



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Early life experience : neuroendocrine adaptations to maternal absence

Enthoven, L.

Citation

Enthoven, L. (2007, October 4). *Early life experience : neuroendocrine adaptations to maternal absence*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12379>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12379>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).



Summary - Samenvatting

Summary

Adverse early life events in humans have the capability to change the susceptibility for stressful events later in life. Early life adversity is therefore presented as a risk factor in those subjects, who already have a genetic predisposition to develop stress-related psychiatric disorders. The developmental constraints that underlie the lasting consequences of these early life events are, however, poorly understood. Therefore, the separation of rodent infants from their mother is frequently used as a laboratory model to study both the immediate effects and its long-term outcomes.

The studies presented in this thesis focus on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA axis). In **Chapter 1** a description is given of the function of the adult HPA axis and its main components. This is followed by a section in which the role of the HPA axis in the development of a vulnerable phenotype for affective psychopathology is presented, as well as the implications of genotype-environment interactions. Both human epidemiological and animal experimental studies have shown that early (social) experiences influence the functioning of physiological processes even into adulthood. To understand the mechanisms underlying the effects of adverse early life events and its effects on HPA axis functioning it is imminent to have knowledge on the development of the HPA axis and on factors that regulate this development.

Chapter 1 continues with a description of the characteristics of the rodent stress hypo-responsive period (SHRP) lasting in mice from postnatal day 1-12. During the SHRP mild stressors, such as exposure to a novel environment, trigger only a very weak pituitary ACTH and adrenal corticosterone response, which is profound under the same conditions in the adult animal. At that time the HPA axis still develops and has not reached adult functionality yet. Furthermore, the SHRP is hypothesised to be a critical period in rodent development, in which environmental factors can ‘program’, among others, the responsiveness of the HPA axis. Therefore, the current ideas on mechanisms underlying the SHRP are presented. The extrapolation of SHRP knowledge to man is then discussed to evaluate the validity of animal models. Though numerous models are currently described in literature, the focus in this thesis was on two models: repeated daily 8 hours maternal separations and a single 24 hours maternal deprivation. Interestingly, in the case of repeated maternal separations most data in literature refer to long-term effects, whereas using the 24 hour maternal deprivation paradigm mostly the immediate effects have been examined.

The **objectives** of the studies presented in this thesis are therefore to test the following two hypotheses:

- Mouse pups exposed to repeated daily 8 hours separations from maternal care display as a result of this experience a sustained activation of the HPA axis during the SHRP.
- Mouse pups tested in the single 24 hours maternal deprivation model display an altered developmental trajectory of the HPA axis and have as adults long-term changes in cognitive performance and HPA responsiveness to stressors.

In **Chapter 2** we examined whether repeated daily bouts of 8 hours maternal separation, in the absence or presence of an additional novelty stressor, would result in a persistent elevation of corticosterone in CD1 mice. For this purpose the effects of repeated 8 hours separations from postnatal days 3 to 5 were measured on basal and stress-induced ACTH and corticosterone concentrations. Furthermore, mRNA expression of selected HPA axis markers and of *c-fos* in the brain and circulating levels of glucose and ghrelin, including their hypothalamic NPY mRNA endpoint, were also measured.

The results showed that the infant's initial immediate HPA axis response to 8 hours of maternal absence was gradually eliminated when the maternal separations were repeated the next two days. Despite the absence of an HPA axis response to the third maternal separation at postnatal day 5, these mouse pups continued to respond to novelty exposure (*i.e.* subjecting a mouse pup individually to a clean novel cage). Interestingly, when the repeated maternal separations were each time combined with novelty exposure, the response of corticosterone secretion relative to ACTH was enhanced. In addition, these effects of separation on the HPA axis activation were reflected by the *c-fos* mRNA expression pattern in the PVN, but not in cortex or thalamus. *C-fos* mRNA expression in the PVN showed a profound response to a single separation and subsequent desensitisation to repeated separations, while remaining responsive to novelty exposure. Basal circulating levels of corticosterone and ACTH were persistently suppressed 16 hours after reunion, an effect that also transiently occurred for CRH mRNA in the PVN. Pituitary POMC and GR mRNA expression in hippocampus or hypothalamus did not change. However, MR mRNA expression in gyrus dentatus of the hippocampus showed a progressive increase with repeated separations, surpassing the gradual increase observed in undisturbed mother-reared mice. Circulating levels of ghrelin and glucose, indicative for depleting energy substrates, and their hypothalamic NPY mRNA endpoint did not match the maternal separation-induced corticosterone patterns in the infant. Glucose levels decreased and ghrelin levels increased after the first as well as the third maternal separation. These data clearly indicate that, while the mouse pup's initial HPA axis response to repeated maternal absence readily desensitised and a state of hypocorticism was induced, the HPA axis did remain highly responsive to mild stressors, indicating a permanent disruption of the SHRP.

