Auch wären Unterschiede in der Rezeptor-Sensitivität eine mögliche Erklärung dafür, dass Immunzellen der PS-Männchen während der Konfrontationsphase stärker auf ähnlich hohe Konzentrationen des Stresshormons Corticosteron reagieren. In Verbindung mit pränatalem Stress sind Veränderungen von Hormonrezeptoren auf Immun- und Endothelzellen bisher zwar noch nicht untersucht worden. Allerdings konnte bei Laborratten bereits ein Zusammenhang zwischen pränatalem Stress und einer veränderten Dichte von Corticosteroid-Rezeptoren des Typs I und des Typs II in Bereichen des Gehirns, wie beispielsweise dem Hippokampus, gezeigt werden (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995). Der Hippokampus ist zentraler Bestandteil des limbischen Systems und unerlässlich für Lernen und Gedächtnisleistung. Die Unterschiede im Erholungsmuster der Immunzellen zwischen beiden Nachkommengruppen könnten auch auf einer unterschiedlichen emotionalen Bewertung der Stresssituation beruhen. Allerdings würde man in diesem Zusammenhang bei PS-Männchen höhere Corticosteronspiegel gegenüber PC-Männchen erwarten. Dieser Befund zeigte sich jedoch nicht. Dennoch könnten auch die Konzentrationen anderer stressbedingter Hormone, wie die der Katecholamine bei PS-Männchen deutlich stärker erhöht gewesen sein als bei PC-Männchen und für die immunologischen Unterschiede mit in Betracht kommen.

Interessant für die Bewertung der Bedeutung der aktuellen Befunde ist eine Studie von Llorente und Mitarbeitern (Llorente et al., 2002). Sie untersuchten ebenfalls die Auswirkungen chronischer Belastung pränatal gestresster Sprague-Dawley-Laborratten im Adultalter auf Anzahl und Verteilungsmuster immunrelevanter Zellen im peripheren Blut. Im Gegensatz zu den vorliegenden Befunden zeigte die chronische, über zehn Tage erfolgte tägliche Immobilisierung (2h) der Tiere am zehnten Tag nur relativ schwache Effekte: die chronische Immobilisierung verminderte den Prozentsatz der CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) der Nachkommen von Kontrollen, nicht aber der pränatal gestressten Tiere. Dies verdeutlicht, dass sich die physiologische Antwort auf eine Belastungssituation in Abhängigkeit des verwendeten Stressors unterscheiden kann (Sgoifo et al., 1996).

Insgesamt zeigen die dargelegten Befunde erstmalig, dass sozialer maternaler Stress während der Trächtigkeit das Reaktionsmuster des Immunsystems adulter Ratten gegenüber (postnatalem) sozialem Stress beeinflusst. Dabei könnten die stressinduzierten immunologischen Veränderungen des hier beschriebenen Ausmaßes von Relevanz für das Krankheitsrisiko eines Individuums sein, da sie die Antikörperproduktion (Fleshner et al., 1989) beeinträchtigen und die Metastasenbildung von Tumoren erhöhen können (Stefanski und Ben-Eliyahu, 1996). Ob sie jedoch tatsächlich die Anfälligkeit gegenüber Erkrankungen beeinflussen, bedarf gezielter Untersuchungen anhand der Verwendung von Krankheitsmodellen. Auch die Untersuchung lymphatischer Organe sowie *in vivo-challenge* spezifischer Subsysteme des Immunsystems könnten zukünftig dazu beitragen, die biologische Relevanz der vorliegenden Befunde besser bewerten zu können.

Pränataler Stress und Verhalten (F1-Generation)

Als Ergebnis der beiden Verhaltenstests zeigten sich PS-Männchen aktiver und weniger ängstlich in neuen Umweltsituationen als PC-Männchen. Dies widerspricht der generellen Einschätzung, wie sie in anderen Stress-Studien dargestellt wird (Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Welberg et al., 2001; Estanislau und Morato, 2005; Tazumi et al., 2005). Dagegen decken sich die hier vorliegenden Befunde teilweise mit denen einer Studie, in der ein psychologischer pränataler Stressor verwendet wurde (Präsenz einer Katze (*Felis catus*) während der Trächtigkeit) (Lordi et al., 2000). Allerdings bestätigte eine Studie aus dem Jahr 2005 (Patin et al., 2005) die Befunde Lordis und Mitarbeiter (2000) nicht. Sie charakterisierten pränatal gestresste Tiere in ihrem Verhalten ebenfalls als ängstlicher. Demnach könnte die erhöhte Aktivität und geringere Ängstlichkeit der PS-Männchen ein Indiz dafür darstellen, in Situationen nachteiliger Umweltbedingungen (z.B. *crowding*: Christian und Lemunyan, 1958) mit erhöhter Abwanderung zu reagieren.

Der Befund einer größeren Varianz der Wurfzeitpunkte innerhalb des Hell-Dunkel-Rhythmus bei PS-Weibchen deutet auf eine Verschiebung ihrer tagesrhythmischen Aktivität hin. Dies steht im Einklang mit einem Befund (Koehl et al., 1999), der ebenfalls bei weiblichen Laborratten gefunden wurde. Dieser zeigt, dass die HPA-Achse pränatal gestresster Weibchen durch Hypercortisolismus (übersteigerte Corticosteronkonzentrationen) über den gesamten Tagesgang charakterisiert sein kann. Diese Studie zeigte auch, dass die Corticosteronwerte der pränatal gestressten Weibchen besonders während der Ruhephase (Hellphase), und damit auch während der von uns charakterisierten Kernzeit erhöht waren. Da pränatal gestresste Weibchen in der hier

durchgeführten Studie ihre Jungen häufiger außerhalb der Kernzeit gebären, könnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Corticosteron und Wurfzeitpunkt bestehen.

Pränataler Stress und Reproduktion (F1-Generation)

Der Befund eines leicht höheren Geburtsgewichtes der Nachkommen von PS-Weibchen verglichen mit Nachkommen von PC-Weibchen verdeutlicht, dass sich die Belastung der F0-Mütter bis in die Generation der Enkel erstrecken kann. Frühere Studien zeigten sowohl keine (Pollard, 1986), als auch deutlich negative Einflüsse maternaler Belastung auf die Reproduktion von F1-Nachkommen (Christian und Lemunyan, 1958; Herrenkohl, 1979). Zu den negativen Einflüssen zählten beispielsweise das Ausbleiben einer Konzeption, ein häufigerer Abbruch der Trächtigkeit, eine Verminderung der Wurfgröße sowie ein vermindertes Geburtsgewicht der Nachkommen (Herrenkohl, 1979). Da sich in der vorliegenden Studie PS-Weibchen in der Anzahl ihrer Nachkommen nicht von PC-Weibchen unterschieden, könnte eine höhere Körpermasse der Nachkommen pränatal gestresster Weibchen bei der Geburt ebenfalls eine höhere Überlebenschance bedeuten. Somit zeigt sich, dass chronische maternale soziale Belastung die Reproduktion der F0-Generation bei Long-Evans Laborratten beeinflusst, die Effekte auf die Reproduktion der F1-Nachkommengeneration jedoch weniger deutlich ausfallen.

Kritische Betrachtung

Die Wahl der Untersuchung der Nachkommen aus den dritten Würfen der F0-Weibchen basierte auf dem Ziel, den Einfluss einer chronischen maternalen Belastung auf die F0-Generation selbst, wie auch auf die Nachkommen zu untersuchen. Die Untersuchung lediglich eines Wurfes birgt eine gewisse Limitierung der Aussagemöglichkeiten. Zukünftige Untersuchungen könnten in diesem Zusammenhang klären, ob und in wie weit sich eine noch längere chronische Phase der maternalen Belastung (gegebenenfalls aber auch eine kürzere) auf einen möglichen vierten oder fünften Wurf von Nachkommen ähnlich auswirkt.

Da die frühe postnatale Entwicklung der Jungtiere beider F1-Nachkommen-Gruppen unter den gleichen standardisierten Bedingungen bei ihren Müttern stattfand, darf davon ausgegangen werden, dass die vorgeburtliche Phase im Mutterleib ausschlaggebend für die Unterschiede zwischen den Nachkommen war. Dennoch kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich die maternale Investition der Mütter beider Gruppen während der Laktation voneinander unterschied. Die Entscheidung für eine Aufzucht der Jungtiere

durch ihre Mütter erfolgte, da dies aus biologischer Sicht die natürlichste Form darstellt (Götz et al., 2007a). Eine Alternative hierzu ist, F1-Jungtiere beider Gruppen von Ammenmüttern aufziehen zu lassen (engl.: *cross-fostering*). Dabei werden Nachkommen belasteter und unbelasteter F0-Weibchen von der jeweils anderen Gruppe von Müttern aufgezogen. Experimente dieser Art könnten klären, welchen Einfluss die maternale Fürsorge (maternale Gruppe) auf Befunde (Physiologie und Verhalten) des Nachwuchts hat (Maccari et al., 1995). Eine andere Möglichkeit, Effekte durch Unterschiede in der maternalen Fürsorge auszuschließen, bestünde darin, alle F1-Nachkommen von einer separaten, eigens für diesen Zweck parallel zu den F0-Weibchen der beiden Experimental-Gruppen verwendeten Gruppe von Ammenmüttern aufziehen zu lassen. Allerdings gestaltet es sich in der Praxis schwierig, eine entsprechend hohe Anzahl solcher Ammen mit gleicher oder zumindest sehr ähnlicher Anzahl an Jungtieren sowie in vergleichbarem Laktationszustand zur Verfügung zu haben. Dies muss gewährleistet sein, um Aspekten der Verfügbarkeit von Muttermilch für das einzelne Jungtier gerecht zu werden.

Weitere Studien könnten zukünftig auch klären, welcher Zeitraum während der Trächtigkeit das kritische Zeitfenster darstellte, das für die Unterschiede der Nachkommen von Bedeutung war. Dies erscheint von Interesse, da sich Effekte maternaler Belastung auf die Nachkommen in Abhängigkeit von Zeitpunkt bzw. Zeitraum der maternalen Belastung unterscheiden können (Peters, 1988; Lordi et al., 2000). Außerdem könnten die in dieser Studie untersuchten Parameter der Nachkommen zusätzlich in verschiedenen Lebensaltern untersucht werden, um den Zeitpunkt der Manifestation physiologischer wie ethologischer Unterschiede zu ermitteln.

Das Design der *Resident-Intruder*-Konfrontation stellt es ein sehr gutes Modell dar, um stressinduzierte immunologische Veränderungen zu untersuchen. Der Einbezug eines Schutzkäfigs ist dabei ein besonders positiver Aspekt, da durch ihn unerwünschte, durch Verwundung ausgelöste entzündliche, sog. inflammatorische Prozesse vermieden werden. Ein Grund für die lediglich geringen Unterschiede bezüglich der Auswirkungen der pränatalen Belastung auf die Reproduktion der F1-Nachkommen könnte darin liegen, dass die Tiere in Standardhaltung in Männchen-Weibchen-Paaren gehalten wurden, und somit ein möglicher Reproduktionspartner stets zur Verfügung stand. Allerdings könnten die Befunde veränderten Verhaltens (tagesrhythmische Aktivität) der F1-Tiere unter natürlichen Lebensbedingungen einen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, einen Reproduktionspartner zu finden. Weitere Experimente unter seminaturalen

Haltungsbedingungen, wie eine Haltung in Kolonien, könnten dazu beitragen, diese Frage zu klären.

Abschließende Bewertung

Die vorliegenden Untersuchungen pränatal gestresster Nachkommen und Nachkommen unbelasteter F0-Weibchen zeigten Unterschiede im Verhalten, dem Immunsystem und Teilen des endokrinen Systems. Da die Untersuchungen an Nachkommen im Adultalter durchgeführt wurden, darf vermutet werden, dass diese Unterschiede dauerhaft sind und über die gesamte Lebensspanne eines Tieres durchaus Bedeutung erlangen können.

Der gewählte maternale Stressor ähnelte insgesamt Konfliktsituationen, wie sie unter natürlichen Bedingungen vorkommen dürften. Deshalb könnten diese Befunde einen wichtigen Beitrag zur Beurteilung der Effekte pränataler Belastung bei Säugetieren leisten. Zudem erscheinen sie auch von Bedeutung für die Schwangerschaft des Menschen, da moderate Störungen durch soziale Konflikte im alltäglichen Leben auftreten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, ob und wie sich chronische soziale Belastung während der Trächtigkeit (maternaler Stress) bei Long-Evans Laborratten auf die Reproduktion der Parentalgeneration (F0-Weibchen) selbst, sowie auf die Reproduktion, das Verhalten und die Physiologie ihrer pränatal gestressten Nachkommen (F1-Generation) auswirkt (pränataler Stress). Hierbei galt das Hauptaugenmerk der Untersuchung dem Einfluss pränataler Belastung auf Verhalten und Physiologie, insbesondere auf das Immunsystem adulter männlicher Nachkommen. Induziert wurde die maternale Belastung durch wiederholte Konfrontation trächtiger F0-Weibchen mit weiblichen Artgenossen im so genannten *Resident-Intruder* Modell.

Die vorliegende Studie zeigte auf maternaler Ebene einen deutlichen Einfluss chronischer sozialer Belastung auf die Reproduktion der F0-Weibchen, obwohl es sich um einen eher milden Stressor handelte. Die maternale Belastung resultierte in einer Verminderung der Nachkommenzahl, spiegelte sich jedoch nicht in einem verminderten Geburtsgewicht der Jungtiere wider. Jedoch zeigte sich während der frühen Entwicklungsphase bis zum Zeitpunkt der Entwöhnung eine stärkere Zunahme an Körpermasse bei Nachkommen gestresster F0-Weibchen (PS-Nachkommen) als bei Nachkommen unbelasteter F0-Weibchen (PC-Nachkommen). Diese Veränderungen der Reproduktion gestresster F0-Weibchen deuten auf eine adaptive reproduktive Strategie hin.

Die Untersuchung der Reproduktion der F1-Generation zeigte zwar keinen Effekt pränataler Belastung auf die Nachkommenzahl, jedoch lag das Geburtsgewicht der Nachkommen von PS-Weibchen höher als das der entsprechenden Kontrollen. Zudem deutete die größere Varianz der Wurfzeitpunkte innerhalb des Hell-Dunkel-Rhythmus bei PS-Weibchen auf eine Verschiebung ihrer tagesrhythmischen Aktivität hin. Somit waren Effekte pränataler Belastung auf die Reproduktion der F1-Generation ersichtlich, fielen jedoch weniger deutlich aus, als die Effekte maternaler Belastung auf die F0-Generation.

Unterschiede zwischen beiden Gruppen männlicher F1-Nachkommen zeigten sich sowohl auf ethologischer und physiologischer Ebene. So konnten PS-Männchen in ihrem Verhalten in neuen Umweltsituationen als aktiver und weniger ängstlich charakterisiert werden (elevated plus maze und open-field Test). Weiterhin konnte im Blutserum der PS-Männchen eine geringere Konzentration des Stresshormons Corticosteron, sowohl unter standardisierten Haltungsbedingungen wie unter Belastung (*ACTH challenge*), festgestellt werden. Dieser Befund deutet auf eine geringere Aktivierung des adrenocorticalen Systems

bei PS-Männchen hin. Diese eher als positiv zu erachtenden Effekte pränatalen Stresses wurden auf immunologischer Ebene nicht bestätigt. Bei PS-Männchen zeigte sich eine verminderte Anzahl und Funktionalität immunrelevanter Zellen im Blut, speziell der T-Helferzellen. Dies gilt sowohl für die Ausgangswerte, als auch für die nach wiederholter Konfrontation ermittelten Werte. Zudem konnte ein verändertes Reaktionsmuster der Zellen des Immunsystems bei PS-Männchen während wiederholter sozialer Konfrontation festgestellt werden. Die Befunde der Untersuchungen an adulten Nachkommen legen dauerhafte Effekte der pränatalen Belastung auf die Tiere nahe.

6. English Summary

This study investigated the question as to whether and how chronic social stress during pregnancy (maternal stress) in Long-Evans laboratory rats affects reproduction of the maternal generation itself (F0 females) as well as the reproduction, the behaviour and the physiology of the prenatally stressed offspring (F1 generation). The main focus of this study was to investigate the impact of prenatal stress on behaviour and physiology, especially on the immune system, of the adult male progeny. Maternal stress was induced by repeated confrontations of pregnant F0 females with female conspecifics using the so called *resident-intruder* model.

On the maternal level it could be shown that chronic social maternal stress had a great impact on F0 females' reproduction, even though the stressor could be considered as a mild one. Maternal stress lowered offspring number compared to unstressed control F0 females. Thereby, the lower litter sizes of stressed F0 females were not accompanied with reduced offspring birth weights. However, during the early juvenile phase until the point of weaning, descendants of stressed F0 females (PS animals) gained more body mass than descendants of control F0 females (PC animals). These changes in stressed F0 female reproduction suggest an adaptive reproductive strategy.

The investigation of F1 generation's reproduction did not show an effect of prenatal stress on offspring number, but birth weights of descendants from PS females were higher than in descendants of PC females. Furthermore the greater variance in parturition events in PS females within the light/dark cycle indicated a shift in circadian activity. In conclusion, chronic social stress during pregnancy affected the reproduction of the parental generation (F0 females) and, to a lesser degree, also of the F1 generation.

The investigation of male F1 generation offspring revealed differences in the behaviour as well as in physiology. PS males could be characterized as being more active and less anxious in novel environments (elevated plus-maze and open-field). Further, PS males had lower concentrations of the stress hormone corticosterone in their blood than PC males – both under standard housing conditions as well as after *ACTH challenge*. This result suggests a lower activation of the adrenocortical system in PS-males. These comparatively positive effects of prenatal stress could, however, not be confirmed by immunological data. With respect to basal values PS males showed a lowered number and function of blood immune cells, especially of the T helper cell subpopulation. These differences between PS and PC males also became evident in social confrontations with conspecifics. Moreover,

blood immune cells of PS males showed a differing reaction pattern to repeated social confrontation compared to PC males. These findings suggest enduring effects of prenatal stress on adult males.

7. Literaturverzeichnis

Ader, R., Felten, D., Cohen, N., (1991)

Psychoneuroimmunology.
Academic Press, New York.

Ambrose, H., (1972)

Effect of habitat familiarity and toe-clipping on rate of owl predation in *Microtus pennsylvanicus*.
J. Mammal. 53, 18-24.

Arnetz, B.B., Wasserman, J., Petrini, B., Brenner, S.O., Levi, L., Eneroth, P., Salovaara, H., Hjelm, R., Salovaara, L., Theorell, T., et al., (1987)

Immune function in unemployed women.
Psychosom. Med. 49, 3-12.

Austin, M.-P., Leader, L.R., Reilly, N., (2005)

Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour.
Early Hum. Dev. 81, 917-926.

Bakker, J.M., Schmidt, E.D., Kroes, H., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Tilders, F.J., Van Rees, E.P., (1995)

Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat.
J. Neuroimmunol. 63, 183-191.

Ballard, P.L., (1979)

Glucocorticoids and differentiation.
Monogr. Endocrinol. 12, 493-515.

Barbazanges, A., Piazza, P.V., Le Moal, M., Maccari, S., (1996)

Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress.
J. Neurosci. 16, 3943-3949.

Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Phipps, K., Clark, P.M., (1993)

Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth.
Diabetologia 36, 62-67.

Barnett, S.A., (1958)

Physiological effects of "social stress" in wild rats: I. The adrenal cortex.
J. Psychosom. Res. 3, 1-11.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Panerai, A.E., Sgoifo, A., Dantzer, R., Parmigiani, S., (2005)

Social factors and individual vulnerability to chronic stress exposure.
Neurosci. Biobehav. Rev. 29, 67-81.

Bauer, M.E., Perks, P., Lightman, S.L., Shanks, N., (2001)

Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation.
Physiol. Behav. 73, 525-532.

Beacham, T.D., (1979)

Size and growth characteristics of dispersing voles *Microtus townsendii*.
Oecologia 42, 1-10.

Beitins, I.Z., Bayard, F., Ances, I.G., Kowarski, A., Migeon, C.J., (1973)

The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term.
Pediatr. Res. 7, 509-519.