Chapter 3 elaborated on the data observed in **Chapter 2** and determined whether the neuroendocrine desensitisation to maternal absence as observed and described in the previous chapter is due to enhanced glucocorticoid feedback. For this purpose the effects of either MR or GR antagonists were measured on circulating corticosterone levels. The results indicated that when the GR antagonist mifepristone was applied at postnatal day 5, the infant's corticosterone response to the first separation was amplified. However, the GR antagonist became ineffective if the pups were exposed to repeated maternal absence in the preceding two days. Under basal conditions during the SHRP (at postnatal days 5 and 8) the GR antagonist caused generally a small decrease rather than an increase of circulating corticosterone levels. However, upon a subtle HPA activation, achieved by a mild immune challenge, the GR antagonist became effective again

in interfering with glucocorticoid feedback and then thus triggered a profound corticosterone increase. Blockade of the MR by spironolactone resulted in small but significant increases in circulating corticosterone levels under basal conditions after 8 and 24 hours, as well as after the third separation. MR antagonism did not increase, but rather decreased corticosterone levels when the animals were separated for the first time. During novelty exposure a brief exposure to the MR antagonist enhanced the corticosterone response both in the single and repeatedly separated pups, while GR antagonism under those short-term conditions was ineffective.

In conclusion, these findings excluded an enhanced glucocorticoid feedback as mechanism underlying the desensitisation of the HPA axis in response to repeated maternal separations and support the role of the GR in maintenance of the SHRP. The results also indicate the operation of an MR-responsive mechanism during the SHRP that mostly restrains HPA activity under basal, stressful and maternal separation conditions. The current evidence thus points towards the implication of an MR-responsive central PVN input that abolishes the pituitary-adrenal response to repeated maternal absence, but maintains the neuroendocrine responsiveness to novelty.

In the second part of this thesis the long-term effects of a single 24 hours maternal deprivation were determined. In **Chapter 4** it was first investigated if 6 months old CD1 mice subjected as infants to a single 24 hours maternal deprivation at postnatal day 8 showed modulated cognitive performance in a spatial learning task and had an altered HPA axis response to a stressful event. It was observed that maternal deprivation indeed affected reversal learning in the water maze, indicating that a more persistent and less flexible behaviour had developed. However, acquisition and long-term memory were not affected. This implied that the long-term effects of maternal deprivation in mice are subtle. The endocrine response to stress was not affected. In view of current knowledge the results support the notion that, like in rats, long-term effects depend on the age at which the maternal deprivation is experienced, while also the age at examination is important.

In **Chapter 5** the effects of maternal deprivation at different ages during the SHRP on endocrine responsiveness and basal mRNA expression of selected HPA axis markers at early adolescence (weaning; postnatal day 28) were compared in order to gain more insight into the observed effects of maternal deprivation described in **Chapter 4**. It was observed that maternal deprivation did produce long-term changes in the HPA axis, both at the basal set point and in responsiveness to a mild stressor, but only when the deprivation period was applied within the SHRP. Early in the SHRP (postnatal day 3) maternal deprivation prolonged the corticosterone response to stress at weaning and reduced basal GR mRNA expression in the CA1 subfield of the hippocampus, whereas at a later age (postnatal day 8) maternal deprivation only enhanced the ACTH response. Strikingly, a subsequent deprivation (postnatal days 3 and 8) interfered with the effects induced by the first deprivation (postnatal day 3), resulting in sustained, non-responsive high ACTH concentrations and concomitantly a corticosterone response to stress, which was indistinguishable from that in control animals. These data thus further underscore

the importance of the pup's age at deprivation and, consequently, the developmental stage of the brain and the HPA axis. These data add to the current view that the outcome depends on age of the pup and the nature, duration and frequency at which the adverse event is experienced, while sex and genetic background are also of crucial importance.

In **Chapter 6** several HPA axis markers were investigated during SHRP development after maternal deprivation at postnatal day 3. This study was initiated to test the hypothesis that maternal deprivation will alter the subsequent developmental pattern of the HPA axis. It was shown that the short-term effects partly resemble those observed for maternal deprivation at postnatal day 8, implying an enhanced basal and stress-induced ACTH and corticosterone concentrations, as well as a reduction of CRH and GR mRNA in the PVN. Differences were the lack of effects on hippocampal MR (all regions) and GR mRNA expression (CA1 region), which actually showed a delay in development. One day after reunion of the pups with the dam the SHRP was reinstated. A novelty stressor was no longer able to activate the HPA axis in previously deprived mice; basal ACTH and corticosterone were suppressed to levels below control for three days. Maternal deprivation did not influence the duration of the SHRP, as determined by the novelty-induced corticosterone and ACTH. In addition, most of the robust short-term effects on central HPA axis markers gradually re-adjusted in the days following reunion, returning to control levels each at its own rate. GR mRNA in the PVN was reduced for only one day before returning to control levels. However, CRH mRNA in the PVN was suppressed for two days, but exceeded control levels at postnatal day 7 after which it gradually declined and caught up again to the declining control levels. So, the robust deprivation effects on various HPA axis markers gradually recovered after reunion and maternal deprivation early in the SHRP did not influence the duration of the SHRP.

The results described in this thesis were discussed in a broader perspective in **Chapter 7**. To illustrate **Figure 7.1** gives a schematic overview of the different alterations in HPA axis regulation when neonate mice are subjected to a single or repeated 8 hours maternal separations. The results have led to the concept that mouse pups readily adapt to repeated maternal absence through a presumed cognitive mechanism that allows processing of novel stimuli into a physiological stress response at times mother-reared animals remain quiescent under the same stressful conditions. Regarding the outcome of a single adverse event of 24 hours of maternal deprivation a bewildering variation in immediate effects and long-term consequences is noted that depend on the context or developmental stage of the brain, the genetic background and the age during lifespan the individual is being tested.

In conclusion:

- The mouse pup's HPA axis readily adapts to repeated daily maternal absence for 8 hours, but remains highly responsive to other stressors.
- Central cognitive inputs rather than peripheral metabolic inputs seem to facilitate the

observed adaptation to repeated maternal absence.

- In response to 24 hours of maternal deprivation at postnatal day 3 the various HPA components gradually return, after initial activation, to the values observed for the mother-reared animals to conclude with similar emergence from the SHRP.
- The outcome of 24 hours of maternal deprivation varies over the lifespan and depends on the age and genetic background of the infant, as well as on the duration and frequency of the adverse event.

Samenvatting

Een traumatische vroege levenservaring kan de wijze waarop mensen later in het leven omgaan met stressvolle gebeurtenissen beïnvloeden. Zo'n vroege levenservaring wordt daarom ook wel gezien als een risicofactor voor stressgerelateerde psychiatrische ziekten, zoals depressie in individuen met een genetische aanleg hiervoor. Het mechanisme, dat ten grondslag ligt aan de blijvende gevolgen van vroege levenservaringen, is echter nauwelijks bekend. Wel is bekend, dat voor de ontwikkeling van de hersenen en het stress systeem de binding aan de moeder van uitermate groot belang is. De scheiding van de moeder is dan ook een veelgebruikt laboratorium model voor verwaarlozing. Het hier beschreven onderzoek aan de muis maakt dan ook gebruik van de scheiding van moeder en pup om zowel de onmiddellijke gevolgen als die op langere termijn te onderzoeken.