Biondi, M., Picardi, A., (1996)

Clinical and biological aspects of bereavement and loss-induced depression: a reappraisal.
Psychother. Psychosom. 65, 229-245.

Blanchard, D.C., Spencer, R.L., Weiss, S.M., Blanchard, R.J., McEwen, B., Sakai, R.R., (1995)

Visible burrow system as a model of chronic social stress: behavioral and neuroendocrine correlates.
Psychoneuroendocrinology 20, 117-134.

Blasco, M.J., Lopez Bernal, A., Turnbull, A.C., (1986)

11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity of the human placenta during pregnancy.
Horm. Metab. Res. 18, 638-641.

Braastad, B.O., (1998)

Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals.
Appl. Anim. Behav. Sci. 61, 159-180.

Cabrera, R.J., Rodriguez-Echandia, E.L., Jatuff, A.S., Foscolo, M., (1999)

Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior.
Braz. J. Med. Biol. Res. 32, 1229-1237.

Campbell, A.L., Murphy, B.E., (1977)

The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 435-440.

Chang, C.C., Tatum, H.J., (1975)

Effect of intrauterine copper wire on resorption of fetuses in rats.
Contraception 11, 79-84.

Christian, J.J., Lemunyan, C.D., (1958)

Adverse effects of crowding on lactation and reproduction of mice and two generations of their progeny.
Endocrinology 63, 517-529.

Clutton-Brock, T.H., Iason, G.R., (1986)

Sex ratio variation in mammals.
Q. Rev. Biol. 61, 339-374.

Coe, C.L., Lubach, G.R., Karaszewski, J.W., Ershler, W.B., (1996)

Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys.
Brain. Behav. Immun. 10, 221-234.

Cohen, S., Williamson, G.M., (1991)

Stress and infectious disease in humans.
Psychol. Bull. 109, 5-24.

Cornwall, G.A., Carter, M.W., Bradshaw, W.S., (1984)

The relationship between prenatal lethality or fetal weight and intrauterine position in rats exposed to diethylstilbestrol, zeranol, 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl, or cadmium.
Teratology 30, 341-349.

Cote, S.D., Festa-Bianchet, M., (2001)

Birthdate, mass and survival in mountain goat kids, effects of maternal characteristics and forage quality.
Oecologia 127, 230-238.

Darnaudery, M., Dutriez, I., Viltart, O., Morley-Fletcher, S., Maccari, S., (2004)

Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat.
Behav. Brain Res. 153, 211-216.

Davis, D.E., Christian, J.J., (1957)

Relation of adrenal weight to social rank in mice.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 728-731.

de Catanzaro, D., (1988)

Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice.
Physiol. Behav. 43, 691-696.

De Groot, J., Van Milligen, F.J., Moonen-Leusen, B.W., Thomas, G., Koolhaas, J.M., (1999)

A single social defeat transiently suppresses the anti-viral immune response in mice.
J. Neuroimmunol. 95, 143-151.

Dobson, S.F., Risch, T.S., Murie, J.O., (1999)

Increasing returns in the life history of Columbian ground squirrels.
J. Anim. Ecol. 68, 73-86.

Dupouy, J.P., Coffigny, H., Magre, S., (1975)

Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats.
J. Endocrinol. 65, 347-352.

Ebner, K., Wotjak, C.T., Landgraf, R., Engelmann, M., (2005)

Neuroendocrine and behavioral response to social confrontation: residents versus intruders, active versus passive coping styles.
Horm. Behav. 47, 14-21.

Engler, H., Dawils, L., Hoves, S., Kurth, S., Stevenson, J.R., Schauenstein, K., Stefanski, V., (2004)

Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms.

J. Neuroimmunol. 156, 153-162.

Estanislau, C., Morato, S., (2005)

Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze.

Behav. Brain Res. 163, 70-77.

Euker, J., Riegle, G., (1973)

Effects of stress on pregnancy in the rat.

J. Reprod. Fertil. 34, 343-346.

Fauci, A.S., (1975)

Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow.

Immunology 28, 669-680.

Fauci, A.S., Dale, D.C., (1974)

The effect of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes.

J. Clin. Invest. 53, 240-246.

Fleshner, M., Hermann, J., Lockwood, L.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., (1995)

Stressed rats fail to expand the CD45RC+CD4+ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN-gamma.

Brain. Behav. Immun. 9, 101-112.

Fleshner, M., Laudenslager, M.L., Simons, L., Maier, S.F., (1989)

Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats.

Physiol. Behav. 45, 1183-1187.

Geley, S., Fiegl, M., Hartmann, B.L., Kofler, R., (1996)

Genes mediating glucocorticoid effects and mechanisms of their regulation.

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 128, 1-97.

Glöckner, R., Karge, E., (1991)

Influence of chronic stress before and/or during gestation on pregnancy outcome of young and old Uje: WIST rats.

J. Exp. Anim. Sci. 34, 93-98.

Götz, A.A., Stefanski, V., (2007)

Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring.

Physiol. Behav. 90, 108-115.

Götz, A.A., Wittlinger, S., Stefanski, V., (2007a)

Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events.
J. Neuroimmunol. 185, 95-102.

Götz, A.A., Wolf, M., Stefanski, V., (2007b)

Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats.
submitted to: Physiology & Behavior.

Griffin, W.C., 3rd, Skinner, H.D., Salm, A.K., Birkle, D.L., (2003)

Mild prenatal stress in rats is associated with enhanced conditioned fear.
Physiol. Behav. 79, 209-215.

Guinness, F.E., Clutton-Brock, T.H., Albon, S.D., (1978)

Factors affecting calf mortality in red deer (*Cervus elaphus*).
J. Anim. Ecol. 47, 817-832.

Guo, A., Nappi, R.E., Criscuolo, M., Ficarra, G., Amram, A., Trentini, G.P., Petraglia, F., Genazzani, A.R., (1993)

Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 51, 41-45.

Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S., (1994)

Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats.
J. Neuroendocrinol. 6, 341-345.

Herbert, T.B., Cohen, S., (1993)

Stress and immunity in humans: a meta-analytic review.
Psychosom. Med. 55, 364-379.

Herrenkohl, L.R., (1979)

Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring.
Science 206, 1097-1099.

Jain, S., Bruot, B.C., Stevenson, J.R., (1996)

Cold swim stress leads to enhanced splenocyte responsiveness to concanavalin A, decreased serum testosterone, and increased serum corticosterone, glucose, and protein.
Life Sci. 59, 209-218.

Kaiser, S., Sachser, N., (1998)

The social environment during pregnancy and lactation affects the female offsprings' endocrine status and behaviour in guinea pigs.
Physiol. Behav. 63, 361-366.

Kaiser, S., Sachser, N., (2001)

Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offsprings' endocrine status and infantilizes their behaviour.
Psychoneuroendocrinology 26, 503-519.

Kaiser, S., Sachser, N., (2005)

The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function.
Neurosci. Biobehav. Rev. 29, 283-294.

Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M.H., Matthews, S.G., (2006)

Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids.
J. Physiol. 572, 31-44.

Kapoor, A., Matthews, S.G., (2005)

Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring.
J. Physiol. 566, 967-977.

Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., Weinstock, M., (1998)

Prenatal stress depresses immune function in rats.
Physiol. Behav. 63, 397-402.

Kiecolt-Glaser, J.K., Glaser, R., Shuttleworth, E.C., Dyer, C.S., Ogrocki, P., Speicher, C.E., (1987)

Chronic stress and immunity in family caregivers of Alzheimer's disease victims.
Psychosom. Med. 49, 523-535.

Klein, S.L., Rager, D.R., (1995)

Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats.
Dev. Psychobiol. 28, 321-326.

Koehl, M., Darnaudery, M., Dulluc, J., Van Reeth, O., Le Moal, M., Maccari, S., (1999)

Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender.
J. Neurobiol. 40, 302-315.

Kofman, O., (2002)

The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders.
Neurosci. Biobehav. Rev. 26, 457-470.

König, B., Riester, J., Markl, H., (1988)

Maternal care in house mice (*Mus musculus*): II. The energy costs of lactation as a function of litter size.
J. Zool. Lond. 216, 195-210.

Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., (1999)

Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology.
Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 925-935.

Koolhaas, J.M., Meerlo, P., De Boer, S.F., Strubbe, J.H., Bohus, B., (1997)

The temporal dynamics of the stress response.
Neurosci. Biobehav. Rev. 21, 775-782.

Lesage, J., Del-Favero, F., Leonhardt, M., Louvart, H., Maccari, S., Vieau, D., Darnaudery, M., (2004)

Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat.

J. Endocrinol. 181, 291-296.

Lister, R.G., (1987)

The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse.

Psychopharmacology (Berl) 92, 180-185.

Llorente, E., Brito, M.L., Machado, P., Gonzalez, M.C., (2002)

Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring.

J. Physiol. Biochem. 58, 143-149.

Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J., (2000)

Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring.

Int. J. Psychophysiol. 37, 195-205.

Maccari, S., Piazza, P.V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M., (1995)

Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress.

J. Neurosci. 15, 110-116.

Metzgar, L.H., (1967)

An experimental comparison of screech owl predation on resident and transient white footed mice (*Peromyscus leucopus*).

J. Mammal. 48, 387-391.

Miczek, K.A., (1979)

A new test for aggression in rats without aversive stimulation: differential effects of d-amphetamine and cocaine.

Psychopharmacology (Berl) 60, 253-259.

Millan, S., Gonzalez-Quijano, M.I., Giordano, M., Soto, L., Martin, A.I., Lopez-Calderon, A., (1996)

Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions.

Life Sci. 59, 1431-1442.

Monjan, A.A., Collector, M.I., (1977)

Stress-induced modulation of the immune response.

Science 196, 307-308.

Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Koehl, M., Casolini, P., Van Reeth, O., Maccari, S., (2003a)

Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine.

Brain Res. 989, 246-251.

Morley-Fletcher, S., Rea, M., Maccari, S., Laviola, G., (2003b)

Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats.

Eur.J. Neurosci. 18, 3367-3374.

Morrow-Tesch, J.L., Mcglone, J.J., Norman, R.L., (1993)

Consequences of restraint stress on natural killer cell activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*).

Psychoneuroendocrinology 18, 383-395.

Moynihan, J.A., Ader, R., (1996)

Psychoneuroimmunology: animal models of disease.

Psychosom. Med. 58, 546-558.

Munck, A., Guyre, P.M., Holbrook, N.J., (1984)

Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions.

Endocr. Rev. 5, 25-44.

Murie, J.O., Boag, D.A., (1984)

The relationship of body weight to overwinter survival in columbian ground squirrels.

J. Mammal. 65, 688-690.

Murphy, B.E., Clark, S.J., Donald, I.R., Pinsky, M., Vedady, D., (1974)

Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus.

Am. J. Obstet. Gynecol. 118, 538-541.

Nyirenda, M.J., Seckl, J.R., (1998)

Intrauterine events and the programming of adulthood disease: The role of fetal glucocorticoid exposure (Review).

Int. J. Mol. Med. 2, 607-614.

Padgett, D.A., Sheridan, J.F., Dorne, J., Berntson, G.G., Candelora, J., Glaser, R., (1998)

Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1.

Proc. Nat.l Acad. Sci. U. S. A. 95, 7231-7235.

Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Caston, J., (2005)

Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats.

Brain Res. Dev. Brain Res. 160, 265-274.

Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., (1985)

Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.

J. Neurosci. Methods. 14, 149-167.

Peters, D.A., (1988)

Effects of maternal stress during different gestational periods on the serotonergic system in adult rat offspring.

Pharmacol. Biochem. Behav. 31, 839-843.

Pollard, I., (1984)

Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats: prolonged effects on the litters of a second pregnancy.

J. Endocrinol. 100, 301-306.

Pollard, I., (1986)

Prenatal stress effects over two generations in rats.

J. Endocrinol. 109, 239-244.

Poltyrev, T., Keshet, G.I., Kay, G., Weinstock, M., (1996)

Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats.

Dev. Psychobiol. 29, 453-462.

Pratt, N.C., Lisk, R.D., (1989)

Effects of social stress during early pregnancy on litter size and sex ratio in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*).

J. Reprod. Fertil. 87, 763-769.

Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H., Le Moal, M., (1986)

Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats.

Physiol. Behav. 36, 223-228.

Rödel, H.G., Bora, A., Kaetzke, P., Khaschei, M., Hutzelmeyer, H., von Holst, D., (2004)

Over-winter survival in subadult European rabbits: weather effects, density dependence, and the impact of individual characteristics.

Oecologia 140, 566-576.

Roff, D.A., (1992)

The evolution of life histories.

Chapman & Hall, London.

Rogers, M.P., Dubey, D., Reich, P., (1979)

The influence of the psyche and the brain on immunity and disease susceptibility: a critical review.

Psychosom. Med. 41, 147-164.

Rogowitz, G.L., McClure, P.A., (1995)

Energy export and offspring growth during lactation in cotton rats (*Sigmodon hispidus*).

Funct. Ecol. 9, 143-150.

Seckl, J.R., (1997)

Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease.

Steroids 62, 89-94.

Sgoifo, A., De Boer, S.F., Haller, J., Koolhaas, J.M., (1996)

Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression.

Physiol. Behav. 60, 1403-1407.

Sgoifo, A., Koolhaas, J., De Boer, S., Musso, E., Stilli, D., Buwalda, B., Meerlo, P., (1999)

Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats.

Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 915-923.

Sobrian, S.K., Vaughn, V.T., Ashe, W.K., Markovic, B., Djuric, V., Jankovic, B.D., (1997)

Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring.

Environ. Res. 73, 227-241.

Stearns, S.C., (1992)

The evolution of life histories.

Oxford University Press, Oxford.

Stefanski, V., (2001)

Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis.

Physiol. Behav. 73, 385-391.

Stefanski, V., Ben-Eliyahu, S., (1996)

Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms.

Physiol. Behav. 60, 277-282.

Stefanski, V., Engler, H., (1998)

Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats.

Physiol. Behav. 64, 733-741.

Stefanski, V., Engler, H., (1999)

Social stress, dominance and blood cellular immunity.

J. Neuroimmunol. 94, 144-152.

Stefanski, V., Knopf, G., Schulz, S., (2001)

Long-term colony housing in Long Evans rats: immunological, hormonal, and behavioral consequences.

J. Neuroimmunol. 114, 122-130.

Stefanski, V., Raabe, C., Schulte, M., (2005)

Pregnancy and social stress in female rats: influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations.

J. Neuroimmunol. 162, 81-88.

Takeshita, S., (1990)

Studies on the influence of acute maternal stress on the fetal endocrine system in late gestation of rats.

Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi 42, 1671-1677.

Tazumi, T., Hori, E., Uwano, T., Umeno, K., Tanebe, K., Tabuchi, E., Ono, T., Nishijo, H., (2005)

Effects of prenatal maternal stress by repeated cold environment on behavioral and emotional development in the rat offspring.

Behav. Brain Res. 162, 153-160.

Tournier, J.N., Mathieu, J., Mailfert, Y., Multon, E., Drouet, C., Jouan, A., Drouet, E., (2001)

Chronic restraint stress induces severe disruption of the T-cell specific response to tetanus toxin vaccine.

Immunology 102, 87-93.

Tsigos, C., Chrousos, G.P., (2002)

Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress.

J. Psychosom. Res. 53, 865-871.

Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., Tuchscherer, A., (2002)

Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs.

Vet. Immunol. Immunopathol. 86, 195-203.

Unsworth, J.W., Pac, D.F., White, G.C., Bartmann, R.M., (1999)

Mule deer survival in Colorado, Idaho, and Montana.

J. Wildl. Manage. 63, 315-326.

Vallee, M., Maccari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., Mayo, W., (1999)

Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat.

Eur. J. Neurosci. 11, 2906-2916.

Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., Maccari, S., (1997)

Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion.

J. Neurosci. 17, 2626-2636.

von Holst, D., (1986)

Psychosocial stress and its pathophysiological effects in tree shrews.

In: Schmidt, T.H., Dembroski, T.M., Blümchen, G. (Eds.), *Biological and psychological factors in cardiovascular disease*,

Springer, Heidelberg, pp. 476-490.

von Holst, D., (1998)

The concept of stress and its relevance for animal behavior.

Adv. Stud. Behav. 27, 1-131.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., (1976)

The open-field test: A critical review.

Psychol. Bull. 83, 482-504.

Weinstock, M., (2005)

The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring.

Brain. Behav. Immun. 19, 296-308.

Welberg, L.A., Seckl, J.R., (2001)

Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain.

J. Neuroendocrinol. 13, 113-128.

Welberg, L.A., Seckl, J.R., Holmes, M.C., (2001)

Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour.

Neuroscience 104, 71-79.

Welberg, L.A., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P.M., (2005)

Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity.

J. Endocrinol. 186, R7-R12.

Wentzel, P., Rydberg, U., Eriksson, U.J., (2006)

Antioxidative treatment diminishes ethanol-induced congenital malformations in the rat.

Alcohol. Clin. Exp. Res. 30, 1752-1760.

Wildt, D.E., Riegler, G.D., Dukelow, W.R., (1975)

Physiological temperature response and embryonic mortality in stressed swine.

Am. J. Phys. 229, 1471-1475.

Yang, K., (1997)

Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: barrier to maternal glucocorticoids.

Rev. Reprod. 2, 129-132.

Young, J.B., Morrison, S.F., (1998)

Effects of fetal and neonatal environment on sympathetic nervous system development.

Diabetes Care 21, B156-B160.

Zheng, K.C., Ariizumi, M., (2007)

Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress.

J. Occup. Health. 49, 32-38.

8. Erklärung über den geleisteten Eigenanteil an den wissenschaftlichen Veröffentlichungen bzw. Manuskripten

Die vorliegende Doktorarbeit besteht aus drei wissenschaftlichen Veröffentlichungen. Der von mir zu diesen drei Manuskripten beigetragene Eigenanteil wird im Folgenden dargelegt.

Götz A. A., Wolf M., Stefanski V. (2007). **Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats.**
In Press: "Physiology & Behavior" doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.009

Die Erhebung der Daten erfolgte durch mich und Martin Wolf. Die Gesamtdaten wurden von mir statistisch ausgewertet. Verfasst wurde das Manuskript durch meine Person, mit unterstützendem Beitrag von PD. Dr. V. Stefanski.

Eigenanteil: ~80%

Götz A. A., Stefanski V. (2007). **Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring.**
Published in "Physiology & Behavior" 90(1): 108-115.

Die Verhaltenstests, Blutentnahmen, die Aufarbeitung der Blutproben im Labor sowie die Auswertung der Daten erfolgte durch meine Person. Die Studie wurde von mir verfasst, mit unterstützendem Beitrag von PD. Dr. V. Stefanski.

Eigenanteil: ~80%

Götz A. A., Wittlinger S., Stefanski V. (2007). **Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events.**
Published in "Journal of Neuroimmunology" 185(1-2): 95-102.

Die Durchführung der Konfrontationsexperimente, der Blutentnahmen und die Aufarbeitung der Proben im Labor erfolgten durch mich und Sabrina Wittlinger. Die

Auswertung der Gesamtdaten erfolgte durch meine Person. Die Studie wurde von mir verfasst, mit unterstützendem Beitrag von PD. Dr. V. Stefanski.

Eigenanteil: ~80%

9. Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner versichere ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen. Diese oder eine gleichartige Doktorprüfung wurde von mir an keiner anderen Hochschule endgültig nicht bestanden.

Bayreuth,

(Alexander Götz)

**Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on
reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats**

Alexander A. Götz, Martin Wolf, Volker Stefanski

In Press: *Physiology & Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.009

(Corresponding author: Alexander A. Götz)

Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats

Alexander A. Götz, Martin Wolf and Volker Stefanski

In Press: *Physiology & Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.01.009

(Corresponding author: Alexander A. Götz)

Abstract:

The impact of daily social maternal stress on reproduction parameters was studied in F0 and F1 generation female Long-Evans rats. Chronic maternal stress was induced in pregnant females (F0 females) by 2h social confrontation with a dominant female throughout pregnancy. Social stress of F0 females was associated with lower maternal body mass investment in litters. While maternal stress did not cause a decline in the F0 female mass, it resulted in reduced litter sizes and lower litter masses. The individual body mass of offspring from stressed (=prenatally stressed offspring, PS) and control F0 generation mothers (=prenatal control offspring, PC) did not differ at birth. However, PS offspring grew faster during lactation and were therefore heavier than PC offspring at weaning. Reproduction parameters of F1 generation females were determined until an age of 180 days. Investigation revealed that PS females did not differ from PC females in any reproduction parameter assessed, except for higher PS offspring body mass at birth. It was also observed that a higher percentage of PS females gave birth outside the core breeding period during the light (=inactive) period. This study shows that exposure to a relatively mild social stressor during pregnancy alters female reproduction in rats. However, there was no indication of higher infant mortality which is often associated with severe laboratory stress. We argue that the reduced litter sizes in stressed F0 mothers represent an adaptive strategy from an evolutionary point of view.