Het onderzoek is gericht op het effect van de onthouding van moederzorg op de ontwikkeling van de hypothalamus-hypofyse-bijnier (HHB) as (Engels: hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis). Deze HHB as is cruciaal voor de omgang met stress en wordt in detail beschreven in **Hoofdstuk 1**. Zowel fysieke als psychische stressoren kunnen de HHB as activeren; de paraventriculaire nucleus van de hypothalamus (PVN) geeft corticotropine-releasing hormoon (CRH) en arginine vasopressine (AVP) af aan de eminentia mediana waar het portaalvatensysteem de neurohormonen opneemt en onmiddellijk naar hypofysevoorkwab voert. Hier stimuleren deze hormonen vervolgens de afgifte van adrenocorticotroop hormoon (ACTH) in de bloedsomloop. ACTH stimuleert op zijn beurt de productie van corticosteron in de bijnierschors. De activiteit van de HHB as wordt via een negatief terugkoppelingsmechanisme geregeld en hiertoe bindt corticosteron aan de glucocorticoid- en mineralocorticoidreceptoren (GR en MR). Deze negatieve terugkoppeling verloopt in de HHB as via GR in de PVN en de hypofyse. Daarnaast koppelt corticosteron ook terug op die processen, die in oorsprong de HHB as hebben geactiveerd. Deze stressreacties kunnen ontstaan zijn door een verstoring van het energiemetabolisme en door immuun- en ontstekingsreacties. Corticosteron voorkomt dan dat deze stressreacties, die essentieel zijn voor de verdediging van het lichaam, doorschieten en zelf schadelijk worden. Psychosociale stressreacties zijn de grootste verstoorders van het evenwicht in lichaam en geest (ook wel homeostase genoemd). Bij het herstel van homeostase na psychische stress zijn zowel MR als GR betrokken. Die brengen gedragsaanpassingen tot stand en hebben een belangrijke functie in emotie, motivatie en gemoedstoestand.

Epidemiologisch onderzoek heeft uitgewezen, dat vroege (sociale) ervaringen het functioneren van fysiologische processen zelfs tot in volwassenheid kunnen beïnvloeden. Een vergelijkbaar resultaat is geboekt in dierexperimenteel onderzoek met ratten en muizen en ook met primaten. Het is bekend dat de HHB as een belangrijke rol speelt in het ontstaan en verloop van psychiatrische aandoeningen. Om het mechanisme te kunnen begrijpen, dat ten grondslag ligt aan deze levenslange effecten van vroege ervaringen, is inzicht in de (normale) ontwikkeling

van de HHB as van groot belang.

Hoofdstuk 1 gaat daarom verder met een beschrijving van de kenmerken van de stress hypo-responsieve periode (SHRP), die in de muis duurt van dag 1 tot 12 na de geboorte (postnataal). Tijdens de SHRP kunnen milde stressoren (novelty stressor genoemd; zoals blootstelling aan een nieuwe omgeving) slechts een zeer geringe ACTH- en corticosteronrespons veroorzaken, terwijl deze respons aanzienlijk is in volwassen dieren bij dezelfde stressor. Gedurende de SHRP ontwikkelt de HHB as zich, maar heeft nog niet dezelfde functionaliteit bereikt, zoals die zich bij volwassen dieren manifesteert. Bovendien wordt deze periode over het algemeen gezien als een kritieke periode in knaagdierontwikkeling, waarin omgevingsfactoren en dus ook traumatische levenservaringen de responsiviteit van (onder andere) van de HHB as blijvend kunnen wijzigen. Recent is ontdekt dat als onderdeel van deze ‘programming’ de expressie van de GR blijvend veranderd kan worden via epigenetische processen. Deze epigenetische processen worden in dit proefschrift verder buiten beschouwing gelaten.

De extrapolatie van de ideeën over de SHRP in knaagdieren naar mensen wordt besproken ten einde de betrouwbaarheid van diermodellen te kunnen vaststellen. Er zijn vele verschillende diermodellen beschreven, die alle variaties op het thema ‘scheiding van moeder en pup’ betreffen. In dit proefschrift zijn twee modellen toegepast in CD1 muizen: (1) een driemaal herhaalde dagelijkse maternale separatie van 8 uur en (2) een enkele maternale deprivatie van 24 uur. Bij de herhaalde maternale separaties richten we ons op de directe effecten (**Hoofdstukken 2 en 3**), omdat er tot nu toe voornamelijk lange termijn effecten beschreven zijn zonder dat bekend is hoe die effecten tot stand komen. Voor de enkele maternale deprivatie is er juist vooral veel bekend over de directe effecten en zijn de gevolgen voor de lange termijn onderzocht (**Hoofdstukken 4, 5 en 6**).

De **doelstelling** van het onderzoek in dit proefschrift betreft het toetsen van de volgende hypothesen:

- Pups, die blootgesteld worden aan herhaalde dagelijkse separatie van maternale zorg voor periodes van 8 uur, hebben als gevolg van deze ervaring een permanent geactiveerde HHB as tijdens de SHRP.
- Pups, die blootgesteld worden aan een enkele episode van 24 uur maternale deprivatie, laten veranderingen zien in de ontwikkeling van de HHB as, waardoor ze als volwassen dieren anders reageren tijdens leertaken en tevens een veranderde HHB as responsiviteit voor stressoren laten zien.