Keywords: social maternal stress; litter size; prenatal stress; reproduction; breeding period; pup survival; sex ratio;

1. Introduction

Stress during pregnancy, usually referred to as maternal stress, can impair female reproduction. Many studies in mammals have shown a negative impact of maternal stress on reproductive success, such as reduced litter sizes or an increased mortality of neonates [1-6]. In laboratory rats, maternal stress has also been shown to affect gestational length, reduce offspring body mass at birth, and alter the offspring's sex ratio, often resulting in female-biased litters [3,6-13].

It is important to note that the above mentioned effects are not consistently reported in all studies [14-21], and differences between studies with respect to factors such as type and duration of stressor exposure play an important role for reproductive outcomes (for review see [13]). The majority of maternal stress studies used conventional, rather artificial laboratory stressors such as restraint or electroshock, however in more recent studies psychosocial stressors have increasingly been used [6,12,22,23]. Psychosocial stressors such as social confrontation or a frequent change of group membership induce a state of instability which represents a socio-ecological condition closer related to that of natural populations [24]. Recent studies often found different behavioural, endocrine, and immunological reactions in the offspring of mothers exposed to either psychosocial stressors or conventional laboratory stressors [22,25].

Prenatal stress is defined as the impact of a maternal stressor on the developing foetus. Many studies have shown that prenatal stress has profound influences on the behaviour, and the endocrine and immune system of the F1 generation [16,22,25-30], suggesting that the reproduction of the F1 generation may also be affected. However, there are only limited numbers of studies supporting this point. Using a combination of heat, restraint, and bright light, Herrenkohl (1979) reported a lower fertility and fecundity in prenatally stressed rats [31], whereas Pollard (1986), using escapable electroshock, did not find such effects [32].

The aim of the present report was to investigate the impact of chronic psychosocial stress during pregnancy on several reproduction parameters of the parental (F0-females) and daughter (F1-females) generations in Long Evans laboratory rats. Conflict with conspecifics is a natural element of daily life in many mammals living under natural conditions. In the present study we mimicked those conditions, exposing rats to a stressor over an extended period of time. In contrast to most previous reports, we used a

psychosocial conflict paradigm with relatively high biological face validity to induce mild maternal stress [23].

2. Materials and Methods

2.1 Animals and standard housing conditions

Adult male-female pairs of Long-Evans rats, descendants of an outbred stock originally obtained from Harlan Winkelmann (Borchen, Germany), were kept in standard polycarbonate cages (26x42x15 cm). The animals had *ad libitum* access to rat standard diet and water, and were kept under controlled conditions on a 12:12-h light/dark cycle (lights off at 01:00 h). Temperature was 20 ± 1 °C, and the relative humidity approximately 50%. Cages were cleaned weekly. All procedures were approved by the local authority for laboratory animal care and use (Regierung von Mittelfranken, Ansbach, Germany).

2.2 F0 generation females and maternal stress

Two month old experimental females from standard housing conditions were randomly assigned to maternal stress (MS) or maternal control (MC) groups and allowed to breed undisturbed with their male partner. All F0 females were checked daily to determine first parturition (females aged about 3-4 months at this time). Only F0 females that gave birth were included in the study (MS: n=39; MC: n=37). Starting from the day after the first parturition, MS females underwent a daily two hours stress procedure until the birth of third litter. Thus, MS females were stressed daily during their whole second and third pregnancy (mean duration of pregnancy was about 22 days). Maternal stress was induced using a resident-intruder confrontation procedure adjusted for females [23,33]. Briefly, daily confrontations were conducted by transferring a pregnant intruder F0 female into the home cage of an unfamiliar resident female. Female-female confrontation resulted in social defeat of the intruder female. Control F0 females remained undisturbed in their home cages. Our main interest was to investigate the effects of chronic stress during pregnancy of non lactating females. Litters of the first and second pregnancy were therefore removed three days after delivery. After delivery of the third litter, no further confrontations were conducted. From that point also the male mating partner was permanently removed from the standard housing cage to ensure undisturbed weaning conditions for the offspring from stressed (prenatal stress, PS) and control females (prenatal control, PC). The young were kept with their mothers until weaning (postnatal day 21, PND21).

The current experiments are part of a long-term study on the effects of maternal/prenatal stress on the immune and endocrine system and on behaviour [25,34]. Here, we report the effects on reproduction.

2.3 Reproductive parameters of F0 generation females

Reproduction parameters recorded in MS and MC females were: the age at third litter parturition, the time interval between second and third litter parturition, and size and body mass of the third litter. In addition, maternal body mass after parturition and maternal body mass investment [%] in third litter offspring [third litter mass at birth x 100 / (third litter mass at birth + maternal body mass after parturition)] were determined. At weaning, surviving pups (F1) were counted and the survival rates of pups were calculated (% of pups surviving to PND21). Additionally, individual body masses and the male : female ratio were determined (% female pups per litter).

2.4 Reproductive parameters of F1 generation females

After weaning on PND21, male-female sibling pairs were established from each litter and kept in standard cages as described before. PC and PS females were allowed to breed undisturbed until an age of 180 days. Reproduction parameters recorded in PS and PC females were: age of females at first litter parturition, the total number of litters, the total number of pups, and the body mass per pup at birth. Maternal body mass investment [%] in litters was determined according to 2.3.

In addition, the timing of parturition of PS and PC mothers was assessed by determining the proportion of parturition events within the light and the dark phase.

2.5 Statistics

Non parametric and parametric statistics were used. Prior to the use of parametric statistics we ensured that data were normally distributed (Shapiro-Wilk test). Tests used were *Mann Whitney U*-test, χ^2 -test and *t*-test for independent variables. Within graphs, significant *P*-values are shown by asterisks (**P*<0.050; ***P*<0.010; ****P*<0.001). All statistics were calculated using SPSS for Windows (Version 14.0, SPSS, Chicago; IL) and Statistica 6.1 (StatSoft Inc.).

3. Results

3.1 Effect of maternal stress on reproduction parameters in the F0 generation

F0 females were either stressed daily (MS, n=39) during their second and third pregnancy, or kept undisturbed (MC, n=37). Reproductive parameters were assessed after the third pregnancy.

Maternal stress had a significant impact on litter size and total litter mass, with MS females giving birth to fewer pups with a lower litter mass (Fig. 1). The body mass per pup was similar in both groups (Fig. 1) with a tendency towards an increased time interval between birth of the second and third litters in MS females (MC: 24.9 ± 0.9 days; MS: 26.4 ± 0.8 days, *MWU*-test: $Z=-1.868$, $P=0.062$).

Maternal age and body mass (measured within 24 h after parturition) was similar in MC (146.8 ± 2.3 days; 322.0 ± 6.6 g) and MS females (143.1 ± 2.0 days, 320.8 ± 6.8 g, *MWU*-test, $Z=-1.076$; $P=0.282$; $Z=-0.053$; $P=0.958$). However, maternal body mass investment was lower in MS (17.3 ± 0.8 %) than in MC females (19.7 ± 0.8 %, *MWU*-test: $Z=-2.112$, $P=0.035$).

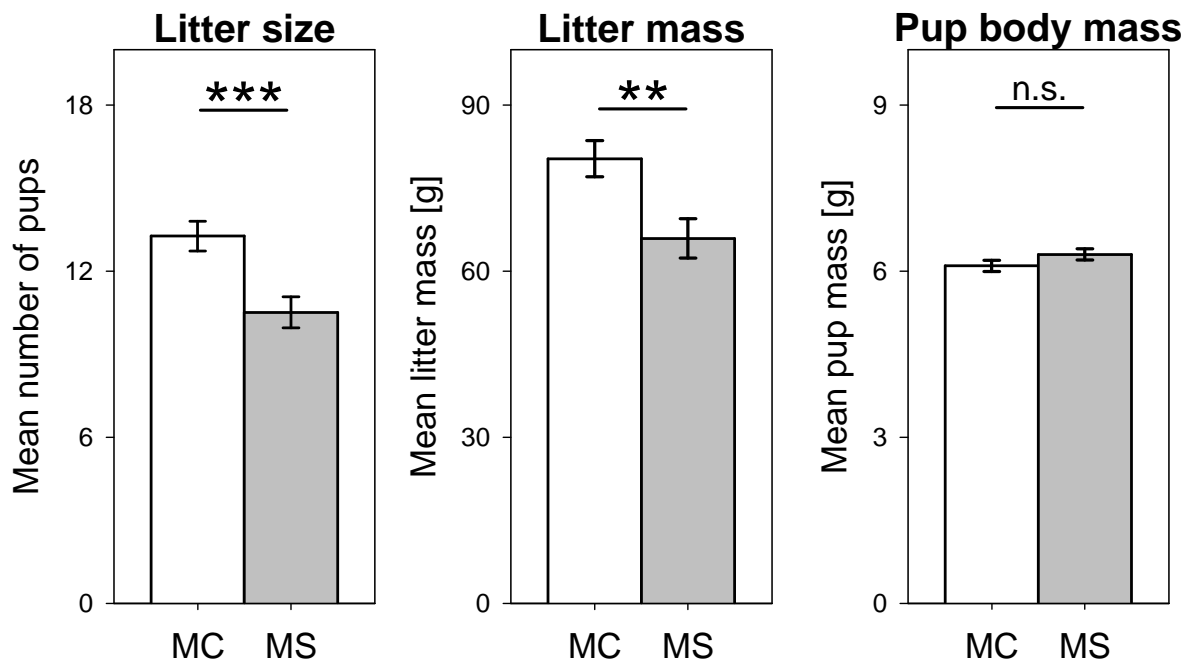


Fig. 1: Litter size, litter mass, and body mass per pup of third litters of maternal control (MC, n=37) and maternally stressed (MS, n=39) females (F0) at birth. Data represent mean \pm SEM; Statistics: *t*-test for independent variables;

3.2 Effects of maternal stress on survival and body mass of the F1 generation until weaning

The percentage of young (of each litter) that survived from birth to weaning did not differ between the offspring of MC ($89.0 \pm 1.9\%$) and MS females ($88.3 \pm 2.2\%$, *MWU*-test: $Z=-0.265$; $P=0.791$); therefore litter sizes at weaning were still smaller in litters from MS than from MC females (Fig. 2). However, in contrast to the time of birth, the mean body mass of individual pups was higher in MS litters at weaning (Fig. 2), and both gender contributed to this effect (PC males: 32.0 ± 0.9 g; PS males: 36.2 ± 1.1 g; *t*-test: $t_{68}=-2.924$; $P=0.005$; PC females: 30.9 ± 1.0 g; PS females: 35.2 ± 1.1 g; *t*-test: $t_{69}=-2.887$; $P=0.005$). Despite this fact, there was still a tendency towards higher total body masses of MC litters (Fig. 2) with the male / female ratio (% female, PC: 52.5 ± 3.1 , PS: $50.3 \pm 3.1\%$, *t*-test: $t_{69}=0.501$, $P=0.618$) being similar in both groups.

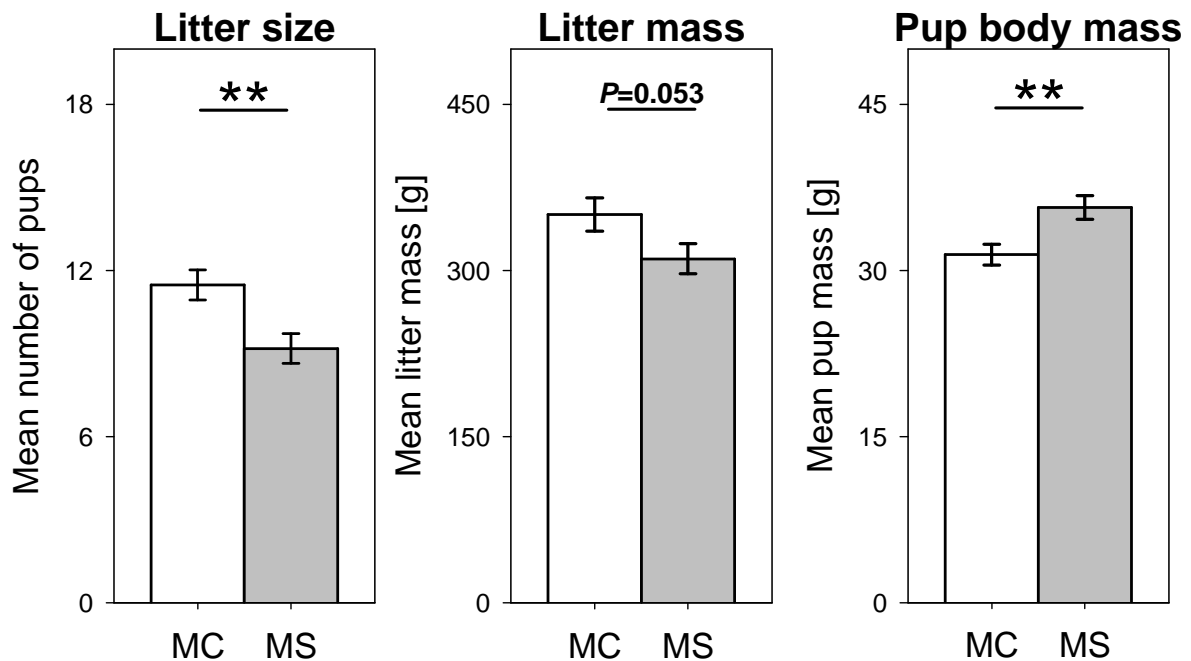


Fig. 2: Litter size, litter mass, and body mass per pup of third litters of maternal control (MC, $n=33$) and maternally stressed (MS, $n=38$) females (F0) at weaning. Data represent mean \pm SEM;

Statistics: *t*-test for independent variables: because of technical reasons data from 5 litters are missing.

3.3 Effects of maternal stress (in the parental F0 generation) on reproduction parameters of the F1 generation females

After weaning, PC and PS offspring were kept in male-female pairs and allowed to breed undisturbed until the age of 180 days. As indicated in Table 1, PC and PS females did not differ in several measures such as time of first parturition, maternal body mass investment, total number of litters, or total number of pups (Table 1). However, the mean body mass of pups from PS females was slightly higher (about 6 %) than that from PC females (Table 1). Most parturition events took place during the light phase (PC: 84.3 %; PS: 77.1 %), with a peak between 16:00 and 23:00 h. In each hour of this 7-hour core breeding period, more than the randomly expected parturition events (4.17% per hour) were recorded. More PS than PC mothers gave birth outside the core breeding period (= non core period) during the light/inactive period (Fig. 3).

Table 1: Reproductive parameters of prenatal control, (PC), and prenatally stressed, (PS), F1 generation females until an age of 180 days. Data represent mean \pm SEM;

	<u>PC</u> N=49	<u>PS</u> N=42	<u>MWU-test</u>
First litter parturition [age]	94.8 \pm 1.5	94.5 \pm 1.7	Z=-0.275, P=0.783
Number of litters [n]	3.5 \pm 0.1	3.3 \pm 0.2	Z=-0.633, P=0.527
Number of pups [n]	38.7 \pm 1.9	38.0 \pm 2.5	Z=-0.127, P=0.899
Maternal investment [%]	18.6 \pm 0.5	18.6 \pm 0.7	Z=-0.307, P=0.759
Pups' birth weights [g]	6.4 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	Z=-3.328, P<0.001

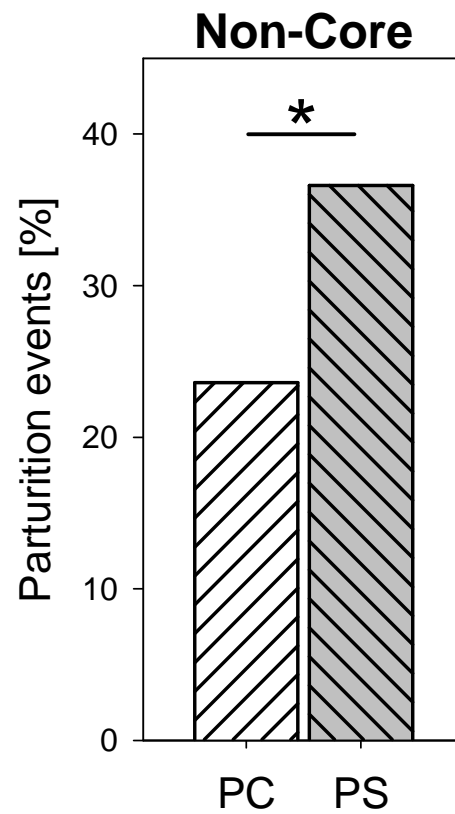


Fig. 3: Percentage of parturition events of prenatal control (PC; n=31), and prenatally stressed (PS; n=41) females (F1) outside the core breeding period (non core period) (for methodological details see 2.4). Statistics: χ^2 -test: $\chi^2=4.19, P=0.041$;

4. Discussion

We investigated the effects of exposure to a chronic psychosocial stressor during pregnancy on the F0 females' reproductive outcome and on the reproduction of their prenatally stressed offspring (F1 females). F0 mothers were exposed daily to an aggressive female before and during their third pregnancy. We have previously shown that this stress model causes repeated daily increases of plasma corticosterone concentrations but does not lead to a reduction in maternal body mass [23]), thus representing a relatively mild psychosocial stressor. Daily confrontations during pregnancy of F0 females resulted in reduced litter sizes and total litter body masses. Given that the body masses of stressed and unstressed F0 females were similar, the maternal body mass investment was lower in stressed females. The birth weight and mortality rates until weaning were similar in both offspring groups, but PS offspring had a higher growth rate until weaning. Within an evolutionary context, the altered reproduction pattern of stressed females could be adaptive. The most crucial factor determining offspring growth and survival is the amount of milk provided by the mother. Lower number of siblings usually increase the share of milk obtained by the individual offspring, thus leading to increased pre-weaning growth [35-38]; reviewed in: [39]. Moreover, offspring growth during the juvenile phase is often associated with an increased probability of surviving until sexual maturity [40-44]. For a mother in stressful environments it could therefore be advantageous to invest energy into lactation rather than in the total number of offspring (trade-off between offspring quality and quantity) [45,46]. Recently we have reported that prenatally stressed offspring are less anxious and more explorative as compared to offspring of unstressed females [25]. Possibly, an increased explorative activity improves the ability of the prenatally stressed offspring to emigrate, which could potentially improve its survival under adverse environmental conditions. The present data also suggest that social stress increases the time interval between two parturition events in F0 females. In line with the above arguments, a delay in conception would allow stressed females to invest more energy into reproduction, since the females would have more time to compensate for their costs of the previous reproductive event [47].

The findings of the present study only partially correspond to the effects often associated with severe stressors. Most notably we did not find an increased mortality of neonates [3,6] or a reduced body mass of stressed mothers at weaning [17]. One possible explanation for these differences is the type of stress response associated with the respective stress model. Although mothers in the present confrontation situation show a short-term increase in

corticosterone concentration in response to daily confrontation, no chronically elevated activation of the HPA system or a loss of body mass was observed here [23]. This physiological pattern suggests an (pro-) active coping style of the mothers. We assume, that still sufficient maternal energy could be allocated to reproduction under the present conditions, while other conditions associated with chronic and passive stress may require far more energy for maternal self-preservation. This assumption would be of interested to study in the future. In comparison to the parental (F0) generation, there was only a limited effect of maternal stress on the reproduction of PS mothers (F1 generation). The offspring of PS mothers were slightly heavier (6%) at birth compared to offspring from PC mothers. The present data however suggest that the diurnal peak of delivery is less clearly defined in PS females, because a lower proportion of PS-females gave birth during the core breeding period. This may indicate a shift in females' diurnal rhythm. Indeed a previous report has shown that prenatally stressed female rats show hypercorticism over the entire 24-h period and high corticosterone concentrations particularly during the quiescent period [48]. Whether higher corticosterone concentrations during the light period cause the altered breeding pattern, needs to be tested. Nevertheless, the altered diurnal breeding rhythm of PS-females could support the general view that prenatal stress has an impact on the behaviour of offspring in adulthood [20,49,50]. Offspring pairs in the present study were established either from stressed or unstressed litters. This approach reflects a natural condition where offspring of stressed mothers remain in the same area and reproduce. Of course, there are other possible breeding conditions that could be tested. For example, it would be of interest to investigate mixed offspring pairs (stress/ non-stress). Such condition may exist in a natural habitat after emigration or if only some individuals of a rat colony were exposed to stress. In addition, investigation of mixed offspring pairs might help to clarify a possible influence of the father on offspring characteristics.