In **Hoofdstuk 2** werd onderzocht of dagelijks herhaalde perioden van 8 uur afwezigheid van de moeder van het nest (maternale separatie) op postnatale dagen 3, 4 en 5 in de aan- of afwezigheid van een extra novelty stressor, namelijk het plaatsen van de pups in een schone, nieuwe kooi, leidt tot een continu verhoogd corticosteronniveau in CD1 muizenpups. Naast de effecten van herhaalde 8-urige separaties op basale en stress-geïnduceerde ACTH- en corticosteronconcen-

traties in het bloed, werd ook de mRNA expressie van geselecteerde HHB as markers en van *c-fos* in hersencoupees bepaald. Tevens werden de bloedplasmaconcentraties van glucose en ghreline gemeten, inclusief hun hypothalamische NPY mRNA eindpunt.

Uit de resultaten bleek, dat de initiële onmiddellijke HHB as respons op 8 uur maternale afwezigheid bij de pups geleidelijk verdween als de maternale separatie de twee volgende dagen werd herhaald. Ondanks de afwezigheid van een HHB as respons op de derde maternale separatie (op postnatale dag 5), reageerden de muizenpups echter nog steeds op een novelty stressor. Wanneer de herhaalde maternale separaties werden gecombineerd met deze novelty stressor werd de corticosteronrespons zelfs versterkt in vergelijking met de waargenomen ACTH-respons. Deze separatie-effecten op de HHB as werden ook teruggevonden in het *c-fos* mRNA expressiepatroon in de PVN, maar niet in de cortex of thalamus. Na de eerste maternale separatie werd een flinke respons op *c-fos* mRNA expressie gezien en vervolgens een desensitisatie na herhaalde separaties, terwijl de responsiviteit op een novelty stressor bleef. Basale concentraties van corticosteron en ACTH in het bloed werden onderdrukt tot 16 uur na herening met de moeder, een effect dat ook optrad voor CRH mRNA expressie in de PVN. De mRNA expressie van hypofyse POMC en GR in de hippocampus of hypothalamus veranderden niet. MR mRNA in de gyrus dentatus van de hippocampus liet echter een continue stijging zien naargelang meer separaties hadden plaatsgevonden, welke zelfs de normale geleidelijke stijging waargenomen in ongestoorde pups voorbij ging. Bloedplasmaconcentraties van ghreline en glucose, indicatief voor een veranderd patroon in de energiehuishouding, en hun NPY mRNA eindpunt kwamen niet overeen met het door maternale separatie geïnduceerde corticosteronpatroon in de pup. Glucoseniveaus daalden en ghrelineniveaus stegen, zowel na de eerste als na de derde maternale separatie. De metabole signalen veroorzaken dus niet de waargenomen HHB aanpassingen.

Deze data laten duidelijk zien dat, terwijl de pup's initiële HHB as respons op herhaalde maternale separaties desensitiseert en een staat van hypocorticisme induceert, de HHB as wel zeer responsief blijft voor milde stressoren. De pups zijn reeds op dag drie in staat onderscheid te maken tussen de ervaring dat moeder weg is en de ervaring van een nieuwe omgeving. De eerder genoemde SHRP is dan ook permanent verstoord na herhaalde afwezigheid van de moeder, ook al reageert de HHB as niet meer op haar tijdelijke afwezigheid.

In **Hoofdstuk 3** is verder ingegaan op deze resultaten en werd onderzocht of de neuroendocriene desensitisatie op maternale separaties, zoals die gezien en beschreven zijn in het vorige hoofdstuk, komt door een verhoogde glucocorticoïdterugkoppeling. Hiervoor werden de effecten van een MR en GR antagonist gemeten op corticosteronniveaus in bloedplasma om vast te stellen of de HHB as niet meer reageert na herhaalde afwezigheid van de moeder. Wanneer de GR antagonist mifepristone toegediend werd op postnatale dag 5 werd de corticosteronrespons op maternale separatie in de pups versterkt. De GR antagonist had dit effect echter niet wanneer de pups aan herhaalde maternale separaties in de dagen ervoor waren blootgesteld. Onder basale condities tijdens de SHRP (op postnatale dag 5 en 8) zorgde de toediening van de GR antagonist over het algemeen voor een lichte daling in plaats van een stijging in corticosteronniveaus. Maar