The present study shows that a daily mild stressor, applied over an extended period, affects F0 reproduction. This finding is of biological relevance because it reflects a naturalistic condition with recurrent daily conflicts. However, it would be an interesting question for future studies to elaborate whether social stress exposure over shorter periods is equally potent in influencing the F0 female reproduction. Previous studies have demonstrated that early [2,5] as well as late pregnancy stress [1,4,6] are both particularly effective in causing reproductive deficits.

In conclusion, chronic social stress during pregnancy affects reproduction of the parental generation and, to a lesser degree, also of the F1 generation females. Although maternal

stress reduced mass and size of litters, the growth of individual offspring until weaning was improved. We hypothesize that such changes in reproduction in stressed F0 mothers towards lower litter size and higher offspring weaning mass reflect an adaptive reproductive strategy. In this way, mothers might improve the probability of survival of the offspring in adverse environments.

Acknowledgements:

The present work was supported by the German Research Foundation (DFG) (project number: STE 633/ 5-1). Thanks to Heiko Rödel for his helpful advice in statistical analysis.

References:

- [1]. Euker J, Riegler G. Effects of stress on pregnancy in the rat. *J Reprod Fertil* 1973;34:343-6.
- [2]. Wildt DE, Riegler GD, Dukelow WR. Physiological temperature response and embryonic mortality in stressed swine. *Am J Phys* 1975;229:1471-5.
- [3]. Pollard I. Effects of stress administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring of rats: prolonged effects on the litters of a second pregnancy. *J Endocrinol* 1984;100:301-6.
- [4]. Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, Tuchscherer A. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;86:195-203.
- [5]. de Catanzaro D. Effect of predator exposure upon early pregnancy in mice. *Physiol Behav* 1988;43:691-6.
- [6]. Lordi B, Patin V, Protais P, Mellier D, Caston J. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int J Psychophysiol* 2000;37:195-205.
- [7]. Sobrian SK, Vaughn VT, Ashe WK, Markovic B, Djuric V, Jankovic BD. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ Res* 1997;73:227-41.
- [8]. Glöckner R, Karge E. Influence of chronic stress before and/or during gestation on pregnancy outcome of young and old Uje: WIST rats. *J Exp Anim Sci* 1991;34:93-8.
- [9]. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, Darnaudery M. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol* 2004;181:291-6.
- [10]. Clutton-Brock TH, Iason GR. Sex ratio variation in mammals. *Q Rev Biol* 1986;61:339-74.
- [11]. Salgado AS, Martinez SM, Tarres MC. Body weight of litters of rats stressed during pregnancy. *Medicina* 1977;37:38-42.
- [12]. Pratt NC, Lisk RD. Effects of social stress during early pregnancy on litter size and sex ratio in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Reprod Fertil* 1989;87:763-9.
- [13]. Braastad BO. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Appl Anim Behav Sci* 1998;61:159-80.

- [14]. Estanislau C, Morato S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2005;163:70-7.
- [15]. Poltyrev T, Keshet GI, Kay G, Weinstock M. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol* 1996;29:453-62.
- [16]. Llorente E, Brito ML, Machado P, Gonzalez MC. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *J Physiol Biochem* 2002;58:143-9.
- [17]. Morley-Fletcher S, Rea M, Maccari S, Laviola G. Environmental enrichment during adolescence reverses the effects of prenatal stress on play behaviour and HPA axis reactivity in rats. *Eur J Neurosci* 2003;18:3367-74.
- [18]. Griffin WC, 3rd, Skinner HD, Salm AK, Birkle DL. Mild prenatal stress in rats is associated with enhanced conditioned fear. *Physiol Behav* 2003;79:209-15.
- [19]. Kapoor A, Matthews SG. Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring. *J Physiol* 2005;566:967-77.
- [20]. Dahlöf LG, Hard E, Larsson K. Influence of maternal stress on offspring sexual behaviour. *Anim Behav* 1977;25:958-68.
- [21]. Guo A, Nappi RE, Criscuolo M, Ficarra G, Amram A, Trentini GP, Petraglia F, Genazzani AR. Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1993;51:41-5.
- [22]. Kaiser S, Sachser N. The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:283-94.
- [23]. Stefanski V, Raabe C, Schulte M. Pregnancy and social stress in female rats: influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *J Neuroimmunol* 2005;162:81-8.
- [24]. von Holst D, *Social stress in wild mammals in their natural habitat*, in *Coping with Challenge: Welfare in Animals including Humans*, Broom DM, Editor. 2001, Dahlem University Press: Berlin. p. 317-35.
- [25]. Götz AA, Stefanski V. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol Behav* 2007;90:108-15.
- [26]. Austin M-P, Leader LR, Reilly N. Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Hum Dev* 2005;81:917-26.
- [27]. Kofman O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 2002;26:457-70.

- [28]. Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol* 2006;572:31-44.
- [29]. Klein SL, Rager DR. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev Psychobiol* 1995;28:321-6.
- [30]. Kay G, Tarcic N, Poltyrev T, Weinstock M. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol Behav* 1998;63:397-402.
- [31]. Herrenkohl LR. Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. *Science* 1979;206:1097-9.
- [32]. Pollard I. Prenatal stress effects over two generations in rats. *J Endocrinol* 1986;109:239-44.
- [33]. Stefanski V, Gruner S. Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain Behav Immun* 2006;20:369-77.
- [34]. Götz AA, Wittlinger S, Stefanski V. Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events. *J Neuroimmunol* 2007;185:95-102.
- [35]. König B, Riester J, Markl H. Maternal care in house mice (*Mus musculus*): II. The energy costs of lactation as a function of litter size. *J Zool Lond* 1988;216:195-210.
- [36]. Rogowitz GL, McClure PA. Energy export and offspring growth during lactation in cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *Funct Ecol* 1995;9:143-50.
- [37]. Dobson SF, Risch TS, Murie JO. Increasing returns in the life history of Columbian ground squirrels. *J Anim Ecol* 1999;68:73-86.
- [38]. Rödel HG, Prager G, Stefanski V, von Holst D, Hudson R. Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. *Physiol Behav* (2007);doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.047.
- [39]. Mendl M. The effects of litter size on variation in mother-offspring relationships and behavioural and physical development in several mammalian species. *J Zool Lond* 1988;215:15-34.
- [40]. Guinness FE, Clutton-Brock TH, Albon SD. Factors affecting calf mortality in red deer (*Cervus elaphus*). *J Anim Ecol* 1978;47:817-32.
- [41]. Murie JO, Boag DA. The relationship of body weight to overwinter survival in columbian ground squirrels. *J Mammal* 1984;65:688-90.
- [42]. Unsworth JW, Pac DF, White GC, Bartmann RM. Mule deer survival in Colorado, Idaho, and Montana. *J Wildl Manage* 1999;63:315-26.
- [43]. Cote SD, Festa-Bianchet M. Birthdate, mass and survival in mountain goat kids, effects of maternal characteristics and forage quality. *Oecologia* 2001;127:230-8.

- [44]. Rödel HG, Bora A, Kaetzke P, Khaschei M, Hutzelmeyer H, von Holst D. Overwinter survival in subadult European rabbits: weather effects, density dependence, and the impact of individual characteristics. *Oecologia* 2004;140:566-76.
- [45]. Roff DA. The evolution of life histories. In, London: Chapman & Hall; 1992.
- [46]. Stearns SC. The evolution of life histories. In, Oxford: Oxford University Press; 1992.
- [47]. Rödel HG, Bora A, Kaetzke P, Khaschei M, Hutzelmeyer HD, Zapka M, von Holst D. Timing of breeding and reproductive performance of female European rabbits in response to winter temperature and body mass. *Can J Zool* 2005;83:935-42.
- [48]. Koehl M, Darnaudery M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol* 1999;40:302-15.
- [49]. Patin V, Lordi B, Vincent A, Caston J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;160:265-74.
- [50]. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 2001;65:427-51.

**Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum
corticosterone, blood immune parameters and anxiety
behaviour in adult male rat offspring**

Alexander A. Götz, Volker Stefanski

Published in *Physiology & Behavior* 90(1): 108-115: (2007)

(Corresponding author: Alexander A. Götz)

Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring

Alexander A. Götz, Volker Stefanski

Published in *Physiology & Behavior* 90(1): 108-115: (2007)

(Corresponding author: Alexander A. Götz)

Abstract

Exposure to prenatal stress can impair the behavioural and hormonal development in mammals. However, the consequences for the immune system are rarely investigated and there is only limited evidence that naturalistic prenatal stressors do also have the potential to affect the offspring. Thus, by using a social conflict model in female Long-Evans rats, we investigated the effects of prenatal social stress on several behavioural, hormonal and immunological parameters. Offspring from stressed and non-stressed pregnant females were housed in pairs after weaning, and tested at an age of 4-6 months. Prenatally stressed (PS) males were more active in the elevated plus-maze test as indicated by significantly more frequent entries into the open arms compared to prenatal control males (PC). In addition, PS males had significantly lower serum corticosterone concentrations under basal conditions as well as after ACTH-challenge. The basal number of total leukocytes was significantly lower in the PS group due to significantly lower lymphocyte counts. In particular, the CD4⁺ T-helper cell subset was affected. The lymphocyte proliferation to pokeweed mitogen was lower in PS males. Because some of the present findings do not correspond to previous studies using conventional stressors, we assume that the nature of the stressor plays an important role for pregnancy outcome and behaviour and physiology of the offspring in later life.

Keywords: pregnancy, psychosocial stress, offspring, immune cell numbers, proliferation, corticosterone, ACTH challenge, elevated plus-maze, open field

1. Introduction

Increasing evidence suggests that not only stressor exposure during early postnatal life (Anisman et al., 1998; Pryce et al., 2005), but also stress experienced by the mother during pregnancy can affect physiology and behaviour of the offspring. The effects of prenatal stress were primarily tested in young animals (e.g. (Arck, 2001; Clark et al., 1999; Coe et al., 1996; McLean and Smith, 2001; Sobrian et al., 1997)), but also the adult organism seems to be affected. Several studies on adult rat behaviour indicated increased emotionality/anxiety of prenatally stressed offspring e.g. in the elevated plus-maze test (Estanislau and Morato, 2005; Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Welberg et al., 2001). However, this effect was not consistently reported (Lordi et al., 2000; Rimondini et al., 2003; Tazumi et al., 2005). Moreover, also the behavioural results from open field studies were not uniform (Cannizzaro et al., 2006; Poltyrev et al., 1996; Tazumi et al., 2005; Vallee et al., 1997). With respect to HPA axis activity, prenatally stressed rats often showed a more pronounced secretion of corticosterone in reaction to laboratory stressors in adulthood (Barbazanges et al., 1996; Maccari et al., 1995; Vallee et al., 1999; Vallee et al., 1996; Weinstock, 1997). However, most studies did not find differences in basal plasma corticosterone concentrations (Kaiser et al., 2003; Kaiser and Sachser, 2001; Kay et al., 1998; McCormick et al., 1995; Morley-Fletcher et al., 2003; Sobrian et al., 1997; Takahashi and Kalin, 1991; Vallee et al., 1996). Despite the importance of the immune system for the health of an individual, only few studies focused on the impact of prenatal stress on the adult animals' immune system. Llorente et al (2002) showed that maternal "hanging stress" in Sprague-Dawley rats reduced the total leukocyte count in the peripheral blood of adult male offspring, especially the CD8⁺ T lymphocyte subset, while the number of granulocytes was increased (Llorente et al., 2002). Two further studies assessed some measures of splenic immune function, but the direction of changes was not consistent. Klein and Rager (1995) reported higher NK cell cytotoxicity in prenatally stressed than in adult control offspring (Klein and Rager, 1995), while the opposite finding was published by Kay and co-workers (1998) (Kay et al., 1998). In the latter study, also lower mitogenic response of splenocytes was reported in prenatally stressed offspring (Kay et al., 1998).

In the prenatal stress studies mentioned above, exclusively conventional laboratory stressors were used. However, social stressors certainly represent an ecologically more relevant stimulus especially with respect to the human situation (Kaiser and Sachser, 2005). In a series of studies in guinea pigs, Kaiser and colleagues showed that maternal

exposure to social stress during pregnancy and lactation indeed affects the behaviour and neuroendocrine function of the adult offspring (Kaiser et al., 2003; Kaiser and Sachser, 2001; Kaiser and Sachser, 2005; Sachser and Kaiser, 1996), but systematic investigation on the effects of prenatal social stress in adult rodents is still missing.

In the present study we used a psychosocial conflict paradigm to induce maternal stress. Repeated daily confrontation of female rats has been shown to result in elevated serum corticosterone concentrations and several other physiological alterations in pregnant mothers (Stefanski et al., 2005). The aim of this study was to investigate the long-term effects of repeated acute maternal stress on behaviour and physiology in male offspring. In particular, we carried out standardised behavioural reaction tests (elevated plus-maze test, open field test), measured the HPA axis responsiveness (serum corticosterone under baseline conditions and after ACTH-challenge), and determined several measures of blood cellular immunity.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and standard housing conditions

Adult male-female pairs of Long-Evans rats, descendants of an outbred stock, originally obtained from Harlan Winkelmann (Borchen, Germany), were kept in standard polycarbonate cages (26x42x15 cm). The animals had *ad libitum* access to rat standard diet and water, and were kept under controlled conditions on a 12:12-h light/dark cycle (lights off at 01:00 h). Temperature was 20 ± 1 °C, and the relative humidity approximately 50%. Cages were cleaned weekly, but never less than five days before blood sampling. All procedures were approved by the local authority for laboratory animal care and use (Regierung von Mittelfranken, Ansbach, Germany).

2.2 Maternal stress

Maternal stress was induced by using a resident-intruder confrontation procedure adjusted for females (Stefanski and Gruner, 2006; Stefanski et al., 2005). This social conflict model is based on the establishment of a “territory” by a resident female, and its subsequent defence against unfamiliar females. The confrontations were started in the middle of the active (dark) period by transferring each intruder female into the home cage (“territory”) (100x50x70 cm) of an unfamiliar resident female. Except during the confrontations (2 h each day), resident females were housed in pairs with males. Immediately before each confrontation, the resident male was removed from the enclosure. The absence of males assured dyadic aggressive interactions between the females, but in none of the cases these interactions led to wounding of intruder females due to resident biting. Resident females were between 6 and 12 months old; only resident females that reliably attacked female intruders in pre-tests within 15 min were used. Intruder females were confronted daily for 2 h (continuous coexistence) for a period of two months. Using a daily rotation system, a maximum of 16 intruders were exposed simultaneously to one of twenty different unfamiliar resident females (each resident female was used at least every other day). Control females remained undisturbed in their home cages. Experimental females were randomly assigned to intruder (total $n = 52$) or control groups (total $n = 51$) and were 3-4 month old at the start of the confrontations (equalling the start of their second pregnancy). In all experiments litter of third pregnancy was used.

2.3 Prenatally stressed offspring, experimental design, and time of blood sampling

After delivery no further confrontations were conducted, and the male mating partner was removed from the standard housing cage to assure undisturbed weaning condition for offspring from stressed (prenatal stress, PS) and control females (prenatal control, PC). The young were kept with their mothers until weaning (postnatal day 21). Four male-female pairs (if possible) were established from each litter and kept in standard cages as described before. Experimental procedures (see below) were performed on prenatal control and prenatally stressed males. The males were assigned to three major experiments:

- (1) Behavioural analysis (age: 134-141 days; PC and PS: 14 animals each)
- (2) ACTH challenge test (age: 160-190 days; number of animals: PC = 29 / PS = 30),
- (3) Basal immune measurements (age: 140-180 days; number of animals: PC = 44 / PS = 46, in three sets).

From all animals investigated (behavioural analysis, ACTH challenge, and basal immune measurements) blood was collected for the determination of basal corticosterone concentrations (see *Corticosterone measurement*). Blood samples for basal corticosterone were taken at least five days before any behavioural analysis or a blood sampling for immune measurements. In case of the ACTH experiment, basal corticosterone samples were taken immediately prior ACTH injection (see details there). From 85 PC and 90 PS males blood was obtained within the three minute time limit set for accurate basal corticosterone measurements.

2.4 Behavioural tests

Two different tests were conducted subsequently: the *elevated plus-maze* (at age 134 days) and the *open field test* (at age 141 days).

Elevated plus-maze: The apparatus consisted of four elevated arms (80 cm above the floor, 50 cm long and 10 cm wide). The arms were arranged in a cross-like position, with two opposite arms being enclosed (by 40 cm high walls), and two being open, having at their intersection a central square platform (10 x 10 cm) which gave access to all four arms. All floor surfaces were grey and made of polyvinyl carbonate (PVC). Under dim red

light condition each rat was placed on the central platform facing one open arm. The behaviour was recorded for ten minutes.

The variables recorded were: number of entries and time spent (with all four paws) inside each arm or the central platform, respectively; open arm entries in percentage of all entries (open + closed arms), time spent on open arms in percentage of total time spent on all arms (open + closed arms). The mean time per entry spent in each category was also calculated. Observations were made in the dark phase between 08:00 and 10:00 h. The plus-maze was carefully cleaned after each test.

Open field test: The open field arena (100 x 100 cm) was made of dark grey polyvinyl carbonate (PVC) with 70 cm high walls. The arena was divided into 25 squares of 20 x 20 cm and was dimly illuminated by red light. Each rat was placed in the centre of the open field and its behaviour was recorded by a video camera. For ten minutes the following behaviours were determined: number of entries and percentage of time spent in outer squares (those adjacent to the walls), number of entries and time spent in inner squares, as well as time spent moving (sec.), mean time per entry (sec.) and locomotion (number of lines crossed) for each of both categories, respectively. After each test, the open field was carefully cleaned as mentioned before. Data were analysed via the computer programme MS-DOS The Observer 3.0 (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands).

2.5 Blood sampling technique

Blood samples were taken from the tail vein of unanaesthetized rats between 08:00 and 10:00 h. using an established technique, described before (Stefanski, 1998). Briefly, the rats were restrained in a dark, size-adjustable restrainer with the tail exposed through an open spout. A heparinized 22-gauge needle was then inserted into the vessel in the midventral surface of the tail. Around 0.5 ml of blood were, depending on the tests carried out, collected in several tubes, (uncoated tubes for serum-corticosterone measurement, heparinized test tubes for functional assays and K₂-EDTA-coated tubes for FACS-analysis). The sample was usually collected within 1–3 min. Blood sampling was terminated after 3 minutes for analysis of serum concentrations of corticosterone, and after 4 min for immune measurements. The blood was used immediately after sampling for the immunological measurements. For corticosterone measurements, serum was separated by centrifugation and stored at –20 °C.

2.6 Corticosterone measurement

Total serum corticosterone concentration was measured using a standard radioimmunoassay (Foster and Dunn, 1974). The specific antibody was kindly provided by the Institute of Pharmacology, University of Heidelberg, Germany. Antibody cross-reactivity with other relevant steroids was 4.4% (cortisol), 30% (deoxy-corticosterone) and 5.5% (testosterone). Sensitivity of the corticosterone radioimmunoassay was 5 ng/ml. The intraassay coefficient of variation was 2.3% and interassay coefficient of variation was 8.4%.

2.7 ACTH challenge test

Immediately after blood samples for corticosterone baseline measurements (see 2.3) were taken ACTH challenge test was performed. Each individual was injected subcutaneously with 0.05 ml (= 5 I.U.) of a synthetic ACTH solution (Synacthen Depot, Novartis, Germany; concentration: 1mg/ml), which resulted (as pre-tests have shown) in a maximum increase in glucocorticoid levels, reaching a plateau phase sixty minutes after injection. This maximum level can be interpreted as the adaptive state of an individual's adrenocortical system (Koolhaas et al., 1999). After the ACTH injection, the animals were returned to home cages, and after a further 60 minutes blood samples were again taken for corticosterone concentration measurement.

2.8 Leukocyte counts and subpopulations

Total leukocyte counts were determined on an automatic cell counter (Z2, Beckman-Coulter, Miami, FL). For leukocyte phenotyping, blood aliquots were incubated for 20 min at room temperature with FITC-conjugated anti-rat myeloid cells (clone ED9), PE-conjugated anti-rat CD45/LCA (clone OX-1), FITC-conjugated anti-rat CD4 (clone OX-38), FITC-conjugated anti-rat CD8b (clone 341), FITC-conjugated anti-rat NKR-P1A (clone 10/78), FITC-conjugated anti-rat CD45RA (clone OX-33) or PE-conjugated anti-rat CD3 (clone G4.18). Monoclonal antibodies were obtained from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany) and Serotec (Düsseldorf, Germany). Antibody labeling was performed following the standard protocols and using FACS lysing solution (BD

Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany) supplemented by PBS (Dulbecco's PBS without calcium and magnesium, 2% FBS, 0.1% NaN₃). Ten thousand cells from each sample were analysed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany) using the software Attractors and CellQuest.

Lymphocytes, monocytes and neutrophil granulocytes were identified by their forward and side scatter characteristics and their differences in CD45 and ED9 expression. Lymphocyte subpopulations were identified by a combination of lineage specific surface markers:

CD3⁺/CD4⁺ (T helper cells), CD3⁺/CD8b⁺ (cytotoxic T cells), CD3⁻/NKR-P1A⁺ (NK cells), CD45RA⁺ (B cells). Monocytes (CD3⁻/CD4⁺) were excluded from the lymphocyte gate.

2.9 Proliferative response

Whole blood mitogenic stimulation assays were performed to determine the proliferative capacity of lymphocytes using Concanavalin A (ConA) (predominantly stimulating T cells) and pokeweed mitogen (PWM) (stimulating B and T cells), (both Sigma, Deisenhofen, Germany). In brief, heparinized blood was diluted 1:10 with RPMI-10 (RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50 µg/ml gentamicin). One hundred microlitres of this dilution were cultured in sterile 96-well round-bottom tissue culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) with either 100 µl RPMI-10 (unstimulated cells) or RPMI-10 containing 5 µg/ml ConA or 5 µg/ml PWM respectively (stimulated cells). Cells were then incubated for 72 h in a humidified atmosphere (37 °C, 5% CO₂), pulsed with 0.5 µCi [³H]-thymidine (NEN Life Science Products, Cologne, Germany), and harvested 24 h later on glass filters (Skatron, Lier, Norway). Incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac, Freiburg, Germany). All measurements were carried out in quadruplicate. The mean of counts per minute (cpm) was calculated for each individual (Mean ± SEM of absolute counts over all animals was: Con A: 43502 ± 2323; PWM: 24701 ± 1944; cpm of unstimulated cells were about 1% of cpm of cells stimulated with Con A and about 2% of cells stimulated with PWM) and the proliferative index (*PI*) was determined ($PI = \text{stimulated cells} / \text{unstimulated cells}$). Calculation of *PI* values allow direct comparisons among different sampling days. Additionally, the *PI* is independent of individual lymphocyte numbers in the assay and therefore represents proliferative capacity of lymphocytes on a single cell level.

2.10 Statistics

Prior to the use of parametric statistics we ensured that data were normally distributed (Shapiro-Wilk test). We also ensured that variances were homogenous (Levene test). If data were not normally distributed log-transformation was used. In cases where transformation failed to reach normal distribution data (that showed a right skewed distribution) were analysed by a generalized linear model for gamma distribution with log-link function (Dobson, 2001).

Samples for blood immune cells were obtained from three distinct trials, which may cause inter-trial differences in immune parameters measured. Therefore, additionally to the factor prenatal treatment (group) the factor trial (data set one to three) was included into the statistical models. If interaction terms (group x trial) were not statistically significant, they were removed from the final model (Engqvist, 2005).

All data are expressed as mean \pm SEM. Within graphs significant *P*-values are shown by asterisks (**P*<0.050, ***P*<0.010). All statistics were calculated using SPSS for Windows (Version 12.0, SPSS, Chicago, IL) and Statistica 6.1 (StatSoft Inc.).

3. Results

3.1 Behavioural tests

3.1.1 Elevated plus-maze

PS males were more active than PC males during the 10 minutes test trial. PS males entered both arms more frequently (total arm entries (open + closed arms)): PC 17.0 ± 0.7 ; PS 20.9 ± 1.3 (t -test for independent variables: $t_{25}=2.620$; $P=0.015$); this was mainly due to the fact that PS males entered the central platform and the open arms more frequently (Fig. 1). The number of entries into the closed arms did not differ between the groups (Fig. 1). A percentage of open arm entries (% open arms / (open + closed arms)) was calculated to adjust for individual differences in activity. This percentage was higher in PS males, although the difference failed to reach statistical significance (PC: $17.3 \pm 3.2\%$; PS: $25.1 \pm 3.5\%$; $t_{25}=1.636$; $P=0.114$).

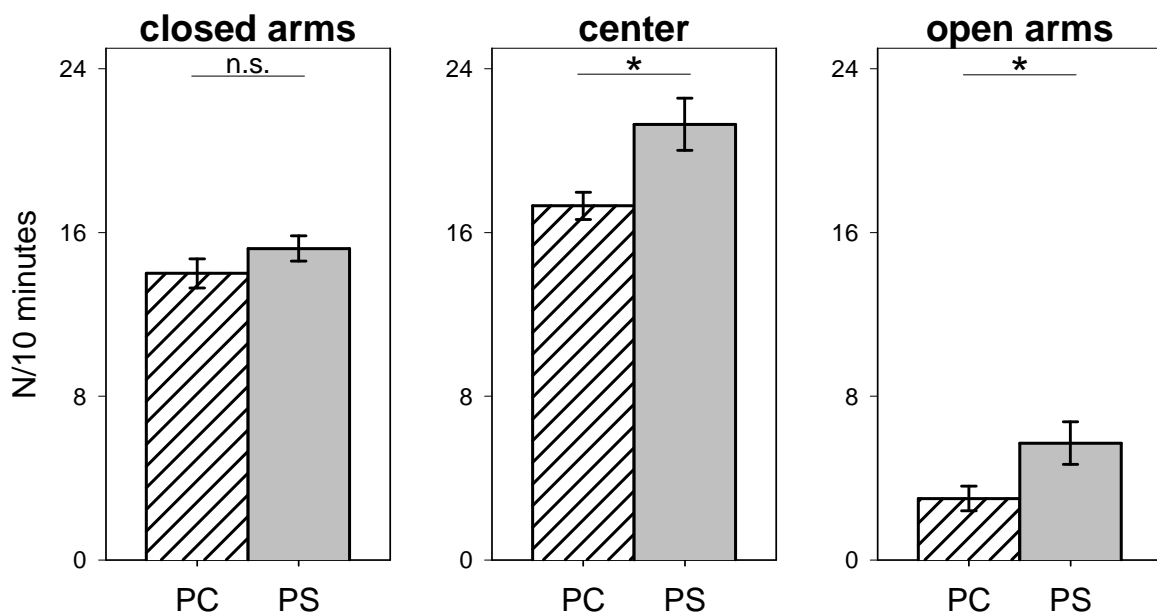


Fig. 1: The effect of prenatal stress on entries into closed arms, central platform and open arms in the elevated plus-maze test (mean \pm SEM). PC (hatched bars, $n=13$) and PS males (grey bars, $n=14$). t -test for independent variables: (A) closed arms: $t_{25}=-1.294$; $P=0.207$; (B) central platform: $t_{25}=-2.701$; $P=0.012$; (C) open arms: $t_{25}=-2.207$; $P=0.037$.

3.1.2 Open field

Statistical analysis revealed no significant differences in parameters recorded between both, PC and PS males. However, there nearly was a tendency towards PS males, that spent a higher percentage of time in the inner squares (PS: 8.8 % \pm 1.5; PC: 6.1 % \pm 0.8, $t_{26}=-1.630$; $P=0.115$) and more time moving within respective (PS: 26.6 sec. \pm 5.1; PC: 16.3 sec. \pm 3.4, $t_{26}=-1.683$; $P=0.104$) than PC males.

3.2 Baseline serum corticosterone concentrations and ACTH-induced CORT release

Baseline corticosterone (CORT) concentrations from all animals included in this study showed that CORT concentrations were about 12% higher in PC males (PC: 125.8 \pm 4.8 [ng/ml]) compared to PS males (PS: 112.4 \pm 3.9 [ng/ml]) (t -test for independent variables; $t_{173}=2.151$, $P=0.033$).

RM-ANOVA revealed that the factors *ACTH* and *prenatal stress* had a significant impact on serum corticosterone concentrations. As expected, ACTH injections resulted in a strong increase in CORT concentrations in both groups. CORT concentrations were higher in PC males compared to PS males, and the absence of a significant *ACTH* \times *prenatal stress* interaction indicates a similar reaction of both groups to ACTH challenge (%-increase: PC: 189.6 \pm 27.4; PS: 202.4 \pm 28.1) (Fig. 2, see figure legends for statistical details).

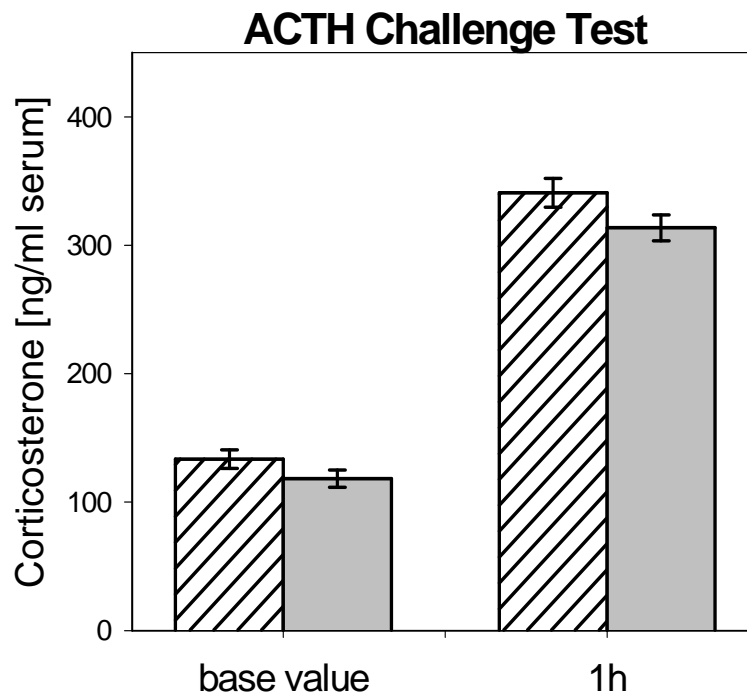


Fig. 2: Serum corticosterone concentration (mean \pm SEM) of adult male offspring from control (hatched bars, $n=29$) and stressed pregnancies (grey bars, $n=30$) prior to (base value) and one hour after ACTH injection.

RM- ANOVA revealed significant effects for the factor *prenatal stress*: $F_{1,57}=5.613$, $P=0.021$ and *treatment*: $F_{1,57}=500.720$, $P<0.001$, but no *stress x treatment* interaction: $F_{1,57}=0.445$, $P=0.503$.

3.3 Number and function of blood immune cells

PS males had significantly lower numbers of white blood cells (WBC) in the peripheral blood than PC males (Fig. 3, Table 1). This effect was mainly due to a significantly lower number of lymphocytes in PS males. The number of granulocytes in PS males did not differ significantly ($P=0.121$). Analysis of lymphocyte subsets revealed that the effect on total lymphocyte counts was caused by the significantly lower numbers of T cells, but not B or NK cells. $CD4^+$ T cell numbers were about 23.4 % lower in PS than in PC males. A similar effect was also observed in the $CD8^+$ T cell subset (Fig. 4, Table 1), although the level of significance was not reached ($P=0.059$).

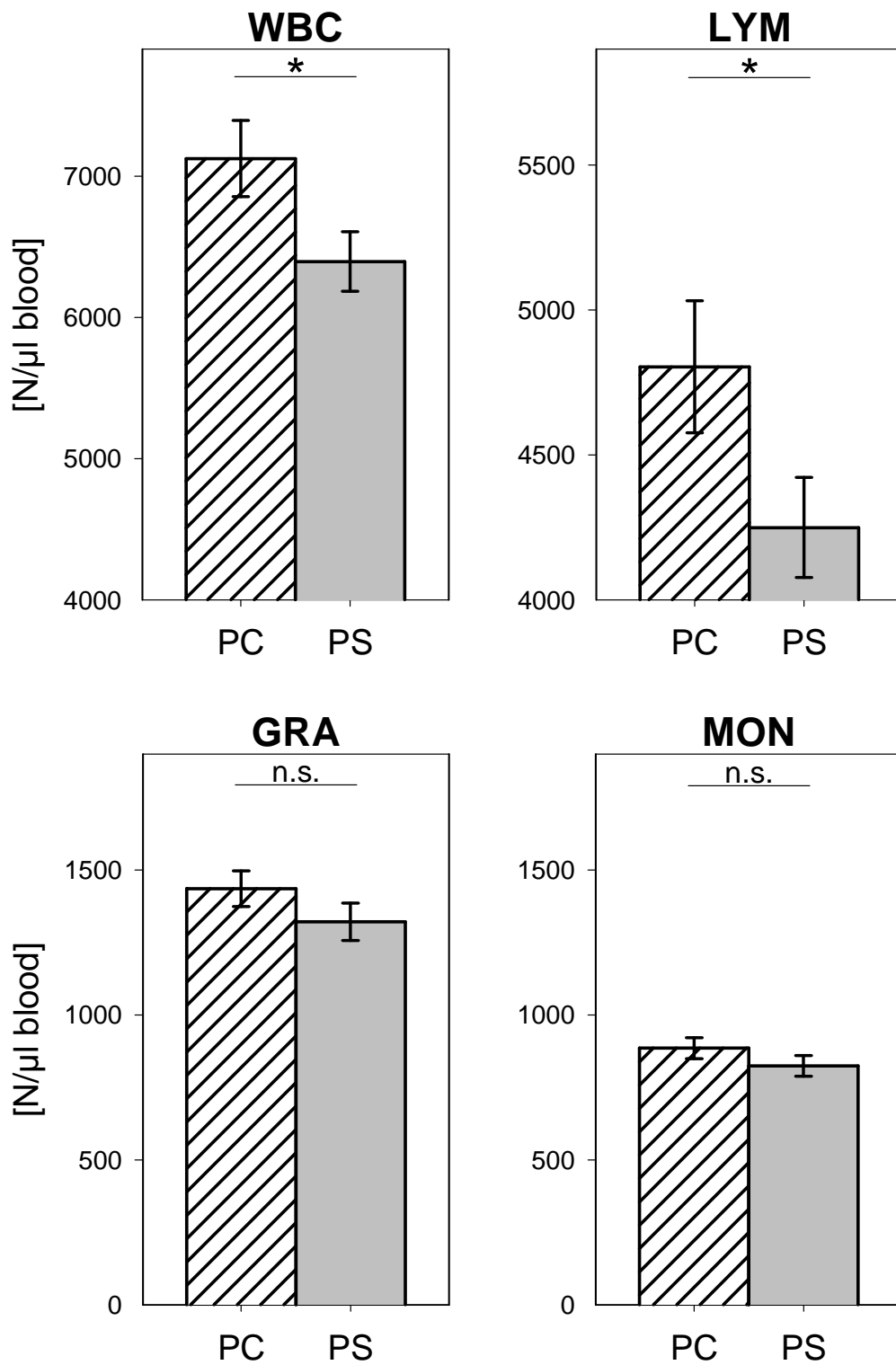


Fig.3: Basal numbers (mean \pm SEM) of WBC (white blood cells), LYM (lymphocytes), GRA (granulocytes), and MON (monocytes) of PC (hatched bars, $n=44$) and PS males (grey bars, $n=46$). For statistical details see Table 1.

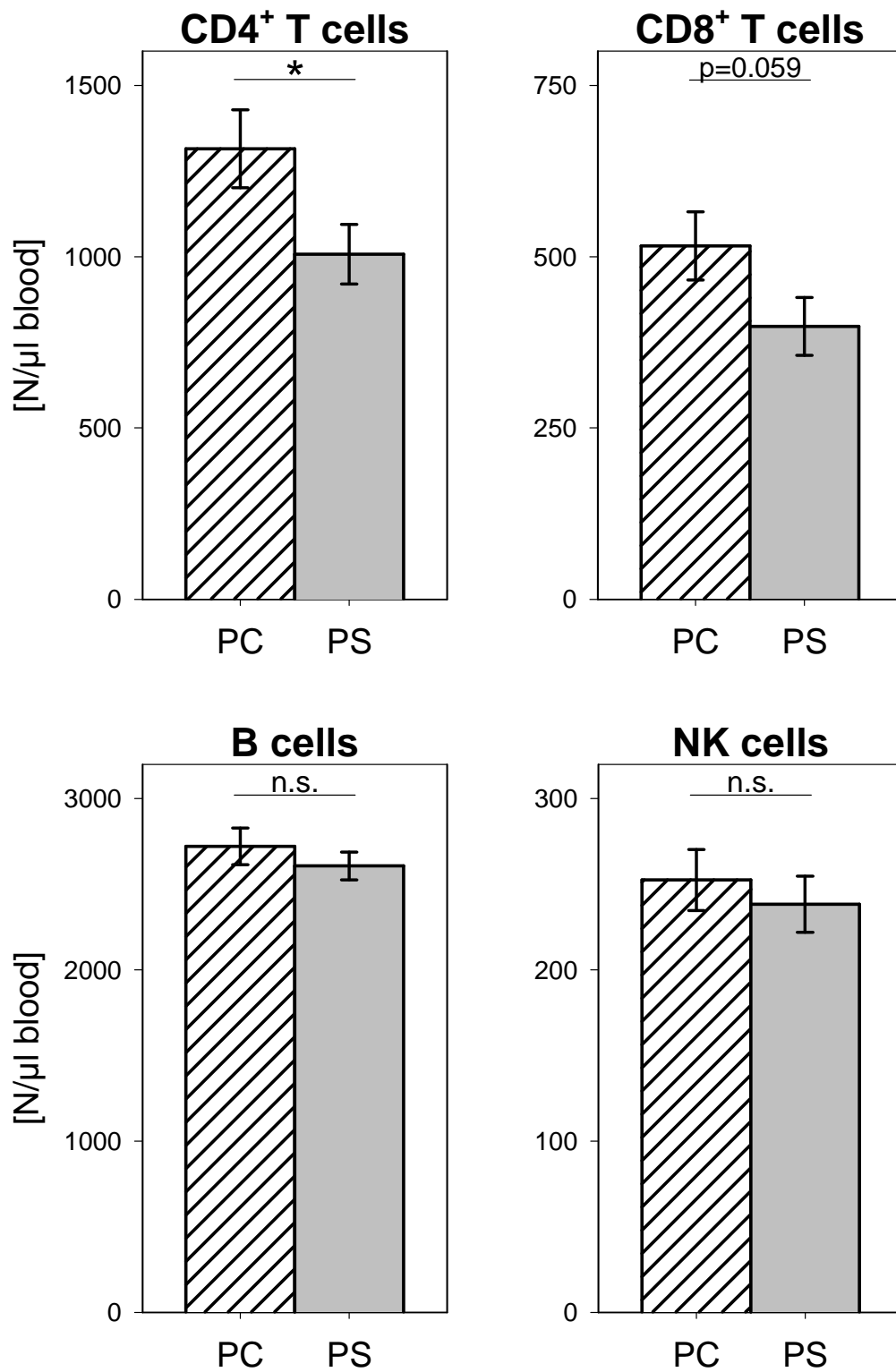


Fig.4: Basal cell counts (mean \pm SEM) of CD4⁺ T-helper, CD8⁺ cytotoxic T cells, B cells and NK cells of PC (hatched bars, $n=44$) and PS males (grey bars, $n=46$). For statistical details see Table 1.