na een kleine HHB as activatie, bereikt door het induceren van een milde immuunrespons, werd de GR antagonist wel weer effectief in het verstoren van de GR terugkoppeling en veroorzaakte dan wel een flinke corticosteronverhoging. De MR antagonist spironolactone veroorzaakte een kleine, maar significante verhoging van corticosteron onder basale condities, 8 en 24 uur na toediening. Maar ook na de derde maternale separatie van 8 uur werd een kleine verhoging van corticosteron gezien. De MR antagonist verlaagde juist de corticosteronniveaus, wanneer de pups voor de eerste keer 8 uur werden gescheiden van hun moeder. Tijdens een novelty stressor zorgde een korte blootstelling aan antagonist voor een sterk verhoogde corticosteronrespons, zowel in dieren die een eerste of derde maternale separatie meemaakten. De GR antagonist was ineffectief onder die omstandigheden.

Concluderend ligt een verhoogde glucocorticoïdterugkoppeling dus niet ten grondslag aan de desensitisatie van de HHB as respons op herhaalde maternale separaties en ondersteunen deze resultaten een rol voor de GR in het handhaven van de SHRP. Uit de resultaten blijkt ook de aanwezigheid van een MR-responsief mechanisme, dat de HHB as in toom houdt onder basale, stressvolle en maternale separatie condities tijdens de SHRP. De huidige uitkomsten impliceren dus een MR-responsieve centrale PVN input die de hypofyse-bijnier respons op herhaalde maternale separaties beëindigd, maar die tegelijkertijd de neuroendocriene responsiviteit voor een novelty stressor in stand houdt.

In het tweede deel van dit proefschrift werden de lange termijn effecten van een enkele maternale deprivatie van 24 uur onderzocht. In **Hoofdstuk 4** is beschreven dat 6 maanden oude CD1 muizen, die als pup blootgesteld waren aan maternale deprivatie op postnatale dag 8, veranderde cognitieve prestaties laten zien in een ruimtelijke leertaak, de zogenaamde water maze. Dit is een waterbad met een net onder het wateroppervlak verborgen platform als ontsnappingsmogelijkheid. Eén enkele maternale deprivatie zorgde ervoor, dat deze muizen minder goed met een verplaatsing van het platform naar een andere positie in het waterbad konden omgaan (reversal learning) dan muizen uit de controlegroep. Dit geeft aan, dat deze muizen door de maternale deprivatie minder flexibel gedrag vertonen in een verander(en)de omgeving. Echter, het aanleren van een platformpositie en het onthouden van deze positie (lange termijn geheugen) waren niet aangetast. Ook bleef de HHB respons op een novelty stressor onveranderd. Dit impliceert, dat de lange termijn effecten van een enkele maternale deprivatie in muizen zeer subtiel zijn. Deze gegevens ondersteunen de hypothese dat, zoals dat bij ratten het geval is, de lange termijn effecten afhangen van de leeftijd, dus het moment waarop de maternale deprivatie plaatsvindt, en van de leeftijd waarop de effecten onderzocht worden.

In het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 5** werden de effecten van maternale deprivatie op verschillende dagen tijdens de SHRP in vroegvolwassen muizen, ‘pubers’ op postnatale dag 28, vergeleken om meer inzicht te krijgen in de lange termijn effecten beschreven in **Hoofdstuk 4**. Maternale deprivatie op verschillende dagen veroorzaakte inderdaad lange termijn effecten op markers van de HHB as, zowel onder basale condities als in reactie op milde stressoren, maar

alleen wanneer de deprivatie plaats had gevonden tijdens de SHRP. Maternale deprivatie vroeg in de SHRP (postnatale dag 3) zorgde op postnatale dag 28 voor een verlengde corticosteronrespons op stress en een verminderde basale GR mRNA expressie in het CA1 gebied van de hippocampus, terwijl op een latere leeftijd (postnatale dag 8) maternale deprivatie alleen maar een verhoogde ACTH-respons tot gevolg had. Opmerkelijk was, dat een extra deprivatieperiode (postnatale dagen 3 en 8) de effecten van de eerste deprivatieperiode (postnatale dag 3) beïnvloedde. Onder deze condities werden hoge ACTH concentraties gemeten, maar geen afwijkende corticosteronrespons. Deze resultaten geven nogmaals het belang aan van de leeftijd, en dus van het ontwikkelingsstadium van de hersenen en van de HHB as, waarop de deprivatie plaatsvindt. Het gevolg van een maternale deprivatie hangt dus af van de leeftijd van de pup, en ook van de aard, duur en frequentie van de stressvolle ervaring vroeg in het leven.