Tests for lymphocyte functional capacities revealed a lower proliferative response in PS than PC males in case of PWM (Fig. 5, Table 1).

In some cases the factor trial was significant; however there was never a significant interaction between group and trial, indicating that the effects of group did not differ between trials.

TABLE 1: Effects of prenatal treatment (group) and trial (data set one to three) on basal blood cell numbers and proliferative activity of T and B cells of prenatal control (PC) and prenatally stressed (PS) males (a-d: general linear model; e-j: generalized linear model for data with gamma distribution). Statistically significant effects are shown in bold letters.

Response variable	Source of variation	<i>F</i> / <i>W</i>	<i>df</i>	<i>P</i>
(a) WBC	group	5.292	1.86	0.024
	trial	4.269	2.86	0.017
(b) GRA	group	2.449	1.86	0.121
	trial	12.795	2.86	< 0.001
(c) MON	group	1.510	1.86	0.223
	trial	1.335	2.86	0.268
(d) B cells	group	1.171	1.86	0.282
	trial	10.778	2.86	< 0.001
(e) LYM	group	4.110	1.86	0.043
	trial	3.510	2.86	0.173
(f) CD4 ⁺ T cells	group	5.25	1.86	0.022
	trial	1.14	2.86	0.565
(g) CD8 ⁺ T cells	group	3.562	1.86	0.059
	trial	0.259	2.86	0.879
(h) NK cells	group	0.440	1.86	0.505
	trial	7.270	2.86	0.026
(i) Con A induced proliferation	group	0.499	1.86	0.480
	trial	0.926	2.86	0.629
(j) PWM induced proliferation	group	7.715	1.86	0.005
	trial	1.903	2.86	0.386

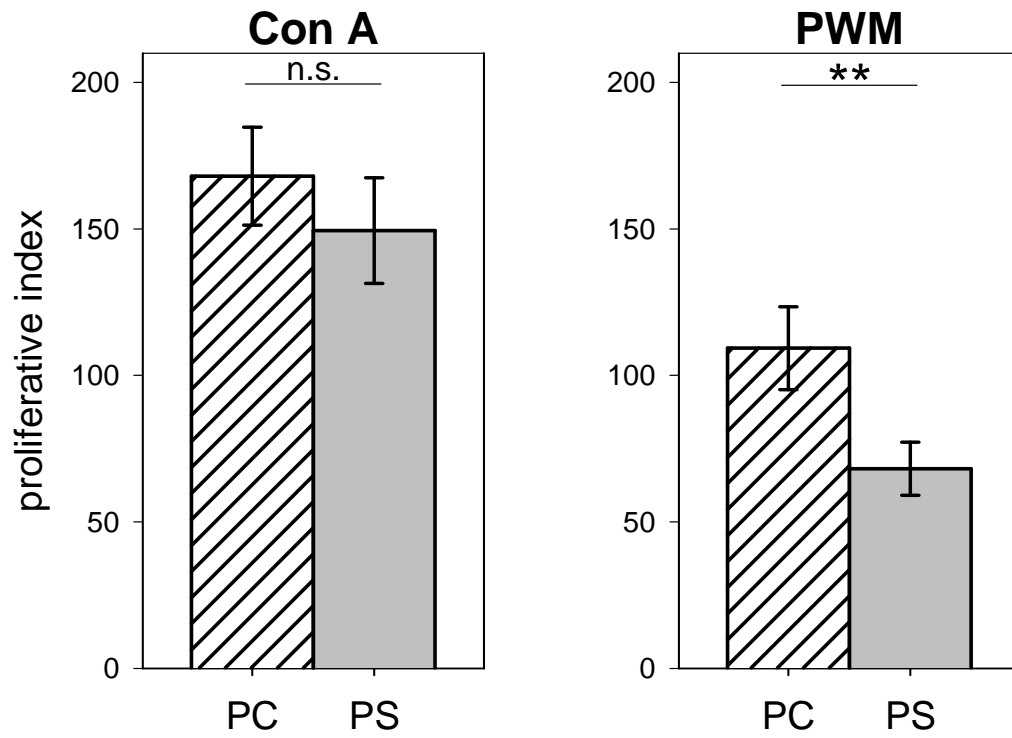


Fig.5: Proliferative index (mean \pm SEM) of PC (hatched bars, $n=44$) and PS males (grey bars, $n=46$) in response to the mitogens Con A and PWM. For statistical details see Table 1.

4. Discussion:

The hormonal and endocrine findings of the present report contradict in several aspects the existing results in literature. The lower basal corticosterone concentrations as well as lower corticosterone concentrations under ACTH challenge condition point to a lower HPA axis activity in the prenatal stress group. Thus, our data support the view that prenatal stress affects the HPA axis in rats, but there is no indication that this effect would lead to a more pronounced corticosterone secretion after stress exposure as indicated in earlier studies (Barbazanges et al., 1996; Kapoor and Matthews, 2005; Morley-Fletcher et al., 2003; Vallee et al., 1999; Vallee et al., 1996). In line with our endocrine findings, the behavioural tests indicate that prenatally stressed males are more active and less anxious in novel environments than males from undisturbed pregnancies. This contrasts findings from other conventional stress studies (Estanislau and Morato, 2005; Poltyrev et al., 1996; Tazumi et al., 2005; Vallee et al., 1997; Welberg et al., 2001), but agrees with a report that used a psychological prenatal stressor (presence of a cat during pregnancy) (Lordi et al., 2000). It could therefore be assumed that the nature and severity of the stressor (psychophysical vs. psychosocial) strongly influences the physiological outcome. Indeed, in a study carried out on rats it was shown that the dynamics of a hormonal response can differ substantially between social and conventional stressors (Sgoifo et al., 1996). In addition, several other methodological differences with respect to the duration and frequency of stress exposure or the timing within the gestation period could have had a substantial impact.

The fact that PS rats were more active and exploratory while having a lowered HPA activity suggests a beneficial effect of mild prenatal stress. This view, however, appears not to be supported by the immunological data. PS males had lower CD4⁺ and CD8⁺ numbers and a low proliferative index indicating reduced proliferative response of lymphocytes on a single cell level. The direction and magnitude of the immunological effect resembles in many aspects those of stressed adult males in chronic social confrontations (Engler et al., 2004; Stefanski, 1998; Stefanski and Engler, 1998). Because the immunological alterations associated with social stress are of health relevance (Stefanski and Ben-Eliyahu, 1996), a similar negative health effect may also exist in prenatally stressed males. Whether the observed immunological differences between prenatally stressed and control offspring indeed have functional significance and affect disease susceptibility, warrants future investigation with the use of immune challenge tests and standard disease models (Fleshner et al., 1995; Moynihan and Ader, 1996; Stefanski

and Ben-Eliyahu, 1996). The immunological pattern in PS males agrees with previous finding by Llorente and co-workers, who found reduced leukocyte and CD8⁺ T cell numbers (Llorente et al., 2002) in adult male offspring, and by Kay and co-workers, who reported reduced proliferation scores for splenic lymphocytes (Kay et al., 1998). However, in none of these studies a psychosocially relevant maternal stressor was investigated.

The lower number and function of lymphocytes in PS males does not seem to be mediated by serum CORT concentrations during adulthood. According to the concept of glucocorticoid-induced lymphopenia and suppression of T cell proliferation (Fauci, 1975; Fauci and Dale, 1974; Gillis et al., 1979a; Gillis et al., 1979b), a lower lymphocyte number would be expected in PC rather than in PS males. However, maternal corticosterone may have affected the immune system of PS males *in utero* and therefore may be a prime candidate for the mediation of maternal stress to the foetus. This view is supported by the fact that maternal glucocorticoids are strongly increased during social confrontation (Stefanski et al., 2005). Furthermore, glucocorticoids can easily cross placental tissues (Dupouy et al., 1975; Slone-Wilcoxon and Redei, 2004; Takeshita, 1990; Welberg et al., 2000; Welberg et al., 2001; Welberg et al., 2005; Zarrow et al., 1970) and have substantial immunomodulatory properties (Bakker et al., 1995). Nevertheless, other hormones such as catecholamines are also known to affect the fetus and could therefore have played an important role as well. (Herlenius and Lagercrantz, 2004; Young and Morrison, 1998).

The behavioural and endocrine effects noted in the present study may not appear dramatic. Nevertheless, important processes in the CNS and the endocrine system were permanently altered in the adult offspring. Since some studies suggest that the effects of prenatal stress become more pronounced under challenge conditions (Fride et al., 1986; Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995), subsequent studies should investigate the behaviour and the physiological reactions of adult offspring in e.g. chronic social confrontations or in colonies.

The aim of the present study was to investigate the effect of maternal stress during pregnancy on adult offspring under relatively naturalistic conditions. Thus, after weaning, offspring was raised with their native mothers rather than being transferred to foster dams. From the present study one can conclude that the consequences for the offspring's later life were purely based on the exposure of the mother to social stress during pregnancy. However, although it could be assumed that the period *in utero* was most relevant for the observed differences between PS and PC males, we cannot fully exclude that postnatal maternal nurture and care differed between the mothers of PS and PC males. Future studies

using cross-fostering experiments should clarify whether or not the postnatal phase might have had an additional influence (Cabrera et al., 1999; Maccari et al., 1995).

In conclusion, our results demonstrate that social confrontations of pregnant rats, constituting a comparatively mild psychosocial stressor, have the capability to alter the behaviour, the immune and the endocrine system of the offspring. It should be noted that the long-term effect of psychosocial maternal stress on the adult offspring is remarkable, considering that this stressor did not cause substantial stress-effects in the pregnant female (with conventional stressors, generally a reduction in maternal body mass is observed (Darnaudery et al., 2004; Guo et al., 1993)). Our stress model in females and the findings in the offspring may be particularly relevant to the natural situation in mammals including humans, because this stressor mimics conflict situations occurring under natural conditions where pregnancies are often associated with acute and repeated episodes of mild psychosocial stress.

Acknowledgements:

The present work was supported by the German Research Foundation (DFG) (project number: STE 633/ 5-1). We would like to thank Heiko Rödel for his helpful comments in questions of statistical analysis, and Andrea Berger and Inge Zerenner-Fritzsche for the excellent technical assistance.

References:

- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., Merali, Z., 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 149-164.
- Arck, P.C., 2001. Stress and pregnancy loss: role of immune mediators, hormones and neurotransmitters. *Am. J. Reprod. Immunol.* 46, 117-123.
- Bakker, J.M., Schmidt, E.D., Kroes, H., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., Tilders, F.J., van Rees, E.P., 1995. Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat. *J. Neuroimmunol.* 63, 183-191.
- Barbazanges, A., Piazza, P.V., Le Moal, M., Maccari, S., 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.* 16, 3943-3949.
- Cabrera, R.J., Rodriguez-Echandia, E.L., Jatuff, A.S., Foscolo, M., 1999. Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Braz. J. Med. Biol Res.* 32, 1229-1237.
- Cannizzaro, C., Plescia, F., Martire, M., Gagliano, M., Cannizzaro, G., Mantia, G., Cannizzaro, E., 2006. Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: Interaction with a brief, daily maternal separation. *Behav. Brain Res.* 169, 128-136.
- Clark, D.A., Arck, P.C., Chaouat, G., 1999. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41, 5-22.
- Coe, C.L., Lubach, G.R., Karaszewski, J.W., Ershler, W.B., 1996. Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys. *Brain. Behav. Immun.* 10, 221-234.
- Darnaudery, M., Dutriez, I., Viltart, O., Morley-Fletcher, S., Maccari, S., 2004. Stress during gestation induces lasting effects on emotional reactivity of the dam rat. *Behav. Brain Res.* 153, 211-216.
- Dobson, A.J., 2001. An introduction to generalized linear models. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., pp. 1-225.
- Dupouy, J.P., Coffigny, H., Magre, S., 1975. Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *J. Endocrinol.* 65, 347-352.
- Engler, H., Dawils, L., Hoves, S., Kurth, S., Stevenson, J.R., Schauenstein, K., Stefanski, V., 2004. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J. Neuroimmunol.* 156, 153-162.
- Engqvist, L., 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analysis of behavioural and evolutionary ecology studies. *Anim Behav.* 70, 967-971.

- Estanislau, C., Morato, S., 2005. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 163, 70-77.
- Fauci, A.S., 1975. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28, 669-680.
- Fauci, A.S., Dale, D.C., 1974. The effect of in vivo hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 53, 240-246.
- Fleshner, M., Hermann, J., Lockwood, L.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. Stressed rats fail to expand the CD45RC+CD4+ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN-gamma. *Brain. Behav. Immun.* 9, 101-112.
- Foster, L.B., Dunn, R.T., 1974. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. *Clin. Chem.* 20, 365-368.
- Fride, E., Dan, Y., Feldon, J., Halevy, G., Weinstock, M., 1986. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol. Behav.* 37, 681-687.
- Gillis, S., Crabtree, G.R., Smith, K.A., 1979a. Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 123, 1624-1631.
- Gillis, S., Crabtree, G.R., Smith, K.A., 1979b. Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. II. The effect on the in vitro generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.* 123, 1632-1638.
- Guo, A., Nappi, R.E., Criscuolo, M., Ficarra, G., Amram, A., Trentini, G.P., Petraglia, F., Genazzani, A.R., 1993. Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. *Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol.* 51, 41-45.
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S., 1994. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J. Neuroendocrinol.* 6, 341-345.
- Herlenius, E., Lagercrantz, H., 2004. Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp. Neurol.* 190, S8-21.
- Kaiser, S., Kruijver, F.P., Straub, R.H., Sachser, N., Swaab, D.F., 2003. Early social stress in male Guinea-pigs changes social behaviour, and autonomic and neuroendocrine functions. *J. Neuroendocrinol.* 15, 761-769.
- Kaiser, S., Sachser, N., 2001. Social stress during pregnancy and lactation affects in guinea pigs the male offsprings' endocrine status and infantilizes their behaviour. *Psychoneuroendocrinology* 26, 503-519.
- Kaiser, S., Sachser, N., 2005. The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 283-294.

- Kapoor, A., Matthews, S.G., 2005. Short periods of prenatal stress affect growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity in male guinea pig offspring. *J. Physiol.* 566, 967-977.
- Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., Weinstock, M., 1998. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol. Behav.* 63, 397-402.
- Klein, S.L., Rager, D.R., 1995. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev. Psychobiol.* 28, 321-326.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 925-935.
- Llorente, E., Brito, M.L., Machado, P., Gonzalez, M.C., 2002. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *J. Physiol. Biochem.* 58, 143-149.
- Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J., 2000. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int. J. Psychophysiol.* 37, 195-205.
- Maccari, S., Piazza, P.V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M., 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15, 110-116.
- McCormick, C.M., Smythe, J.W., Sharma, S., Meaney, M.J., 1995. Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res. Dev Brain Res.* 84, 55-61.
- McLean, M., Smith, R., 2001. Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction* 121, 493-501.
- Morley-Fletcher, S., Darnaudery, M., Koehl, M., Casolini, P., Van Reeth, O., Maccari, S., 2003. Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test. Effects of a chronic treatment with tianeptine. *Brain Res.* 989, 246-251.
- Moynihan, J.A., Ader, R., 1996. Psychoneuroimmunology: animal models of disease. *Psychosom. Med.* 58, 546-558.
- Poltyrev, T., Keshet, G.I., Kay, G., Weinstock, M., 1996. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev. Psychobiol.* 29, 453-462.
- Pryce, C.R., Ruedi-Bettschen, D., Dettling, A.C., Weston, A., Russig, H., Ferger, B., Feldon, J., 2005. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 649-674.

- Rimondini, R., Agren, G., Borjesson, S., Sommer, W., Heilig, M., 2003. Persistent behavioral and autonomic supersensitivity to stress following prenatal stress exposure in rats. *Behav. Brain Res.* 140, 75-80.
- Sachser, N., Kaiser, S., 1996. Prenatal social stress masculinizes the females' behaviour in guinea pigs. *Physiol. Behav.* 60, 589-594.
- Sgoifo, A., de Boer, S.F., Haller, J., Koolhaas, J.M., 1996. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol. Behav.* 60, 1403-1407.
- Slone-Wilcoxon, J., Redei, E.E., 2004. Maternal-fetal glucocorticoid milieu programs hypothalamic-pituitary-thyroid function of adult offspring. *Endocrinology* 145, 4068-4072.
- Sobrian, S.K., Vaughn, V.T., Ashe, W.K., Markovic, B., Djuric, V., Jankovic, B.D., 1997. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ. Res.* 73, 227-241.
- Stefanski, V., 1998. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol. Behav.* 63, 605-613.
- Stefanski, V., Ben-Eliyahu, S., 1996. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiol. Behav.* 60, 277-282.
- Stefanski, V., Engler, H., 1998. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol. Behav.* 64, 733-741.
- Stefanski, V., Gruner, S., 2006. Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain. Behav. Immun.* 20, 369-377.
- Stefanski, V., Raabe, C., Schulte, M., 2005. Pregnancy and social stress in female rats: influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *J. Neuroimmunol.* 162, 81-88.
- Takahashi, L.K., Kalin, N.H., 1991. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain Res.* 558, 75-78.
- Takehita, S., 1990. Studies on the influence of acute maternal stress on the fetal endocrine system in late gestation of rats. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 42, 1671-1677.
- Tazumi, T., Hori, E., Uwano, T., Umeno, K., Tanebe, K., Tabuchi, E., Ono, T., Nishijo, H., 2005. Effects of prenatal maternal stress by repeated cold environment on behavioral and emotional development in the rat offspring. *Behav. Brain Res.* 162, 153-160.
- Vallee, M., MacCari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., Mayo, W., 1999. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid

- secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2906-2916.
- Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., Maccari, S., 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17, 2626-2636.
- Vallee, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H., 1996. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res.* 712, 287-292.
- Weinstock, M., 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 1-10.
- Welberg, L.A., Seckl, J.R., Holmes, M.C., 2000. Inhibition of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1047-1054.
- Welberg, L.A., Seckl, J.R., Holmes, M.C., 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 104, 71-79.
- Welberg, L.A., Thirivikraman, K.V., Plotsky, P.M., 2005. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *J. Endocrinol.* 186, R7-R12.
- Young, J.B., Morrison, S.F., 1998. Effects of fetal and neonatal environment on sympathetic nervous system development. *Diabetes Care* 21, B156-B160.
- Zarrow, M.X., Philpott, J.E., Denenberg, V.H., 1970. Passage of ¹⁴C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature* 226, 1058-1059.

**Maternal social stress during pregnancy alters immune function
and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat
offspring during stressful life-events**

Alexander A. Götz, Sabrina Wittlinger, Volker Stefanski (2007)

Published in: Journal of Neuroimmunology 185(1-2): 95-102

(Corresponding author: Alexander A. Götz)

1
2 **Maternal social stress during pregnancy alters immune function**
3 **and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat**
4 **offspring during stressful life-events**
5

6 Alexander A. Götz, Sabrina Wittlinger, Volker Stefanski (2007)

7 Published in: Journal of Neuroimmunology 185(1-2): 95-102

8 (Corresponding author: Alexander A. Götz)

9
10 **Abstract:**

11 The impact of social confrontations on distribution and function of blood immune cells in
12 adult male rat offspring from stressed and non-stressed pregnancies was studied. Repeated
13 2h resident-intruder confrontations were performed on ten consecutive days using a
14 protective cage. Prenatally stressed intruder males (PSI) had a generally lower number of
15 neutrophils, monocytes, T and NK cells and reduced lymphocyte proliferation in whole
16 blood cultures than prenatally non-stressed control intruders (PCI). Differences also
17 existed in the temporal dynamics of immunological changes. On confrontation day 1,
18 stress-induced reductions in lymphocyte and monocyte numbers but increased granulocyte
19 counts were observed in both groups. However, only PCI showed a partial recovery of T
20 cell and monocyte numbers on confrontation day 10 and a full restoration in all immune
21 cell numbers five days post confrontation. Thus, the immunological response to a
22 psychosocial stressor in adult rats can be modified by the mothers' exposure to stress
23 during pregnancy.
24

25 *Keywords:* prenatal; pregnancy; psychosocial stress; offspring; immune cells;
26 proliferation; corticosterone.
27

1. Introduction

Prenatal stress can influence the neuroendocrine system and the behaviour of mammals (Austin et al., 2005; Kapoor et al., 2006; Kofman, 2002; Owen et al., 2005). Although the offspring from stressed and unstressed pregnancies differ in some behavioural and endocrine aspects under normal life conditions, most of the differences become evident when the animals are exposed to challenging or stressful conditions. For example, offspring of stressed pregnancies have a higher HPA axis activity under immobilization or exposure to novel environment as compared to offspring from unstressed mothers (Barbazanges et al., 1996; Maccari et al., 1995; Vallee et al., 1999; Vallee et al., 1996; Weinstock, 1997). Moreover, prenatally stressed males are often more anxious in behavioural tests such as the elevated plus maze (Estanislau and Morato, 2005; Poltyrev et al., 1996; Vallee et al., 1997; Welberg et al., 2001), although this effect may be reversed depending on the nature of maternal stressor (Götz and Stefanski, 2006, in press). Prenatal stress has also been linked to decreased pup survival (Lordi et al., 2000; Patin et al., 2002; Pratt and Lisk, 1989; Tuchscherer et al., 2002) and increased susceptibility to infection and disease in later life (Bailey et al., 2004; Herrenkohl, 1986; Kapoor et al., 2006). Despite of its pivotal importance for the health of individuals, only few studies so far have investigated the effects of prenatal stress on the immune system (Coe et al., 1996; Götz and Stefanski, 2006, in press; Kay et al., 1998; Klein and Rager, 1995; Llorente et al., 2002; Sobrian et al., 1997). The outcome of these studies, however, was not always uniform: for example, Llorente and co-workers (Llorente et al., 2002) found reduced percentages of blood CD8⁺ T cells and increased percentages of granulocytes in adult male rat offspring of mothers exposed to "hanging stress" during pregnancy, whereas (Kay et al., 1998) found no differences in the percentages of lymphocyte subsets in the offspring from mothers of stressed (noise and light) and unstressed pregnancies. Some studies (Kay et al., 1998; Tuchscherer et al., 2002) also indicate lower proliferation rates of lymphocytes in response to mitogen stimulation in prenatally stressed offspring. With respect to the offsprings' immune system, only one study (Götz and Stefanski, 2006, in press) has investigated the effect of a maternal social stressor (repeated social confrontations). In this recent report, we found lower numbers of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and decreased proliferative capacities to pokeweed mitogen stimulation in the blood of prenatally stressed as compared to non-stressed male offspring.

With one exception (Llorente et al., 2002), only basal levels of immune measures were investigated in offspring of stressed pregnancies. Thus, in the present study we investigated the pattern of immunological changes in offspring from stressed and control mothers in response to a social stressor in later life. Maternal stress was induced by using an established psychosocial stress model in female rats (Stefanski et al., 2005). Adult offspring from stressed and control mothers were then investigated in social confrontations which have been shown to result in marked endocrine and immunological changes in adult laboratory rats (Koolhaas et al., 1997; Raab et al., 1986; Stefanski, 2000; Stefanski and Engler, 1998; Stefanski and Engler, 1999).

2. Materials and Methods

2.1 Animals and standard housing conditions

Adult male-female pairs of Long-Evans rats, descendants of an outbred stock originally obtained from Harlan Winkelmann (Borchen, Germany), were kept in standard polycarbonate cages (26x42x15 cm). The animals had *ad libitum* access to rat standard diet and water, and were kept under controlled conditions on a 12:12-h light/dark cycle (lights off at 01:00 h). Temperature was 20 ± 1 °C, and the relative humidity approximately 50%. Cages were cleaned weekly, but no cleaning was done during the confrontation period (see 2.3). All procedures were approved by the local authority for laboratory animal care and use (Regierung von Mittelfranken, Ansbach, Germany).

2.2 Maternal stress (female confrontation)

Maternal stress was induced by using a resident-intruder confrontation procedure. Confrontations were conducted in the dark period by transferring a pregnant intruder female into the home cage of an unfamiliar resident female in a separate room. Except during the confrontations, resident females were housed with a male partner. Female-female confrontation resulted in dyadic aggressive interactions and in social defeat of the intruder female, but biting and wounding was absent. Intruder females were confronted daily for 2 h (continuous coexistence) for a period of two months, using a daily rotation system with different unfamiliar resident females (each resident female was used at least every other day). For further details see (Götz and Stefanski, 2006, in press; Stefanski and Gruner, 2006; Stefanski et al., 2005). Experimental females were randomly assigned to maternal stress or control group and were 3-4 month old at the start of the confrontations (equalling the start of their second pregnancy). Control females remained undisturbed in their home cages. In all experiments litter of third pregnancy were used.

2.3 Prenatally stressed offspring and experimental design

After delivery no further confrontations were conducted and the male mating partner of each pair was removed from the standard housing cage to assure undisturbed weaning conditions for offspring from stressed (prenatal stress, PS) and control females (prenatal

control, PC). The young were kept with their mothers until weaning (postnatal day 21). One or two male-female pairs from each litter were used in the present study and kept in standard cages as described before. Experimental procedures were performed on 20 prenatal control males, descendants from 16 control mothers, and 24 prenatally stressed males, descendants from 19 females stressed during pregnancy, at an age of 5-6 month (*weighing approximately 450g*). The present report is part of a long-term survey on the effects of prenatal stress on the adult male progeny in Long-Evans rats (see also (Götz and Stefanski, 2006, in press)).

2.4 Social stress procedure of offspring

(resident-intruder-confrontation using protective cage)

For the induction of social defeat stress an experimental male (=intruder) was placed in the home cage (100 x 50 x 70 cm) of an adult male resident rat (for methodological details of the confrontation procedure see (Engler and Stefanski, 2003; Stefanski et al., 2003)). In all confrontations, adult male offspring from stressed mothers (PS-intruders (PSI) and control mothers (PC-intruders (PCI)) were attacked and subdued by the respective residents within the first 10 minutes. Social defeat was defined successful if the intruder showed defensive behaviour as indicated by submissive body posture (lying motionless on the back with ventral surface exposed to the opponent) or flight behaviour (direct movement away from the opponent at running pace). In contrast to continuous confrontations with direct physical contact between the two opponents, in the present study the intruder was separated from the resident by transferring it to a protective wire mesh cage (50 x 15 x 30 cm) located within the resident's enclosure immediately after social defeat. This procedure assured that the intruder was protected from repeated attacks and potential injury, while it was still exposed to visual, acoustic and olfactory cues from the resident. The intruder was kept for two hours in the protective cage before returning to its female partner (see 2.1). Social defeat procedure was conducted on ten consecutive days using a daily rotation system and started during the middle of the active (dark) period between 06:00 h and 08:00 h.

2.5 Blood sampling

Blood samples were always taken between 08:00 and 10:00 h from male offspring (1) five days prior to the start of confrontations (base value), (2) immediately after the first day

(confrontation day 1), (3) after the 10th day (confrontation day 10) in protective cage and (4) five days after the final confrontation (post5). Blood was taken from PCI and PSI from the tail vein without anaesthesia (Stefanski, 1998). About 0.5 ml of blood was collected in several tubes (uncoated tubes for serum corticosterone (CORT) measurement, K₂-EDTA-coated test tubes for FACS-analysis and heparinized tubes for activity tests. The CORT sample was usually collected within 1–3 minutes, and within 4 min for immune parameters from entering the experimental room. For determination of serum corticosterone concentrations, serum was separated by centrifugation and stored at –20°C until further analysis. Blood for immunological measurements was used within two hours after blood sampling.

2.6 Corticosterone measurement

Total serum corticosterone concentration was measured using a standard radioimmunoassay (Foster and Dunn, 1974). The specific antibody was kindly provided by the Institute of Pharmacology, University of Heidelberg, Germany. Antibody cross-reactivity with other relevant steroids was 4.4% (cortisol), 30% (deoxy-corticosterone) and 5.5% (testosterone). Sensitivity of the corticosterone radioimmunoassay was 5 ng/ml. The intraassay coefficient of variation was 0.4% and interassay coefficient of variation was 9.9%. Data of animals from which not all four CORT samples were obtained in a 3 minute time limit were discarded from analysis.

2.7 Leukocyte counts and subpopulations

Total leukocyte counts were determined on an automatic cell counter (Z2, Beckman-Coulter, Miami, FL). For leukocyte phenotyping, blood aliquots were incubated for 20 min at room temperature with FITC-conjugated anti-rat myeloid cells (clone ED9), PE-conjugated anti-rat CD45/LCA (clone OX-1), FITC-conjugated anti-rat CD4 (clone OX-38), FITC-conjugated anti-rat CD8b (clone 341), FITC-conjugated anti-rat NKR-P1A (clone 10/78), FITC-conjugated anti-rat CD45RA (clone OX-33) or PE-conjugated anti-rat CD3 (clone G4.18). Monoclonal antibodies were obtained from BD Pharmingen (Heidelberg, Germany) and Serotec (Düsseldorf, Germany). Antibody labeling was

performed following the standard protocols and using FACS lysing solution (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany) supplemented by PBS (Dulbecco's PBS without calcium and magnesium, 2% FBS, 0.1% NaN₃). Ten thousand cells from each sample were analysed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, Heidelberg, Germany) using the software Attractors and CellQuest.

Lymphocytes, monocytes and neutrophil granulocytes were identified by their forward and side scatter characteristics and their differences in CD45 and ED9 expression. Lymphocyte subpopulations were identified by a combination of lineage specific surface markers:

CD3⁺/CD4⁺ (T helper cells), CD3⁺/CD8b⁺ (cytotoxic T cells), CD3⁻/NKR-P1A⁺ (NK cells), CD45RA⁺ (B cells). Monocytes (CD3⁻/CD4⁺) were excluded from the lymphocyte gate.

2.8 Proliferative response

Whole blood mitogenic stimulation assays were performed to determine the proliferative capacity of lymphocytes using Concanavalin A (ConA,) (predominantly stimulating T cells) and pokeweed mitogen (PWM) (stimulating B and T cells) (both Sigma, Deisenhofen, Germany). In brief, heparinized blood was diluted 1:10 with RPMI-10 (RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and 50 µg/ml gentamicin). One hundred microlitres of this dilution were cultured in sterile 96-well round-bottom tissue culture plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) with either 100 µl RPMI-10 (unstimulated cells) or RPMI-10 containing 5 µg/ml ConA or 5 µg/ml PWM respectively (stimulated cells). Cells were then incubated for 72 h in a humidified atmosphere (37 °C, 5% CO₂), pulsed with 0.5 µCi thymidine (NEN Life Science Products, Cologne, Germany), and harvested 24 h later on glass filters (Skatron, Lier, Norway). Incorporated radioactivity was measured in a liquid scintillation counter (Wallac, Freiburg, Germany). All measurements were carried out in quadruplicate. The mean of counts per minute (cpm) was calculated for each individual (Mean ± SEM of absolute counts over all animals and all days: Con A: 28822 ± 1233; PWM: 15533 ± 861; cpm of unstimulated cells were about 1% of cpm of cells stimulated with Con A and about 2% of cells stimulated with PWM) and the proliferative index (PI) was determined (PI = stimulated cells/unstimulated cells). Calculation of PI values allows direct comparisons among different sampling days.

2.9 Statistics

Prior to the use of parametric statistics we ensured that data were normally distributed (Shapiro-Wilk test). We also ensured that variances were homogenous (Levene test). If data were not normally distributed square root transformation was used to approximate to normal distribution. Physiological differences between PCI and PSI were analysed by repeated measure (RM) ANOVA with *prenatal stress* as the between-subject factor and *postnatal confrontation* as the repeated measures within-subject factor. Degrees of freedom (df) values were corrected if Mauchly's test of sphericity indicated significant results. Provided RM-ANOVA revealed significant *prenatal stress x postnatal confrontation* interaction, post-hoc analysis (*t*-test for independent variables, and paired *t*-tests) with respective Benjamini-Hochberg correction (total k=16) (Benjamini and Hochberg, 1995) were performed to detect physiological differences between groups and for within group comparisons, induced by treatment. If there was only a significant effect for the factor *postnatal confrontation* only within group comparisons were performed (paired *t*-tests with respective Benjamini-Hochberg correction (total k=12).

All data are expressed as mean \pm SEM. All statistics were calculated using SPSS for Windows (Version 12.0, SPSS, Chicago, IL) and Statistica 6.1 (StatSoft Inc.)

3. Results

3.1 Effects of prenatal stress and postnatal social confrontation on serum corticosterone and body mass

Serum corticosterone concentrations before confrontation (basal value), on confrontation day 1 and 10, and on day 5 post-confrontation indicated a strong effect of the factor *postnatal confrontation* on CORT concentration and a similar response pattern of prenatally stressed intruders (PSI) and control offspring (prenatal control intruders: PCI) (RM-ANOVA). Post-hoc analysis indicated that only on confrontation day 1 CORT concentrations were significantly elevated (Fig.1, see figure legends for statistical details).

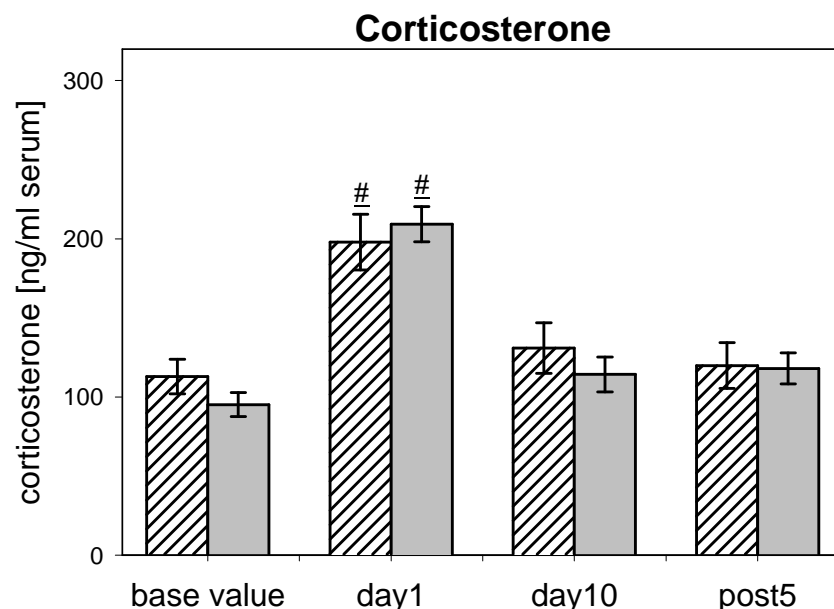


Fig. 1: Serum corticosterone concentration of prenatal control intruders (PCI) (n=18; hatched bars) and prenatally stressed intruder males (PSI males) (n=23; grey bars) five days before (base value), on day one (day1) and day ten (day10) of confrontation as well as five days post confrontation (post5).

RM-ANOVA: *postnatal confrontation*: $F_{3,39}=35.919$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,39}=0.845$, $P=0.472$; *prenatal stress*: $F_{1,39}=0.287$, $P=0.595$. Post-hoc: paired t-test (within group differences):

different from any other data point, at least $P<0.05$.

Analysis of body mass development revealed no differences between PSI and PCI (RM-ANOVA: *postnatal confrontation*: $F_{1,85,42}=16.300$, $***P<0.001$; *postnatal confrontation x*

prenatal stress: $F_{1,85,42}=0.148$; $P=0.847$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=0.027$, $P=0.871$). Starting from equal base values five days prior to the start of the confrontation period (PCI: 453.1 ± 9.7 g; PSI: 455.3 ± 10.8 g), both, prenatally stressed and control offspring showed a slight loss in body mass in response to the confrontation procedure (day1: PCI: 450.9 ± 10.7 g; PSI: 452.2 ± 9.9 g and day10: PCI: 446.4 ± 10.1 g; PSI: 447.9 ± 9.4 g). Five days after the end of the confrontation period both groups had recovered in body mass and were heavier than before the confrontation period (PCI: 460.7 ± 9.8 g; PSI: 464.7 ± 9.3 g).

3.2 Effects of prenatal stress and postnatal social confrontation on number of blood immune cells

RM-ANOVA showed that *postnatal confrontation* had a significant impact on all immune cells investigated in both intruder groups (PCI and PSI) (Fig.2, see figure legends for statistical details). Confrontation resulted in decreased numbers of lymphocytes (LYM) and monocytes (MON) but increased numbers of neutrophile granulocytes (GRA). The decrease of lymphocyte number was a combined result of significant reductions of the number of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells, B cells, and to a lower extend NK cells (Fig.3, see figure legends for statistical details).

In addition, several significant differences existed between the PCI and PSI males. The numbers of monocytes, granulocytes, T cells, and NK cells were generally lower in PSI males than in PCI males during the whole investigation period. Moreover, interaction between the factors *postnatal confrontation* \times *prenatal stress* indicates differences in the temporal dynamics of lymphocyte and especially T cell numbers. Detailed post-hoc analysis indicate similarly reduced $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell numbers at confrontation day 1 in PCI and PSI males. However, only the PCI group showed partially recovered T cell numbers on day 10 and fully restored numbers post confrontation.

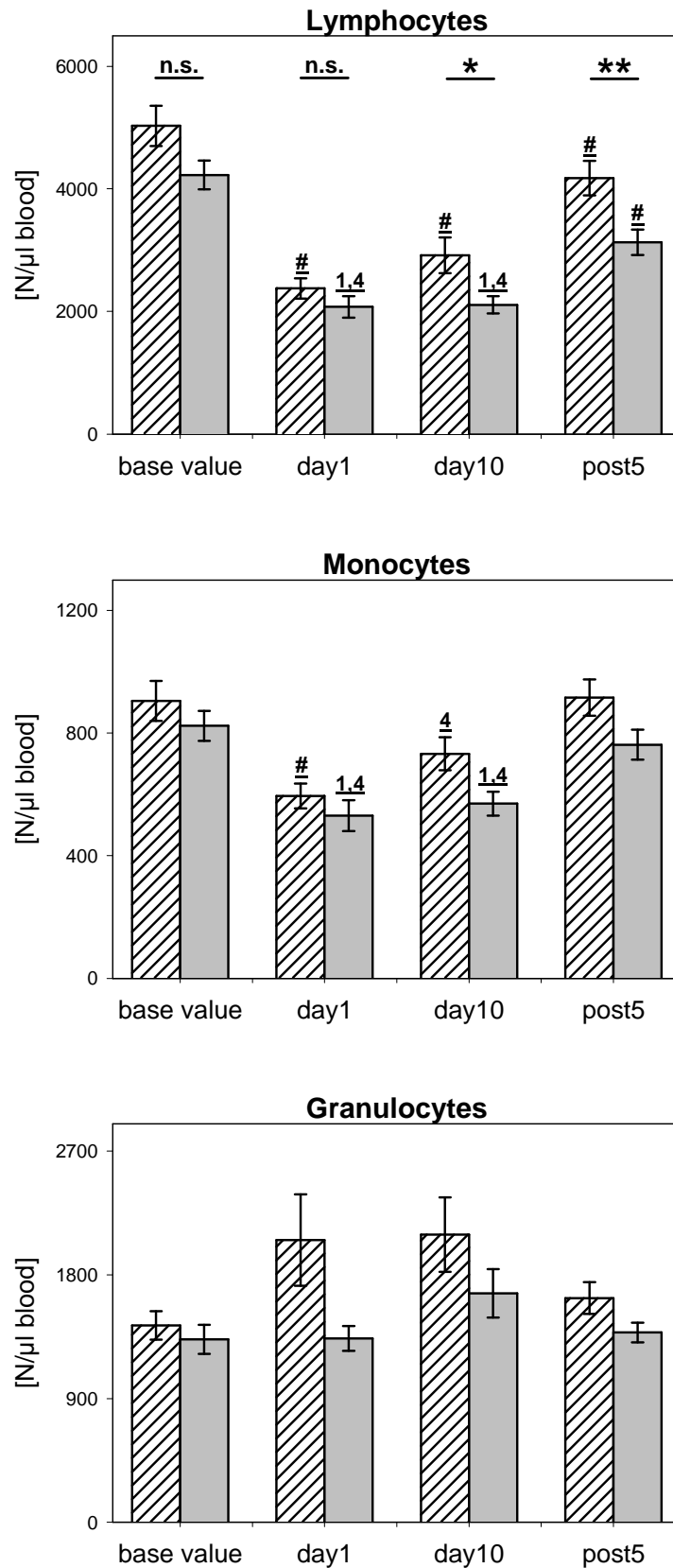


Fig. 2: Lymphocyte (LYM), Monocyte (MON) and Granulocyte (GRAN) counts of PCI (n=20; hatched bars) and PSI males (n=24; grey bars) five days before (base value), on day one and day ten of confrontation as well as five days post confrontation (post5).