De HHB ontwikkeling gedurende de SHRP na maternale deprivatie op postnatale dag 3 is beschreven in **Hoofdstuk 6** met als hypothese dat deze ontwikkeling van postnatale dag 4 tot en met 13 veranderd zou zijn. De directe effecten waren deels vergelijkbaar met de veranderingen die beschreven zijn voor maternale deprivatie op postnatale dag 8; dit houdt een verhoogde basale en stressgeïnduceerde ACTH- en corticosteronrespons in, evenals een vermindering van CRH en GR mRNA in de PVN. Er werden nu echter geen directe effecten op MR (in alle subvelden) en GR mRNA (CA1 subveld) expressie in de hippocampus gezien. Wanneer echter op de opeenvolgende dagen gemeten werd, dan bleek de toename van GR mRNA, die normaal gezien wordt tijdens de ontwikkeling, vertraagd te zijn. Eén dag nadat de pups weer herenigd waren met hun moeder leek de SHRP weer (opnieuw) ingesteld te zijn. Blootstelling aan een novelty stressor kon de HHB as in gedepriveerde pups dan niet meer activeren. Bovendien werd een onderdrukking van basaal ACTH en corticosteron gezien voor de drie dagen na de hereniging met de moeder tot niveaus lager dan die gemeten in controle dieren. Maternale deprivatie had geen invloed op de duur van de SHRP, die in beide gevallen na ongeveer 12 dagen ten einde was. Bovendien stelden de directe effecten op centrale HHB markers zich weer geleidelijk in. De terugkeer van de markers naar controleniveaus was echter verschillend voor de markers onderling. GR mRNA expressie in de PVN was slechts één dag verminderd. Dit in tegenstelling tot CRH mRNA expressie in de PVN. Deze was twee dagen verminderd, vervolgens verhoogd op postnatale dag 7, waarna de niveaus langzaam weer afnamen tot het controleniveau. Concluderend heeft maternale deprivatie vroeg in de SHRP dus geen invloed op de duur van de SHRP en zijn de deprivatie-effecten op de HHB as markers tijdelijk van aard.

In **Hoofdstuk 7** worden alle resultaten in een breder perspectief besproken. In **Figuur 7.1** zijn schematisch de HHB veranderingen weergegeven in de pasgeboren muis na een éénmalige separatie of na herhaalde 8 uur separaties van de moeder. De pups kunnen zich snel aanpassen aan de afwezigheid van de moeder. Dit kan zijn omdat ze na één ervaring haar terugkeer al kunnen voorspellen, maar intussen blijft het HHB systeem wel op een novelty stressor reageren. Voorts geeft een enkele episode van 24 uur maternale deprivatie een aanzienlijke variatie in zowel

de onmiddellijke als de lange termijn effecten. Deze effecten blijken afhankelijk te zijn van de omgeving, de ontwikkelingsfase van het brein, de genetische achtergrond en tenslotte de leeftijd waarop het individu getest wordt.

Conclusies:

De HHB as van een CD1 muizenpup past zich snel aan aan herhaalde dagelijkse maternale separaties van 8 uur, maar blijft wel zeer responsief op blootstelling aan een nieuwe omgeving reageren. De snelle aanpassing van de pup is niet het gevolg van een aangepaste energiehuishouding door het ontbreken van voedsel of door een verhoogde negatieve terugkoppeling, maar lijkt eerder verband te houden met cognitieve processen, die de pup op deze jonge leeftijd al in staat stellen te voorspellen dat de moeder toch wel weer terugkomt. Deze observaties geven dus goed de indrukwekkende plasticiteit van de ontwikkelende hersenen weer.

Na een enkele maternale deprivatie van 24 uur op postnatale dag 3 zijn de HHB parameters slechts tijdelijke verstoord. Op de langere termijn worden echter wel subtiele veranderingen waargenomen in cognitieve taken en HHB activiteit, die afhankelijk zijn van de leeftijd en de genetische achtergrond van de pup, alsmede van de duur en frequentie van de vroege levenservaring.