RM-ANOVA: **Lymphocytes:** *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=141.658$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=2.865$, $P=0.039$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=6.735$, $P=0.013$; **Monocytes:** *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=21.738$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=0.632$, $P=0.596$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=5.976$, $P=0.019$; **Granulocytes:** *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=3.801$, $P=0.012$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=0.877$, $P=0.455$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=6.320$, $P=0.016$. Post-hoc analysis: unpaired *t*-test (between groups): * $P<0.05$; ** $P<0.01$; paired *t*-test (within group): 1 = significantly different from base value: $P<0.05$, 4 = significantly different from post5: $P<0.05$, # = significantly different from any other data point: $P<0.05$.

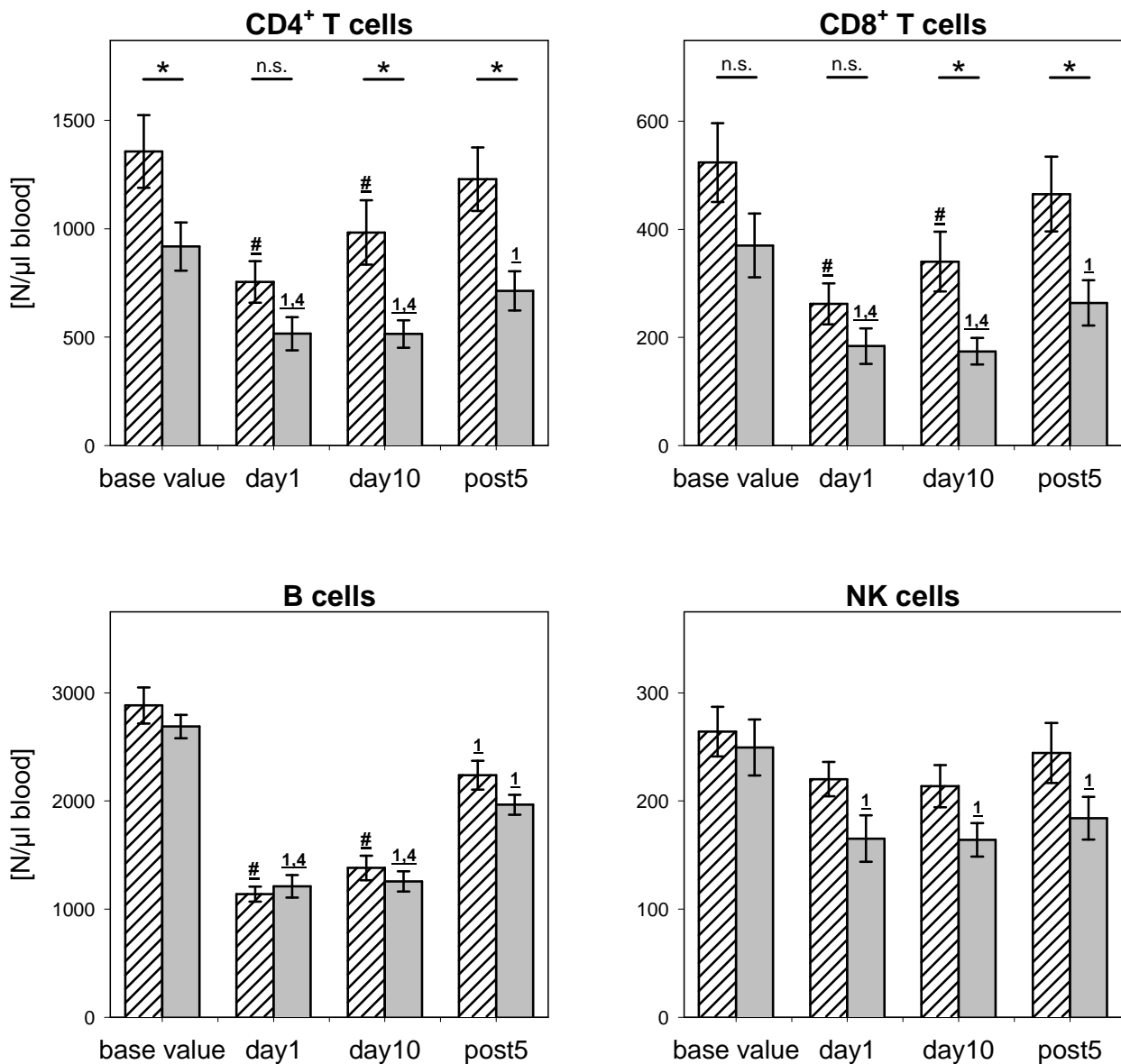


Fig. 3: T cell (CD4⁺ and CD8⁺), B cell and Natural killer (NK) cell counts of PCI (n=20; hatched bars) and PSI males (n=24; grey bars) five days before (base value), on day one and day ten of confrontation as well as five days post confrontation (post5).

RM-ANOVA: CD4⁺ T cells: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=82.483$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=2.380$, $P=0.073$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=6.883$, $P=0.012$; CD8⁺ T cells: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=71.692$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=1.964$, $P=0.123$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=4.418$, $P=0.042$; B cells: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=184.038$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=1.767$, $P=0.157$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=1.071$, $P=0.307$; NK cells: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=6.428$, $P<0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=1.128$, $P=0.340$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=6.567$, $P=0.014$. Post-hoc analysis: unpaired *t*-test (between groups) and paired *t*-test (within group); for details see Fig. 2.

3.3 Effects of prenatal stress and postnatal social confrontation on function of blood immune cells

Postnatal confrontation significantly affected the capability of lymphocytes to proliferate in response to mitogen stimulation (ConA and PWM). In addition, RM-ANOVA indicated significant group differences. The proliferative capacity to both mitogens was generally lower in PSI males than in PCI males during the whole investigation period (Fig.4, see figure legends for statistical details).

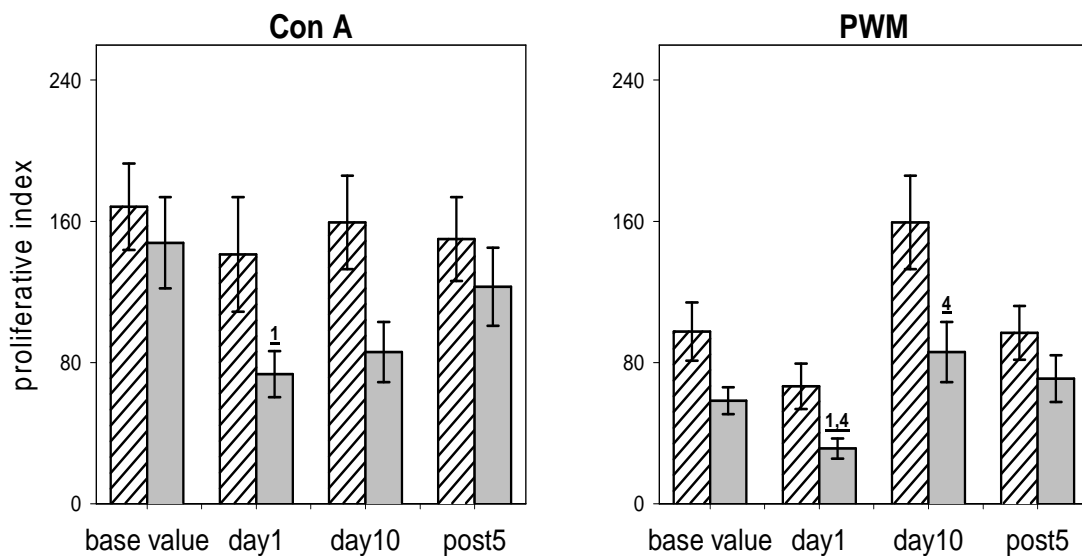


Fig. 4: Proliferative index (mean \pm SEM) of PCI (hatched bars, n=20) and PSI males (grey bars, n=24) in response to the mitogen ConA and PWM five days before (base value), on day one and day ten of confrontation as well as five days post confrontation (post5).

RM-ANOVA: Con A: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=4.448$, $P=0.005$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=1.048$, $P=0.374$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=5.419$, $P=0.025$; PWM: *postnatal confrontation*: $F_{3,42}=7.469$, $P=0.001$; *postnatal confrontation x prenatal stress*: $F_{3,42}=0.833$, $P=0.478$; *prenatal stress*: $F_{1,42}=7.941$, $P=0.007$. Post-hoc analysis: unpaired *t*-test (between groups) and paired *t*-test (within group); for details see Fig. 2.

4. Discussion

This study demonstrates that exposure to prenatal stress modifies the magnitude and the pattern of social stress-induced immune system changes in the adult offspring. First, however, we focus on the general effects of confrontation that were evident in both offspring groups. Social confrontation caused a strong increase in corticosterone concentrations in the intruder males on confrontation day 1 but not on day 10. Together with the observation that confronted males showed only a slight loss in body mass after ten consecutive days of confrontation, one would conclude that the males adapt to the repeated social stressor. However, the immunological data point to a sustained effect of social stress on the immune system and therefore suggest that the immune system ranges among the biological systems very sensitive to stress. The pattern of immunological changes in protective cage intruders in the present report was characterized by reduced numbers and function of lymphocytes and an increased number of neutrophils. This pattern is in accordance with previous chronic social stress studies on mammals (Engler et al., 2004; Raab et al., 1986; Stefanski and Engler, 1998; Stefanski et al., 1996; von Holst, 1998) and may indicate a possible shift in the balance of the immune system from specific towards unspecific immune system dominance in the peripheral blood. Because the protective cage drastically reduces the possibility of undesired wounding and subsequent inflammatory processes involving the immune system it appears to be an advantageous system to investigate stress-induced immune alterations in social confrontations.

In response to social confrontation, PSI differed from PCI males in two main aspects. First, with the exception of B cell numbers, PSI males had a lower number and function of all immune cells investigated. We recently reported that such differences exist under non-stress (basal) conditions (Götz and Stefanski, 2006, in press) and now demonstrate that this prenatal-stress associated pattern is also evident in confrontations and extends into the post-confrontational period. It should be noted that the lower proliferative response in PSI males is probably not a consequence of reduced lymphocyte numbers in the blood, because the proliferative index takes into account differences in lymphocyte numbers. Importantly, PSI and PCI males showed a different recovery pattern during confrontation. In contrast to PCI males, PSI males showed neither a partial recovery of T lymphocyte and monocyte numbers during confrontation nor a full recovery after the end of the confrontations. This indicates that stress-induced alterations are not quickly reversible in PSI males.

The lower overall levels of several immune measures in PSI males could mirror a displacement of setpoints for numbers and function of immune cells in the peripheral blood. Such a displacement may be a consequence of an altered receptor density on immune or/and endothelial cells caused by differential exposure to stress hormones such as corticosterone during intrauterine development. Differences in receptor sensitivity could be a possible explanation why immune cells in PSI males react more strongly to a similar concentration of a specific hormone such as corticosterone. Although prenatal stress-associated changes of hormone receptors on immune and endothelial cells have not been investigated yet, it has been shown that prenatal stress alters glucocorticoid type I and type II receptor density in other body regions such as the hippocampus (Henry et al., 1994; Maccari et al., 1995). With respect to the differential recovery pattern of immune cell numbers in PCI and PSI males, also differences in the stress perception between could play a role. Although there was no difference in CORT concentrations, other stress-related hormones such as catecholamines might be more strongly increased in the PSI intruders. Future investigations should thus include activity measures of the sympathetico-adrenalmedullary system.

Stress-induced immune changes of a magnitude as observed in the present study could be of health relevance as they may impair antibody production (Fleshner et al., 1995) and increase tumor metastasis (Stefanski and Ben-Eliyahu, 1996). Because PSI males had lower number and function of immune cells, one might assume a higher risk for health in this group, especially under stressful condition. However, this assumption must be taken with caution as the results are limited to the peripheral blood. In future investigations the study of lymphatic organs, *in vivo* challenge of specific immune subsystems, and the use of animal disease models could help to better evaluate the biological relevance of the immunological findings. Nevertheless, the fact that a relatively naturalistic mild maternal social stressor has the potential to influence the immunological reaction of male offspring under a relatively mild stressful condition in adulthood is an important finding: it leads to the conclusion that maternal stress effects on offspring can easily be overlooked or underestimated when testing offspring immunity. The present findings are therefore of relevance for normal pregnancies in mammals including humans, where moderate disturbances induced by social conflicts occur in daily life.

The study of Lorente (Llorente et al., 2002) is of special interest for the present report, because prenatally stressed offspring was investigated under challenge condition in adulthood (repeated immobilisation for ten days). Similar to in the present study, the

authors showed that prenatal stress reduced basal lymphocyte numbers in the blood of adult offspring. However, the effects of immobilisation stress were only minor, and a reduced percentage of blood CD8⁺ T cells was observed in the control rather than in the prenatal stress offspring. Several methodological differences such as the maternal stress procedure (“hanging stress”) or the use of a different rat strain (Sprague-Dawley rats) may have contributed to the differential outcome. We would rate the nature of the stressor (challenge) among the most important factors, as the physiological stress response can substantially differ between physical and social stressors (Sgoifo et al., 1996).

In prenatal stress studies, pups can be raised either with their native mothers or with foster dams. We have chosen the first condition because this is the most naturalistic raising condition from a biological point of view (see also (Götz and Stefanski, 2006, in press)). But although the period *in utero* was probably most relevant for the observed differences between PSI and PCI males, one can not fully exclude that postnatal maternal nurture and care also differed between stressed and control mothers. Thus, it would be worthwhile to include cross-fostered pups in subsequent studies. Regardless of possible contribution of postnatal environment however, the consequences for the offspring later life were purely based on the exposure of the mother to social stress during pregnancy.

In conclusion our results demonstrate for the first time that maternal social stress during pregnancy affects the reaction pattern of the immune system to social stress in the adult offspring in rats.

Acknowledgements:

The present work was supported by the German Research Foundation (DFG) (project number: STE 633/ 5-1). We thank Heiko Rödel for his helpful advice in statistical analysis, and Andrea Berger and Inge Zerenner-Fritzsche for excellent technical assistance.

References:

- Austin, M.-P., Leader, L.R., Reilly, N., 2005. Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehaviour. *Early Hum. Dev.* 81, 917-926.
- Bailey, M.T., Lubach, G.R., Coe, C.L., 2004. Prenatal Stress Alters Bacterial Colonization of the Gut in Infant Monkeys. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.*, 414-421.
- Barbazanges, A., Piazza, P.V., Le Moal, M., Maccari, S., 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.* 16, 3943-3949.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57, 289-300.
- Coe, C.L., Lubach, G.R., Karaszewski, J.W., Ershler, W.B., 1996. Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys. *Brain. Behav. Immun.* 10, 221-234.
- Engler, H., Dawils, L., Hoves, S., Kurth, S., Stevenson, J.R., Schauenstein, K., Stefanski, V., 2004. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J. Neuroimmunol.* 156, 153-162.
- Engler, H., Stefanski, V., 2003. Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. *Psychoneuroendocrinology* 28, 951-969.
- Estanislau, C., Morato, S., 2005. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav. Brain Res.* 163, 70-77.
- Fleshner, M., Hermann, J., Lockwood, L.L., Laudenslager, M.L., Watkins, L.R., Maier, S.F., 1995. Stressed rats fail to expand the CD45^{RC}+CD4⁺ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN-gamma. *Brain. Behav. Immun.* 9, 101-112.
- Foster, L.B., Dunn, R.T., 1974. Single-antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. *Clin. Chem.* 20, 365-368.
- Götz, A., Stefanski, V., 2006, in press. Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol. Behav.* doi:10.1016/j.physbeh.2006.09.014.
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M., Maccari, S., 1994. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J. Neuroendocrinol.* 6, 341-345.
- Herrenkohl, L.R., 1986. Prenatal stress disrupts reproductive behavior and physiology in offspring. *Ann. N Y Acad Sci.* 474, 120-128.

- Kapoor, A., Dunn, E., Kostaki, A., Andrews, M.H., Matthews, S.G., 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol.* 572, 31-44.
- Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T., Weinstock, M., 1998. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiol. Behav.* 63, 397-402.
- Klein, S.L., Rager, D.R., 1995. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev. Psychobiol.* 28, 321-326.
- Kofman, O., 2002. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 457-470.
- Koolhaas, J.M., Meerlo, P., De Boer, S.F., Strubbe, J.H., Bohus, B., 1997. The temporal dynamics of the stress response. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 775-782.
- Llorente, E., Brito, M.L., Machado, P., Gonzalez, M.C., 2002. Effect of prenatal stress on the hormonal response to acute and chronic stress and on immune parameters in the offspring. *J. Physiol. Biochem.* 58, 143-149.
- Lordi, B., Patin, V., Protais, P., Mellier, D., Caston, J., 2000. Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int. J. Psychophysiol.* 37, 195-205.
- Maccari, S., Piazza, P.V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M., 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15, 110-116.
- Owen, D., Andrews, M.H., Matthews, S.G., 2005. Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 209-226.
- Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Thoumas, J.L., Vaudry, H., Caston, J., 2002. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Brain Res. Dev Brain Res.* 139, 1-8.
- Poltyrev, T., Keshet, G.I., Kay, G., Weinstock, M., 1996. Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev. Psychobiol.* 29, 453-462.
- Pratt, N.C., Lisk, R.D., 1989. Effects of social stress during early pregnancy on litter size and sex ratio in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J. Reprod. Fertil.* 87, 763-769.
- Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormede, P., Taghzouti, K., Simon, H., Le Moal, M., 1986. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiol. Behav.* 36, 223-228.
- Sgoifo, A., de Boer, S.F., Haller, J., Koolhaas, J.M., 1996. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *Physiol. Behav.* 60, 1403-1407.

- Sobrian, S.K., Vaughn, V.T., Ashe, W.K., Markovic, B., Djuric, V., Jankovic, B.D., 1997. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ. Res.* 73, 227-241.
- Stefanski, V., 1998. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol. Behav.* 63, 605-613.
- Stefanski, V., 2000. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology* 25, 389-406.
- Stefanski, V., Ben-Eliyahu, S., 1996. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiol. Behav.* 60, 277-282.
- Stefanski, V., Engler, H., 1998. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol. Behav.* 64, 733-741.
- Stefanski, V., Engler, H., 1999. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroimmunol.* 94, 144-152.
- Stefanski, V., Gruner, S., 2006. Gender difference in basal and stress levels of peripheral blood leukocytes in laboratory rats. *Brain. Behav. Immun.* 20, 369-377.
- Stefanski, V., Peschel, A., Reber, S., 2003. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *J. Neuroimmunol.* 138, 17-24.
- Stefanski, V., Raabe, C., Schulte, M., 2005. Pregnancy and social stress in female rats: influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *J. Neuroimmunol.* 162, 81-88.
- Stefanski, V., Solomon, G.F., Kling, A.S., Thomas, J., Plaeger, S., 1996. Impact of social confrontation on rat CD4 T cells bearing different CD45R isoforms. *Brain. Behav. Immun.* 10, 364-379.
- Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W., Tuchscherer, A., 2002. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 86, 195-203.
- Vallee, M., MacCari, S., Dellu, F., Simon, H., Le Moal, M., Mayo, W., 1999. Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2906-2916.
- Vallee, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., Maccari, S., 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *J. Neurosci.* 17, 2626-2636.

- Vallee, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., Simon, H., 1996. Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res.* 712, 287-292.
- von Holst, D., 1998. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Adv. Stud. Behav.* 27, 1-131.
- Weinstock, M., 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 1-10.
- Welberg, L.A., Seckl, J.R., Holmes, M.C., 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 104, 71-79.